

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

Pâmella Karina Santana Frühauf Perez

**O EFEITO NEUROPROTETOR DA ESPERMINA EM CONDIÇÕES DE
INFLAMAÇÃO OCORRE VIA BDNF, ATIVAÇÃO DO RECEPTOR
TrkB, CREB E ALTERAÇÃO NA NEUROGÊNESE**

Tese de Doutorado

Santa Maria, RS
2019

Pâmella Karina Santana Frühauf Perez

**O EFEITO NEUROPROTETOR DA ESPERMINA EM CONDIÇÕES DE
INFLAMAÇÃO OCORRE VIA BDNF, ATIVAÇÃO DO RECEPTOR
TrkB, CREB E ALTERAÇÃO NA NEUROGÊNESE**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia,
da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,
RS), como requisito para obtenção do grau de
Doutora em Farmacologia

Orientador: Prof^a Dr^a. Maribel Antonello Rubin

Santa Maria, RS
2019

Pâmella Karina Santana Frühauf Perez

O EFEITO NEUROPROTETOR DA ESPERMINA EM CONDIÇÕES DE INFLAMAÇÃO OCORRE VIA BDNF, ATIVAÇÃO DO RECEPTOR TrkB, CREB E ALTERAÇÃO NA NEUROGÊNESE

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito para obtenção do grau de **Doutora em Farmacologia**

Aprovado em 11 de Junho de 2019:

Maribel Antonello Rubin, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Cristiane Regina Guerino Furini, Dra. (PUCRS)

Denis Broock Rosemberg Dr. (UFSM)

Mauro Schneider Oliveira, Dr. (UFSM)

Nadja Schröder, Dra. (UFRGS)

Santa Maria, RS
2019

AGRADECIMENTOS

Gratidão à Deus, Pai e Mãe Universal, pela oportunidade de, em meu livre arbítrio, experienciar a ciência, a busca pelo conhecimento e aprimoramento não apenas intelectual e pessoal como também espiritual. Afinal, quanto mais adentrei nos mistérios da ciência, mais me curvei diante da grandeza e inteligência Superior e Divina;

Agradeço a todos os homens e mulheres cientistas, que desde os primórdios da humanidade dedicaram as suas vidas às descobertas e evolução do que hoje chamamos de ciência. Obrigada por vossa coragem, intuição e conhecimento, sem o trabalho dos senhores e senhoras de ontem, o de hoje não seria possível;

Gratidão à professora Dra. Maribel Rubin, por esses anos de orientação, paciência e amizade. Obrigada por abrir as portas da pesquisa e da ciência para mim, e mais ainda, por permitir que eu trilhasse ao seu lado esse caminho até aqui. Gratidão pelo empenho e acolhida;

Gratidão ao professor Dr. Carlos Mello, por instigar a curiosidade em mim, por me ensinar a desconstruir velhos conceitos e ousar buscar novas perguntas. Eu agradeço pelos ensinamentos que me trouxe, que irão comigo para muito além da vida acadêmica;

Agradeço ao meu esposo Cezar, por tornar todos esses anos mais leves, doces e felizes, porque concomitante ao doutorado, construímos a nossa família. O teu amor me ensina e me fortalece. Obrigada por me ensinar a ver as situações muito além do que parecem;

Agradeço a minha Mãe Norma e ao meu Pai Luiz Paulo, a raiz da vontade e da oportunidade em trilhar esse caminho. Obrigada por regarem a minha infância com livros, incentivos e liberdade de escolha;

Agradeço as minhas irmãs e sobrinhos pelo apoio, carinho e alegria de sempre;

Gratidão aos meus estimados colegas do LABNEURO pela companhia, pela amizade e pelo apoio;

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

"Não há nenhum bem ou mal em si, como não há nem 'elixir da vida' nem 'elixir da morte', nem veneno em si. Tudo está contido na única e mesma essência universal, dependendo os resultados do grau de sua diferenciação e de suas várias correlações. O seu lado de luz produz vida, saúde, bem-aventurança, paz divina, etc.; o lado de trevas traz morte, doenças, tristezas e conflitos."

(Helena Petrovna Blavatsky)

“O mistério do Universo
É viver para aprender”

(dAMARu)

RESUMO

O EFEITO NEUROPROTETOR DA ESPERMINA EM CONDIÇÕES DE INFLAMAÇÃO OCORRE VIA BDNF, ATIVAÇÃO DO RECEPTOR TrkB, CREB E ALTERAÇÃO NA NEUROGÊNESE

AUTORA: Pâmella Karina Santana Frühauf Perez

ORIENTADORA: Maribel Antonello Rubin

É bem descrito que o lipopolissacarídeo (LPS) promove a neuroinflamação e piora a memória e a neurogênese. A espermina, uma poliamina natural no sistema nervoso central, protege contra os déficits de memória induzido por LPS por um mecanismo que envolve a subunidade GluN2B do receptor NMDA. Porém não se sabe quais mecanismos pós-receptor NMDA estão envolvidos nesse efeito. Portanto, o objetivo do presente estudo foi determinar se o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), o receptor de tropomiosina cinase B (TrkB) e a proteína ligante do elemento responsivo ao cAMP (CREB) estão envolvidos no efeito protetor da espermina sobre o déficit de memória induzido por LPS. Outro objetivo é investigar os efeitos da espermina em condições de neuroinflamação sobre a proliferação e diferenciação das células tronco neurais e níveis de BDNF *in vitro*. Camundongos Swiss machos adultos receberam, imediatamente após o treino na tarefa de reconhecimento de objetos, solução salina ou LPS (250 µg/kg, i.p.); 5 min mais tarde receberam salina ou espermina (0,3 mg/kg, i.p.) e, quando especificado, 5 min depois solução salina ou o antagonista do receptor TrkB, ANA-12 (0,5 mg/kg, i.p.). Os animais foram testados 24 h após o treino. Em outro grupo de animais, determinou-se a imunorreatividade de BDNF, CREB e fosfo-CREB no hipocampo e no córtex cerebral 4 h após a injeção de espermina. Para os estudos *in vitro*, as células tronco neurais foram tratadas com LPS (100 nM) e/ou espermina (1-100 nM) analisando-se a migração celular (24 h de diferenciação neural), neuritogênese (3 dias de diferenciação neural), diferenciação neural (neurogênese e gliogênese – 7 dias de diferenciação neural), bem como os níveis de BDNF. A espermina protegeu do déficit de memória induzido por LPS e esse efeito protetor foi bloqueado pelo ANA-12. A espermina reverteu a diminuição dos níveis de BDNF maduro induzido por LPS, tanto no córtex cerebral, quanto no hipocampo. Além disso, a espermina aumentou a fosfo-CREB e a razão fosfo-CREB/CREB-total no córtex cerebral em camundongos tratados com LPS. Aliado a isso, os experimentos *in vitro* demonstraram que a espermina aumentou a migração celular, bem como o número e o comprimento dos neuritos; preveniu os danos sobre a neurogênese, e o aumento da gliogênese induzidos por LPS. Ainda a espermina preveniu a diminuição dos níveis de BDNF induzida por neuroinflamação em células tronco neurais. Portanto os resultados deste trabalho indicam que o efeito protetor da espermina sobre a memória em condições de neuroinflamação depende da ativação do receptor TrkB e é acompanhado pela restauração dos níveis de BDNF maduro no hipocampo e no córtex cerebral, bem como o aumento da fosforilação da CREB no córtex cerebral. Além disso, a espermina pode restabelecer o equilíbrio entre a neurogênese e a gliogênese, possivelmente por recuperar os níveis de BDNF em um processo inflamatório, o que representa uma nova perspectiva para a neuro-restauração.

Palavras chave: Poliaminas; receptor NMDA; ANA-12; neuroinflamação; tarefa de reconhecimento de objetos; BDNF; neurogênese.

ABSTRACT

THE NEUROPROTECTIVE EFFECT OF SPERMINE IN INFLAMMATION CONDITIONS OCCURS VIA BDNF, TrkB ACTIVATION, CREB AND ALTERATION IN NEUROGENESIS

AUTHOR: Pâmella Karina Santana Frühauf Perez

ADVISOR: Maribel Antonello Rubin

Lipopolysaccharide (LPS) has been long known to promote neuroinflammation and disrupting memory pathway and neurogenesis. Since spermine, one of the main natural polyamines in the central nervous system, protects from LPS induced memory deficit by a mechanism that comprises GluN2B receptors, the aim of the present study was to determine whether brain-derived neurotrophic factor (BDNF), tropomyosin-related kinase B (TrkB) receptor and cAMP response element binding (CREB), are involved in this protective effect of spermine. Furthermore, we also investigated the effect of spermine on neuroinflammation conditions on proliferation and differentiation of neural stem cells (NSCs) and BDNF levels *in vitro*. Adult male Swiss albino mice received, immediately after training in the novel object recognition task, saline or LPS (250 µg/kg, i.p.); 5 min later they received saline or spermine (0.3 mg/kg, i.p.) and, when specified, 5 min thereafter saline or the TrkB receptor antagonist ANA-12 (0.5 mg/kg, i.p.) in different flanks. Animals were tested 24 h after training. Spermine protected from LPS-induced memory deficit and this protective effect was reversed by ANA-12. In a subset of animals BDNF, CREB and phospho-CREB immunoreactivity was determined in the hippocampi and cerebral cortex 4 h after spermine injection. For *in vitro* studies, NPCs were treated with LPS (100 nM) and / or spermine (1-100 nM) for analysis of cellular migration (24 h of neural differentiation) neuritogenesis (3 days of neural differentiation), as well as, neurogenesis, gliogenesis and BDNF levels (7 days of neural differentiation). ANA-12 reversed the protective effect of spermine on LPS-induced memory deficit. Spermine reversed the decrease of mature BDNF levels induced by LPS in both hippocampus and cerebral cortex. Moreover, spermine increased the phospho-CREB and phospho-CREB/total-CREB ratio expression in cerebral cortex of LPS-treated mice. In addition, *in vitro* experiments demonstrated that spermine increased cell migration and the number and length of neurites and prevented LPS-induced impairment of neuritogenesis. Moreover, spermine prevented LPS-induced decrease of neuronal differentiation of NSCs and prevented LPS-induced gliogenesis. Spermine also reversed the decrease of BDNF levels induced by neuroinflammation in NSCs. Collectively, the results support that the protective effect of spermine on LPS-induced memory deficits depends on TrkB receptor activation and is accompanied by restoration of mature BDNF levels in hippocampus and cerebral cortex, as well as increased CREB phosphorylation in the cerebral cortex. Moreover, spermine may restore the balance between neurogenesis and gliogenesis possibly by recovering BDNF levels in an inflammatory process, which represents a new perspective for neuro-restoration.

Keywords: Polyamines; NMDA receptor; ANA-12; Neuroinflammation; Object Recognition Task; BDNF; Neurogenesis

LISTA DE FIGURAS

Introdução:

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Representação esquemática da ativação do receptor TrkB pelo BDNF..... | 18 |
| Figura 2: Regulação transcricional por CREB..... | 21 |
| Figura 3: Hipótese neurogênica para o papel do CREB na regulação da memória..... | 22 |
| Figura 4: Estrutura Química das poliaminas..... | 30 |
| Figura 5: Sítios de modulação alostérica no receptor NMDA..... | 31 |
| Figura 6: Ativação da cascata AMPc/PKA/CREB pelas poliaminas | 34 |

Resultados:

Manuscript 1

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1: Effect of ANA-12 (ANA) on the recognition index (%) of mice treated with lipopolysaccharide (LPS) and spermine (SPM)..... | 40 |
| Figure 2: Effect of lipopolysaccharide (LPS) and spermine (SPM) on the levels of total BDNF and mature BDNF in the hippocampus (A, B) and cerebral cortex (C, D). | 41 |
| Figure 3 Effect of lipopolysaccharide (LPS) and spermine (SPM) on total CREB (A) and phosphoCREB (B) immunoreactivity, and phosphoCREB/total CREB ratio (C) in the hippocampus and cerebral cortex. | 42 |

Manuscript 2

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Graphical Abstract | 47 |
| Figure 1: Representative in vitro formation, migration and differentiation of neural stem cells (NSCs) | 52 |
| Figure 2: Spermine increased neural migration..... | 55 |
| Figure 3: Spermine prevented LPS-induced impairment of NSCs migration..... | 56 |
| Figure 4: Spermine prevented LPS-induced impairment of neurite outgrowth..... | 57 |
| Figure 5: Spermine prevented LPS-induced BDNF decrease in NSCs..... | 58 |
| Figure 6: Spermine prevented LPS-induced decrease of neuronal differentiation of NSCs..... | 59 |
| Figure 7: Spermine prevented LPS-induced gliogenesis..... | 61 |

Discussão

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 7. Esquema do mecanismo molecular da Espermina sobre a memória e neurogênese..... | 72 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMPA - Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (do inglês *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*)
- ANA-12 – Antagonista do receptor TrkB
- BDNF- Fator neurotrófico derivado do encéfalo (do inglês *brain-derived neurotrophic factor*)
- BHE - barreira hematoencefálica
- BO – Bulbo olfatório
- CamKII – Calcio calmodulina cinase II (do inglês *Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II*)
- CREB - Proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc (do inglês *cyclic amp-response element binding protein*)
- CTNs – Células tronco neurais
- DA – Doença de Alzheimer
- DFMO - Difluorometilornitina
- DP – Doença de Parkinson
- FC – Fator de crescimento
- FCE – Fator de crescimento epidérmico
- GD – Giro denteado
- i.p. – Intraperitoneal
- INOs Óxido nítrico-sintase (do inglês *inducible nitric oxide synthase*)
- LPS – Lipopolissacarídeo
- LTP – Potenciação de longa duração (do inglês *Long Term Potentiation*)
- MAPK - Proteína cinase ativada por mitógenos (do inglês *mitogen-activated protein kinase*)
- MCD – Memória de curta duração
- MLD – Memória de longa duração
- NFκB - Fator de transcrição nuclear kappa B (do inglês *nuclear factor kappa B*)
- NHA – Neurogênese hipocampal adulta
- NMDA - N-Metil-D-Aspartato
- NO - Óxido nítrico (do inglês, *nitric oxide*)
- NTD - Domínio N-terminal (do inglês *N-terminal domain*)
- ODC - Ornitina descarboxilase
- p75 NTR – Receptores de neurotrofinas p75
- PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos (do inglês *Pathogen-associated molecular pattern*)
- PI3K- Fosfatidilinositol 3 cinase (do inglês *phosphatidylinositol 3-kinase*)
- PKA - Proteína cinase dependente de AMPc (do inglês *protein kinase A*)
- PKC - Proteína cinase dependente de cálcio (do inglês *protein kinase C*)
- SNC – Sistema nervoso central
- TLR4- Receptor *Toll Like 4*
- t-PA - Ativador de plasminogênio tecidual (do inglês *tissue plasminogen activator*)
- TrkB – Receptor de tropomiosina cinase B (do inglês *tropomyosin--related kinase B*)

SUMÁRIO

| | |
|----------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 11 |
| 1.1 MEMÓRIA..... | 11 |
| 1.2 TAREFA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS..... | 13 |
| 1.3 HIPOCAMPO, CORTEX CEREBRAL E MEMÓRIA..... | 14 |
| 1.4 BDNF..... | 16 |
| 1.4.1 Receptores para BDNF..... | 14 |
| 1.4.2 Efeitos do BDNF..... | 19 |
| 1.5 CREB..... | 20 |
| 1.6 CÉLULAS TRONCO NEURAIS E NEUROGÊNESE..... | 22 |
| 1.7 NEUROINFLAMAÇÃO..... | 25 |
| 1.7.1 Comunicação entre sistema nervoso central e sistema imune..... | 25 |
| 1.7.2 Lipopolissacarídeo, neuroinflamação e memória..... | 26 |
| 1.8 POLIAMINAS..... | 29 |
| 1.8.1 Alvos celulares para as Poliaminas..... | 30 |
| 1.9 RECEPTOR NMDA, POLIAMINAS E MEMÓRIA..... | 30 |
| 1.10 JUSTIFICATIVA..... | 34 |
| 2. OBJETIVOS | 35 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL..... | 35 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 35 |
| 3. METODOLOGIA E RESULTADOS | 36 |
| 3.1 ARTIGO I..... | 37 |
| 3.2 ARTIGO II..... | 46 |
| 4. DISCUSSÃO | 69 |
| 5. CONCLUSÕES | 74 |
| 6. PERSPECTIVAS | 75 |
| 7. REFERÊNCIAS | 76 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 MEMÓRIA

A aprendizagem e a memória são processos psíquicos infinitamente fascinantes que abordam uma das características fundamentais da atividade humana: a capacidade de adquirir novas ideias a partir das experiências e formar arquivos de memórias que poderão ser acessados e lembrados ao longo do tempo (Kandel, 2001). Conforme Noberto Bobbio “somos aquilo que lembramos”, não podemos executar tarefas que não sabemos, nem mesmo comunicar fatos que desconhecemos. E Ivan Izquierdo (2018) acrescenta: “Somos aquilo que lembramos e também somos o que decidimos esquecer”. Embora o esquecimento esteja muito relacionado com as anormalidades das funções mnemônicas, esquecer também desempenha um papel fundamental na prevenção da sobrecarga dos sistemas cerebrais dedicados as memórias (MCGAUGH, 2000, 2015).

O processamento dos diferentes tipos de memórias baseia-se necessariamente no tripé: aquisição, consolidação/armazenamento e evocação de informações (IZQUIERDO, 2018; IZQUIERDO & MEDINA, 1997). Para o processamento de uma nova memória é necessário que inicialmente ocorra o aprendizado, o qual consiste na aquisição de novas informações. Em seguida, essas informações recém adquiridas (traço mneumônico instável) são gradualmente transformadas em traços ou arquivos estáveis, num processo denominado de consolidação/armazenamento das memórias (NADEL *et al.*, 2012). O armazenamento é um processo dinâmico que depende da estabilização de uma rede neuronal (MEDINA *et al.*, 2008). Durante este processo de estabilização, as memórias de longa duração (MLD) necessitam de síntese proteica e de expressão gênica em áreas específicas do encéfalo (NADEL *et al.*, 2012).

Por fim, o processamento das memórias passa por uma fase denominada de evocação (recordação ou lembrança) de conceitos, vivências, fatos, sensações ou pensamentos que foram inicialmente adquiridos. Desta forma, só conseguimos recordar as informações que realmente foram aprendidas (IZQUIERDO, 2018, IZQUIERDO & MEDINA, 1997).

As memórias podem ser classificadas de acordo com o tempo que duram: memórias de curta duração (MCD): duram de minutos a poucas horas (1-6 h), e memórias de longa duração (MLD): persistem por 24-48 h, vários dias, semanas (BARCO *et al.*, 2006), meses ou anos (memória remota) (BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007; IZQUIERDO, 2018). Apesar da MCD e MLD serem processos paralelos e compartilharem os mesmos substratos neuroanatômicos (região CA1 do hipocampo, córtex entorrinal e parietal), elas são independentes, ou seja, possuem mecanismos neuroquímicos e/ou eletrofisiológicos diferentes (IZQUIERDO, 2018; IZQUIERDO & MEDINA, 1997). As MLD não são adquiridas imediatamente em sua forma definitiva. Durante os primeiros minutos ou horas após sua aquisição, são inicialmente lábeis e suscetíveis à interferência de outras memórias, substâncias ou tratamentos (ALBERINI & KANDEL, 2014; BAILEY *et al.*, 1996; DUDAI, 2012; McGAUGH & IZQUIERDO & MCGAUGH, 2000). A administração de inibidores de síntese proteica, como a anisomicina, pode impedir a fixação de memórias nas primeiras horas depois da aquisição (IZQUIERDO, 2018). A MLD através de um processo de estabilização, torna-se resistente à interrupção, seja por manipulação farmacológica ou interferências moleculares (ALBERINI & KANDEL, 2014). Portanto, a consolidação da MLD requer a síntese de novas proteínas, transcrição gênica e crescimento de novas conexões sinápticas (FIORITI *et al.*, 2015; BAILEY *et al.*, 2015; IZQUIERDO, 2018). Por outro lado, a MCD não envolve a ativação gênica e a síntese de proteínas, mas depende da ativação de diversas vias envolvendo cinases, tais como: proteína cinase dependente de AMPc (PKA), proteína cinase dependente de cálcio (PKC), e proteína cinase dependente de sinais extracelulares (ERK) (IZQUIERDO, 2018).

De acordo com seu conteúdo, as memórias são classificadas em memórias declarativas (explícitas) e memórias não declarativas (implícitas). As memórias declarativas são controladas fundamentalmente pelo hipocampo e suas conexões. Consistem em registrar fatos, eventos e conhecimentos gerais que são adquiridos com plena intervenção da consciência (verbalizadas). No entanto, são memórias facilmente esquecidas (IZQUIERDO, 2018). As memórias declarativas são subdivididas em: 1) memórias episódicas: que consistem em eventos que assistimos ou participamos (assistir a filmes, data da formatura) e 2) memórias semânticas: baseiam-se em conhecimentos gerais (matemática, medicina, perfume das flores) (IZQUIERDO, 2011). Neste contexto, os experimentos realizados com animais de

laboratório abrangem em geral, quase exclusivamente, memórias declarativas episódicas (reconhecer um evento em um determinado contexto) (IZQUIERDO, 2011, IZQUIERDO & MEDINA, 2002).

Por outro lado, as memórias não declarativas ou implícitas, são controladas fundamentalmente pelo núcleo caudado e o cerebelo. Referem-se àquelas memórias de procedimentos ou habilidades que são adquiridas através de prática e repetições (andar de bicicleta, tocar piano, soletrar), persistem por um longo tempo e dificilmente são esquecidas ou extintas. Entretanto, não conseguimos verbalizar e não envolvem evocação consciente, ou seja, é difícil “declarar” que possuímos tais memórias, para demonstrar que as temos, devemos de fato andar de bicicleta, tocar piano, soletrar (IZQUIERDO & MEDINA, 2002; QUILIFELDT, 2010).

1.2 TAREFA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS

A memória de reconhecimento se refere a habilidade para identificar um objeto ou uma situação e julgar se já foi previamente experienciada ou não. (BROWN *et al.*, 2010; WARBURTON, 2010). A tarefa de reconhecimento de objetos é um teste comportamental que se baseia na tendência natural de roedores de explorar mais um objeto novo em detrimento de um familiar em um contexto conhecido e, que possibilita investigar os mecanismos envolvidos no processamento de memórias declarativas. Essa preferência incondicionada por objetos novos é considerada como um indicativo de que a representação de um objeto familiar existe na memória (ENNACEUR, 2010). Nesse paradigma de aprendizagem, a diferença na exploração entre um objeto previamente conhecido e um objeto novo é dada como um índice de desempenho de memória (MAZARATI *et al.*, 2011).

De fato, dificuldade em reconhecer itens conhecidos ou discriminá-los de um novo é um dos primeiros sintomas do declínio cognitivo na doença de Alzheimer (FURINI *et al.*, 2010; BUDSON *et al.*, 2005; DUDAS *et al.*, 2005; LAATU *et al.*, 2003; LEE, *et al.*, 2003). Por estas e outras razões, paradigmas de aprendizagem baseados no reconhecimento de objeto são fundamentais para a neurobiologia da memória declarativa (WINTERS *et al.*, 2008).

Em contraste com a maioria dos paradigmas de memória e aprendizado classicamente usados que requerem longos períodos de treinamento do animal, a tarefa de reconhecimento de objetos oferece a possibilidade de se obter a informação rápida, além de não requerer a exposição a um estímulo aversivo e nem restrição hídrica ou alimentar. Esta tarefa tem sido utilizada para avaliar o efeito das poliaminas sobre a memória em diversos modelos experimentais: modelo da doença de Huntington (VELLOSO, *et al.*, 2009); modelo de trauma cerebral (YAKA *et al.*, 2007); animais com sobrecarga de ferro no cérebro (SCHRODER *et al.*, 2013); modelos de neuroinflamação induzido por LPS (MIWA *et al.*, 2011).

1.3 HIPOCAMPO, CÓRTEX CEREBRAL E MEMÓRIA

Já é bem descrito que o hipocampo é a estrutura cerebral essencial para a consolidação da memória, uma vez que esta estrutura possui uma função crítica para a memória associativa, episódica e espacial (WHITLOCK *et al.*, 2006). Ao contrário do que se possa pensar, o hipocampo não é o sítio onde os engramas da memória ficam armazenados, mas é este o principal coordenador do processo de consolidação da memória (IZQUIERDO *et al.*, 2000). Associado ao lobo temporal medial faz conexões com amplas áreas corticais associativas (pré-frontal, parietal e as demais áreas anteriores e posteriores do lobo temporal) onde a memória de longo prazo fica armazenada. Além disso, o hipocampo faz conexões com o diencéfalo (corpos mamilares hipotalâmicas e núcleos anteriores do tálamo) que também participa do processo de consolidação (CORIA-LUCERO, 2016). Por isso, é considerado uma zona de convergência neuroanatômica para informações sensoriais altamente processadas sobre qualidades de objetos e contextos e, portanto, serve como um centro para apoiar vinculação de informações em memórias associativas (WANG *et al.*, 2014, ROLLS *et al.*, 2017).

A região CA3 do hipocampo desempenha uma função crucial na recuperação de memórias completas com base em conjuntos incompletos de sugestões (NAKAZAWA *et al.*, 2003). Isso se explica devido ao fato de essa região possuir uma vasta conectividade neuronal com áreas cerebrais essenciais ao armazenamento da memória (córtex entorrinal, por exemplo). Na região CA3, as células piramidais as quais projetam-se para a região CA1 via células de Schäffer recebem estímulos

excitatórios de três fontes: células granulares do giro denteado, células estreladas das camadas superficiais do córtex entorrinal, e das próprias células piramidais da região CA3. No momento da aprendizagem, o hipocampo age como um codificador de memórias, distribuindo códigos para permitir associações rápidas entre uma unidade e outra, localização de um objeto ou recompensa e para fornecer recuperação da memória a partir de uma parte (ROLLS *et al.*, 2018).

O córtex cerebral tem um papel central na memória de trabalho, operacional, utilizando componentes visuo-espacial, ainda, possui função essencial no armazenamento de memórias de longa duração (IZQUIERDO *et al.*, 1997). Especificamente o córtex (íntero-temporal e pré-frontal) relaciona-se à percepção de objetos (VANN *et al.*, 2011; BANKS *et al.*, 2012) onde ficam armazenados arquivos icônicos de longa duração (BANKS *et al.*, 2012). Tem sido demonstrado ainda que a síntese de proteínas dentro do córtex insular é necessária para a consolidação da memória de reconhecimento (DE LA CRUZ *et al.*, 2008). De fato, um estudo utilizando a anisomicina (bloqueador de síntese de proteínas) infundida no córtex insular e perirrinal na tarefa de reconhecimento de objetos, bloqueia a memória de longa duração, mas não a de curta duração (BALDERAS *et al.*, 2008). Ademais, lesões no córtex parietal ou temporal são acompanhadas de uma perda de tipos de memória circunscrita como, por exemplo, a de nomes de pessoas, lugares ou objetos (HUIJBERS *et al.*, 2012).

Os estudos citados sugerem que o hipocampo e o córtex cerebral integram uma rede funcional cooperativa envolvida no processamento da codificação mnemônica. Com essas ideias em mente, uma hipótese sugere que o hipocampo age direcionando informações que seriam necessárias para a consolidação nas conexões neocorticais (LAROCHE *et al.*, 2000). De fato, o córtex pré-frontal em roedores, recebe projeções neuronais diretas da região CA1 e subículo do hipocampo (CHURCHWELL *et al.*, 2010). Ainda, lesões no córtex pré-frontal, alteram a atividade neuronal no hipocampo, comprovando uma importante relação entre essas duas estruturas (KENTROS *et al.*, 2004; KYD *et al.*, 2003; ROWLAND *et al.*, 2008).

Convergente a isso, é conhecido que, a deterioração gradual nas funções cognitivas em animais idosos está associada a alterações tanto hipocampais quanto corticais nesses animais (HEDDEN & GABRIELI, 2004). Em doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, as áreas do encéfalo mais atingidas pela

neuroinflamação são o hipocampo e o córtex, aonde se detecta um aumento dos níveis de ativação da micróglia e maior liberação de citocinas inflamatórias como o TNF- α e IL-1 β (LEDO *et al.*, 2013).

1.4 BDNF

O fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) é o fator neurotrófico mais abundante no encéfalo, particularmente no hipocampo e no córtex cerebral (LIU, *et al.*, 2015). É um membro da família das neurotrofinas dos fatores de crescimento, sendo considerada a principal neurotrofina do encéfalo (ALBERINI & KANDEL, 2014). O BDNF é considerado uma molécula sinaptogênica, uma vez que aumenta a transmissão sináptica, facilita a plasticidade sináptica, e promove o crescimento sináptico no encéfalo em desenvolvimento e adulto (TANILA, 2016; COHEN-CORY *et al.*, 2010). O BDNF estimula e controla a neurogênese (FERREIRA *et al.*, 2018; ZIGOVA *et al.*, 1998), promovendo a migração (CHEN *et al.*, 2013; DICOU, 2009) diferenciação (CHEN *et al.*, 2013), maturação (WATERHOUSE *et al.*, 2012) e sobrevivência (HUANG & REICHARD, 2001) dos novos neurônios no sistema nervoso. Além disso, mostra um efeito neuroprotetor em condições adversas, como isquemia cerebral, hipóxia, hipoglicemia e neurotoxicidade (BATINA & DAS, 2015).

Uma vez que as neurotrofinas são sintetizadas em sua forma imatura, isto é pro-neurotrofinas, existem três caminhos pelos quais as neurotrofinas intracelulares podem seguir: clivagem intracelular seguida de secreção; secreção seguida de clivagem extracelular; ou secreção sem clivagem subsequente (PANG *et al.*, 2016; RODIER, *et al.*, 2014; MOWLA, *et al.*, 2001;). O BDNF é sintetizado como pré-pro-BDNF que é processado para pro-BDNF pela remoção do peptídeo sinal. O Pro-BDNF é então clivado em BDNF maduro dentro do retículo endoplasmático pela furina e/ou em vesículas secretoras pela proteína convertase 1; enquanto que extracelularmente, essa clivagem é obtida principalmente pelo ativador de plasminogênio tecidual (t-PA), através da ativação da plasmina (PANG *et al.*, 2016; NAGAPPAN *et al.*, 2009; LU *et al.*, 2005).

Diversos estudos estão relacionando o t-PA ao processamento extracelular do BDNF e seus efeitos positivos sobre a memória de longo prazo (PANG *et al.*, 2016;

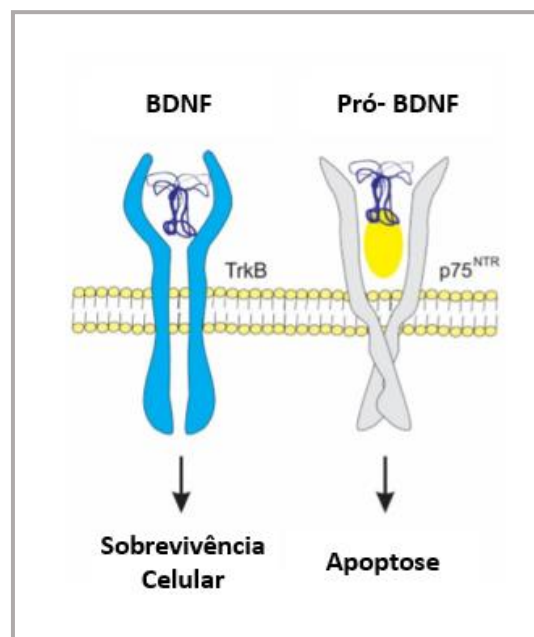
NAGAPPAN *et al.*, 2009; LU *et al.*, 2005). O estudo de Pang e colegas (2004), realizado com fatias hipocâmpais de camundongos, mostra que mesmo que pareçam independentes, existe uma relação sequencial entre t-PA, plasmina e BDNF maduro. Esse estudo fornece evidências que a protease extracelular t-PA cliva o plasminogênio para gerar plasmina, que por sua vez converte o precursor pro-BDNF em BDNF maduro (PANG *et al.*, 2004). Ainda, foi demonstrado que enquanto a depleção gênica do t-PA prejudica (PAWLAK, *et al.*, 2002; FREY *et al.*, 1996) a superexpressão gênica melhora o aprendizado e a memória (PAWLAK *et al.*, 2002; MADANI *et al.*, 1999), demonstrando, portanto, um papel chave do t-PA com as funções cognitivas e o processamento extracelular do BDNF (ZHANG *et al.*, 2018; ANGELUCCI *et al.*, 2018).

1.4.1 Receptores para BDNF

As funções das neurotrofinas resultam da ativação de distintos receptores de membrana: o receptor p75NTR (*p75 neurotrophin receptor*) e os receptores com atividade tirosina cinase (Trk, figura 1) (*tropomyosin-related kinases*) (YANG *et al.*, 2014; PENG *et al.*, 2005). Dentro da família dos receptores Trk, incluem-se os receptores TrkA, TrkB, e TrkC (LU *et al.*, 2005). Ao contrário do receptor p75NTR ao qual se ligam todas as neurotrofinas com baixa afinidade, os receptores da família Trk têm maior afinidade e são seletivos para as diferentes neurotrofinas, sendo TrkA o receptor de alta afinidade para o fator de crescimento de nervo, o TrkB para o BDNF e NT-4, TrkC para NT-3 (BATHINA & DAS, 2015; NAGAHARA *et al.*, 2009). As neurotrofinas quando estão na forma de pró-proteínas, se ligam exclusivamente ao receptor p75NTR (Figura 1). Os receptores Trk são receptores de tirosina cinases que se auto fosforilam em determinados resíduos de tirosina no seu domínio intracelular, após a ligação da neurotrofinas, tornando-se ativos (KAPLAN & MILLER, 2000). Esses receptores são ativados apenas pelas neurotrofinas maduras e não pelas pró-neurotrofinas (LEE *et al.*, 2001). A ativação do receptor de BDNF resulta na ativação de diferentes vias intracelulares, levando a plasticidade neural (PANG *et al.*, 2016), neurogênese (FERREIRA *et al.*, 2018), e sobrevivência celular (BAI *et al.*, 2019). Tem sido mostrado que a ativação dos receptores p75 e TrkB produzem efeitos opostos na estrutura neuronal e na plasticidade sináptica (TENG *et al.*, 2005; WOO, *et al.*, 2005). Yang e colaboradores (2014) mostraram que o pró-BDNF regula negativamente a transmissão e plasticidade sináptica bem como a remodelação neuronal. Enquanto é

bem conhecido que o BDNF maduro aumenta a sinaptogênese, a arborização dendrítica e a diferenciação neuronal (BUDNI *et al.*, 2015). Enquanto seu precursor, pró-BDNF, ao ativar o receptor p75, ativa vias de indução de apoptose (Figura 1), retração no crescimento dendrítico e ainda depressão sináptica (YANG *et al.*, 2009). As neurofinas regulam a sobrevivência, a proliferação celular, bem como o crescimento de axônios e dendritos através da ativação do receptor Trk. O receptor TrkB tem um domínio extracelular com muitos sítios de glicosilação, um único segmento transmembrana e um domínio intracelular caracterizado pela atividade Trk. Após a sua ativação uma série de pequenas proteínas G, incluindo Ras, bem como proteína cinase ativada por mitógenos (MAP cinase), fosfatidilinositol 3-cinases (PI3K), e fosfolipase-3- γ são reguladas (FANG *et al.*, 2003). A ativação do TrkB é rápida (cerca de 2 minutos), e sua desativação demora cerca de 30 minutos em roedores (FANG *et al.*, 2003).

Fig. 1- Representação esquemática da ativação do receptor TrkB pelo BDNF



Fonte: Adaptado de BUDNI, *et al.*, 2015.

1.4.2 Efeitos do BDNF

A expressão do BDNF é regulada pela atividade neuronal, uma vez que a ativação glutamatérgica aumenta a expressão do RNAm de BDNF em fatias de hipocampo de ratos (CALDEIRA *et al.*, 2007; ZAFRA *et al.*, 1990). O aumento da atividade sináptica induzida por agonista do receptor alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) produz uma elevação transitória nos níveis de RNAm de BDNF e TrkB em neurônios do hipocampo e no córtex de ratos (LAUTERBORN *et al.*, 2000). Estímulos elétricos que induzem potenciação de longa duração (LTP) no hipocampo aumentam a expressão do BDNF em fatias hipocámpais de ratos (PATTERSON *et al.*, 1992). Por outro lado, o bloqueio dos receptores de glutamato, ou a estimulação do sistema GABAérgico (ácido gama-aminobutírico) reduz os níveis de RNAm de BDNF no hipocampo (XU *et al.*, 2000; ZAFRA *et al.*, 1990). Consistente com essas observações, um estudo de Crozier e colaboradores (1999) mostrou que o bloqueio de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) contendo a subunidade GLUN2B previne o aumento do BDNF em neurônios hipocámpais (CROZIER *et al.*, 1999).

Existem evidências comprovando o papel do BDNF e TrkB na memória e na LTP, que é a base para o conhecimento mecanístico da memória. Animais com deleção gênica para o BDNF apresentam prejuízo de memória espacial e de extinção da memória (BEKINSCHTEIN *et al.*, 2014). Além disso, o tratamento com BDNF recombinante em fatias hipocámpais de animais “Knockout” para BDNF recupera a LTP e a transmissão sináptica basal (SCHILDT *et al.*, 2013; LINNARSSON *et al.*, 1997; PATTERSON *et al.*, 1996). Ainda, tem sido visto que o bloqueio da ligação do BDNF ao receptor TrkB reduz a resposta sináptica e a memória espacial (MINICHIELLO, 2009). Por outro lado, a superexpressão do receptor TrkB em camundongos, resulta em melhora na aprendizagem e memória nas tarefas de labirinto aquático de Morris e medo condicionamento contextual (KOPONEN *et al.*, 2004).

De acordo com estudos recentes, os efeitos positivos do BDNF sobre a memória e neuroproteção, parecem ter uma relação bidirecional com a proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc (CREB). A ativação do receptor TrkB pelo BDNF ativa a via PI3K/AKT culminando na fosforilação e aumento da atividade da CREB (BAI *et al.*, 2019). Por outro lado, os níveis de BDNF são aumentados após ativação da CREB sendo a via CREB/BDNF essencial para a formação da memória

de longa duração e reparação neuronal (ALBERINE & KANDEL 2014; ORTEGA-MARTINEZ *et al.* 2015; BEKINSCHTEIN *et al.*, 2014; BEKINSCHTEIN *et al.*, 2008).

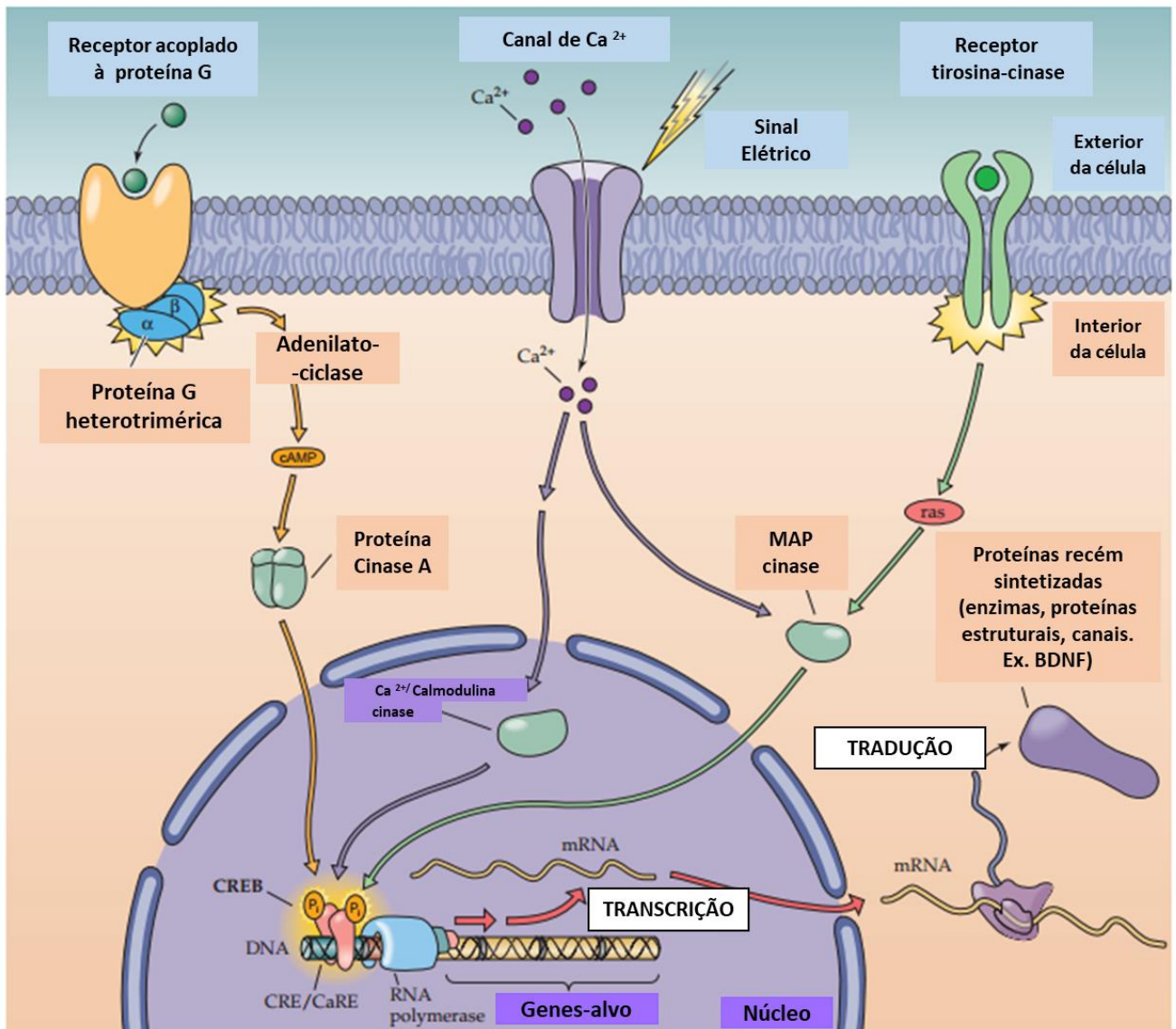
1.5 CREB

A proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc (CREB) é membro de uma família de proteínas que atua como fator de transcrição. Localizada no núcleo, a CREB é fundamental na transmissão da informação da sinalização celular iniciada na membrana, até alteração na expressão dos genes (ORTEGA-MARTINEZ *et al.* 2015; YAMASHIMA, 2012).

A cascata bioquímica se inicia com a ativação de receptores que aumentam a liberação de cálcio e produção de segundos mensageiros como o AMPc, permitindo a ativação de proteínas cinases como a PKA e proteína cinase dependente de cálcio do tipo II (CaMKII). As proteínas cinases, quando ativadas, translocam-se para o núcleo da célula, onde fosforilam a CREB, tornando-a ativa. A CREB na forma ativa, liga-se a certas sequências de DNA, chamadas de elementos de resposta ao AMPc (CRE), e assim aumenta ou diminui a transcrição gênica (ORTEGA-MARTINEZ *et al.* 2015). Os genes cuja transcrição são regulados pela CREB são os responsáveis pela ligação da RNA-polimerase ao DNA para a síntese de proteínas (CARLEZON, *et al.*, 2005) (Figura 2).

A atividade transcricional de CREB depende do seu estado de fosforilação, o qual é determinado pela ação das proteínas cinases e fosfatases. A fosforilação é o mecanismo chave na sinalização da regulação de diversos processos como o ciclo celular (LIU *et al.*, 2014), morte celular (MARTIN, 2010) e neurogênese (ORTEGA-MARTINEZ *et al.* 2015). O efeito de um estímulo sobre a CREB depende da natureza desse estímulo e do contexto celular. Por exemplo, a ativação do receptor NMDA pode levar a desfosforilação da CREB em receptores extrassinápticos, enquanto que em sítios sinápticos leva a fosforilação da CREB e à expressão de genes dependentes de CREB (GHIANI *et al.*, 2007). As moléculas envolvidas na modulação da fosforilação da CREB incluem uma série de neurotransmissores (dopamina, glutamato, serotonina, GABA), fatores de crescimento e neurotrofinas (BDNF) (ORTEGA-MARTINEZ *et al.* 2015; YAMASHIMA, 2012).

Fig.2. Regulação transcricional por CREB.



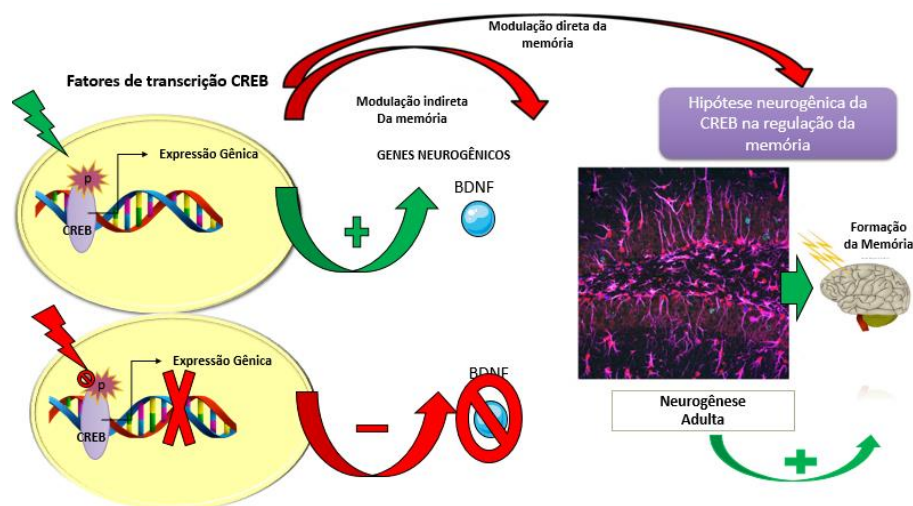
Várias rotas de sinalização convergem ao ativarem cinases que fosforilam CREB. Entre essas estão, PKA, Ca²⁺/calmodulina-cinase e MAP cinase. A fosforilação de CREB permite-lhe ligar coativadores (não mostrados na figura), que estimulam RNA polimerase a iniciar a síntese de RNA. O RNA é então processado e exportado ao citoplasma, onde serve como RNA para tradução em proteína.

Fonte: adaptado de Purves, 2010.

A CREB tem sido postulada como um regulador da sobrevivência celular, proliferação e diferenciação em cérebros em desenvolvimento, enquanto que em cérebros adultos sua função inclui aprendizagem e memória e plasticidade neuronal (YAMASHIMA, 2012). Este fator de transcrição é considerado a molécula chave responsável pela conversão da MCD à MLD na maioria das espécies (SUZUKI *et al.*, 2011; ZHONG *et al.*, 2016).

A CREB influencia nos processos cognitivos diretamente por afetar a memória ou indiretamente por afetar a capacidade neurogênica em cérebros adultos, isto é, afeta a consolidação da memória através da regulação da neurogênese hipocampal adulta (NHA), a qual ocorre principalmente na zona subgranular hipocampal do giro denteado (ORTEGA-MARTINEZ *et al.* 2015). Em vista disso, uma série de linhas de camundongos transgênicos regulados positivamente para CREB apresentam melhora na memória, bem como exibem uma regulação positiva na expressão do BDNF e aumento na neurogênese hipocampal (KIDA & SERITA, 2014; SUZUKI *et al.*, 2011). Estes dados indicam novos papéis para CREB na aprendizagem e memória; via regulação da expressão do BDNF, e com isso, da neurogênese (Figura. 3).

Fig. 3. Hipótese neurogênica para o papel do CREB na regulação da memória.



Um resumo de como a CREB pode influenciar o processo de formação de memória através da sua participação direta ou através da sua modulação na neurogênese hipocampal adulto.

Fonte: Adaptado de Ortega-Martinez, 2015.

1.6 CÉLULAS TRONCO NEURAIIS E NEUROGÊNESE

O encéfalo está em constante processo de mudança, tanto em seu desenvolvimento, como em sua fase madura, seja para adaptar-se a novas situações ou armazenar novas memórias por exemplo (CLARKE *et al.*, 2000; OISHI *et al.*, 2002). Um tipo de plasticidade que tem sido extensivamente investigada é a formação de novas células nervosas a partir de células tronco neurais (CTNs) (RUSZNÁK *et al.*, 2016). As CTNs são encontradas no SNC de embriões em desenvolvimento e

neonatal, bem como em regiões específicas do cérebro adulto maduro, incluindo giro denteado, zona sub-granular e bulbo olfatório (MARTINEZ-CERDEÑO, 2018; FANSELOW & DONG, 2010; GOULD, 2007). As CTNs são células auto-renováveis e multipotentes, isto é, podem sofrer divisões produzindo células-tronco adicionais com as mesmas propriedades e potencialidades ou se diferenciar em linhagens específicas do SNC. A diferenciação celular envolve os processos de neurogênese, a formação de novos neurônios, bem como a gliogênese, a geração de astrócitos e oligodendrócitos (MARTINEZ-CERDEÑO, 2018; HILL *et al.*, 2018). A neurogênese é fundamental na modificação da conectividade neuronal, já a gliogênese garante a produção de novas células de suporte e defesa (BERGMAN *et al.*, 2013).

As CTNs podem ser isoladas a partir do telencéfalo embrionário de ratos ou camundongos, constituindo assim um excelente modelo *in vitro* para investigar eventos de desenvolvimento neural, como a proliferação, migração e neurogliogênese, bem como a influência de fatores externos nesse processo (PILLAT *et al.*, 2015). Na presença de fatores de crescimento, as CTNs se proliferam e se mantêm em estado multipotente formando neuroesferas (LUKASZEWICZ *et al.*, 2002; REYNOLDS & WEISS, 1996). As neuroesferas são microestruturas tridimensionais flutuantes geradas a partir de tecidos primários dissociados do SNC. Uma única neuroesfera pode conter centenas a milhares de CTNs (MARSHALL *et al.*, 2007).

As CTNs mantêm a integridade fisiológica do SNC em resposta a lesões ou doenças degenerativas (FRISÉN *et al.*, 2016). Portanto, um desequilíbrio no balanço neurogliogênico pode acarretar prejuízos funcionais ao SNC (GO *et al.*, 2009). As células gliais são indispensáveis para o desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso central, porém, são comprovadamente vulneráveis a uma influência prejudicial de estímulos patológicos e desequilíbrio tecidual (JANOWSKA *et al.*, 2018). Em condições patológicas pode haver proliferação massiva de células gliais, o que resulta em danos no SNC, como a redução da neurogênese, e a consequente supressão da neuro-restauração (KINOUCI *et al.*, 2003, GUIDOLIN *et al.*, 2018; YAMAGUCHI *et al.*, 2016; GO *et al.*, 2009). Assim, o processo de proliferação e diferenciação de CTNs é dinamicamente regulado por diversos fatores, os quais podem modular o balanço entre neurogênese e gliogênese. Entre estes fatores incluem-se: hormônios, fatores de crescimento, neurotransmissores e citocinas

inflamatórias (TRUJILLO *et al.*, 2012; CAMERON *et al.*, 1998; MUOTRI *et al.*, 2006; GROSS *et al.*, 1996).

A neuroinflamação é um fator determinante na diferenciação neural, uma vez que desencadeia alterações transcricionais nas CTNs, alterando a identidade neural dessas células (ESTRADA *et al.*, 2017). A neuroinflamação desencadeia a ativação das células microgliais residentes e a liberação de citocinas inflamatórias com efeitos pró-inflamatórios ou pró-apoptóticos (CUI *et al.*, 2007; GO *et al.*, 2009). A neuroinflamação modula negativamente a neurogênese, através da ativação de receptores específicos como os da família toll-like (ROLLS *et al.*, 2007), determinando a diferenciação neural ao fenótipo glial (ROLLS *et al.*, 2007; DINEL *et al.*, 2014; JONAKAIT *et al.*, 2007; KWAK *et al.*, 2014). O aumento da gliogênese (KWAK *et al.*, 2014) e de células gliais maduras em seu estado ativado tem sido observado em estudos envolvendo doenças neurodegenerativas, como Alzheimer (HANSEN *et al.*, 2018).

Existem diversas proteínas endógenas que podem atuar como fatores de modulação positiva sobre a neurogênese, tais como, CREB e BDNF. O BDNF aumenta o crescimento neurítico (McALLISTER *et al.* 1995; HORCH & KATZ 2002), a sobrevivência (HUANG & REICHARDT, 2001), a proliferação (FOLTRAN *et al.*, 2016), a diferenciação (BINDER & SCHARFMAN, 2004) e a maturação (ACHESON *et al.*, 1995) de CTNs embrionárias e adultas (NUMAKAWA *et al.*, 2017; FOLTRAN *et al.*, 2016; LEAL *et al.*, 2017). Além disso, é amplamente aceito que o BDNF influencia o destino da diferenciação de CTNs para o fenótipo neuronal (FERREIRA *et al.*, 2017; NUMAKAWA *et al.*, 2017; CHAO *et al.*, 2003). Estudos recentes têm atribuído à neurogênese parte dos efeitos positivos de CREB e BDNF sobre a memória (KIDA & SERITA, 2014).

Entre os neurotransmissores que atuam como fatores de modulação positiva para a neurogênese está o glutamato (SCHLETT *et al.*, 2006). O glutamato facilita a proliferação, sobrevivência, migração e diferenciação das CTNs (JANSON & AKERMAN, 2014). Muito desse efeito se deve à ativação do receptor glutamatérgico NMDA. As mudanças nas concentrações de Ca^{2+} intracelular, desencadeada pela ativação dos receptores glutamatérgicos AMPA, NMDA, cainato, são consideradas o sinal essencial que promove a proliferação e a sobrevivência de CTNs (JANSSON & AKERMAN, 2014). De fato, o desequilíbrio da homeostase do glutamato,

desencadeado por dano celular, inflamação e tratamento com drogas, prejudica a proliferação de CTNs e formação de novos neurônios (SCHLETT, 2006). Em consonância com isso, vários estudos mostram que a ativação do receptor NMDA promove aumentos da proliferação (FAN *et al.*, 2012; BURSZTAJN *et al.*, 2007; MOCHIZUKI *et al.*, 2007; JOO *et al.*, 2007), migração (SIGNOR *et al.*, 2016; JANSSON *et al.*, 2013) e diferenciação (JOO *et al.*, 2007; ARVIDSSON *et al.*, 2001) de CTNs.

1.7 NEUROINFLAMAÇÃO

1.7.1 Comunicação entre sistema nervoso central (SNC) e sistema imune

O SNC e o sistema imune possuem uma relação bidirecional em que um exerce um papel regulador sobre o outro (NGUYEN *et al.*, 2002; PERRY, 2010). O SNC possui uma reação imune inata bem organizada em resposta a uma infecção bacteriana sistêmica ou lesão cerebral. Para isso conta com a barreira hematoencefálica (BHE), que é uma estrutura de permeabilidade altamente seletiva, a qual protege o SNC de substâncias potencialmente neurotóxicas presentes no sangue (FOX *et al.*, 2000). Logo, alteração na integridade da BHE e migração de leucócitos para dentro do SNC são eventos iniciais na patogenia de doenças inflamatórias, neurodegenerativas, infecciosas e neoplásicas do SNC (HONG *et al.*, 2016; SCHAIN *et al.*, 2017).

Outra importante via de acesso ao SNC é o nervo vago que é a principal via aferente da cavidade torácico abdominal para o encéfalo. Quando as citocinas entram em contato com receptores específicos nas terminações vagais, é emitido um impulso nervoso até o núcleo vagal do encéfalo, que terminam no núcleo do trato solitário, que por sua vez, sinaliza a regiões do encéfalo envolvidas com humor e motivação (QUAN & HERKENHAM, 2002). Ainda, sinais humorais, em particular citocinas, chegam ao SNC via órgãos circunventriculares que são regiões encefálicas com ausência de BHE (LI *et al.*, 2018; CUNNINGHAM *et al.*, 2007).

Outra forma de sinalizar inflamação ao SNC é sintetizar moléculas que possam atravessar a BHE. As células endoteliais possuem receptores para citocinas, que uma vez ativados secretam eicosanoides, mediadores inflamatórios lipídicos, como as prostaglandinas. Esses eicosanoides têm propriedades físico-químicas que os

possibilitam, via corrente sanguínea, acessar o encéfalo através da BHE, induzindo processos fisiopatológicos. A sinalização da inflamação para o encéfalo através dessas vias evoca uma resposta dos macrófagos perivascular e da micróglia, que uma vez ativados sintetizam mediadores inflamatórios dentro do SNC, incluindo citocinas, prostaglandinas e óxido nítrico (LÉCUYER *et al.*, 2017; OBERMEIER *et al.*, 2013/2016).

1.7.2 Lipopolissacarídeo, neuroinflamação e memória

Várias patologias do SNC estão associadas com inflamação. Assim, a doença de Alzheimer (CALSOLARO *et al.*, 2016), lesão cerebral traumática (CHIU *et al.*, 2016), autismo (KERN *et al.*, 2015), doença de Parkinson (NASROLAHI *et al.*, 2019), esclerose múltipla (DATTA *et al.*, 2017) são doenças associadas à neuroinflamação a qual contribui para a progressão e o agravamento dos quadros patológicos.

Os eventos imunes que ocorrem em uma inflamação podem ser reproduzidos com a administração de lipopolissacarídeo (LPS) (LEE *et al.*, 2008; MIWA *et al.*, 2011; KHAN *et al.*, 2018; LISBOA *et al.*, 2018). O LPS é um componente biologicamente ativo da membrana de bactérias gram-negativas sendo responsável por sua estrutura e estabilidade e um dos mais potentes indutores de resposta do sistema imune. O sistema imune inato é capaz de detectar concentrações picomolares desta molécula e desencadear uma rápida resposta celular (GIOANNINI *et al.*, 2004). Em macrófagos o LPS afeta a transcrição de mais de 1000 genes diferentes (BJORKBACKA *et al.*, 2004). Por isso, a administração de LPS tem sido adotada em diversos modelos experimentais para induzir processos inflamatórios e ativar o sistema imune através da liberação de citocinas pró-inflamatórias no SNC (LEE *et al.*, 2008; MIWA *et al.*, 2011; KHAN *et al.*, 2018; LISBOA *et al.*, 2018).

O LPS é composto por três partes, sendo uma parte polissacarídica hidrofílica, que é covalentemente ligada a uma parte lipídica hidrofóbica (Lipídeo A), a qual está inserida na membrana, e a região do antígeno-O. A região lipídica, lipídeo-A, é a fração mais conservada da endotoxina e é responsável por suas atividades biológicas, como por exemplo, a sua virulência, toxicidade e a estimulação do sistema imune (LU *et al.*, 2008; PETSCH & ANSPACH, 2000).

O lipídeo-A age na ativação do sistema imune, podendo atuar em diferentes células, como macrófagos, monócitos, neutrófilos, plaquetas sanguíneas, células endoteliais (LU *et al.*, 2008; PETSCH & ANSPACH, 2000).

O reconhecimento dos patógenos é uma das propriedades mais básicas e importantes dos sistema imune. Os organismos pluricelulares possuem um sistema de reconhecimento e defesa contra patógenos invasores, para isso possuem receptores específicos, como os “Toll Like Receptors” (TLR). Esses receptores são um bom exemplo de receptores de reconhecimento padrão, estimulados por estruturas características expressas por bactérias, vírus, e fungos chamadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (NGUYEN *et al.*, 2002; O'NEILL *et al.*, 2013). Um desses PAMPs é o LPS (O'NEILL *et al.*, 2013). A interação dos TLR com os PAMPs desencadeia a expressão de citocinas inflamatórias. Os TLR reconhecem um amplo espectro de ligantes incluindo LPS, proteínas (flagelina) e ácidos nucleicos e ativam uma via de sinalização comum que culmina na ativação de fatores de transcrição como o fator de transcrição nuclear kappa B (NF-KB) (ZHANG *et al.*, 2018; FULENWIDER *et al.*, 2018). A ativação do NF-KB leva a alterações na expressão gênica, tais como regulação positiva da expressão de moléculas co-estimulatórias de superfície, e a secreção de citocinas, como a IL-1, IL-6,IL-8,IL-12 e TNF- α (ZHANG *et al.*, 2018).

Diversos estudos têm demonstrado as ações centrais do LPS quando administrado sistemicamente. Lee e colaboradores (2008) demonstram que a administração sistêmica de LPS resulta no acúmulo do peptídeo β amiloide 1-42 no hipocampo e córtex cerebral de camundongos (LEE *et al.*, 2008). Estes resultados sugerem que um estímulo neuroinflamatório contribui para quadros clínicos semelhantes às condições patológicas da doença de Alzheimer. Ainda, a administração sistêmica de LPS induz a ativação da micróglia (QIN *et al.*, 2007), bem como aumento da expressão de diversos mediadores pró-inflamatórias como NF-KB (WANG *et al.*, 2018; KHAN *et al.*, 2018), citocinas (YEH *et al.*, 2018; MCFARLAND *et al.*, 2018) iNOS (CHOI *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2018), ROS (KHAN *et al.*, 2018) COX-2, (CHOI *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2013), EROs (LEE *et al.*, 2013) GFAP (CHOI *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2012), Caspase-3 (YEH *et al.*, 2018; ZARIFKAR, CHOOPANI *et al.*, 2010).

Diversos estudos (CARVALHO *et al.*, 2016; CHOI *et al.*, 2012; KRANJAC *et al.*, 2012) têm investigado os efeitos da neuroinflamação na memória e o possível mecanismo pelo qual a resposta inflamatória central pode levar a prejuízos cognitivos, para então tentar reverter esses danos por meio de intervenções farmacológicas. Em conformidade com isso, tem-se demonstrado que a administração de LPS prejudica a memória na tarefa de medo condicionado ao contexto (SATAMOTO *et al.*, 2018; BILBO *et al.*, 2005; KRANJAC *et al.*, 2012), labirinto aquático de Morris (LI *et al.*, 2018; CHOI *et al.*, 2012; ZARIFKAR *et al.*, 2010), bem como na tarefa de esquivas inibitória (NOORBAKHSHNIA *et al.*, 2017; SPARKMAN *et al.*, 2005) em ratos e camundongos. Além disso, o LPS diminui a preferência por objeto novo no teste de reconhecimento de objetos, em camundongos (FRUHAUF *et al.*, 2015; CARVALHO *et al.*, 2016; MIWA *et al.*, 2011; YAKA *et al.*, 2007). No trabalho de Liraz-Zaltsman e colegas (2016) é demonstrado que um modulador positivo de receptor NMDA do sítio da glicina (D-ciclocerina) reverte os efeitos nocivos do LPS sobre a memória nas tarefas de labirinto aquático de Morris e reconhecimento de objetos. Em vista disso, várias substâncias vêm sendo testadas para reverter os danos cognitivos causados pela neuroinflamação.

Os danos na aprendizagem e memória subjacentes à neuroinflamação induzida por LPS podem não decorrer diretamente do aumento das citocinas inflamatórias e ativação da glia, uma vez que muitas alterações moleculares ocorrem no estado de neuroinflamação. A administração de LPS pode também reduzir os níveis de moléculas chave para o aprendizado e a memória no hipocampo e córtex cerebral, como CREB (LIAO *et al.*, 2017, GOEL *et al.*, 2017), BDNF (GOEL, *et al.*, 2017; CHOWDHURY *et al.*, 2018; GUAN AND FANG, 2006; KRANJAC *et al.*, 2012; LIAO *et al.*, 2017), fator de crescimento do nervo (GUAN FANG *et al.*, 2006), neurotrofina-3 (GUAN FANG *et al.*, 2006). Ainda, a neuroinflamação desencadeada por LPS pode bloquear a neurogênese em cérebros adultos (LIANG *et al.*, 2016; EKDAHL *et al.*, 2003; MONJE *et al.*, 2003). Um trabalho recente do nosso grupo (FRUHAUF *et al.*, 2015), mostrou que a espermina previne os danos de memória induzidos por LPS sem diminuir o aumento de citocinas inflamatórias induzido por LPS. A reversão dos efeitos prejudiciais do LPS pode se dar através da ativação do receptor NMDA o qual pode desencadear a ativação de vias de sinalização necessárias para a formação da memória. Porém não se sabe quais mecanismos após a ativação do receptor NMDA

estão envolvidos no efeito da espermina em prevenir o prejuízo da memória induzido por LPS.

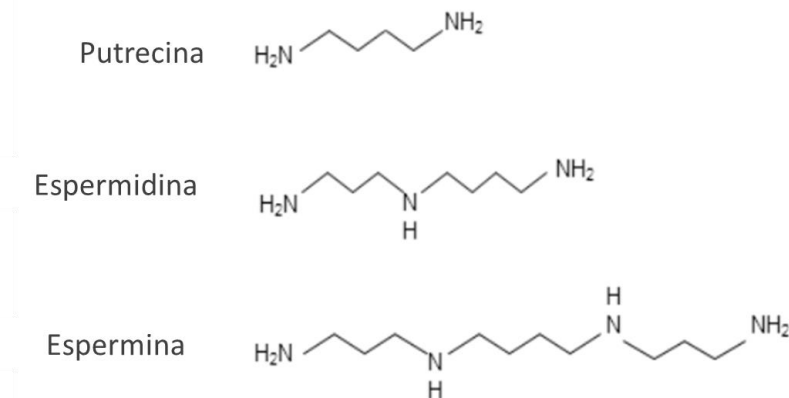
1.8 POLIAMINAS

As poliaminas putrescina, espermidina (SPD) e espermina (SPM), (Figura 4) são aminas alifáticas presentes em quase todas as células incluindo células procarióticas, eucarióticas plantas e animais (THOMAS & THOMAS, 2001). Essas aminas alifáticas estão amplamente distribuídas no sistema nervoso central, sendo encontradas principalmente em regiões como: hipotálamo, bulbo, hipocampo e cerebelo, os quais possuem em maior concentração a espermidina e a espermina, seguida pela putrescina, a qual é encontrada em baixas concentrações, cerca de cem vezes menor que as outras duas (SEILER & SCHMIDT-GLENEWINKEL, 1975; LIU *et al.*, 2008). A concentração das poliaminas no encéfalo varia não apenas na estrutura encefálica, mas também em subáreas (como a região CA1, CA2/3 e giro denteado do hipocampo), assim como também, os níveis de poliamina diminuem com a idade em muitos organismos (MINOIS *et al.*, 2011; SEILER, 1981; LIU *et al.*, 2008).

Quanto a caracterização estrutural das poliaminas sabe-se que a putrescina é uma di-amina primária (1,4 – diaminobutano), espermidina é uma tri-amina (mono-N-3-aminopropil-1,4-diaminobutano) e a espermina é uma tetra-amina (bis-N-3-aminopropil-1,4-diaminobutano) (Figura 4) (TETI *et al.*, 2002). São solúveis em água, possuem baixo peso molecular e possuem caráter básico devido aos grupamentos amino (SEILER *et al.*, 1996; TETI *et al.*, 2002; GUGLIUCCI, 2004).

Evidências sugerem que as poliaminas são sintetizadas por neurônios, liberadas no espaço extracelular, e captadas por células gliais pré-sinápticas (BENEDIKT *et al.*, 2012). Também são armazenadas em vesículas sinápticas e liberadas de maneira cálcio-dependente, através de um estímulo químico ou elétrico (MASUKO *et al.*, 2003; NICOLAS & CARTER, 1994). Além disso, há um sistema de receptação de poliaminas de alta afinidade, que regula o nível extracelular e o tempo de efeito das poliaminas (CULLIS *et al.*, 1999; SEILLER *et al.*, 1994).

Fig. 4 Estrutura Química das poliaminas



Fonte: Adaptado de MINOIS *et al.*, 2011

1.8.1 Alvos celulares para as Poliaminas

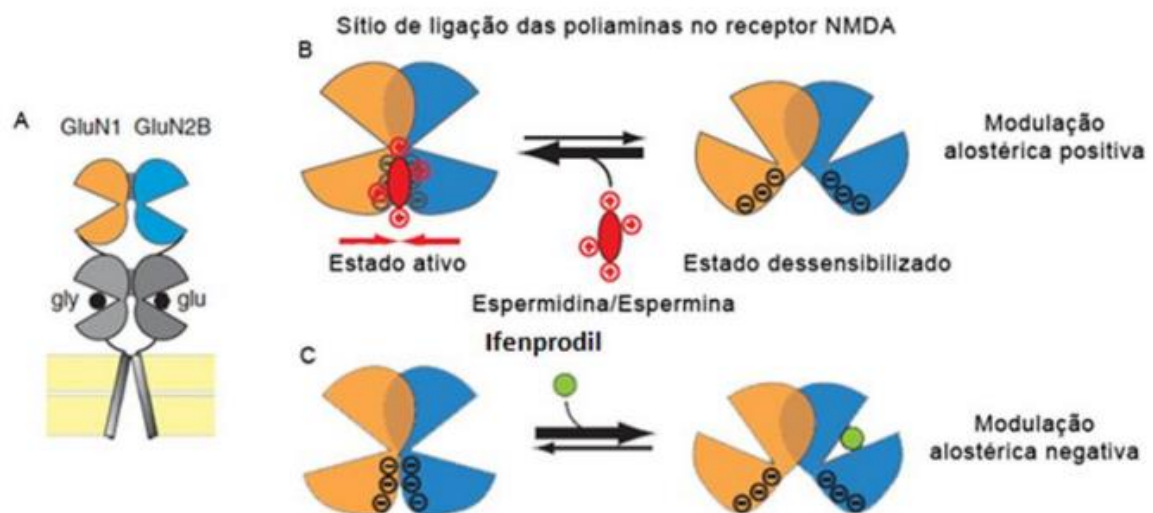
As poliaminas podem se ligar a várias macromoléculas, como DNA e RNA, também podem se ligar a proteínas e lipídios de membrana, devido à sua carga positiva, sendo estas interações eletrostáticas responsáveis pela maioria de suas funções (OUAMEUR *et al.*, 2004; WALLACE, 2003). As poliaminas estão relacionadas com inúmeros processos celulares, incluindo a modulação positiva da neurogênese (MALATERRE *et al.*, 2004) uma vez que atua na proliferação celular, regulação de tradução e expressão de gene, morte celular por apoptose, a modulação da sinalização e estabilização da membrana da célula (GUERRA *et al.*, 2016). Ainda, elas interagem com diversos canais iônicos, tais como, receptores AMPA permeáveis ao Ca^{2+} , receptores cainato e o receptor NMDA (WALLACE, 2003; THOMAS & THOMAS, 2001; IGARASHI & KASHIWAGI, 2000a; TABOR & TABOR, 1984). O enfoque dos estudos envolvendo as poliaminas se dá em sua interação com o sítio de ligação das poliaminas do receptor NMDA (COUGHENOUR & BARR, 2001).

1.9 RECEPTOR NMDA, POLIAMINAS E MEMÓRIA

As poliaminas funcionam como moduladores alostéricos positivos do receptor NMDA, ligando-se na interface formada pelos lóbulos inferiores do domínio N-

terminal (NTD) das subunidades GluN1 e GluN2B do receptor (MONY *et al.*, 2011) (figura 5). O dímero formado pelo NTD das subunidades GluN1/GluN2B, que possuem formato de concha, pode alternar entre dois estados conformacionais, um estado ativo e outro estado “tipo-dessensibilizado”. No estado ativado, as regiões NTD das duas subunidades estão abertas, o que mantém os lóbulos inferiores próximos e aumenta a probabilidade de ligação do agonista. Já no estado tipo-dessensibilizado, cargas eletrostáticas mantêm os lóbulos inferiores de GluN1 e GluN2B separados, o que provoca o fechamento da região NTD. A espermina e a espermidina agem estabilizando o receptor em um estado ativado, aliviando a repulsão eletrostática que separa os lóbulos inferiores das subunidades GluN1 e GluN2B (MONY *et al.*, 2011).

Fig. 5 Sítios de modulação alostérica no receptor NMDA.



A) Visão esquemática do heterodímero formado pelas subunidades GluN1 e GluN2B. B) Sítio de ligação das poliaminas no receptor NMDA. C) Sítio de ligação de antagonistas da subunidade GluN2B do receptor NMDA. gly: Glicina; glu: glutamato.

Fonte: Adaptado de MONY *et al.*, 2011.

Descobertas importantes nos anos 80 impulsionaram e orientaram a pesquisa sobre os efeitos comportamentais de poliaminas. A primeira foi a descoberta pela Merrew Dow Pharma (Bowlin) do inibidor irreversível da ornitina descarboxilase (ODC), DFMO, que diminui os níveis celulares de poliamina e permite estudar as consequências da perda de função destes compostos, particularmente putrescina e

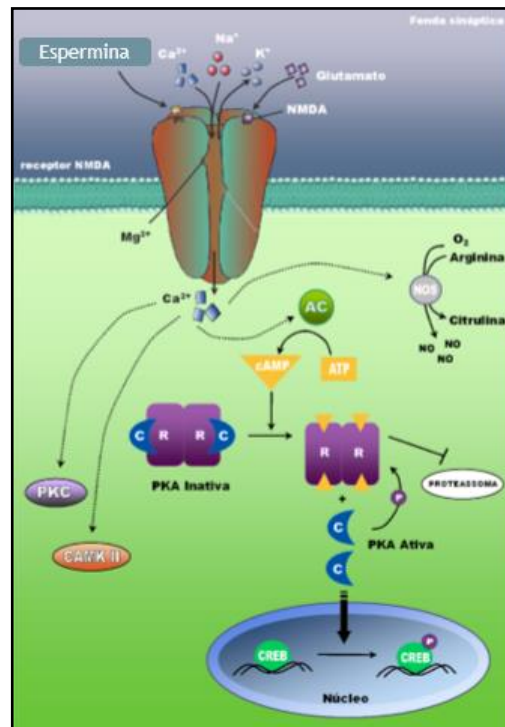
espermidina (para uma revisão ver Cohen, 1998). Outros estudos investigaram o efeito da DFMO em vários aspectos fisiológicos e patológicos, como crescimento cardíaco e hipertrofia (BARTOLOME *et al.*, 1980), crescimento do tumor (DUNZENDORFER & FELLER, 1981), desenvolvimento do sistema nervoso (SLOTKIN & BARTOLOME *et al.*, 1986), mecanismos de convulsão (DE VERA *et al.*, 1991), toxicidade por etanol (RUBIN *et al.*, 2009) e aprendizagem e memória (GUPTA *et al.*, 2009). A segunda foi a demonstração de que as poliaminas, principalmente espermidina e espermina atuam no receptor NMDA de maneira bifásica, sugerindo dois efeitos distintos das poliaminas. Em altas concentrações não potencializam a ligação do [³H] MK-801, enquanto que baixas concentrações as poliaminas aumentam a condutância do receptor NMDA, por aumentar a frequência da abertura do canal (WILLIAMS, 1997; SACAAN & JOHNSON, 1990; RANSOM & STEC, 1988). Estudos de eletrofisiologia confirmaram o efeito bifásico das poliaminas na atividade do receptor NMDA (CHIDA *et al.*, 1992; MCGURK *et al.*, 1990; WILLIAMS *et al.*, 1990). Considerando o papel do receptor NMDA no aprendizado e na memória (COLLINGRIDGE, 1987; TONKISS *et al.*, 1988; MORRIS, 1989), o próximo passo seria testar se tal modulação poliaminérgica deste receptor afetaria a aprendizagem e memória.

Kishi e colegas (1998) foram os primeiros a demonstrar o efeito facilitatório das poliaminas na performance de roedores em tarefas de memória. O estudo mostrou que a infusão intrahipocampal de espermidina e D-cicloerina, por interagir com o receptor glutamatérgico NMDA no hipocampo, atenua os déficits na aquisição da memória induzido pelo MK-801 (antagonista NMDA). No mesmo ano, o estudo de Meyer e colegas reforçou o efeito facilitatório das poliaminas sobre a memória, uma vez que a espermina atenuou o prejuízo de memória induzidos por CPP, um antagonista competitivo NMDA, na tarefa de labirinto em 'T' (MEYER *et al.*, 1998).

Alguns estudos têm mostrado que a super expressão gênica da subunidade GluN2B do receptor NMDA melhora a memória utilizando as tarefas de reconhecimento de objetos, medo condicionada ao contexto e ao som, a extinção do medo, e transmissão social de preferência alimentar mas não a memória de reconhecimento de odor (CAO *et al.*, 2007; TANG *et al.*, 1999; WHITE & YOUNGENTOB, 2004). Também tem sido descrito que as poliaminas melhoram a memória de roedores em diferentes tarefas, bem como atenuam o déficit de

memória induzido por diferentes agentes amnésicos (BERLESE, *et al.*, 2005; CAMERA, *et al.*, 2007; FRUHAUF, *et al.*, 2015; KISHI, *et al.*, 1998b; MIKOLAJCZAK, *et al.*, 2002; RIBEIRO, *et al.*, 2013; RUBIN, *et al.*, 2001, 2004; SIGNOR, *et al.*, 2014; SIGNOR, *et al.*, 2016; VELLOSO, *et al.*, 2009). Tem sido descrito que o efeito facilitatório das poliaminas sobre a memória envolve o receptor NMDA uma vez que o MK 801, antagonista NMDA, impede a melhora da memória induzida por espermidina (CAMERA *et al.*, 2007). Além disso, outros trabalhos mostram que a administração intra-amígdala (RUBIN *et al.*, 2004), intra-hipocampal (SIGNOR *et al.*, 2016) e sistêmica (CAMERA *et al.*, 2007) de arcaína, antagonista do sítio das poliaminas no receptor NMDA, em uma dose que não apresenta efeito *per se*, reverte o efeito facilitatório da espermidina sobre a consolidação e persistência da memória na tarefa de medo condicionado, mostrando o envolvimento do sítio de ligação das poliaminas no receptor NMDA no efeito das poliaminas. Velloso e colaboradores (2009) descrevem que a administração intraestriatal de espermina pós-treino reverte o prejuízo de memória induzido por ácido quinolínico, um modelo da doença de Huntington, na tarefa de reconhecimento de objetos. Ainda, estudo recente de nosso laboratório (FRUHAUF *et al.*, 2015) mostrou que a espermina reverte os danos de memória induzidos por LPS na tarefa de reconhecimento de objetos em camundongos, sugerindo que a espermina possui um efeito neuroprotetor sobre a memória em estados patológicos envolvendo a neuroinflamação. Evidências recentes também sugerem que o efeito facilitatório na memória induzida pela espermidina envolve a ativação sequencial das vias da PKC e PKA/CREB no hipocampo (Figura 6) (GIRARDI, *et al.*, 2016; GUERRA *et al.*, 2011, 2012, 2016).

Fig 6. Ativação da cascata AMPc/PKA/CREB pelas poliaminas.



A cascata bioquímica se inicia com a ativação de receptores NMDA que aumentam a influxo de cálcio e produção de segundos mensageiros como o AMPc, permitindo a ativação de proteínas cinases como a PKA e proteína cinase dependente de cálcio do tipo II (CaMKII). As proteínas cinases, uma vez ativadas, translocam-se para o núcleo da célula, onde fosforilam CREB, tornando-a ativa. A CREB na forma ativa, liga-se a certas sequencias de DNA, aumentando ou diminuindo a transcrição gênica. Fonte: Adaptado de Guerra *et al.*, 2012.

1.10 JUSTIFICATIVA

Já é sabido que a espermina reverte o prejuízo de memória induzido por LPS em camungongos por mecanismo dependente da ativação do receptor NMDA. Isso posto, destacamos aqui a importância da elucidação do mecanismo pelo qual as poliaminas revertem os danos subjacentes à neuroinflamação a qual está associada a muitas condições neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, conhecida por graves prejuízo cognitivo e danos na neurogênese. Para isso, é necessário que conheçamos o efeito das poliaminas sobre moléculas chave no processo de memória, como CREB e receptor TrkB, e neurogênese em condições de neuroinflamação. Portanto, o interesse na investigação das vias de atuação da espermina em presença de LPS, reside na possibilidade das poliaminas serem usadas para o tratamento de doenças nas quais ocorre neuroinflamação.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o mecanismo envolvido no efeito protetor da espermina sobre o prejuízo da memória induzido por LPS em camundongos bem como avaliar o efeito das poliaminas sobre os danos na neurogênese induzidos por LPS em células tronco neurais (CTNs).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Avaliar o efeito da espermina sobre os níveis de BDNF maduro e total no córtex cerebral e no hipocampo de camundongos tratados com LPS;
- 2 - Investigar o envolvimento do receptor TrkB no efeito protetor da espermina sobre o prejuízo da memória induzido por LPS;
- 3 - Avaliar o efeito da espermina sobre a ativação da CREB (CREB total, fosfo-CREB; fosfo-CREB/CREB total) em camundongos tratados com LPS;
- 4 - Avaliar o efeito da espermina sobre a migração celular e neuritogênese de CTNs tratadas com LPS;
- 5 - Avaliar o efeito da espermina sobre a neurogênese e gliogênese em CTNs tratadas com LPS;
- 6 - Avaliar o efeito da espermina sobre os níveis de BDNF em CTNs tratadas com LPS.

3. METODOLOGIA E RESULTADOS

A metodologia e os resultados apresentados nesta tese de doutorado estão na forma de um artigo científico publicado para a revista *Neurobiology of Learning and Memory* e um manuscrito submetido à revista *Brain Research Bulletin*.

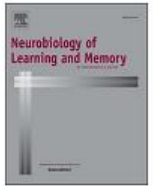
3.1 ARTIGO I

Neurobiology of Learning and Memory 149 (2018) 135–143



Contents lists available at ScienceDirect

Neurobiology of Learning and Memory

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ynlme

Spermine protects from LPS-induced memory deficit via BDNF and TrkB activation

Pâmella K. Frühauf-Perez^a, Fernanda R. Temp^a, Micheli M. Pillat^c, Cristiane Signor^b, Arithane Lorena Wendel^b, Henning Ulrich^c, Carlos F. Mello^{a,*}, Maribel A. Rubín^{a,b,*}^a Graduate Program in Pharmacology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil^b Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, RS, Brazil^c Biochemistry Department, Chemistry Institute, University of São Paulo, 05508-900, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Polyamines
NMDA receptor
ANA-12
Neuroinflammation
Object recognition task
CREB

ABSTRACT

Lipopolysaccharide (LPS) has been long known to promote neuroinflammation and learning and memory deficits. Since spermine, one of the main natural polyamines in the central nervous system, protects from LPS-induced memory deficit by a mechanism that comprises GluN2B receptors, the aim of the present study was to determine whether brain-derived neurotrophic factor (BDNF), tropomyosin-related kinase B (TrkB) receptor and cAMP response element binding (CREB) are involved in this protective effect of spermine. Adult male Swiss albino mice received, immediately after training in the novel object recognition task, saline or LPS (250 µg/kg, i.p.); 5 min later they received saline or spermine (0.3 mg/kg, i.p.) and, when specified, 5 min thereafter saline or the TrkB receptor antagonist ANA-12 (0.5 mg/kg, i.p.) in different flanks. Animals were tested 24 h after training. Spermine protected from LPS-induced memory deficit and this protective effect was reversed by ANA-12. In a subset of animals BDNF, CREB and phospho-CREB immunoreactivity was determined in the hippocampus and cerebral cortex 4 h after spermine injection. Spermine reversed the decrease of mature BDNF levels induced by LPS in both hippocampus and cerebral cortex. Spermine increased phospho-CREB content and phospho-CREB/total CREB ratio in the cerebral cortex of LPS-treated mice. The results support that the protective effect of spermine on LPS-induced memory deficits depends on TrkB receptor activation and is accompanied by restoration of mature BDNF levels in hippocampus and cerebral cortex, as well as increased CREB phosphorylation in the cerebral cortex.

1. Introduction

Neuroinflammation plays a significant role in several neurodegenerative diseases in which learning and memory deficits are a hallmark (Eikelenboom, Bate, Van Gool, Hoozemans et al., 2002; Liraz-Zaltsman, Yaka, Shabashov, Shohami et al., 2016). Peripheral inflammation induced by intraperitoneal (i.p.) injection of the Toll-like receptor (TLR)-4 agonist lipopolysaccharide (LPS) triggers neuroinflammation, leading to learning and memory deficits (Carvalho, Gutierrez, Bueno, Agostinho et al., 2016; Frühauf, Ineu, Tomazi, Duarte et al., 2015; Tarr, McLinden, Kranjac, Kohman et al., 2011; Thomson and Sutherland, 2005). In addition, LPS induces the release of neurotoxic substances and suppresses the secretion of neurotrophic factors, which may contribute for hindered neuroplasticity and consequent cognitive deficit in these animals

(Yirmiya and Goshen, 2011).

Current evidence supports a major role for brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Alberini and Kandel, 2014) in memory formation and retrieval (Bekinschtein, Cammarota, and Medina, 2014). It has been shown that the BDNF gene deletion in the hippocampus impairs spatial learning in the water maze as well as novel object recognition (Heldt, Stanek, Chhatwal, and Ressler, 2007). In fact, BDNF levels are decreased in several neurodegenerative diseases in which cognitive deficit has been reported (Bathina and Das, 2015), such as Alzheimer's (Phillips, Hains, Armanini, Laramée et al., 1991), Parkinson's (Howells, Porritt, Wong, Batchelor et al., 2000; Robbins and Cools, 2014), and Huntington's disease (Lawrence, Watkins, Sahakian, Hodges et al., 2000).

BDNF is the most abundant neurotrophic factor in the adult brain,

Abbreviations: LPS, lipopolysaccharide; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; TrkB, tropomyosin-related kinase B; CREB, cAMP response element binding; SPM, spermine; TLR, Toll-like receptor; t-PA, tissue plasminogen activator; STM, short term memory; LTM, long term memory

* Corresponding authors at: Department of Biochemistry and Molecular Biology, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil (M.A. Rubín). Department of Physiology and Pharmacology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil (C.F. Mello).

E-mail addresses: cf.mello@smail.ufsm.br (C.F. Mello), marubin@smail.ufsm.br (M.A. Rubín).

<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.02.012>

Received 30 August 2017; Received in revised form 18 January 2018; Accepted 14 February 2018

Available online 16 February 2018

1074-7427/ © 2018 Published by Elsevier Inc.

particularly in the hippocampus and cerebral cortex (Liu, Shen, Yuan, Guo et al., 2015). BDNF is synthesized and released by nerve cells in an activity-dependent manner (Chen, Xiong, Tong, and Mao, 2013). For instance, while glutamate stimulates BDNF expression, gamma aminobutyric acid (GABA) suppresses it (Porcher, Hatchett, Longbottom, McAinch et al., 2011). BDNF is synthesized as pro-BDNF and then cleaved into mature BDNF within the endoplasmic reticulum by furin and/or in regulated secretory vesicles by protein convertase 1 (Mowla, Farhadi, Pareek, Atwal et al., 2001; Rodier, Prigent-Tessier, Bejot, Jacquin et al., 2014). BDNF may also be cleaved in the extracellular milieu by tissue plasminogen activator (t-PA) plasmin (Pang, Teng, Zaitsev, Woo et al., 2004). Interestingly, while t-PA gene disruption impairs (Frey, Muller, and Kuhl, 1996; Pawlak, Nagai, Urano, Napierkowska-Pawlak et al., 2002), t-PA overexpression improves learning (Madani et al., 1999; Pawlak et al., 2002), supporting a role for extracellular BDNF processing in learning and memory. A large body of evidence suggests that pro- and mature BDNF interact with different receptor/signaling systems, triggering opposite effects on neuronal survival and plasticity (Kaplan and Miller, 2000; Lee, Kermani, Teng, and Hempstead, 2001; Lu, Pang, and Woo, 2005; Rodier et al., 2014). The mature form of BDNF binds to the tropomyosin-related kinase B (TrkB) receptor (Michalski and Fahnstock, 2003) and promotes synaptic growth in the developing and adult brain (Tanila, 2016), strengthening synaptic transmission and synaptic plasticity (Lu, Nagappan, and Lu, 2014). On the other hand, pro-BDNF binds to p75 receptor and activates neuronal apoptotic pathways (Teng, Teng, Lee, Wright et al., 2005). Accordingly, while TrkB overexpression enhances memory (Koponen, Voikar, Riekkö, Saarelainen et al., 2004), reduced BDNF/TrkB signaling is associated with impaired spatial memory (Minichiello, Korte, Wolfner, Kuhn et al., 1999; Saarelainen, Pussinen, Koponen, Alhonen et al., 2000).

Cyclic AMP (cAMP)-responsive element-binding protein (CREB), a transcription factor that has been implicated in memory formation and enhancement (Kida and Serita, 2014), increases BDNF expression (Suzuki, Fukushima, Mukawa, Toyoda et al., 2011). Accordingly, CREB upregulation promotes memory consolidation (Alberini and Kandel, 2014; Zhou et al., 2009) and facilitates the conversion of short term memory (STM) to long term memory (LTM) (Lobos, Altmann, Mengod, Weiss, Rudin, Karam, 1990; Vogt et al., 2014).

In fact, the genetic loss of CREB function impairs LTM, but not STM (Kim, Kwon, Kim, and Han, 2013; Vogt et al., 2014). Therefore, CREB has been considered a molecular switch for memory formation (Kandel, 2012). Phosphorylated CREB, the active form of this transcription factor, induces the transcription of memory-associated genes (Ortega-Martinez, 2015), such as c-fos, Arc and BDNF (Alberini and Kandel, 2014; Kandel, 2012; Miyamoto, 2006).

Evidence suggests that spermidine and spermine, natural polyamines, may improve learning and memory (Berlese, Sauzem, Carati, Guerra et al., 2005; Frühauf et al., 2015; Guerra, Rubin, and Mello, 2016; Kishi, Ohno, and Watanabe, 1998; Rubin, Berlese, Stiegemeier, Volkweis et al., 2004; Rubin, Boemo, Jurach, Rojas et al., 2000; Signor, Temp, Mello, Oliveira et al., 2016) by interacting with the polyamine-binding site at the NMDA receptor (Mony, Zhu, Carvalho, and Paoletti, 2011). In addition it has been shown that spermine attenuates memory deficits induced by different amnesic agents (Frühauf et al., 2015; Kishi et al., 1998; Mikolajczak, Okulicz-Kozaryn, Kaminska, Niedopad et al., 2002; Velloso, Dalmolin, Gomes, Rubin et al., 2009).

It is interesting to note that spermidine-induced facilitation of memory consolidation involves the sequential activation of protein kinase C and protein kinase A A/CREB signaling in the hippocampus of rats (Guerra, Mello, Bochi, Pazini et al., 2011, 2012). Moreover, the facilitatory effect of spermidine on memory is associated with increased levels of mature BDNF in the hippocampus (Signor, Girardi, Lorena Wendel, Frühauf et al., 2017). Though spermine reverses the cognitive deficiency induced by lipopolysaccharide (LPS) (Frühauf et al., 2015), no study has addressed whether CREB, BDNF and TrkB receptor

activation are involved in the protective effect of spermine from LPS-induced memory impairment.

2. Methods

2.1. Subjects

Adult male Swiss albino mice with approximately 12 weeks of age (30 to 35 g), provided by the Animal center of the *Universidade Federal de Santa Maria* were used. The animals had free access to water and food (Guabi, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil), and were kept in a room with controlled humidity and temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) with a 12-h light–dark cycle. Behavioral experiments were carried out during the light phase of the cycle (between 9:00 a.m. and 5:00 p.m.) in a sound-attenuated and air-regulated room, where the animals were habituated for 1 h prior to experiments. All animal procedures were carried out in accordance with Brazilian law no. 11.794/2008, which is in agreement with the policies on the use of animals and humans in neuroscience research, revised and approved by the Society for Neuroscience in January 1995 and with the Institutional and National regulations for animal research (process 6272010415).

2.2. Drugs

Lipopolysaccharide (*Escherichia coli*, serotype 055:B5), spermine (N, N'-bis (3-aminopropyl) 1,4-butanediamine) and ANA-12 (TrkB antagonist, N-[2-[[[Hexahydro-2-oxo-1H-azepin-3-yl]amino]carbonyl]phenyl]-benzo[b]thiophene-2-carboxamide) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). All drug solutions were prepared on a daily basis, in saline (0.9% NaCl).

2.3. Object recognition arena

The novel object recognition task was carried out as described by (Gomes, Dalmolin, Bar, Karpova et al., 2014). The task was performed in a $30 \times 30 \times 30$ cm wood chamber, which had its walls painted black, a front wall made of Plexiglas and a floor covered with ethyl vinyl acetate sheet. Illumination (about 40 lux) was provided by a light bulb hanging 60 cm above the apparatus. The temperature of the room was maintained at 22°C by an air-conditioner that also provided background sound. The objects used in the experiment were plastic mounting bricks, each having particular shape and color, but the same size.

2.4. Experimental groups

2.4.1. Experiment 1: novel object recognition task

Experiment 1 was devised to investigate the involvement of the TrkB receptor in the protective effect of spermine on LPS-induced memory deficit in the object recognition task. The task consisted of three sessions: habituation, training and test. In the habituation session, mice were individually familiarized to the behavioral apparatus for 10 min and returned to their home cages. Twenty-four hours later the animals were subjected to the training session, in which they were exposed to two of the same objects (object A) for 8 min. The time spent exploring each object was recorded with two stopwatches. Exploration was considered when the animal touched or approached the object with the nose at a distance of < 2 cm. Sitting on or climbing the object was not considered as exploration. The test session, which lasted 5 min, was carried out 24 h after training. Mice were returned to the behavioral chamber, in which a novel object (object B) substituted one of the familiar objects (object A). The time spent exploring the familiar and the novel object were recorded and a recognition index (percent of exploratory behavior directed to the novel object) was calculated $\{[(T_{\text{novel}} - T_{\text{familiar}})/(T_{\text{novel}} + T_{\text{familiar}})] \times 100 (\%) \}$, and used as a memory parameter. The objects were used counterbalancedly

throughout the experiments. The animals did not present previous preference to any of the objects (Frühauf et al., 2015). Chamber and objects were cleaned with a 30% ethanol solution immediately before and after each behavioral session.

Animals were habituated and trained as described above. Immediately after training, the animals were injected with saline or LPS (250 µg/kg). This dose of LPS does not alter locomotor activity 24 h after its injection (Frühauf et al., 2015). Five minutes thereafter they were injected with saline or spermine (0.3 mg/kg, a dose that reverses LPS-induced memory impairment). Five minutes after spermine (or saline) injection, the animals received saline or ANA-12, a TrkB antagonist (0.5 mg/kg, a dose that does not affect memory *per se*) in the opposite flank. Twenty-four hours after training the animals were subjected to the novel object recognition test session, as previously described. All injections were performed intraperitoneally in a 5 ml/kg injection volume. The doses were selected based on the previous studies of Frühauf et al. (2015) and Cazorla, Premont, Mann, Girard et al. (2011)

2.4.2. Experiment 2: BDNF measurement

Experiment 2 was designed to evaluate the involvement of total and mature BDNF in the protective effect of spermine on LPS-induced memory deficit. Animals were trained in the novel object recognition apparatus and injected, immediately post-training, with saline or LPS (250 µg/kg). Five minutes later, they were injected with saline or spermine (0.3 mg/kg) in different flanks. Four hours (Kranjac, Koster, Kahn, Eimerbrink et al., 2013) after spermine administration the animals were euthanized by cervical dislocation and the whole hippocampi and cerebral cortex were dissected and homogenized 1:10 w/v in lysis buffer containing 137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 10% glycerol, 1 mM PMSF, 0.5 mM sodium vanadate and protease and phosphatase inhibitors (Sigma, St. Louis, MO). Total BDNF quantification was carried out by regular Mouse BDNF ELISA Kit (GenWay) in samples treated with 1 N HCl (pH 2.5), according to the manufacturer procedures. For mature BDNF quantification, samples were not treated with HCl. The optical densities were determined at 450 nm in a microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

2.4.3. Experiment 3: Western blot assay

Experiment 3 aimed at investigating the involvement of CREB in the protective effect of spermine on LPS-induced memory deficit. Animals were trained in the novel object recognition apparatus and injected, immediately post-training, with saline or LPS (250 µg/kg). Five minutes later they were injected with saline or spermine (0.3 mg/kg) in the opposite flank. The animals were euthanized by cervical dislocation 4 h after spermine injection, because the levels of cAMP peak 180–360 min after training in cognitive tasks (Bernabeu, Schmitz, Faillace, Izquierdo et al., 1996), and the whole hippocampi and cerebral cortex were dissected on ice. Cerebral structures were homogenized in a lysis buffer which contained 10 mM HEPES (pH 7.9), 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM NaF, 1 mM phenylmethanesulphonyl fluoride, 10 mM β-glycerophosphate, 1 mM DTT and 2 mM sodium orthovanadate, and a mixture of protease and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich). The homogenates were then centrifuged (12,700g for 30 min at 4 °C) and the supernatant (S1), denominated cytosolic fraction, was reserved for subsequent processing. The pellet (P1) was resuspended in lysis buffer with Triton-X 100 (1% final concentration), incubated for 15 min on ice, and centrifuged at 12,700g for 60 min at 4 °C. The supernatant (S2) was discarded, and the pellet (P2) was resuspended in a buffer containing 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM NaF, 10 µg/mL aprotinin, 10 mM β-glycerolphosphate, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 2 mM sodium orthovanadate, 420 mM NaCl, and 25% glycerol in 20 mM HEPES, pH 7.9. Samples were incubated for 15 min on ice and centrifuged at 12,700g for 30 min at 4 °C. The supernatant (S3) was considered the nuclear fraction. Protein concentration in the cytosolic and nuclear fraction was measured by the bicinchonic acid assay (BCA)

using bovine serum albumin as standard (Pierce, Rockford, IL, USA). Cytosolic and nuclear fractions (20 µg protein) were added to 0.2 volumes of concentrated loading buffer (200 mM Tris, 10% glycerol, 2% SDS, 2.75 mM β-mercaptoethanol, and 0.04% bromophenol blue) and boiled for 10 min. Proteins were resolved by 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and electroblotted onto nitrocellulose membranes (Millipore). Membranes were blocked with 5% bovine serum albumin (BSA) in TBS-T (0.05% Tween 20 in Tris-borate saline) plus 5% non-fat milk at room temperature for 1 h, then incubated overnight at 4 °C with primary antibodies: rabbit anti-CREB (ser 133) (1:10000, sc-25786, Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-phospho-CREB (1:10000, sc-7978, Santa Cruz Biotechnology) were blocked only with 5% BSA. This procedure was followed by incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:6000, sc-2768, Santa Cruz Biotechnology) at room temperature for 3 h. Blots were developed by enhanced chemiluminescence (ECL) (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) and band intensities were quantified by ImageJ 219 (NIH). In these experiments, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (anti-GAPDH, 1:50000, G9295, Sigma-Aldrich) was used as an internal reference (loading control). The results were normalized for the control group densitometry values and expressed as the relative amount of phosphorylated and non-phosphorylated forms, and the phosphorylated/total ratio.

2.5. Statistical analysis

Data analysis was executed using two or three-way analysis of variance (ANOVA), depending on the experimental design. The Bonferroni's test was used for *post hoc* analysis, when indicated. A $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. TrkB receptor antagonist blocks the protective effect of spermine on LPS-induced memory deficit

The effect of ANA-12 on the protective effect of spermine from LPS-induced memory deficit in the object recognition task is shown in Fig. 1. Statistical analysis (three-way ANOVA) showed a significant pretreatment (saline or LPS) versus treatment (saline or spermine) versus TrkB receptor antagonist (saline or ANA-12) interaction [$F(1,61) = 5.68$; $p < 0.05$]. *Post-hoc* analysis (Bonferroni's Test) showed that LPS impairs memory consolidation of this task and that spermine administration prevents LPS-induced memory impairment. It also showed that ANA-12 reversed the protective effect of spermine from LPS-induced memory impairment in the novel object recognition task. ANA-12 and spermine had no effect *per se* on the performance of the animals in the task.

3.2. BDNF measurement

3.2.1. LPS decreased total BDNF levels in the cerebral cortex

Fig. 2A and C shows the effect of LPS and spermine on the total BDNF levels in the hippocampus and cerebral cortex. Statistical analysis (two-way ANOVA) showed a significant effect of treatment (saline or spermine) in the hippocampus ($F(1, 16) = 9.36$; $p < 0.05$; Fig. 2A) and pretreatment (LPS or saline) in the cerebral cortex ($F(1, 16) = 8.17$; $p < 0.05$; Fig. 2C). *Post-hoc* analyses (Bonferroni's Test) showed that spermine increased the levels of total BDNF in the hippocampus and that LPS decreased total BDNF levels in the cerebral cortex.

3.2.2. Spermine restores LPS-decreased mature BDNF levels in hippocampus and cerebral cortex

Fig. 2B and 2D shows the effect of post-training administration of spermine on LPS-induced decreased of mature BDNF in the

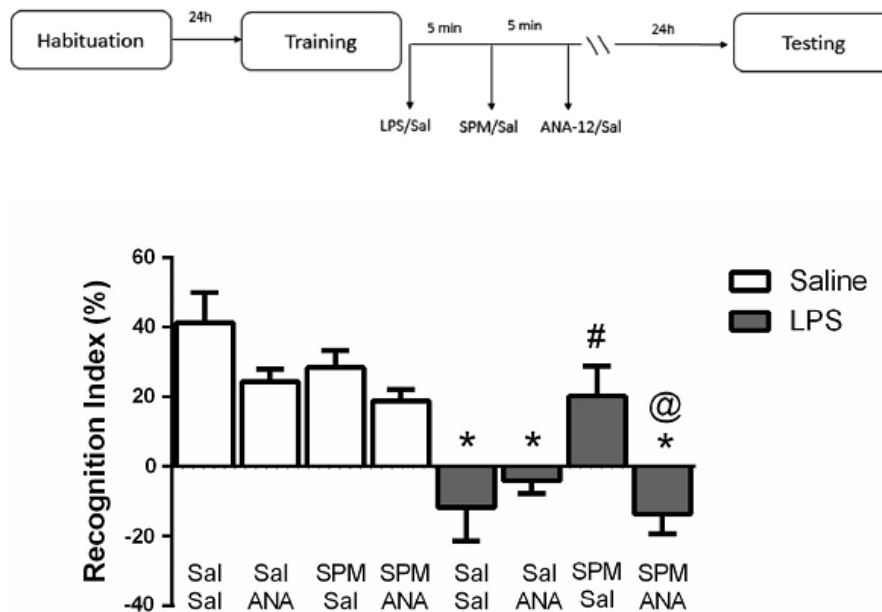


Fig. 1. Effect of ANA-12 (ANA) on the recognition index (%) of mice treated with lipopolysaccharide (LPS) and spermine (SPM). Immediately after training, the animals were injected with saline (Sal) or LPS (250 μ g/kg, i.p.), 5 min later they were injected with Sal or SPM (0.3 mg/kg, i.p.), and 5 min after that they were injected with Sal or ANA (0.5 mg/kg, i.p.) in different flanks, and tested 24 h later. Data are the mean \pm S.E.M. of 8–10 animals per group. * p < 0.05 compared with control group Sal/Sal/Sal, # p < 0.05 compared with LPS/Sal/Sal group, @ p < 0.05 compared with LPS/SPM/Sal group (three-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test).

hippocampus and cerebral cortex. Statistical analysis (two-way ANOVA) revealed a significant pretreatment (saline or LPS) versus treatment (saline or spermine) interaction in the hippocampus ($F(1, 19) = 5.831$; $p < 0.05$; Fig. 2B) and cerebral cortex ($F(1, 19) = 12.14$; $p < 0.05$; Fig. 2D). *Post-hoc* analyses (Bonferroni's Test) showed that LPS decreased the levels of mature BDNF in the hippocampus and cerebral cortex, and that spermine restores mature BDNF levels in both structures.

3.3. Spermine increases phospho-CREB (ser133) and phospho-CREB/total-CREB ratio in cerebral cortex of LPS-treated mice

Fig. 3 depicts the effect of spermine (0.3 mg/kg), LPS (250 μ g/kg), and the administration of spermine and LPS immediately after training on CREB levels and phosphorylation. Statistical analysis (two-way ANOVA) revealed that the administration of spermine, LPS or their combination did not alter the total CREB levels in hippocampus or cerebral cortex (Fig. 3A). On the other hand, spermine administration increased the phospho-CREB immunoreactivity in the cerebral cortex of LPS-treated mice, revealed by a significant pretreatment (saline or LPS) versus treatment (saline or spermine) interaction [$F(1, 30) = 7.95$; $p < 0.05$; Fig. 3B]. Spermine increased phospho-CREB/total-CREB ratio (Fig. 3C) in the cerebral cortex of animals treated with LPS, as revealed by a significant pretreatment (saline or LPS) versus treatment (saline or spermine) interaction [$F(1, 30) = 4.86$; $p < 0.05$].

4. Discussion

In this study we show experimental evidence that the protection provided by spermine from LPS-induced memory impairment involves BDNF and TrkB receptor activation. Accordingly, the protective effect of spermine on LPS-induced memory deficit was blocked by the TrkB antagonist ANA-12; spermine increased total BDNF levels in the hippocampus; reversed the LPS-induced decrease of mature BDNF levels in the hippocampus and cerebral cortex, and increased CREB phosphorylation in the cerebral cortex of mice treated with LPS.

It is interesting that though LPS did not alter total BDNF levels, it significantly reduced mature BDNF levels in the cerebral cortex and hippocampus. These results are in agreement with those from Shaw et al. (2001), who have shown that LPS (100 μ g/kg) does not alter total BDNF levels in the dentate gyrus, but causes cognitive deficits. In line

with this view, Ge et al. (2015) have shown that systemic LPS does not alter total BDNF levels but decreases phosphoCREB, another finding of the current study. In addition, data from spontaneously hypertensive rats and in cell culture (SH-SY5Y cells) corroborate the view that LPS decreases BDNF (Goel, Bhat, Hanif, Nath et al., 2017; Lee, Lim, Ko, Jeong et al., 2017) and phosphoCREB signaling (Lee et al., 2017). The current finding that a TrkB antagonist reverses the protective effect of spermine on LPS-induced memory deficit, to some degree, supports the claim that BDNF/TrkB signaling plays an important role in cognitive function (Hock, Heese, Hulette, Rosenberg et al., 2000; Peng, Wu, Mufson, and Fahnstock, 2005; Phillips et al., 1991; Wang, Li, Yun, Zhuang et al., 2017) and that its decline is associated with learning and memory deficits (Devi and Ohno, 2015). Interestingly, it has been shown that TrkB depletion increases mnemonic dysfunction in animal models of Alzheimer's disease (Devi and Ohno, 2015; Peng et al., 2005; Yang, Harte-Hargrove, Siao, Marincic et al., 2014). Current evidence indicates that CREB modulates memory by increasing BDNF expression (Suzuki et al., 2011). Activated CREB initiates the transcription of genes such as activity-regulated cytoskeleton associated protein (Arc), c-fos, and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Finkbeiner, Tavazoie, Maloratsky, Jacobs et al., 1997; Kawashima, Okuno, Nonaka, Adachi-Morishima et al., 2009; Sheng, Thompson, and Greenberg, 1991), which have been implicated in learning and memory (Kandel, 2012; Kida and Serita, 2014). CREB activation depends on its phosphorylation at serine 133 (S133) domain (Silva, Kogan, Frankland, and Kida, 1998) by various cellular kinases, including protein kinase A (Bernabeu, Bevilacqua, Ardenghi, Bromberg et al., 1997; Gonzalez and Montminy, 1989), protein kinase C (Yamamoto, Acevedo-Duncan, Chalfant, Patel et al., 1998), calcium-calmodulin kinase II (Sun, Enslin, Myung, and Maurer, 1994) and MAP kinase-activated protein kinase 2 (MAPKAP2) (Tan, Rouse, Zhang, Cariati et al., 1996). NMDA-associated intracellular signaling results in the activation of multiple protein targets, such as PKA (Bernabeu et al., 1997; Chetkovich and Sweatt, 1993; Chetkovich, Gray, Johnston, and Sweatt, 1991). Since NMDA receptor-mediated Ca^{2+} influx (Chetkovich et al., 1991) activates cAMP/PKA pathway, it is very possible that it sequentially stimulates adenylate cyclase (AC) activity, cAMP accumulation and PKA activation, culminating in CREB phosphorylation (Eliot, Dudai, Kandel, and Abrams, 1989; Poser and Storm, 2001).

Spermine is one the main natural polyamines in the central nervous system, whose concentration in synaptic vesicles achieves 1.5–2.8 mM

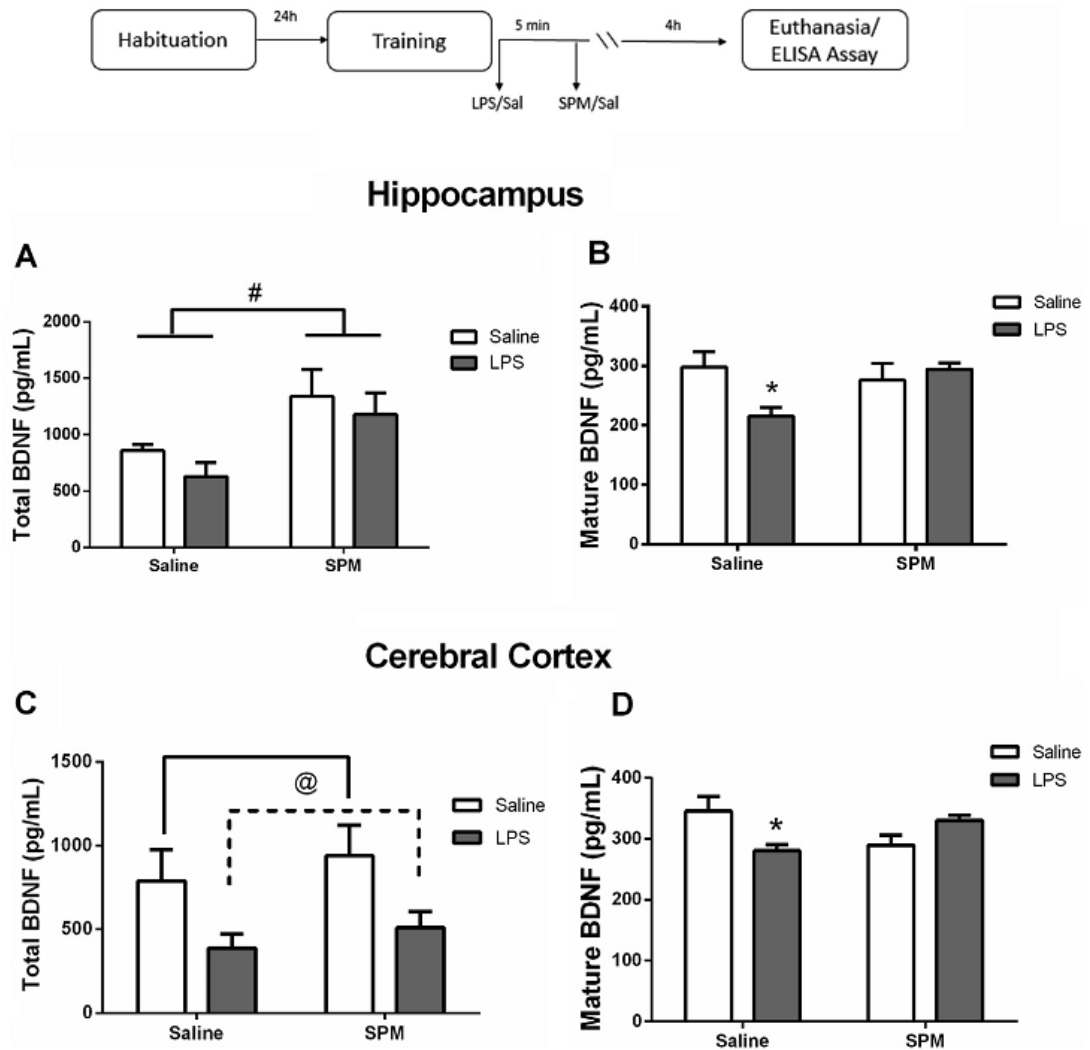


Fig. 2. Effect of lipopolysaccharide (LPS) and spermine (SPM) on the levels of total BDNF and mature BDNF in the hippocampus (A, B) and cerebral cortex (C, D). Immediately after training, the animals were injected with saline (Sal) or LPS (250 μ g/kg, i.p.), 5 min later they were injected with Sal or SPM (0.3 mg/kg, i.p.). Mice were euthanized 4 h after SPM injection. * $p < 0.05$ as compared with control group values (Sal/Sal), # $p < 0.05$ between pooled post-training saline (Sal-Sal and LPS-Sal groups) and pooled post-training SPM (Sal-SPM and LPS-SPM groups), @ $p < 0.05$ between pooled post-training saline (Sal-Sal and Sal-SPM) and pooled post-training LPS (LPS-Sal and LPS-SPM) by the Bonferroni's test. Continuous and dashed lines indicate pooled groups. Data are the mean \pm SEM for 5–6 animals in each group.

(Masuko, Kusama-Eguchi, Sakata, Kusama et al., 2003). Interestingly, spermine synthase deficiency is associated with the Snyder–Robinson syndrome, an X-linked mental retardation disorder (Cason, Ikeguchi, Skinner, Wood et al., 2003) in which the affected patients present low levels of intracellular spermine in lymphocytes and fibroblasts with corresponding increased spermidine/spermine ratios (Cason et al., 2003). The existence of an inborn error of the metabolism characterized by mental retardation due to impaired spermine synthesis suggests that spermine may play a role in cognitive function and brain development. In line with this view, the immediately post-training intrastriatal injection of a low dose of spermine (0.1 nmol) reverses the deleterious effect of quinolinic acid on the memory of the object recognition task (Velloso et al., 2009). Moreover, the effect of systemically administered spermine on the memory of object recognition task of mice is characterized by an inverted “U” dose–effect curve, with the maximal effect (memory improvement) being observed at the dose of 1 mg/kg (Frúhauf et al., 2015). Frúhauf et al. (2015) have also shown that spermine at the dose of 0.3 mg/kg reverses LPS-induced memory impairment. The finding that LPS decreases mature BDNF levels in the cerebral cortex

and hippocampus, and that spermine brings them back to control levels, to some extent, corroborate the currently reported blockade of the protective effect of spermine on the memory of LPS-injected animals by ANA-12 (Fig. 1), because mature BDNF elicits TrkB-mediated responses (Segal, 2003). Therefore, our findings suggest that the protective effect of spermine on memory is associated with increased levels of mature BDNF and depends on the activation of the TrkB receptor. Considering that ANA-12 is known to have anxiolytic effects *per se*, one might argue that the reversal of the protective effect of spermine on memory by ANA-12 is related to this property of the drug. However, since behavioral testing was performed 24 h after drug administration, an anxiolytic activity is unlikely in our assay. Moreover, ANA-12 is rapidly metabolized and, therefore, it also sounds unlikely that biologically active concentrations of ANA-12 will persist in the brain 24 h after its administration (Cazorla et al., 2011). However, we cannot rule out that a long-lasting anxiolytic effect of ANA-12 may have occurred in our experiment and contributed to its behavioral effects. One possible explanation for a TrkB-mediated effect of spermine on memory is that it increased the total amount of BDNF in the hippocampus, facilitating its

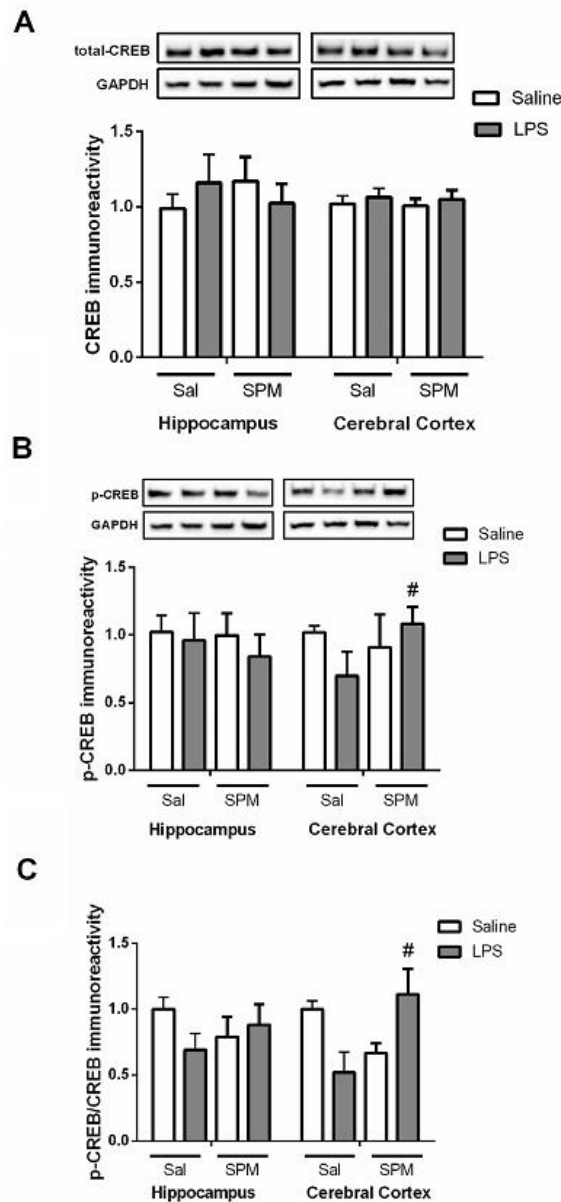
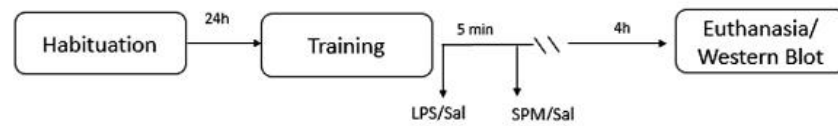


Fig. 3. Effect of lipopolysaccharide (LPS) and spermine (SPM) on total CREB (A) and phosphoCREB (B) immunoreactivity, and phosphoCREB/total CREB ratio (C) in the hippocampus and cerebral cortex. Representative images of Western immunoblotting are shown. Immediately after training, mice were injected with saline (Sal) or LPS (250 μ g/kg, i.p.). 5 min later they were injected with Sal or SPM (0.3 mg/kg, i.p.). Mice were euthanized 4 h after SPM injection. Data were normalized by the densitometry values of the control (Sal/Sal) group. GAPDH immunoreactivity was used as a loading control. Data are the mean \pm S.E.M. for 8–9 animals in each group. [#] $p < 0.05$ compared with (LPS/Sal) group.

conversion to mature BDNF. On the other hand, spermine did not increase total BDNF levels in the cerebral cortex (Fig. 2C), but reverted LPS-induced decrease of mature BDNF in that structure. Therefore, one might propose that spermine facilitates the conversion of proBDNF to its mature form by mechanisms other than increased substrate

availability, and this mechanism remains to be investigated.

In several aspects, the effects of spermine on memory resemble those of spermidine, including the reversal of its effects by NMDA antagonists, supporting a role for the NMDA receptor in its effects (Frühauf et al., 2015; Signor et al., 2014). Consistent with this view,

recent evidence indicates the participation of PKA/CREB pathway cascade in the facilitation of memory induced by spermidine (2016; Guerra et al., 2011). Since both polyamines activate the NMDA receptor by binding at the same dimer interface between GluN1 and GluN2B N-terminal domains (Mony et al., 2011), spermine may analogously bind at NMDA receptor and trigger PKA activation (Guerra et al., 2011) and CREB phosphorylation (Guerra et al., 2011). Indeed, the NMDAR has been implicated in the memory facilitation induced by spermidine (Signor et al., 2014) and spermine (Fruhauf et al., 2015). However, there are some discrepancies on the effects of spermine and spermidine on CREB phosphorylation and BDNF immunoreactivity. While intrahippocampal spermidine increases pCREB and mature BDNF immunoreactivity in the hippocampus (Guerra et al., 2011; Signor et al., 2017), systemic spermine increases pCREB in the cerebral cortex of animals injected with LPS and total BDNF in the hippocampus. One must also consider, however, that the route of administration of the polyamines were different among these studies, as well as the experimental animal used (rats and mice). Since in the studies of Guerra et al. (2011) and Signor et al. (2017) spermidine was infused into the CA1 area of the hippocampus, it is expected that the effects of spermidine would be more pronounced in that cerebral structure. In summary, it is possible that these methodological differences may have accounted for the discrepancies on the effect of spermine and spermidine on CREB phosphorylation and BDNF immunoreactivity among the studies of Guerra et al. (2011), Signor et al. (2017) and the current study. It is also worth pointing out that though spermine and spermidine seem to have similar effects on NMDAR activity (Camera, Mello, Ceretta, and Rubin, 2007; Ribeiro, Mello, Signor, and Rubin, 2013; Rubin et al., 2000, 2004; Rubin, Stiegemeier, Volkweis, Oliveira et al., 2001; Signor et al., 2016) and subsequent CREB signaling (Guerra et al., 2016, 2011, 2012), there are biological functions in which spermidine does not substitute for spermine (Cason et al., 2003). In fact, current evidence suggests that the spermine: spermidine ratio is critical for normal growth and development (Pegg, 2016).

The brain structures analyzed in this work, hippocampus and cerebral cortex, are recognized as important for memory formation (Martinez, Villar, Ballarini, and Viola, 2014; Squire, 1992) and are severely impaired by systemic LPS injection (Lee, Lee, Yuk, Choi et al., 2008; Zarifkar, Choopani, Ghasemi, Naghdi et al., 2010). However, we cannot rule out that LPS is causing memory deficit by acting on other structures involved in learning and memory. For instance LPS-induced increase of iNOS, COX-2, IL-1 β and IL-6 mRNA in the hypothalamus and amygdala (Araki, Hiraki, and Yabe, 2014) may also contribute for the deleterious effect of this toxin.

In conclusion, our study provides experimental evidence that the protection provided by spermine from LPS-induced memory impairment involves phospho-CREB, BDNF and TrkB receptor activation. However, it is still to be determined whether facilitating BDNF signaling is an adequate strategy to prevent neuroinflammation-induced cognitive deficits, particularly because BDNF overexpression in the hippocampus has been associated with seizures and death (Wang et al., 2017).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (306468/2014-0 and 304029/2010-6) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul-FAPERGS (2342-2551/14-6). CFM and MAR are recipients of CNPq fellowships. MMP is recipient of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo fellowship (FAPESP 2015/19478-3). FAPESP Proc. No. 2012/50880-4, granted to H.U. PKFP, CS and FRT are recipients of

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES fellowships.

References

- Alberini, C. M., & Kandel, E. R. (2014). The regulation of transcription in memory consolidation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7, a021741.
- Araki, R., Hiraki, Y., & Yabe, T. (2014). Genipin attenuates lipopolysaccharide-induced persistent changes of emotional behaviors and neural activation in the hypothalamic paraventricular nucleus and the central amygdala nucleus. *European Journal of Pharmacology*, 741, 1–7.
- Bathina, S., & Das, U. N. (2015). Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. *Archives of Medical Science*, 11, 1164–1178.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., & Medina, J. H. (2014). BDNF and memory processing. *Neuropharmacology*, 76 Pt C, 677–683.
- Berlese, D. B., Sauzem, P. D., Carati, M. C., Guerra, G. P., Stiegemeier, J. A., Mello, C. F., & Rubin, M. A. (2005). Time-dependent modulation of inhibitory avoidance memory by spermidine in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 83, 48–53.
- Bernabeu, R., Bevilacqua, L., Ardenghi, P., Bromberg, E., Schmitz, P., Bianchin, M., ... Medina, J. H. (1997). Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94, 7041–7046.
- Bernabeu, R., Schmitz, P., Faillace, M. P., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (1996). Hippocampal cGMP and cAMP are differentially involved in memory processing of inhibitory avoidance learning. *Neuroreport*, 7, 585–588.
- 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.
- Carvalho, F. B., Gutierrez, J. M., Bueno, A., Agostinho, P., Zago, A. M., Vieira, J., ... Andrade, C. M. (2016). Anthocyanins control neuroinflammation and consequent memory dysfunction in mice exposed to lipopolysaccharide. *Molecular Neurobiology*, 54(5), 3350–3367.
- Cason, A. L., Ikeguchi, Y., Skinner, C., Wood, T. C., Holden, K. R., Lubs, H. A., ... Schwartz, C. E. (2003). X-linked spermine synthase gene (SMS) defect: The first polyamine deficiency syndrome. *European Journal of Human Genetics*, 11, 937–944.
- Cazorla, M., Premont, J., Mann, A., Girard, N., Kellendonk, C., & Rognan, D. (2011). Identification of a low-molecular weight TrkB antagonist with anxiolytic and antidepressant activity in mice. *J Clin Invest*, 121, 1846–1857.
- Chen, A., Xiong, L. J., Tong, Y., & Mao, M. (2013). The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury. *Biomed Rep*, 1, 167–176.
- Chetkovich, D. M., Gray, R., Johnston, D., & Sweatt, J. D. (1991). N-methyl-D-aspartate receptor activation increases cAMP levels and voltage-gated Ca²⁺ channel activity in area CA1 of hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 88, 6467–6471.
- Chetkovich, D. M., & Sweatt, J. D. (1993). nMDA receptor activation increases cyclic AMP in area CA1 of the hippocampus via calcium/calmodulin stimulation of adenylyl cyclase. *Journal of Neurochemistry*, 61, 1933–1942.
- Devi, L., & Ohno, M. (2015). TrkB reduction exacerbates Alzheimer's disease-like signaling aberrations and memory deficits without affecting beta-amyloidosis in 5XFAD mice. *Translational Psychiatry*, 5, e562.
- Eikelenboom, P., Bate, C., Van Gool, W. A., Hoozemans, J. J., Rozemuller, J. M., Veerhuis, R., & Williams, A. (2002). Neuroinflammation in Alzheimer's disease and prion disease. *Glia*, 40, 232–239.
- Eliot, L. S., Dudai, Y., Kandel, E. R., & Abrams, T. W. (1989). Ca²⁺/calmodulin sensitivity may be common to all forms of neural adenylyl cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 86, 9564–9568.
- Finkbeiner, S., Tavazoie, S. F., Maloratsky, A., Jacobs, K. M., Harris, K. M., & Greenberg, M. E. (1997). CREB: A major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron*, 19, 1031–1047.
- Frey, U., Muller, M., & Kuhl, D. (1996). A different form of long-lasting potentiation revealed in tissue plasminogen activator mutant mice. *Journal of Neuroscience*, 16, 2057–2063.
- Fruhauf, P. K., Ineu, R. P., Tomazi, L., Duarte, T., Mello, C. F., & Rubin, M. A. (2015). Spermine reverses lipopolysaccharide-induced memory deficit in mice. *Journal of Neuroinflammation*, 12, 3.
- Ge, L., Liu, L., Liu, H., Liu, S., Xue, H., Wang, X., ... Liu, D. (2015). Resveratrol abrogates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior, neuroinflammatory response, and CREB/BDNF signaling in mice. *European Journal of Pharmacology*, 768, 49–57.
- Goel, R., Bhat, S. A., Hanif, K., Nath, C., & Shukla, R. (2017). Angiotensin II receptor blockers attenuate lipopolysaccharide-induced memory impairment by modulation of NF-kappaB-mediated BDNF/CREB expression and apoptosis in spontaneously hypertensive rats. *Molecular Neurobiology*. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-017-0450-5>.
- Gomes, G. M., Dalmolin, G. D., Bar, J., Karpova, A., Mello, C. F., Kreutz, M. R., & Rubin, M. A. (2014). Inhibition of the polyamine system counteracts beta-amyloid peptide-induced memory impairment in mice: Involvement of extrasynaptic NMDA receptors. *PLoS One*, 9, e99184.
- Gonzalez, G. A., & Montminy, M. R. (1989). Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell*, 59, 675–680.
- Guerra, G. P., Mello, C. F., Bochi, G. V., Pazini, A. M., Fachineto, R., Dutra, R. C., ... Rubin, M. A. (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., & Rubin, M. A. (2012). Spermidine-induced improvement of memory involves a cross-talk between protein kinases C and A. *Journal of Neurochemistry*, *122*, 363–373.
- Guerra, G. P., Rubin, M. A., & Mello, C. F. (2016). Modulation of learning and memory by natural polyamines. *Pharmacological Research*, *112*, 99–118.
- Heldt, S. A., Stanek, L., Chhatwal, J. P., & Ressler, K. J. (2007). Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Molecular Psychiatry*, *12*, 656–670.
- Hock, C., Heese, K., Hulette, C., Rosenberg, C., & Otten, U. (2000). Region-specific neurotrophin imbalances in Alzheimer disease: Decreased levels of brain-derived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas. *Archives of Neurology*, *57*, 846–851.
- Howells, D. W., Porritt, M. J., Wong, J. Y., Batchelor, P. E., Kalnins, R., Hughes, A. J., & Donnan, G. A. (2000). Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra. *Experimental Neurology*, *166*, 127–135.
- Kandel, E. R. (2012). The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Mol Brain*, *5*, 14.
- Kaplan, D. R., & Miller, F. D. (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Current Opinion in Neurobiology*, *10*, 381–391.
- Kawashima, T., Okuno, H., Nonaka, M., Adachi-Morishima, A., Kyo, N., Okamura, M., ... Bito, H. (2009). Synaptic activity-responsive element in the Arc/Arg3.1 promoter essential for synapse-to-nucleus signaling in activated neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *106*, 316–321.
- Kida, S., & Serita, T. (2014). Functional roles of CREB as a positive regulator in the formation and enhancement of memory. *Brain Research Bulletin*, *105*, 17–24.
- Kim, J., Kwon, J. T., Kim, H. S., & Han, J. H. (2013). CREB and neuronal selection for memory trace. *Frontiers in Neural Circuits*, *7*, 44.
- Kishi, A., Ohno, M., & Watanabe, S. (1998). Spermidine, a polyamine site agonist, attenuates working memory deficits caused by blockade of hippocampal muscarinic receptors and mGluRs in rats. *Brain Research*, *793*, 311–314.
- Koponen, E., Voikar, V., Riekkilä, R., Saarelainen, T., Rauramaa, T., Rauvala, H., ... Castren, E. (2004). Transgenic mice overexpressing the full-length neurotrophin receptor trkB exhibit increased activation of the trkB-PLCgamma pathway, reduced anxiety, and facilitated learning. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *26*, 166–181.
- Kranjac, D., Koster, K. M., Kahn, M. S., Eimerbrink, M. J., Womble, B. M., Cooper, B. G., ... Boehm, G. W. (2013). Peripheral administration of D-cycloserine rescues memory consolidation following bacterial endotoxin exposure. *Behavioural Brain Research*, *243*, 38–43.
- Lawrence, A. D., Watkins, L. H., Sahakian, B. J., Hodges, J. R., & Robbins, T. W. (2000). Visual object and visuospatial cognition in Huntington's disease: Implications for information processing in corticostriatal circuits. *Brain*, *123*(Pt 7), 1349–1364.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K. K., & Hempstead, B. L. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*, *294*, 1945–1948.
- Lee, J. W., Lee, Y. K., Yuk, D. Y., Choi, D. Y., Ban, S. B., Oh, K. W., & Hong, J. T. (2008). Neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation. *Journal of Neuroinflammation*, *5*, 37.
- Lee, H. J., Lim, S. M., Ko, D. B., Jeong, J. J., Hwang, Y. H., & Kim, D. H. (2017). Soyasapogenol B and genistein attenuate lipopolysaccharide-induced memory impairment in mice by the modulation of NF-kappaB-mediated BDNF expression. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *65*, 6877–6885.
- Liraz-Zaltsman, S., Yaka, R., Shabashov, D., Shohami, E., & Biegon, A. (2016). Neuroinflammation-induced memory deficits are amenable to treatment with D-cycloserine. *Journal of Molecular Neuroscience*, *60*, 46–62.
- Liu, D. Y., Shen, X. M., Yuan, F. F., Guo, O. Y., Zhong, Y., Chen, J. G., ... Wu, J. (2015). The physiology of BDNF and its relationship with ADHD. *Molecular Neurobiology*, *52*, 1467–1476.
- Lobos, E., Altmann, M., Mengod, G., Weiss, N., Rudin, W., & Karam, M. (1990). Identification of an *Onchocerca volvulus* cDNA encoding a low-molecular-weight antigen uniquely recognized by onchocerciasis patient sera. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *39*, 135–145.
- Lu, B., Nagappan, G., & Lu, Y. (2014). BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. *Handbook of Experimental Pharmacology*, *220*, 223–250.
- Lu, B., Pang, P. T., & Woo, N. H. (2005). The yin and yang of neurotrophin action. *Nature Reviews Neuroscience*, *6*, 603–614.
- Madani, R., Hulo, S., Toni, N., Madani, H., Steimer, T., Muller, D., & Vassalli, J. D. (1999). Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice. *EMBO Journal*, *18*, 3007–3012.
- Martinez, M. C., Villar, M. E., Ballarín, F., & Viola, H. (2014). Retroactive interference of object-in-context long-term memory: Role of dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex. *Hippocampus*, *24*, 1482–1492.
- Masuko, T., Kusama-Eguchi, K., Sakata, K., Kusama, T., Chaki, S., Okuyama, S., ... Igarashi, K. (2003). Polyamine transport, accumulation, and release in brain. *Journal of Neurochemistry*, *84*, 610–617.
- Michalski, B., & Fahnstock, M. (2003). Pro-brain-derived neurotrophic factor is decreased in parietal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Research Molecular Brain Research*, *111*, 148–154.
- Mikolajczak, P., Okulicz-Kozaryn, I., Kaminska, E., Niedopad, L., Polanska, A., & Gebka, J. (2002). Effects of acaprosate and some polyamine site ligands of NMDA receptor on short-term memory in rats. *European Journal of Pharmacology*, *444*, 83–96.
- Minichiello, L., Korte, M., Wolfner, D., Kuhn, R., Unsicker, K., Cestari, V., ... Klein, R. (1999). Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron*, *24*, 401–414.
- Miyamoto, E. (2006). Molecular mechanism of neuronal plasticity: Induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. *Journal of Pharmacological Sciences*, *100*, 433–442.
- Mony, L., Zhu, S., Carvalho, S., & Paoletti, P. (2011). Molecular basis of positive allosteric modulation of GluN2B NMDA receptors by polyamines. *EMBO Journal*, *30*, 3134–3146.
- Mowla, S. J., Farhadi, H. F., Pareek, S., Atwal, J. K., Morris, S. J., Seidah, N. G., & Murphy, R. A. (2001). Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *Journal of Biological Chemistry*, *276*, 12660–12666.
- Ortega-Martinez, S. (2015). A new perspective on the role of the CREB family of transcription factors in memory consolidation via adult hippocampal neurogenesis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *8*, 46.
- Pang, P. T., Teng, H. K., Zaitsev, E., Woo, N. T., Sakata, K., Zhen, S., ... Lu, B. (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science*, *306*, 487–491.
- Pawlak, R., Nagai, N., Urano, T., Napiorkowska-Pawlak, D., Ihara, H., Takada, Y., ... Takada, A. (2002). Rapid, specific and active site-catalyzed effect of tissue-plasminogen activator on hippocampus-dependent learning in mice. *Neuroscience*, *113*, 995–1001.
- Pegg, A. E. (2016). Functions of polyamines in mammals. *Journal of Biological Chemistry*, *291*, 14904–14912.
- Peng, S., Wu, J., Mufson, E. J., & Fahnstock, M. (2005). Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, *93*, 1412–1421.
- Phillips, H. S., Hains, J. M., Armanini, M., Laramée, G. R., Johnson, S. A., & Winslow, J. W. (1991). BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron*, *7*, 695–702.
- Porcher, C., Hatchett, C., Longbottom, R. E., McAinch, K., Sihra, T. S., Moss, S. J., ... Jovanovic, J. N. (2011). Positive feedback regulation between gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptor signaling and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) release in developing neurons. *Journal of Biological Chemistry*, *286*, 21667–21677.
- Poser, S., & Storm, D. R. (2001). Role of Ca²⁺-stimulated adenylyl cyclases in LTP and memory formation. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *19*, 387–394.
- Ribeiro, D. A., Mello, C. F., Signor, C., & Rubin, M. A. (2013). Polyaminergic agents modulate the reconsolidation of conditioned fear. *Neurobiology of Learning and Memory*, *104*, 9–15.
- Robbins, T. W., & Cools, R. (2014). Cognitive deficits in Parkinson's disease: A cognitive neuroscience perspective. *Movement Disorders*, *29*, 597–607.
- Rodier, M., Prigent-Tessier, A., Bejot, Y., Jacquin, A., Mossiat, C., Marie, C., & Garnier, P. (2014). Exogenous t-PA administration increases hippocampal mature BDNF levels. plasmin- or NMDA-dependent mechanism? *PLoS One*, *9*, e92416.
- Rubin, M. A., Berlese, D. B., Stiegemeier, J. A., Volkweis, M. A., Oliveira, D. M., dos Santos, T. L., ... Mello, C. F. (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., ... Mello, C. F. (2000). Intrahippocampal 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., ... Mello, C. F. (2001). Intra-amygdala spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. *European Journal of Pharmacology*, *423*, 35–39.
- Saarelainen, T., Pussinen, R., Koponen, E., Alhonen, L., Wong, G., Sirvio, J., & Castren, E. (2000). Transgenic mice overexpressing truncated trkB neurotrophin receptors in neurons have impaired long-term spatial memory but normal hippocampal LTP. *Synapse (New York, NY)*, *38*, 102–104.
- Segal, R. A. (2003). Selectivity in neurotrophin signaling: Theme and variations. *Annual Review of Neuroscience*, *26*, 299–330.
- Shaw, K. N., Commins, S., & O'Mara, S. M. (2001). Lipopolysaccharide causes deficits in spatial learning in the watermaze but not in BDNF expression in the rat dentate gyrus. *Behavioural Brain Research*, *124*, 47–54.
- Sheng, M., Thompson, M. A., & Greenberg, M. E. (1991). CREB: A Ca²⁺-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science*, *252*, 1427–1430.
- Signor, C., Girardi, B. A., Lorena Wendel, A., Frúhauf, P. K., Pillat, M. M., Ulrich, H., ... Rubin, M. A. (2017). Spermidine improves the persistence of reconsolidated fear memory and neural differentiation in vitro: Involvement of BDNF. *Neurobiology of Learning and Memory*, *140*, 82–91.
- Signor, C., Mello, C. F., Porto, G. P., Ribeiro, D. A., & Rubin, M. A. (2014). Spermidine improves fear memory persistence. *European Journal of Pharmacology*, *730*, 72–76.
- Signor, C., Temp, F. R., Mello, C. F., Oliveira, M. S., Girardi, B. A., Gais, M. A., ... Rubin, M. A. (2016). Intrahippocampal infusion of spermidine improves memory persistence: Involvement of protein kinase A. *Neurobiology of Learning and Memory*, *131*, 18–25.
- Silva, A. J., Kogan, J. H., Frankland, P. W., & Kida, S. (1998). CREB and memory. *Annual Review of Neuroscience*, *21*, 127–148.
- Squire, L. R. (1992). Memory and the hippocampus: A synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological Review*, *99*, 195–231.
- Sun, P., Enslin, H., Myung, P. S., & Maurer, R. A. (1994). Differential activation of CREB by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes & Development*, *8*, 2527–2539.
- Suzuki, A., Fukushima, H., Mukawa, T., Toyoda, H., Wu, L. J., Zhao, M. G., ... Kida, S. (2011). Upregulation of CREB-mediated transcription enhances both short- and long-term memory. *Journal of Neuroscience*, *31*, 8786–8802.
- Tan, Y., Rouse, J., Zhang, A., Cariati, S., Cohen, P., & Comb, M. J. (1996). FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP

- kinase-2. *EMBO Journal*, 15, 4629–4642.
- Tanila, H. (2016). The role of BDNF in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Diseases*.
- Tarr, A. J., McLinden, K. A., Kranjac, D., Kohman, R. A., Amaral, W., & Boehm, G. W. (2011). The effects of age on lipopolysaccharide-induced cognitive deficits and interleukin-1beta expression. *Behavioural Brain Research*, 217, 481–485.
- Teng, H. K., Teng, K. K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R. D., ... Hempstead, B. L. (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *Journal of Neuroscience*, 25, 5455–5463.
- Thomson, L. M., & Sutherland, R. J. (2005). Systemic administration of lipopolysaccharide and interleukin-1beta have different effects on memory consolidation. *Brain Research Bulletin*, 67, 24–29.
- Velloso, N. A., Dalmolin, G. D., Gomes, G. M., Rubin, M. A., Canas, P. M., Cunha, R. A., & Mello, C. F. (2009). Spermine improves recognition memory deficit in a rodent model of Huntington's disease. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92, 574–580.
- Vogt, M. A., Inta, D., Luoni, A., Elkin, H., Pfeiffer, N., Riva, M. A., & Gass, P. (2014). Inducible forebrain-specific ablation of the transcription factor Creb during adulthood induces anxiety but no spatial/contextual learning deficits. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 407.
- Wang, M., Li, D., Yun, D., Zhuang, Y., Repunte-Canonigo, V., Sanna, P. P., & Behnisch, T. (2017). Translation of BDNF-gene transcripts with short 3' UTR in hippocampal CA1 neurons improves memory formation and enhances synaptic plasticity-relevant signaling pathways. *Neurobiology of Learning and Memory*, 138, 121–134.
- Yamamoto, M., Acevedo-Duncan, M., Chalfant, C. E., Patel, N. A., Watson, J. E., & Cooper, D. R. (1998). The roles of protein kinase C beta I and beta II in vascular smooth muscle cell proliferation. *Experimental Cell Research*, 240, 349–358.
- Yang, J., Harte-Hargrove, L. C., Siao, C. J., Marinic, T., Clarke, R., Ma, Q., ... Hempstead, B. L. (2014). proBDNF negatively regulates neuronal remodeling, synaptic transmission, and synaptic plasticity in hippocampus. *Cell Rep*, 7, 796–806.
- Yirmiya, R., & Goshen, I. (2011). Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25, 181–213.
- Zarifkar, A., Choopani, S., Ghasemi, R., Naghdi, N., Maghsoudi, A. H., Maghsoudi, N., ... Moosavi, M. (2010). Agmatine prevents LPS-induced spatial memory impairment and hippocampal apoptosis. *European Journal of Pharmacology*, 634, 84–88.
- Zhou, Y., Won, J., Karlsson, M. G., Zhou, M., Rogerson, T., Balaji, J., ... Silva, A. J. (2009). CREB regulates excitability and the allocation of memory to subsets of neurons in the amygdala. *Nature Neuroscience*, 12, 1438–1443.

3.2 ARTIGO II

Spermine protects from LPS-induced neurogenesis impairment *in vitro*

Pâmella K. Frühauf-Perez^a, Micheli M. Pillat^b, Bruna Amanda Girardi^c, Fernanda Tibolla Viero^a, Henning Ullrich^b, Carlos F. Mello^{a*}, Maribel A. Rubin^{a,c*}

^aGraduate Program in Pharmacology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^bBiochemistry Department, Chemistry Institute, Federal University of São Paulo, 05508-900, Brazil.

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

**Corresponding Authors:*

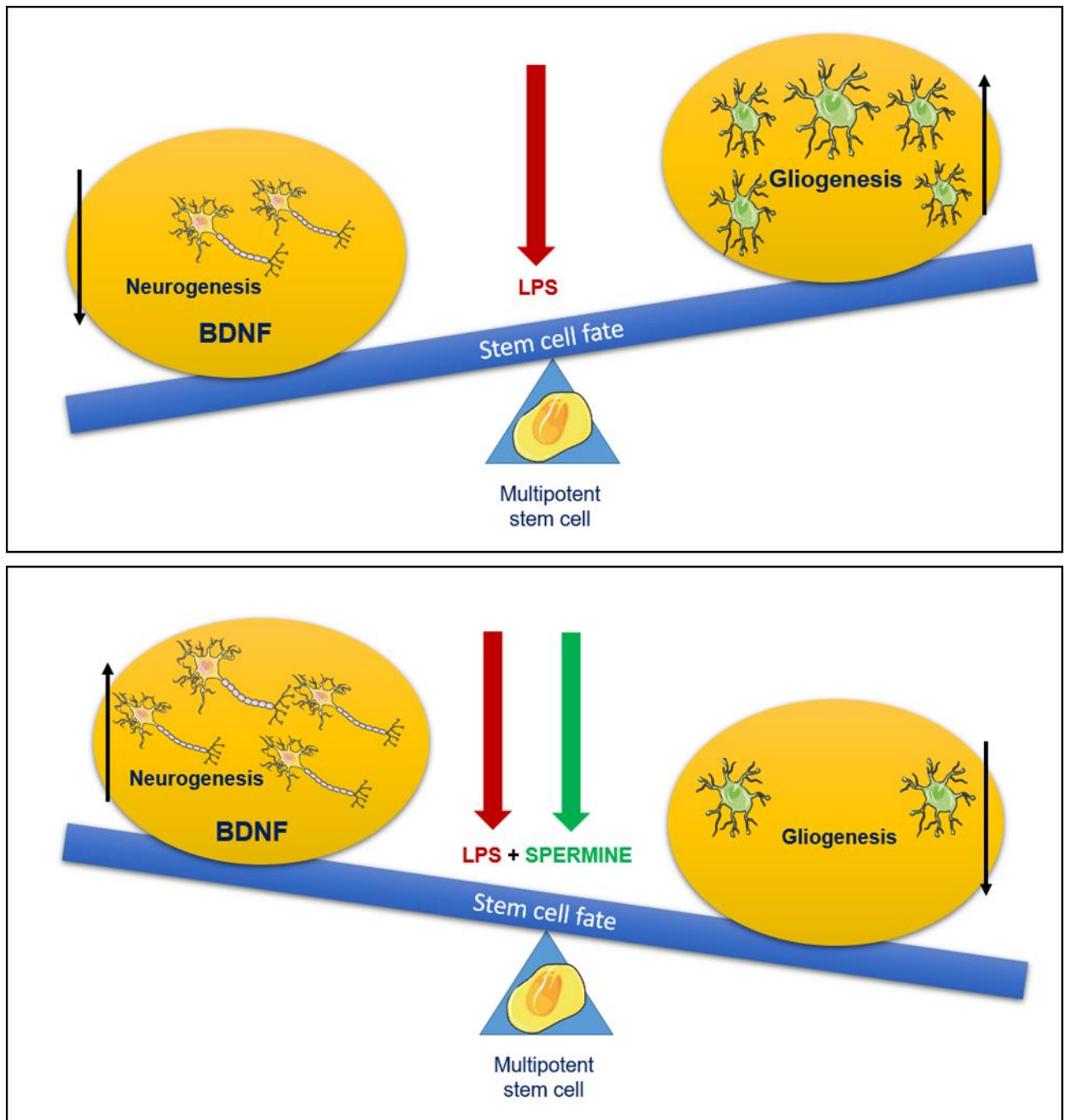
MA Rubin, PhD, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil, 97105-900. Tel: + 55 55 3220 8053, Fax: + 55 55 3220 8978.

E-mail: marubin@smail.ufsm.br

CF Mello, MD, PhD, Department of Physiology and Pharmacology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil, 97105-900. Tel: + 55 55 3220 8870.

E-mail: cf.mello@smail.ufsm.br

GRAPHICAL ABSTRACT



ABSTRACT

Neural stem cells (NSCs) are multipotent cells which can proliferate and differentiate into neurons and glial cells. Altered neurogenesis and gliogenesis have been revealed in a number of pathological conditions associated with neuroinflammation, such as neurodegenerative diseases. Therefore, exposure to lipopolysaccharide, triggers transcriptional changes in neural stem cells, resulting in signaling dysfunction and downregulation of neurotrophic factors, such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Since polyamines are important for cell growth, viability and cell division and N-methyl-D-aspartate receptor positive modulators as well, the aim of the current study was to investigate the effect of spermine, a natural polyamine, on NSC development during neuroinflammation. NSCs, obtained from embryo telencephalons of C57BL/6 mice, were treated with lipopolysaccharide (100 nM) and/or spermine (1-100 nM) and analyzed for cell migration (at 24 h of neural differentiation), neuritogenesis (at 3 days of neural differentiation). Neurogenesis (β 3-tubulin) was analyzed by flow cytometry and immunohistochemical analysis, gliogenesis by immunohistochemical analysis and BDNF levels by ELISA assay (at 7 days of neural differentiation). Spermine increased cell migration *per se*, and prevented lipopolysaccharide-induced impairment of neuritogenesis (number and length of neurites). Moreover, spermine prevented lipopolysaccharide-induced decrease of neuronal differentiation of NSCs and prevented lipopolysaccharide-induced gliogenesis. Spermine also reversed the decrease of BDNF levels induced by neuroinflammation in NSCs. The results support that spermine may restore the balance between neurogenesis and gliogenesis, possibly by recovering BDNF levels in an inflammatory process, which represents a new perspective for neuro-restoration.

Keywords: polyamines; NMDA receptor; neural stem cells; neuroinflammation; BDNF; neuro-restoration.

Abbreviations: BDNF: brain-derived neurotrophic factor; CREB: cAMP response element binding; DAPI: 4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride; GFAP: glial fibrillary acidic protein; GSK3: Glycogen synthase kinase 3; LPS: lipopolysaccharide; MAP2: microtubule-associated protein 2; NF κ B: factor nuclear kappa B; NSCs: neural stem cells; PKC: Protein Kinase C; SPM: spermine; TLR: toll-like receptor.

1. Introduction

Neural stem cells (NSCs) are self-renewing multipotent cells that generate neurons and glial cells in the brain (Martinez-Cerdeño and Noctor, 2018; Hill et al., 2018). NSCs are found in the central nervous system (CNS) of developing embryos and also in the neonatal and mature adult brain (Martinez-Cerdeño and Noctor, 2018). These cells play a key role in embryonic and early postnatal development of the CNS, also maintaining the physiological integrity of CNS in response to injury or degenerative diseases (Clarke et al., 2000; Oishi et al., 2002). NSCs proliferation and differentiation are dynamically regulated by environmental and temporal factors. These include neurotransmitters, cytokines, hormones and growth factors, which influence the acquisition of neuronal or glial phenotypes (Trujillo et al., 2012; Cameron and McKay, 1998; Muotri and Gage, 2006; Gross et al., 1996). Embryonic NSCs can be isolated from the telencephalon of rats or mice embryos and constitute a simple and excellent model to investigate neural development events, such as proliferation, migration, and neurogliogenesis, as well as the effects of external factors on these processes (Pillat, et al, 2015). These factors include inflammatory triggers and mediators (Rolls et al., 2007; Dinel et al., 2014; Jonakait, 2007).

Neuroinflammation negatively modulate neurogenesis through the activation of specific receptors, such as those from the toll-like family (Rolls et al., 2007). Lipopolysaccharide (LPS), a gram-negative bacteria endotoxin, induces inflammation (Giovanni et al., 2004; Dinel et al., 2014) through the activation of the toll-like receptor 4 (TLR4) receptor and the Myd 188/PKC/GSK3/NFkB pathway (Beurel and Jope, 2009; Li and Jope, 2010). The activation of this pathway induces the release of bioactive molecules, such as inflammatory cytokines, which determine neural differentiation to gliogenesis, drastically reducing both adult and embryonic NSCs neurogenesis (Rolls et al. al., 2007; Go et al., 2009). Accordingly, LPS triggers transcriptional changes in NSCs, altering the neural identity of NSCs. This culminates in a decreased transcription of proteins essential to proliferation, pluripotency and maturation of neural cells, such as nestin, sex determining region Y-box 2 (Sox2) and microtubule-associated protein 2 (MAP2), respectively (Estrada et al., 2017). In addition, *in vivo* studies have shown that LPS and pro-inflammatory cytokines reduce brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene transcription and protein expression (Zhang et al., 2016; Fruhauf-Perez et al., 2018). Prenatal LPS exposure reduces BDNF

expression and neurogenesis in brain offspring (Schaafsma et al., 2016; Lin and Wang, 2014). In fact, accumulating evidence suggests that at least part of the deleterious effects of LPS on NSCs proliferation and differentiation are causally related to a decrease in BDNF levels. It is fairly known that BDNF is a neurotrophin that plays key role in both the developing and adult nervous system (Foltran and Diaz, 2016). Moreover, BDNF is a well-known synaptogenic molecule (Michalski et al., 2003) that enhances synaptic transmission and facilitates synaptic plasticity (Cohen-Cory et al., 2010; Tanila, 2016). BDNF actions on NSCs include increase of neuritic growth; (McAllister and Katz et al. 1995; Horch and Katz 2002), survival (Huang and Reichard, 2001), proliferation (Foltran and Diaz, 2016), differentiation (Waterhouse et al., 2012), and maturation (Ji et al., 2010) of both embryonic and adult NSCs (Numakawa et al., 2017; Foltran and Diaz, 2016; Leal et al., 2016). In addition, BDNF contributes to cell fate of NSCs (Ferreira et al., 2018; Numakawa et al., 2017; Lei et al., 2018; Jiao et al. 2014).

It has been reported that glutamate facilitates NSCs proliferation, survival, migration and differentiation (Janson et al., 2014). In this regard, glutamate N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAr) activation facilitates NSCs proliferation and differentiation (Shi et al., 2014; Jansson et al., 2012; Joo et al., 2007; Luk et al., 2003). In line with this view, NMDAr activation not only is required for embryonic striatal progenitors proliferation (Luk et al., 2003), but also induces neuronal differentiation of NSCs into adult brains (Deisseroth et al., 2004). The polyamines spermidine, spermine and putrescine interact with NR2B-containing NMDAr, facilitating glutamate binding and calcium influx (Mony et al., 2011). Accordingly, spermidine increases cell growth and differentiation of NSCs by NMDAr-mediated mechanisms (Signor et al, 2017). However, no study has addressed whether polyamines facilitate NSCs growth and differentiation in pathological conditions.

This study aims to investigate the effect of a polyamine on the proliferation and differentiation of NSCs subjected to inflammatory conditions. Therefore, we investigated whether spermine increases neurogliogenesis in LPS-treated in NSCs. The effect of spermine and LPS on NSCs BDNF levels was also investigated.

2. Materials and methods

2.1. Isolation, culture, and differentiation of NSCs

Fig. 1 shows the experimental design and representative in vitro formation of neurospheres, migration and differentiation of NSCs. NSCs were obtained from embryo telencephalons (embryonic day 13.5) of C57BL/6 mice (Animal house of the Universidade Federal de Santa Maria). The animals were euthanized in a CO₂ gas chamber using protocols reviewed and approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal de Santa Maria. Telencephalons were dissected in aseptic conditions and incubated with trypsin for 5 min at 37°C. An equal volume of fetal bovine serum (FBS) was added for inactivation of trypsin. The cells also were mechanically dissociated. After that, samples were plated at a density of 2×10^5 cells/ml in culture medium DMEM/Ham's F-12 medium containing 2% B-27 (Life Technologies, Carlsbad, California), epidermal growth factor (EGF) and fibroblast growth factor 2 (FGF2) (both at 20 ng/ml and Sigma-Aldrich, St-Louis, MO), and antibiotics (100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin) and cultured at 37°C in a water-saturated atmosphere and 5% of CO₂. For neural differentiation, neurospheres were plated onto adherent poly-L-lysine- and laminin-precoated cell culture grade dishes and cultured in the presence of 2% B-27 (Life Technologies) and in absence or presence of 100 nM LPS (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) or 1, 10 or 100 nM spermine (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA). The medium and these treatments were replaced every other day for 7 days.

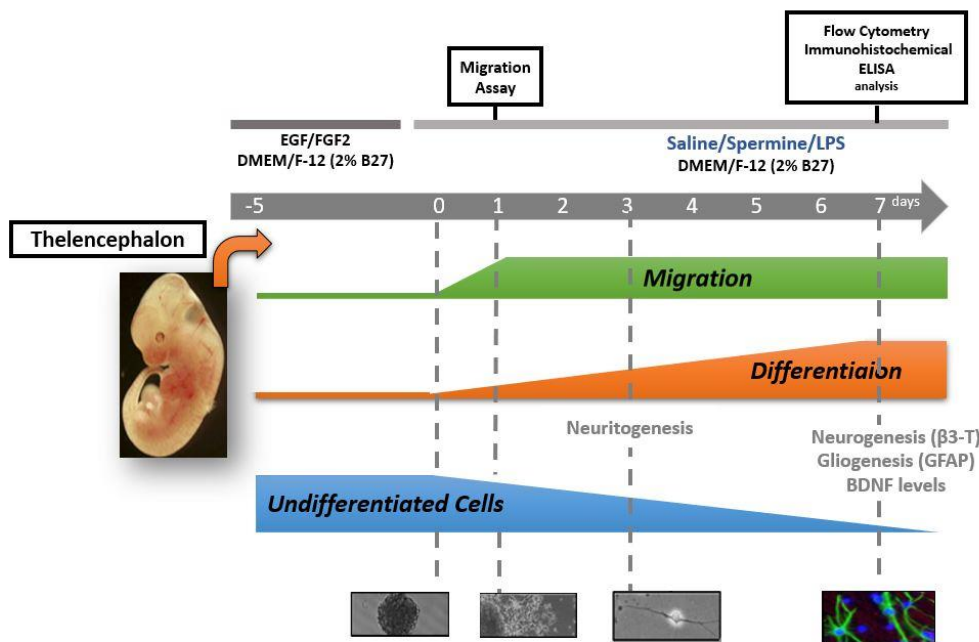


Fig. 1. Representative *in vitro* formation, migration and differentiation of neural stem cells (NSCs). The migration pattern can be visualized in the bottom images on the first day of differentiation, while the progress of differentiation can be visualized by neurite outgrowth on the third day, and by neurogenesis and gliogenesis on the seventh day. The phenotypic differentiation of NSCs, can be determinate by the cell markers: glial fibrillary acidic protein (GFAP) and β 3-Tubulin.

2.2. Migration and neuritogenesis of NSCs

Migration rate was evaluated on day 1 of differentiation as the distance of the foremost cells to the neurosphere boundary, analyzed by differential interference contrast (DIC) microscopy. In brief, cells were examined using a phase-contrast microscope (DP72; Olympus, Tokyo, Japan). Neurite (number and length) was examined on the third day of differentiation in the absence or presence of different treatment regimens. For the neurite growth assay, the total number of cells in the field was counted and those displaying projections 1.5 times longer than the cell body length were considered positive. Each data point corresponds to the counts obtained from three or four independent wells. Neural migration and neurite length were calculated by the Image J program. All experiments were performed in triplicate. Neurospheres of similar diameter were used in this assay.

2.3. BDNF measurement

BDNF levels were measured in differentiated cells (day 7) cultured for 16 h in absence or presence of 100 nM LPS or 1, 10 or 100 nM spermine. BDNF production was measured by the BDNF Emax® Immuno Assay System (Promega) according to the manufacturer procedures. The optical densities were determined at 450 nm in a microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

2.4. Flow cytometry

Flow cytometry was used to quantify neurogenesis using β 3-tubulin, a neuronal marker, and experiments were performed as described previously (Trujillo et al., 2012). Briefly, cells were detached from T-25 flasks using 0.25% trypsin (1 mL; Gibco-Life Technologies, São Paulo, Brazil) for 5 min at 37°C and mechanically dissociated to a single-cell suspension after the addition of FBS (0.5 mL). Cells were passed through a 40- μ m cell strainer, centrifuged, then fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde at room temperature (for fixation), washed with phosphate-buffered saline (PBS), supplemented with 3% of FBS, and incubated at room temperature for 30 min with rabbit mouse anti- β 3-tubulin (1:500; Sigma Aldrich) primary antibodies in PBS plus 0.1% Triton X-100 (for permeabilization of cell membranes), and 3% FBS. After washing, cells were incubated with 555-labeled secondary antibodies and then analyzed in a flow cytometer (Beckman Coulter, Fc500, Fullerton, CA). Thirty-thousand events were acquired per sample with fluorescence measured in logarithmic scales. Forward and side light-scatter signals were used to exclude dead cells and debris. Data were analyzed using the FlowJo V10 software (Ashland, OR). Further details are provided in Supporting Information MIFlowCyt.

2.5. Immunocytochemistry

NSCs were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 minutes and washed with PBS containing 0.1% triton X-100. Antibodies against β 3-tubulin and GFAP were diluted 1:500 in PBS 0.1% triton X-100 for 2 hours. The cells washed with PBS containing 0.1% triton X-100 and incubated for 1 hour at room temperature with either a 1:1,000 dilution of goat anti-mouse IgG (Alexa Fluor 555; Invitrogen or Molecular probes, Eugene, OR, <http://probes.invitrogen.com>) or 1:1,000 dilution of goat anti-

rabbit IgG (Alexa Fluor488; Invitrogen or Molecular probes). After that, cells were incubated with DAPI solution (Sigma-Aldrich, 0.3 µg/ml). Images were obtained with a fluorescence microscope (Axiovert 200, Zeiss) (Pillat et al., 2016).

2.6. Statistical analysis

Data analysis was executed using one or two analysis of variance (ANOVA), depending on the experimental design. The Bonferroni's test was used for post hoc analysis, when indicated. A $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Spermine increased NSCs migration

Since the generation and migration of neurons to where they are needed in the brain is essential for the modification of neural circuitry (Ghashghaei et al., 2007), we initially studied whether spermine alters neural migration during *in vitro* differentiation.

A dose-effect curve was performed to examine the effect of spermine on NSCs migration. The migration assay was performed on day 1 of differentiation in the absence (control) or presence of spermine (1, 10 or 100 nM). NSCs had a radial migration pattern from the edge of neurospheres, where the region limited by the dotted lines comprised approximately 95% of migrating cells (Fig. 2A). Statistical analysis (one-way ANOVA) revealed a significant effect of spermine [$F(3,14) = 16.50$ $p < 0.01$, Fig. 2B]. *Post-hoc* analysis revealed that spermine (1 and 10 nM) increased the distance of cells to the neurosphere boundary, indicating that spermine increased cell migration in mouse neurospheres.

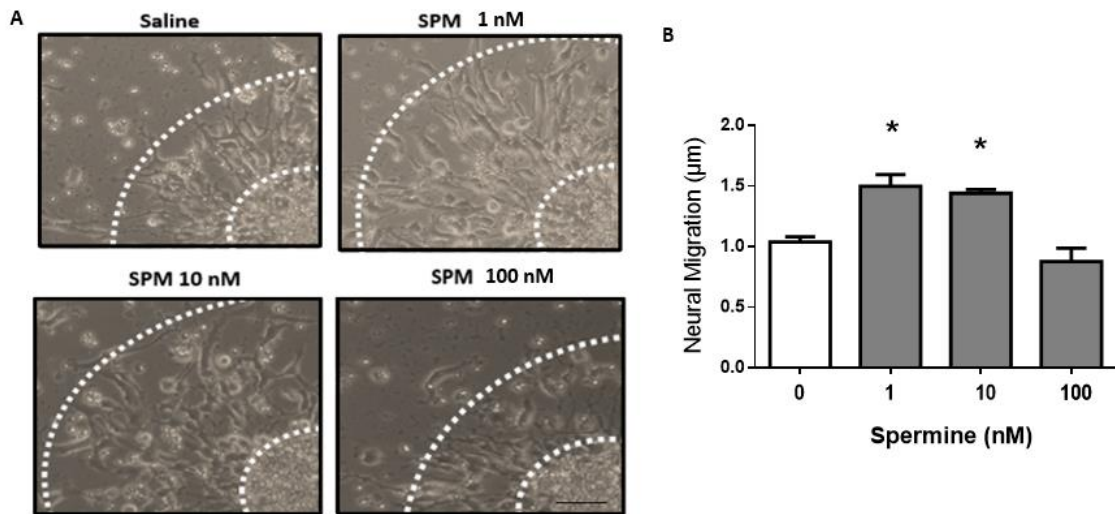


Fig. 2. Spermine increased the neural migration. Representative images from cells (A). The neural stem cells (NSCs) were treated in the presence or absence of spermine (1-100 nM). The region comprised by the dotted lines corresponds to approximately 95% of migrated cells. Spermine increased the neural migration (B). Data are expressed as mean + S.E.M., * $p < 0.05$ compared with SAL group (one-way ANOVA followed by the Bonferroni's post-hoc test). Scale = 50 μm .

3.2. Spermine ameliorated LPS-induced impairment of NSCs migration

Fig. 3 shows the effect of spermine on LPS-induced impairment of cell migration. Representative images of the radial migration pattern from the edge of neurospheres in the presence or absence of LPS (100 nM) and spermine (10 nM) are shown in Fig. 3A. Statistical analysis (two-way ANOVA) revealed a significant treatment (saline or LPS) by polyamine agonist (saline or spermine) interaction [$F(1, 17) = 29.28$; $p < 0.05$, Fig. 3B]. Post-hoc analysis showed that spermine prevented LPS-induced cell migration impairment.

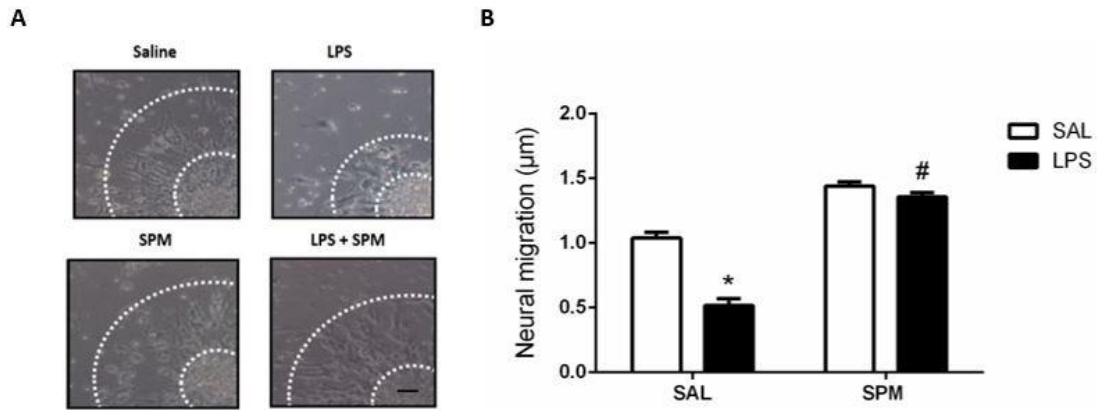


Fig. 3. Spermine prevented LPS-induced impairment of NSCs migration. Representative images from cells (A). Spermine prevented LPS-induced impairment of migration of NSCs (B). The NSCs were treated in the presence or absence of LPS (100 nM) and spermine (10 nM). The region comprised by the dotted lines corresponds to approximately 95% of migrated cells. Data are expressed as mean + S.E.M., * $p < 0.05$ compared with SAL group, # $p < 0.05$ compared with LPS/SAL group (two-way ANOVA followed by the Bonferroni's post-hoc test). Scale = 50 μm .

3.3. Spermine prevented LPS-induced impairment of neurite outgrowth

The effect of spermine (10 nM) and LPS (100 nM) on neuronal differentiation of NSCs was investigated. Representative images of cultures treated with LPS and or spermine are shown in Fig. 4A. Statistical analysis (two-way ANOVA) revealed a treatment (saline or LPS) versus polyamine agonist (saline or spermine) interaction [$F(1, 8) = 15.30$; $p < 0.05$, Fig. 4B] for neurite number and length [$F(1,8) = 7.648$; $p < 0.05$, Fig 4C]. Post-hoc analyses showed that spermine prevented LPS-induced decrease of neurite number and length, restoring neuritogenesis.

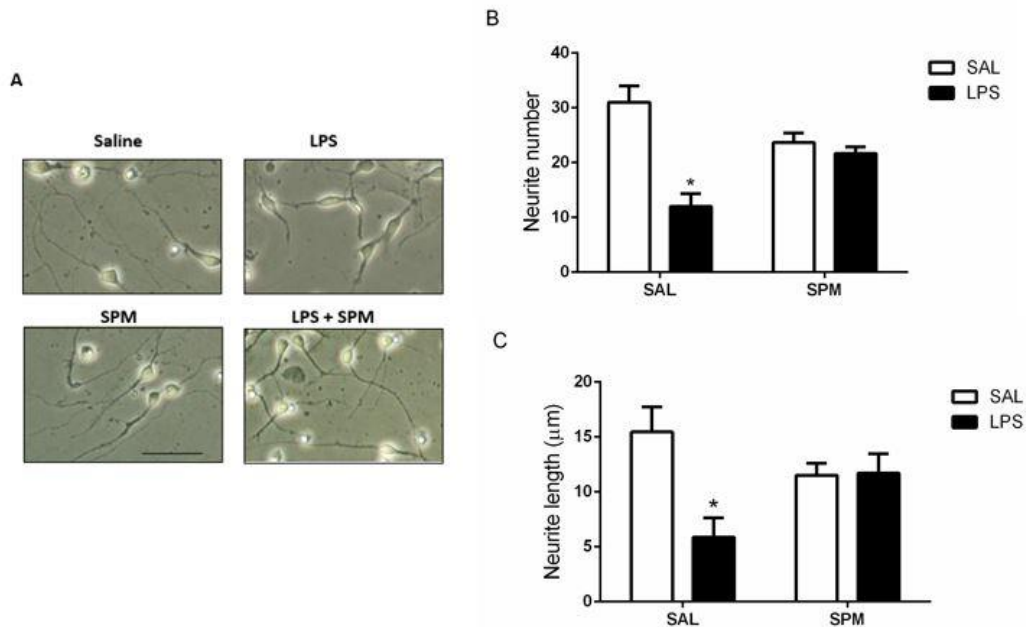


Fig. 4. Spermine prevented LPS-induced impairment of neurite outgrowth. Representative images from cells (A). Spermine prevented LPS-induced impairment on number of primary neuritis (B) and length of neurites (C) in NSCs. Contrast images representing neuritogenesis pattern after 3 days of neural differentiation. The NSCs were treated in the presence or absence of LPS (100 nM) and spermine (10 nM). Data are expressed as mean + S.E.M., * $p < 0.05$ compared with control (saline) group, (two-way ANOVA followed by the Bonferroni's post-hoc test). Scale = 50 μm .

3.4. Spermine prevented LPS-induced BDNF decrease in NSCs

The effect of spermine (1, 10 or 100 nM) on BDNF content of NSCs was investigated on day 7 (Fig. 1). Statistical analysis revealed significant effect of treatment [$F(3,16) = 11.11$; $p < 0.05$] and *post-hoc* analysis revealed that spermine (100 nM) increased BDNF levels (Fig. 5).

We also investigated whether co-incubation with spermine (1, 10 or 100 nM) prevented LPS (100 nM)-induced reduction of BDNF levels. Statistical analysis (two-way ANOVA) on BDNF levels data revealed a significant treatment (saline or LPS) versus polyamine agonist (saline or spermine) interaction [$F(3,16) = 14.96$; $p < 0.05$]. *Post-hoc* analysis revealed that spermine prevented LPS-induced decrease of BDNF levels (Fig. 5).

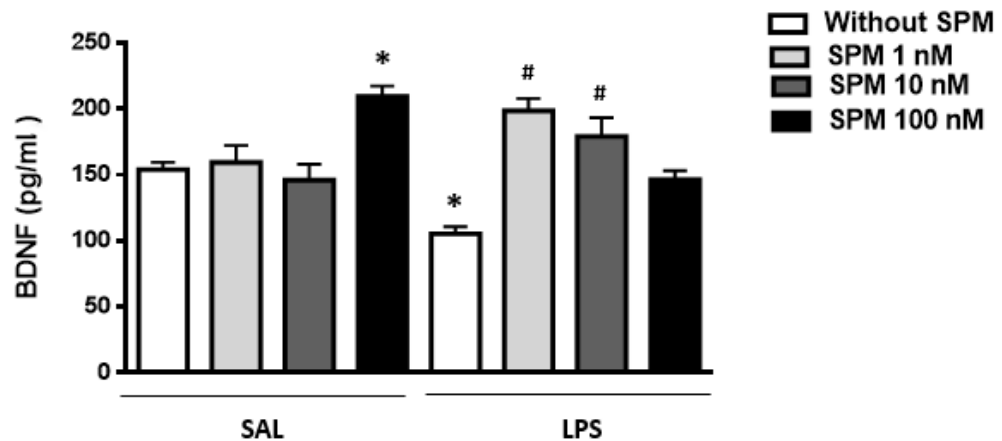


Fig. 5. Spermine prevented LPS-induced BDNF decrease in NSCs. Spermine increase *per se* (100 nM) and restored (1nM and 10 nM) LPS (100 nM) induced reduction in BDNF in NSCs. BDNF levels were measured in differentiated cells (day 7) cultured in the absence or presence of spermine (1-100 nM) and LPS (100 nM) (by enzyme-immunoassay). Data are expressed as mean + S.E.M., * $p < 0.05$ compared with SAL group, # $p < 0.05$, compared with LPS without spermine group.

3.5. Spermine prevented LPS-induced decrease of neuronal differentiation of NSCs

In order to examine the effects of spermine on the neuronal differentiation of NSCs, we investigated the expression of $\beta 3$ -tubulin in the presence of spermine (10 nM) and/or LPS (100 nM) seven days after NSCs plating. Representative images of immunocytochemical $\beta 3$ -tubulin positive cells (Red), are shown in Fig. 6A. Statistical analysis (two-way ANOVA), revealed a significant treatment (saline or LPS) versus polyamine agonist (saline or spermine) interaction [$F(1,8) = 9.96$; $p < 0.05$, Fig. 6B]. Post-hoc analysis showed spermine prevents LPS-induced neuronal differentiation impairment.

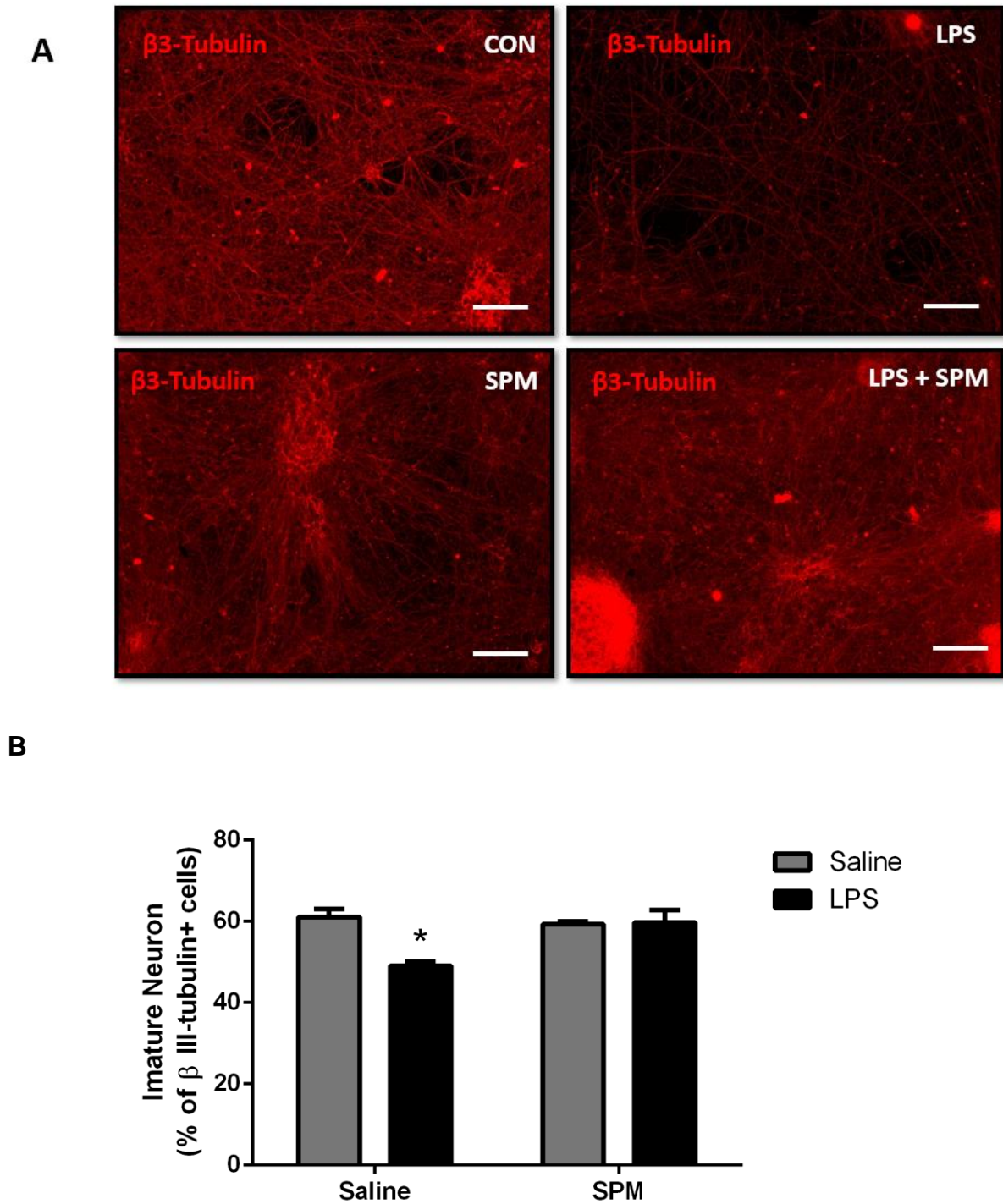
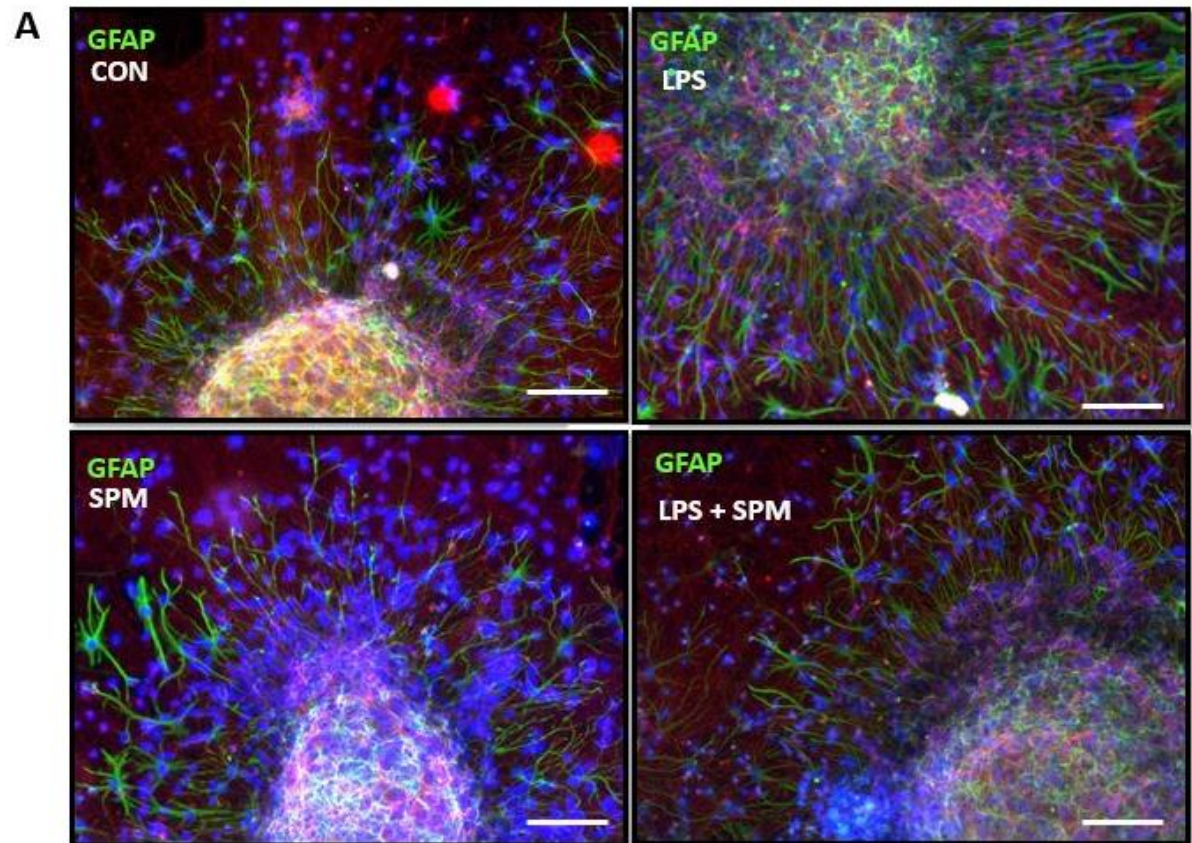


Fig. 6. Spermine prevented LPS-induced decrease of neuronal differentiation of NSCs. Representative images of immunocytochemical β 3-tubulin positive cells (Red) (A) and flow cytometry analysis (B) of β 3-tubulin expression in neurosphere differentiated in presence or absence of SPM and LPS. Seven days after migration, neurospheres were plated onto adherent surfaces in medium deprived of growth factors in presence or absence of SPM (10 nM) and LPS (100 nM). The images are representative of 3 experiments for each group, which gave similar results. CON = Control; LPS = direct addition of LPS alone into NSC differentiation media; SPM = direct addition of spermine alone into NSC differentiation

media; LPS+SPM = direct addition of LPS plus spermine into NSCs differentiation media. Data are expressed as mean + S.E.M., * $p < 0.05$ compared with SAL group. Scale bar = 50 μm .

3.6. Spermine prevented LPS-induced gliogenesis.

In order to examine the effects of spermine on the gliogenesis of NSCs we investigated the expression of GFAP in the presence of spermine (10 nM) and/or LPS (100 nM) seven days after NSC plating. Representative images of immunocytochemical GFAP positive cells (Green) and nuclei (DAPI-blue), are shown in Fig. 7A. Statistical analysis (two-way ANOVA), revealed a significant treatment (saline or LPS) versus polyamine agonist (saline or spermine) interaction [$F(1, 8) = 12.14$; $p < 0.01$, Fig. 7B] Post-hoc analysis showed spermine prevents LPS-induced glial differentiation increase.



B

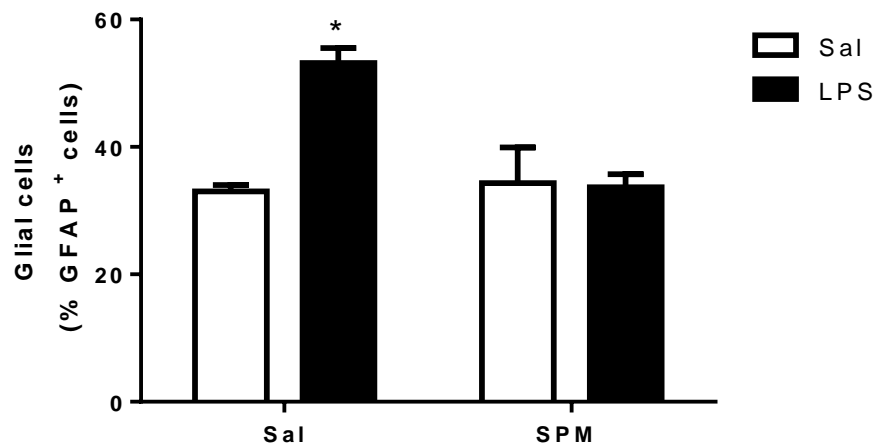


Fig. 7. Spermine prevented LPS-induced gliogenesis. Immunocytochemical staining in neurosphere differentiated in presence or absence of spermine and LPS (A). Differentiated NSCs were stained with cell-type-specific marker for GFAP (green), observed with a confocal microscope. The proportion of immunochemically stained cells was counted relative to nuclei (DAPI) (B). NSCs were cultured for 7 days and double stained for GFAP. The images are representative of 3 experiments for each group, which gave similar results. Abbreviations: GFAP, glial fibrillary acidic protein; DAPI = 4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride. CON = Control; LPS = direct addition of LPS alone into NSC differentiation

media; SPM = direct addition of spermine alone into NSC differentiation media; LPS+SPM = direct addition of LPS plus spermine into NSCs differentiation media. Data are expressed as mean + S.E.M., *p < 0.05 compared with SAL group. Scale bar = 50 μ m.

4. Discussion

The current study provides experimental evidence that spermine increases NSCs migration and neurogenesis. In addition, spermine protected from LPS-induced impairment of NSCs migration and neurogenesis, and LPS-induced decrease of BDNF levels, as well. LPS directed NSCs differentiation to a glial phenotype, decreasing the expression of the neuronal phenotype. Spermine also prevented this effect of LPS on cell fate.

The currently described protective effect of spermine against LPS-induced impairment of neurogenesis is in agreement with previous evidence that polyamines increase NSC migration and differentiation (Signor et al., 2017). Polyamines are important for cell growth, viability and cell division, mainly in rapidly proliferating cells such as parasites, bacteria, cancerous cells and developing brain (Pegg, 2016; Cohen, 1998; Teti et al., 2002; Minois et al., 2011; Pegg, 2009). Accordingly, polyamine deficiency delays cell cycle progression in most cells at the G1/S boundary because it decreases the rate of DNA synthesis, eventually leading to cell death (Yamashita et al., 2013; Igarashi and Kashiwagi, 2019).

Polyamines may have neurotrophic or neurotoxic effects, depending on their concentration in the tissue or cell culture medium (Minois et al., 2011). In line with this view, increasing levels of polyamines facilitate neuronal cell replication, neurogenesis, and synaptogenesis in the developing brain up to concentrations in the low nanomolar range (1-10 nM) (Slotkin and Bartolome, 1986). On the other hand, high concentrations of putrescine, spermidine, and spermine (100 nM or higher) decrease neuronal survival (Minois et al., 2011). These studies corroborate our results, because while low concentrations of spermine (1 and 10 nM) increased, 100 nM spermine did not alter NSCs migration, configuring a biphasic effect of spermine on NSC migration. In fact, a biphasic trophic effect of spermine (maximal effect at 10 nM) has been reported in embryonic neurons that seem to depend on the activation of NMDA receptors (Abe and Saito, 1993). Low concentrations of polyamines potentiate NMDA receptor-

mediated responses by binding at the dimer interface between GluN1 and GluN2B N-terminal domains (Mony et al., 2011), facilitating channel opening and calcium influx. Intracellular Ca^{2+} concentration is considered an essential signal to promote NSCs proliferation and survival (Jansson and Akerman 2014), because it triggers the release of trophic factors involved in excitation-induced proliferation (Joo et al., 2007). In fact, several studies have shown that NMDAr activation promotes proliferation (Fan et al., 2012; Bursztajn, et al., 2007; Mochizuki et al., 2007; Joo et al., 2007), migration (Signor et al., 2017; Jansson et al., 2013) and differentiation (Jansson et al., 2014, Joo et al., 2007; Arvidsson, et al., 2001) of neural stem cells. In addition, polyamines interact with DNA and RNA and stimulate protein biosynthesis in various types of cells, including initiation factors necessary for cell proliferation (Pegg, 2016). Other possible target for polyamines are protein kinases involved in cell division control (Bachrach et al., 2001). Therefore, there are multiple possible mechanisms that could underlie the currently described facilitatory effect of polyamines on NSCs proliferation and differentiation.

Current evidence indicates that inflammation-related activation of TLR-4 triggers neurogenic program change (Estrada et al., 2017; Rolls et al., 2007), impairing neural differentiation, probably by blocking or reducing neurotrophic signaling pathways (Raetz and Whitfield, 2002; Fruhauf-Perez et al., 2018; Zhang et al., 2016). In line with this view, our study showed BDNF levels reduction on the seventh day of differentiation, which accompanied LPS-induced impairment of neurogenesis. Interestingly, our results showed that the two low concentrations of spermine prevented LPS-induced decrease of BDNF levels. It is possible that spermine increases BDNF, either by interacting with NR2B-containing NMDAr, facilitating glutamate binding and calcium influx (Mony et al., 2011), which culminates in the activation of CREB and consequent BDNF gene transcription or other putative mechanism (Iragashi and Kashiwagi, 2019) as mentioned above.

Our study shows that spermine enhances neural network connectivity, restores neurogenesis and increases neurotrophic factor levels of NSCs. However, further investigation is necessary to clarify the mechanisms by which polyamines restores these parameters under neuroinflammatory conditions. Here we show that spermine targets may restore the balance between neurogenesis and gliogenesis in an inflammatory process, representing a novel and perspective for neuro-restoration.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (303417/2018-8) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul-FAPERGS (2342-2551/14-6). CFM and MAR are recipients of CNPq fellowships. MMP is recipient of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo fellowship (FAPESP 2015/19478-3). FAPESP Proc. No. 2012/50880-4, granted to H.U. PKFP, BAG and FTV are recipients of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES fellowships.

References

- Abe, K., & Saito, H., 1993. Pharmacological isolation and characterization of NMDA receptor-mediated synaptic potential in the dentate gyrus of rat hippocampal slices. *Jpn J. Pharmacol.* 61, 333-340.
- Arvidsson, A., Kokaia, Z., & Lindvall, O., 2001. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke. *Eur J Neurosci.* 14, 10-18.
- Bachrach, U., Wang, Y. C., & Tabib, A., 2001. Polyamines: new cues in cellular signal transduction. *News Physiol. Sci.* 16, 106-109.
- Beurel, E., & Jope, R. S., 2009. Lipopolysaccharide-induced interleukin-6 production is controlled by glycogen synthase kinase-3 and STAT3 in the brain. *J. Neuroinflammation.* 6, 9.
- Bursztajn, S., Falls, W. A., Berman, S. A., & Friedman, M. J., 2007. Cell proliferation in the brains of NMDAR NR1 transgenic mice. *Brain Res.* 1172, 10-20.
- Cameron, H. A., Hazel, T. G., & McKay, R. D., 1998. Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. *J. Neurobiol.* 36, 287-306.
- Clarke, D. L., Johansson, C. B., Wilbertz, J., Veress, B., Nilsson, E., Karlstrom, H., Lendahl, U., & Frisen, J., 2000. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science.* 288, 1660-1663.
- Cohen-Cory, S., Kidane, A. H., Shirkey, N. J., & Marshak, S., 2010. Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity. *Dev. Neurobiol.* 70, 271-288.
- Deisseroth, K., Singla, S., Toda, H., Monje, M., Palmer, T. D., & Malenka, R. C., 2004. Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells. *Neuron.* 42, 535-552.
- Dinel, A. L., Joffre, C., Trifilieff, P., Aubert, A., Foury, A., Le Ruyet, P., & Laye, S., 2014. Inflammation early in life is a vulnerability factor for emotional behavior at adolescence and for lipopolysaccharide-induced spatial memory and neurogenesis alteration at adulthood. *J. Neuroinflammation.* 11, 155.
- Estrada, S. M., Thagard, A. S., Lane, A. D., Dehart, M. J., Burd, I., Napolitano, P. G., & Ieronimakis, N., 2017. Bacterial endotoxin exposure invokes transcriptional changes in embryonic murine neural stem cells. *Am J. Obstet. Gynecol.* 217, 488-489.
- Fan, H., Gao, J., Wang, W., Li, X., Xu, T., & Yin, X., 2012. Expression of NMDA receptor and its effect on cell proliferation in the subventricular zone of neonatal rat brain. *Cell Biochem. Biophys.* 62, 305-316.
- Ferreira, F. F., Ribeiro, F. F., Rodrigues, R. S., Sebastiao, A. M., & Xapelli, S., 2018. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Role in Cannabinoid-Mediated Neurogenesis. *Front. Cell Neurosci.* 12, 441.
- Foltran, R. B., & Diaz, S. L., 2016. BDNF isoforms: a round trip ticket between neurogenesis and serotonin? *J. Neurochem.* 138, 204-221.

- Fruhauf-Perez, P. K., Temp, F. R., Pillat, M. M., Signor, C., Wendel, A. L., Ulrich, H., Mello, C. F., & Rubin, M. A., 2018. Spermine protects from LPS-induced memory deficit via BDNF and TrkB activation. *Neurobiol. Learn. Mem.* 149, 135-143.
- Ghashghaei, H.T., Lai, C., Anton, E.S., 2007. Neuronal migration in the adult brain: are we there yet? *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 141-51.
- Gioannini, T. L., Teghanemt, A., Zhang, D., Coussens, N. P., Dockstader, W., Ramaswamy, S., & Weiss, J. P., 2004. Isolation of an endotoxin-MD-2 complex that produces Toll-like receptor 4-dependent cell activation at picomolar concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101, 4186-4191.
- Go, H. S., Shin, C. Y., Lee, S. H., Jeon, S. J., Kim, K. C., Choi, C. S., & Ko, K. H., 2009. Increased proliferation and gliogenesis of cultured rat neural progenitor cells by lipopolysaccharide-stimulated astrocytes. *Neuroimmunomodulation.* 16, 365-376.
- Gross, R. E., Mehler, M. F., Mabie, P. C., Zang, Z., Santschi, L., & Kessler, J. A., 1996. Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron.* 17, 595-606.
- Hill, J. D., Zuluaga-Ramirez, V., Gajghate, S., Winfield, M., & Persidsky, Y., 2018. Activation of GPR55 increases neural stem cell proliferation and promotes early adult hippocampal neurogenesis. *Br J. Pharmacol.* 16, 3407-3421.
- Horch, H. W., & Katz, L. C., 2002. BDNF release from single cells elicits local dendritic growth in nearby neurons. *Nat. Neurosci.* 5, 1177-1184.
- Huang, E. J., & Reichardt, L. F., 2001. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 677-736.
- Igarashi, K., & Kashiwagi, K., 2019. The functional role of polyamines in eukaryotic cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 107, 104-115.
- Jansson, L. C., & Akerman, K. E., 2014. The role of glutamate and its receptors in the proliferation, migration, differentiation and survival of neural progenitor cells. *J. Neural Transm. (Vienna).* 121, 819-836.
- Jansson, L. C., Louhivuori, L., Wigren, H. K., Nordstrom, T., Louhivuori, V., Castren, M. L., & Akerman, K. E., 2012. Brain-derived neurotrophic factor increases the motility of a particular N-methyl-D-aspartate /GABA-responsive subset of neural progenitor cells. *Neuroscience.* 224, 223-234.
- Jansson, L. C., Louhivuori, L., Wigren, H. K., Nordstrom, T., Louhivuori, V., Castren, M. L., & Akerman, K. E., 2013. Effect of glutamate receptor antagonists on migrating neural progenitor cells. *Eur. J. Neurosci.* 37, 1369-1382.
- Ji, Y., Lu, Y., Yang, F., Shen, W., Tang, T. T., Feng, L., 2010. Acute and gradual increases in BDNF concentration elicit distinct signaling and functions in neurons. *Nat. Neurosci.* 13, 302–309.
- Jiao, Y., Palmgren, B., Novozhilova, E., Englund Johansson, U., Spieles-Engemann, A. L., Kale, A., Stupp, S. I., & Olivius, P., 2014. BDNF increases survival and neuronal differentiation of human neural precursor cells cotransplanted with a nanofiber gel to the auditory nerve in a rat model of neuronal damage. *Biomed Res. Int.* 2014, 356415.
- Jonakait, G. M., 2007. The effects of maternal inflammation on neuronal development: possible mechanisms. *Int. J. Dev. Neurosci.* 25, 415-425.

- Joo, J. Y., Kim, B. W., Lee, J. S., Park, J. Y., Kim, S., Yun, Y. J., Lee, S. H., Lee, S. H., Rhim, H., & Son, H., 2007. Activation of NMDA receptors increases proliferation and differentiation of hippocampal neural progenitor cells. *J. Cell. Sci.* 120, 1358-1370.
- Leal, G., Bramham, C. R., & Duarte, C. B., 2017. BDNF and Hippocampal Synaptic Plasticity. *Vitam. Horm.* 104, 153-195
- Lei, H., Zhang, Y., Huang, L., Xu, S., Li, J., Yang, L., Wang, L., Xing, C., Wang, X., & Peng, Y., 2018. L-3-n-Butylphthalide Regulates Proliferation, Migration, and Differentiation of Neural Stem Cell In Vitro and Promotes Neurogenesis in APP/PS1 Mouse Model by Regulating BDNF/TrkB/CREB/Akt Pathway. *Neurotox. Res.* 34, 477-488.
- Li, X., & Jope, R. S., 2010. Is glycogen synthase kinase-3 a central modulator in mood regulation? *Neuropsychopharmacol.* 35, 2143-2154.
- Lin, Y. L., & Wang, S., 2014. Prenatal lipopolysaccharide exposure increases depression-like behaviors and reduces hippocampal neurogenesis in adult rats. *Behav. Brain Res.* 259, 24-34.
- Luk, K. C., Kennedy, T. E., & Sadikot, A. F., 2003. Glutamate promotes proliferation of striatal neuronal progenitors by an NMDA receptor-mediated mechanism. *J. Neurosci.* 23, 2239-2250.
- Martinez-Cerdeno, V., Noctor, S. C., 2018. Neural Progenitor Cell Terminology. *Front. Neuroanat.* 12, 104
- McAllister, A. K., Lo, D. C., & Katz, L. C., 1995. Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron.* 15, 791-803.
- Michalski, B., Corrada, M. M., Kawas, C. H., & Fahnestock, M., 2015. Brain-derived neurotrophic factor and TrkB expression in the "oldest-old," the 90+ Study: correlation with cognitive status and levels of soluble amyloid-beta. *Neurobiol. Aging.* 36, 3130-3139.
- Minois, N., Carmona-Gutierrez, D., & Madeo, F., 2011. Polyamines in aging and disease. *Aging (Albany NY).* 3, 716-732.
- Mochizuki, N., Takagi, N., Kurokawa, K., Kawai, T., Besshoh, S., Tanonaka, K., & Takeo, S., 2007. Effect of NMDA receptor antagonist on proliferation of neurospheres from embryonic brain. *Neurosci. Lett.* 417, 143-148.
- Mony, L., Zhu, S., Carvalho, S., & Paoletti, P., 2011. Molecular basis of positive allosteric modulation of GluN2B NMDA receptors by polyamines. *EMBO J.* 30, 3134-3146.
- Muotri, A. R., & Gage, F. H., 2006. Generation of neuronal variability and complexity. *Nature.* 441, 1087-1093.
- Numakawa, T., Odaka, H., & Adachi, N., 2017. Actions of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Glucocorticoid Stress in Neurogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 18.
- Oishi, K., Ogawa, Y., Gamoh, S., & Uchida, M. K., 2002. Contractile responses of smooth muscle cells differentiated from rat neural stem cells. *J. Physiol.* 540, 139-152.
- Pegg, A. E., 2009. Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life.* 61, 880-894.
- Pegg, A. E., 2016. Functions of Polyamines in Mammals. *J. Biol. Chem.* 291, 14904-14912.

- Pillat, M. M., Cheffer, A., de Andrade, C. M., Morsch, V. M., Schetinger, M. R., & Ulrich, H., 2015. Bradykinin-induced inhibition of proliferation rate during neurosphere differentiation: consequence or cause of neuronal enrichment? *Cytometry A*. 87, 929-935.
- Pillat, M. M., Lameu, C., Trujillo, C. A., Glaser, T., Cappellari, A. R., Negraes, P. D., Battastini, A. M., Schwindt, T. T., Muotri, A. R., & Ulrich, H., 2016. Bradykinin promotes neuron-generating division of neural progenitor cells through ERK activation. *J. Cell Sci.* 129, 3437-3448.
- Raetz, C. R., & Whitfield, C., 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 635-700.
- Rolls, A., Shechter, R., London, A., Ziv, Y., Ronen, A., Levy, R., & Schwartz, M., 2007. Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nat. Cell Biol.* 9, 1081-1088.
- S.S. Cohen, *A Guide to the Polyamines*, Oxford University Press, New York, 1998.
- Schaafsma, W., Basterra, L. B., Jacobs, S., Brouwer, N., Meerlo, P., Schaafsma, A., Boddeke, E., & Eggen, B. J. L., 2017. Maternal inflammation induces immune activation of fetal microglia and leads to disrupted microglia immune responses, behavior, and learning performance in adulthood. *Neurobiol. Dis.* 106, 291-300.
- Shi, W. Z., Miao, Y. L., Guo, W. Z., Wu, W., Li, B. W., An, L. N., Fang, W. W., & Mi, W. D., 2014. Leptin reverses corticosterone-induced inhibition of neural stem cell proliferation through activating the NR2B subunits of NMDA receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 447, 95-100.
- Signor, C., Girardi, B. A., Lorena Wendel, A., Fruhauf, P. K. S., Pillat, M. M., Ulrich, H., Mello, C. F., & Rubin, M. A., 2017. Spermidine improves the persistence of reconsolidated fear memory and neural differentiation in vitro: Involvement of BDNF. *Neurobiol. Learn. Mem.* 140, 82-91.
- Slotkin, T. A., & Bartolome, J., 1986. Role of ornithine decarboxylase and the polyamines in nervous system development: a review. *Brain Res. Bull.* 17, 307-320.
- Tanila, H., 2016. The role of BDNF in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 97, 114-118.
- Teti, D., Visalli, M., & McNair, H., 2002. Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 781, 107-149.
- Trujillo, C. A., Negraes, P. D., Schwindt, T. T., Lameu, C., Carromeu, C., Muotri, A. R., Pesquero, J. B., Cerqueira, D. M., Pillat, M. M., de Souza, H. D., Turaca, L. T., Abreu, J. G., & Ulrich, H., 2012. Kinin-B2 receptor activity determines the differentiation fate of neural stem cells. *J. Biol. Chem.* 287, 44046-44061.
- Waterhouse, E.G.; An, J.J.; Orefice, L.L.; Baydyuk, M.; Liao, G.Y.; Zheng, K.; Lu, B.; Xu, B., 2012. BDNF promotes differentiation and maturation of adult-born neurons through GABAergic transmission. *J. Neurosci.* 32, 14318-14330.
- Yamashita, T., Nishimura, K., Saiki, R., Okudaira, H., Tome, M., Higashi, K., Nakamura, M., Terui, Y., Fujiwara, K., Kashiwagi, K., & Igarashi, K., 2013. Role of polyamines at the G1/S boundary and G2/M phase of the cell cycle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 1042-1050.
- Zhang, X. Y., Tan, Y. L., Chen, D. C., Tan, S. P., Yang, F. D., Wu, H. E., Zunta-Soares, G. B., Huang, X. F., Kosten, T. R., & Soares, J. C., 2016. Interaction of BDNF with cytokines in chronic schizophrenia. *Brain Behav. Immun.* 51, 169-175.

4 DISCUSSÃO

No presente estudo mostramos que 1) o efeito protetor da espermina sobre o prejuízo da memória induzido por LPS em camundongos foi dependente do aumento dos níveis de BDNF maduro, da ativação do receptor TrkB bem como da fosforilação da CREB; 2) a espermina exerceu efeito protetor sobre a neurogênese em células tronco neurais (CTNs) tratadas com LPS, bem como restaurou os níveis de BDNF, a proliferação e diferenciação neuronal, e também preveniu o aumento da gliogênese induzidos por LPS.

Com base nos resultados apresentados nesse trabalho, sugere-se que a espermina possui efeito neuroprotetor em condições de neuroinflamação. A capacidade desta poliamina em proteger a memória de camundongos contra os danos induzidos por LPS se dá principalmente por restaurar a ativação de vias essenciais à formação da memória.

Tem sido mostrado que a ativação dos receptores NMDA pode levar ao aumento dos níveis de BDNF (total e maduro) através da ativação de duas vias: **(1)** aumento do BDNF total: síntese de BDNF via ativação da CREB (MAQSOOD & STONE, 2016), uma vez que, o influxo de cálcio induzido pela despolarização dos canais de cálcio leva a ligação de fatores de transcrição, como fator de resposta ao Ca^{2+} e CREB ao DNA, resultando na transcrição gênica de BDNF (PARK *et al.*, 2014). **(2)** Aumento de BDNF maduro: os níveis elevados de cálcio intracelular (pós ativação NMDA), desencadeiam a liberação do ativador de plasminogênio tecidual (t-PA) na fenda sináptica, aumentando os níveis de plasmina, desencadeando com isso, a conversão de pró-BDNF em BDNF maduro (PETERS *et al.*, 2018) (Figura. 7).

Os resultados de nosso estudo estão em conformidade com o exposto. Uma vez que o antagonista do receptor TrkB, ANA-12, impediu o efeito protetor da espermina sobre a memória de camundongos tratados com LPS, na tarefa de reconhecimento de objetos. Mostrando que o efeito desta poliamina é dependente da ativação do receptor TrkB. Portanto, sugere-se que o BDNF em sua forma madura está envolvido no efeito protetor da espermina. Isso se confirmou com os resultados de que a espermina reverteu a diminuição dos níveis de BDNF maduro tanto no hipocampo quanto no córtex cerebral de animais tratados com LPS. Ainda foi mostrado o envolvimento da ativação da CREB no efeito protetor da espermina.

Sendo assim, podemos sugerir que o influxo de cálcio consequente da ativação do receptor NMDA pela espermina desencadeia a reversão dos danos induzidos por LPS, através da ativação direta da via CREB/BDNF. Ainda, consideramos também a possibilidade deste evento estar sendo favorecido, via liberação de t-PA na fenda sináptica, uma vez que a ativação do receptor NMDA medeia positivamente a sinalização do t-PA (GONIAS *et al.*, 2018). Portanto, nesse caso, a espermina estaria estimulando a produção direta de BDNF maduro (Figura 7). Isso corrobora com estudos que têm mostrado que a ativação do receptor TrkB pelo BDNF ativa a via PI3K/AKT culminando na fosforilação e aumento da atividade da CREB (BAI *et al.*, 2019). Por outro lado, a ativação da CREB aumenta os níveis de BDNF (ALBERINE & KANDEL *et al.*, 2015; ORTEGA-MARTINEZ, 2015; BEKINSCHTEIN *et al.*, 2014; BEKINSCHTEIN *et al.*, 2008) (Figura 7). A fim de elucidar este mecanismo com mais precisão, mais estudos são necessários, utilizando-se, por exemplo, um inibidor de t-PA para investigar o efeito deste sobre os níveis de BDNF maduro em animais tratados com espermina e LPS.

Corroborando com nossos resultados, muitos estudos têm mostrado a relação existente entre o receptor NMDA e BDNF, tanto na transmissão sináptica, como na memória e neuro-restauração (CROZIER *et al.*, 1999, LIHN *et al.*, 1998; ZHOU *et al.*, 2018; CALDEIRA *et al.*, 2007; MAQSOOD & STONE., 2016). Um exemplo disso é o estudo recente de Zhou e colaboradores (2018) o qual mostrou que os déficits de aprendizado e memória induzidos por propofol (além de ser um agente GABAérgico, atua como bloqueador do receptor NMDA) são acompanhados pela diminuição dos níveis de RNAm para BDNF maduro, rNMDA, p-CREB, p-TrkB. Ainda neste estudo, o tratamento tanto com agonista do receptor NMDA quanto com o agonista TrkB revertem a diminuição dos níveis de rNMDA, BDNF maduro e p-TrkB causada pela exposição ao propofol. Ambos os tratamentos revertem também os danos cognitivos.

A restauração da via CREB/BDNF culmina na ativação da neurogênese (ORTEGA-MARTINEZ, 2015), isso corrobora com os resultados de nosso segundo artigo, uma vez que, através de experimentos *in vitro*, mostramos que a espermina preveniu os danos sobre a neurogênese e sobre os níveis de BDNF induzidos por LPS em CTNs. De fato, vários mecanismos têm sido implicados nas alterações das funções neurais induzidas por LPS, uma vez que a ativação dos receptores *toll-like* afeta a neurogênese (ROLLS *et al.*, 2007), especificamente, a ativação de TLR-4, um receptor

específico para LPS, inibe tanto a proliferação quanto a diferenciação celular de CTNs (ROLLS *et al.*, 2007).

Diversos estudos têm mostrado que o balanço neurogliogênico é desregulado pela neuroinflamação (GO *et al.*, 2009; RUZSNAK *et al.*, 2016; MELO-SALLAS *et al.*, 2018), e esse desajuste está presente em diversas patologias neurológicas como Alzheimer, Parkinson, esclerose múltipla (RUSZNAK *et al.*, 2016). O estímulo inflamatório provocado por LPS (ativação do receptor TLR4 em CTNs, através da via Myd 188/PKC/NFkB, por exemplo), ativa células microgliais residentes, desencadeando a secreção de moléculas bioativas, como citocinas inflamatórias, que são determinantes na diferenciação neural à gliogênese, reduzindo drasticamente a neurogênese (ROLLS *et al.*, 2007; GO *et al.*, 2009).

A capacidade da espermina em reverter o dano à neurogênese induzida por LPS está em concordância com estudo recente no qual as poliaminas aumentam a migração e a diferenciação de CTNs (SIGNOR *et al.*, 2017). As poliaminas são componentes críticos do crescimento e divisão celular, particularmente em células de proliferação rápida, como bactérias, parasitas, células cancerosas e células neurais em desenvolvimento (COHEN, 1998; TETI *et al.*, 2002; MINOIS *et al.*, 2011; PEGG & CASERO, 2011). As poliaminas podem ter efeitos neurotróficos ou neurotóxicos, dependendo de sua concentração no tecido ou meio de cultura celular (MINOIS *et al.*, 2011). De acordo com essa visão, níveis crescentes de poliaminas facilitam a replicação de células neuronais, neurogênese e sinaptogênese no cérebro em desenvolvimento até concentrações na faixa nanomolar baixa (1-10 nM) (SLOTKIN & BARTOLOME, 1986). Por outro lado, altas concentrações de putrescina, espermidina e espermina (100 nM ou mais) diminuem a sobrevivência neuronal (MINOIS *et al.*, 2011). Esses estudos corroboram nossos resultados, porque enquanto baixas concentrações de espermina (1 e 10 nM) aumentaram, a espermina 100 nM não alterou a migração de CTNs, configurando um efeito bifásico da espermina na migração de CTNs. De fato, um efeito trófico bifásico da espermina (efeito máximo a 10 nM) é relatado em neurônios embrionários, o que parece ser dependente da ativação dos receptores NMDA (ABE & SAITO, 1993). As poliaminas, em baixas concentrações, modulam positivamente o receptor NMDA por se ligarem na interface do dímero entre os domínios GluN1 e GluN2B N-terminal (MONY *et al.*, 2011), e facilitarem a abertura do canal e influxo de cálcio. A concentração intracelular de Ca^{2+} é considerada um sinal essencial para promover a proliferação e sobrevivência das CTNs (JANSSON &

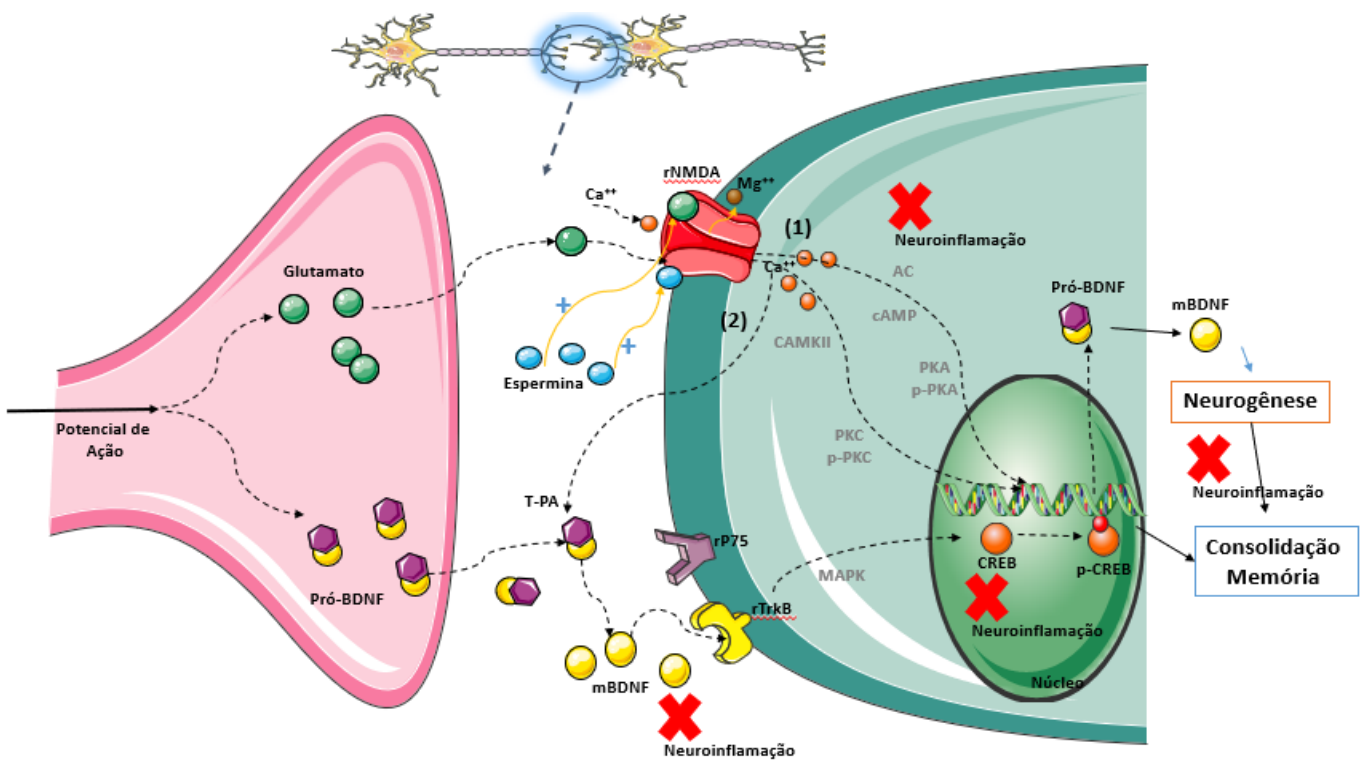
AKERMAN, 2014), uma vez que, desencadeia a liberação de fatores neurotróficos envolvidos na proliferação e diferenciação neuronal induzida por excitação (JOO *et al.*, 2007). De fato, em nosso estudo as concentrações de espermina que apresentaram efeito protetor sobre a migração e diferenciação neural, também preveniram a diminuição dos níveis de BDNF induzido por LPS. Ainda, deve-se considerar que as poliaminas interagem com o DNA e o RNA e estimulam a biossíntese de proteínas em vários tipos de células, incluindo os fatores de iniciação necessários para a proliferação celular (PEGG, 2016). Também, outro alvo possível para as poliaminas são proteínas cinases envolvidas no controle da divisão celular (BACHRACH *et al.*, 2001). Portanto, é importante ressaltar que existem vários possíveis mecanismos através dos quais as poliaminas podem desempenhar o efeito neuroprotetor na proliferação e diferenciação das CTNs.

Os resultados do presente estudo, sugerem que o efeito protetor da espermina está relacionado à restauração da conectividade da rede neuronal, convergindo aos resultados positivos desta poliamina sobre a memória. Estudos anteriores (*in vivo*) do nosso grupo de pesquisa têm mostrado que o efeito protetor da espermina sobre a memória se dá via receptor NMDA GluN2B (FRUHAUF *et al.*, 2015). O que possivelmente esteja acontecendo também *in vitro*. Por facilitar a ligação do glutamato ao seu receptor NMDA, a espermina desencadeia ativação de uma via dependente do influxo de cálcio, com a ativação de proteínas cinases como a PKA, CamKII, PKC, as quais ativam o fator de transcrição CREB (GUERRA *et al.*, 2012), que é modulador transcricional do BDNF (Figura 7). De fato, o BDNF modula diretamente a formação de novos neurônios no SNC (ALTAR *et al.*, 1997; HUANG *et al.*, 2001).

Portanto, nosso estudo fornece evidências que a espermina tem o potencial de reverter danos subjacentes à neuroinflamação, restaurando a memória, em modelos *in vivo*, bem como prevenindo danos na neurogênese e no reparo neuronal em modelo experimental *in vitro*. Tomados juntos, nossos dois estudos sugerem que o efeito protetor da espermina em condições de neuroinflamação, pode estar ocorrendo através da ativação de uma via chave, para a aprendizagem e memória: NMDA/CREB/BDNF e neurogênese (Figura 7). No entanto, para comprovar o envolvimento do efeito neurogênico da espermina sobre a memória é necessário um estudo mais específico, utilizando células hipocâmpais de cérebro maduro de animais tratados com esta poliamina em condições de neuroinfamação.

Atualmente, os benefícios terapêuticos das poliaminas vem sendo comprovados também em estudos clínicos. Esses estudos pioneiros utilizando suplementação alimentar com poliaminas em humanos têm mostrado segurança quanto a toxicidade (SCHWARZ et al., 2018) e confirmado a eficácia das poliaminas para a memória (WIRTH et al., 2018; 2019). Esses avanços têm estimulado, agregado valor às pesquisas e aberto novas possibilidades para a utilização clínica das poliaminas. Em vista do exposto, a espermina possui potencialidade para o futuro uso terapêutico em patologias associadas à neuroinflamação. Uma vez que, uma droga capaz de restaurar a memória e modular o equilíbrio entre neurogênese e gliogênese em um processo inflamatório, representa uma nova perspectiva para a neuro-restauração.

Fig. 7 Esquema do possível mecanismo de ação da espermina em reverter o dano de memória e neurogênese induzidos por LPS.



O potencial de ação libera glutamato e pro-BDNF na fenda sináptica. A espermina facilita a ligação do glutamato ao seu receptor NMDA, aumentando o influxo de cálcio celular. O cálcio desencadeia (1) ativação de um sistema de segundos mensageiros e proteínas cinases como CAMKII, PKA, PKC (2) liberação de t-PA na fenda sináptica o qual promove a conversão do pro-BDNF em BDNF maduro (mBDNF), ativando o receptor TrkB e a via MAPK; ambos eventos desencadeiam a fosforilação da CREB no núcleo celular, culminando com a transcrição gênica de BDNF, essencial para a formação da memória e neurogênese. O 'X' em vermelho representa pontos chave nos quais o processo de neuroinflamação bloqueia a memória e a neurogênese: Reduz a conversão de pro-BDNF em BDNF maduro, reduz a fosforilação de proteínas cinases essenciais e com isso reduz a fosforilação da CREB.

Fonte: do autor

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que:

- 1 O efeito positivo da espermina sobre a memória está relacionado com sua capacidade em reverter a diminuição dos níveis de BDNF maduro induzidos por LPS tanto no hipocampo quanto no córtex cerebral.
- 2 O efeito protetor da espermina sobre o prejuízo da memória induzido por LPS depende da ativação do receptor TrkB.
- 3 O efeito protetor da espermina sobre a memória de animais tratados com LPS está relacionado com o aumento na fosforilação da CREB.
- 4 A espermina protege a proliferação e diferenciação neural em estado de neuroinflamação, uma vez que previne os danos induzidos por LPS sobre a migração celular e neuritogênese.
- 5 A espermina modifica o destino neural em condições de inflamação, uma vez que previne os danos sobre a neurogênese, bem como reverte o aumento na gliogênese induzidos por LPS em células tronco neurais.
- 6 O efeito protetor da espermina sobre a neurogênese em condições de neuroinflamação pode ser dependente do aumento dos níveis de BDNF, uma vez que as mesmas concentrações de espermina que protegeram a migração e diferenciação neuronal, também restauraram os níveis de BDNF nessas mesmas condições.

5.1. CONCLUSÃO GERAL

Com base nos resultados do presente estudo, podemos concluir que o efeito protetor da espermina em condições de neuroinflamação ocorre pela restauração da via BDNF/TrkB/CREB e da neurogênese.

6 PERSPECTIVAS

A partir do exposto, torna-se interessante investigar o efeito da espermina na conversão do pró-BDNF em BDNF maduro. De fato, a espermina pode estar facilitando a via essencial da memória e induzindo a síntese de novas moléculas de BDNF através da ativação da CREB. No entanto, como já foi mencionado, os efeitos positivos do BDNF sobre a memória dependem dos níveis de sua forma madura e não total. Portanto nossa hipótese é que a espermina através da ativação do receptor NMDA, facilita a conversão de BDNF no meio extracelular através do aumento do t-PA na fenda sináptica.

Para isso, podemos investigar se a melhora da memória induzida pela espermina em animais tratados com LPS se dá pelo aumento de t-PA na fenda sináptica e se essa melhora pode ser bloqueada por inibidor de t-PA (PAI-I, Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1). Também, torna-se interessante investigar, por meio da técnica de Western Blot, se um antagonista do receptor NMDA (ifenprodil) poderia diminuir os níveis de t-PA e plasmina. Com isso poderemos sugerir mais fortemente que a espermina age na conversão extracelular de pró-BDNF em sua forma madura, o que abrirá um novo leque de estudo a respeito do efeito positivo das poliaminas sobre a memória.

7 REFERÊNCIAS

- ABE, K., & Saito, H. Pharmacological isolation and characterization of NMDA receptor-mediated synaptic potential in the dentate gyrus of rat hippocampal slices. **Jpn J Pharmacol**, 61, 333-340, 1993.
- ACHESON, A., Conover, J. C., Fandl, J. P., DeChiara, T. M., Russell, M., Thadani, A., Squinto, S. P., Yancopoulos, G. D., & Lindsay, R. M. A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. **Nature**, 374, 450-453, 1995.
- ALBERINI, C. M., & Kandel, E. R. The regulation of transcription in memory consolidation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 7, a021741. 2014.
- ALTAR, C. A., Cai, N., Bliven, T., Juhasz, M., Conner, J. M., Acheson, A. L., Lindsay, R. M., & Wiegand, S. J. Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. **Nature**, 389, 856-860, 1997.
- ANGELUCCI, F., Cechova, K., Prusa, R., & Hort, J. Amyloid beta soluble forms and plasminogen activation system in Alzheimer's disease: Consequences on extracellular maturation of brain-derived neurotrophic factor and therapeutic implications. **CNS Neurosci Ther**, 2018.
- ARVIDSSON, A., Kokaia, Z., & Lindvall, O. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke. **Eur J Neurosci**, 14, 10-18, 2001.
- BACHRACH, U., Wang, Y. C., & Tabib, A. Polyamines: new cues in cellular signal transduction. **News Physiol Sci**, 16, 106-109, 2001.
- BAI, L., Zhang, S., Zhou, X., Li, Y., & Bai, J. Brain-derived neurotrophic factor induces thioredoxin-1 expression through TrkB/Akt/CREB pathway in SH-SY5Y cells. **Biochimie**, 2019.
- BAILEY, C. H., Bartsch, D., & Kandel, E. R.. Toward a molecular definition of long-term memory storage. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 93, 13445-13452. 1996.
- BAILEY, C. H., KANDEL, E. R., & HARRIS, K. M. Structural components of Synaptic Plasticity and Memory Consolidation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, 2015.
- BALDERAS, I., Rodriguez-Ortiz, C. J., Salgado-Tonda, P., Chavez-Hurtado, J., McGaugh, J. L., & Bermudez-Rattoni, F. The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. **Learn Mem**, 15, 618-624, 2008.
- BANKS, P. J., BASHIR, Z. I., & BROWN, M. W.. Recognition memory and synaptic plasticity in the perirhinal and prefrontal cortices. **Hippocampus**, 22, 2012-2031, 2012.

- BARCO, A., BAILEY, C. H., & KANDEL, E. R. Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. **Journal of Neurochemistry**, v. 97, p. 1520–1533, 2006.
- BARTOLOME, J., Huguenard, J., & Slotkin, T. A. Role of ornithine decarboxylase in cardiac growth and hypertrophy. **Science**, 210, 793-794, 1980.
- BATHINA, S., & Das, U. N. Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. **Arch Med Sci**, 11, 1164-1178, 2015.
- BEKINSCHTEIN, P., Cammarota, M., & Medina, J. H. BDNF and memory processing. **Neuropharmacology**, 76 Pt C, 677-683, 2014.
- BEKINSCHTEIN, P., Cammarota, M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. BDNF and memory formation and storage. **Neuroscientist**, 14, 147-156, 2008.
- BEKINSCHTEIN, P., Cammarota, M., Igaz, L. M. *et al.* Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. **Neuron**, v. 53, p. 261-277, 2007.
- BENEDIKT, J., Inyushin, M., Kucheryavykh, Y. V., Rivera, Y., Kucheryavykh, L. Y., Nichols, C. G., Eaton, M. J., & Skatchkov, S. N. Intracellular polyamines enhance astrocytic coupling. **Neuroreport**, 23, 1021-1025, 2012.
- BERGMANN, O., & Frisen, J. Neuroscience. Why adults need new brain cells. **Science**, 340, 695-696, 2013.
- 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.
- BILBO, S. D., Biedenkapp, J. C., Der-Avakian, A., Watkins, L. R., Rudy, J. W., & Maier, S. F. Neonatal infection-induced memory impairment after lipopolysaccharide in adulthood is prevented via caspase-1 inhibition. **J Neurosci**, 25, 8000-8009, 2005.
- BINDER, D. K., & Scharfman, H. E. Brain-derived neurotrophic factor. **Growth Factors**, 22, 123-131, 2004.
- BJORKBACKA, H., Fitzgerald, K. A., Huet, F., Li, X., Gregory, J. A., Lee, M. A., Ordija, C. M., Dowley, N. E., Golenbock, D. T., & Freeman, M. W. The induction of macrophage gene expression by LPS predominantly utilizes Myd88-independent signaling cascades. **Physiol Genomics**, 19, 319-330, 2004.
- BROWN, M. W., Warburton, E. C., & Aggleton, J. P. Recognition memory: material, processes, and substrates. **Hippocampus**, 20, 1228-1244, 2010.
- BUDNI, J., Bellettini-Santos, T., Mina, F., Garcez, M. L., & Zugno, A. I. The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease. **Aging Dis**, 6, 331-341, 2015.
- BUDSON, A. E., Dodson, C. S., Daffner, K. R., & Schacter, D. L. Metacognition and false recognition in Alzheimer's disease: further exploration of the distinctiveness heuristic. **Neuropsychology**, 19, 253-258, 2005.

- BURSZTAJN, S., Falls, W. A., Berman, S. A., & Friedman, M. J. Cell proliferation in the brains of NMDAR NR1 transgenic mice. **Brain Res**, 1172, 10-20, 2007.
- CALDEIRA, M. V., Melo, C. V., Pereira, D. B., Carvalho, R. F., Carvalho, A. L., & Duarte, C. B. BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. **Mol Cell Neurosci**, 35, 208-219, 2007.
- CALSOLARO, V., & Edison, P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. **Alzheimers Dement**, 12, 719-732, 2016.
- 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.
- CAMERON, H. A., Hazel, T. G., & McKay, R. D. Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. **J Neurobiol**, 36, 287-306, 1998.
- CAO, X., Cui, Z., Feng, R., Tang, Y. P., Qin, Z., Mei, B., & Tsien, J. Z. Maintenance of superior learning and memory function in NR2B transgenic mice during ageing. **Eur J Neurosci**, 25, 1815-1822, 2007.
- CARLEZON, W. A., Jr., Duman, R. S., & Nestler, E. J. The many faces of CREB. **Trends Neurosci**, 28, 436-445, 2005.
- CARVALHO, F. B., Gutierrez, J. M., Bueno, A., Agostinho, P., Zago, A. M., Vieira, J., Fruhauf, P., Cechella, J. L., Nogueira, C. W., Oliveira, S. M., Rizzi, C., Spanevello, R. M., Duarte, M. M., Duarte, T., Dellagostin, O. A., & Andrade, C. M. Anthocyanins control neuroinflammation and consequent memory dysfunction in mice exposed to lipopolysaccharide. **Mol Neurobiol**, 2016.
- CHAO, M. V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. **Nat Rev Neurosci**, 4, 299-309, 2003.
- CHEN, A., Xiong, L. J., Tong, Y., & Mao, M. The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury. **Biomed Rep**, 1, 167-176, 2013.
- CHIDA, N., Saito, H., & Abe, K. Spermine facilitates the generation of long-term potentiation of evoked potential in the dentate gyrus of anesthetized rats. **Brain Res**, 593, 57-62, 1992.
- CHIU, C. C., Liao, Y. E., Yang, L. Y., Wang, J. Y., Tweedie, D., Karnati, H. K., Greig, N. H., & Wang, J. Y. Neuroinflammation in animal models of traumatic brain injury. **J Neurosci Methods**, 272, 38-49, 2016.
- CHOI, D. Y., Lee, J. W., Lin, G., Lee, Y. K., Lee, Y. H., Choi, I. S., Han, S. B., Jung, J. K., Kim, Y. H., Kim, K. H., Oh, K. W., Hong, J. T., & Lee, M. S. Obovatol attenuates LPS-induced memory impairments in mice via inhibition of NF-kappaB signaling pathway. **Neurochem Int**, 60, 68-77, 2012.
- CHOWDHURY, A. A., Gawali, N. B., Munshi, R., & Juvekar, A. R. Trigonelline insulates against oxidative stress, proinflammatory cytokines and restores BDNF levels in lipopolysaccharide induced cognitive impairment in adult mice. **Metab Brain Dis**, 33, 681-691, 2018.

- CHURCHWELL, J. C., Morris, A. M., Musso, N. D., & Kesner, R. P. Prefrontal and hippocampal contributions to encoding and retrieval of spatial memory. **Neurobiol Learn Mem**, 93, 415-421, 2010.
- CLARKE, D. L., Johansson, C. B., Wilbertz, J., Veress, B., Nilsson, E., Karlstrom, H., Lendahl, U., & Frisen, J. Generalized potential of adult neural stem cells. **Science**, 288, 1660-1663, 2000.
- COHEN, S.S., **A Guide to the Polyamines**, Oxford University Press, New York, 1998.
- COHEN-CORY, S., Kidane, A. H., Shirkey, N. J., & Marshak, S. Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity. **Dev Neurobiol**, 70, 271-288. 2010.
- COLLINGRIDGE, G. Synaptic plasticity. The role of NMDA receptors in learning and memory. **Nature**, 330, 604-605, 1987.
- CORIA-LUCERO, C. D., Golini, R. S., Ponce, I. T., Deyurka, N., Anzulovich, A. C., Delgado, S. M., & Navigatore-Fonzo, L. S. Rhythmic Bdnf and TrkB expression patterns in the prefrontal cortex are lost in aged rats. **Brain Res**, 1653, 51-58, 2016.
- 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.
- CROZIER, R. A., Black, I. B., & Plummer, M. R. Blockade of NR2B-containing NMDA receptors prevents BDNF enhancement of glutamatergic transmission in hippocampal neurons. **Learn Mem**, 6, 257-266, 1999.
- CUI, J. G., Hill, J. M., Zhao, Y., & Lukiw, W. J. Expression of inflammatory genes in the primary visual cortex of late-stage Alzheimer's disease. **Neuroreport**, 18, 115-119, 2007.
- CULLIS, P. M., Green, R. E., Merson-Davies, L., & Travis, N. Probing the mechanism of transport and compartmentalisation of polyamines in mammalian cells. **Chem Biol**, 6, 717-729, 1999.
- CUNNINGHAM, C., Champion, S., Teeling, J., Felton, L., & Perry, V. H. The sickness behaviour and CNS inflammatory mediator profile induced by systemic challenge of mice with synthetic double-stranded RNA (poly I:C). **Brain Behav Immun**, 21, 490-502, 2007.
- DATTA, G., Colasanti, A., Rabiner, E. A., Gunn, R. N., Malik, O., Ciccarelli, O., Nicholas, R., Van Vlierberghe, E., Van Hecke, W., Searle, G., Santos-Ribeiro, A., & Matthews, P. M. Neuroinflammation and its relationship to changes in brain volume and white matter lesions in multiple sclerosis. **Brain**, 140, 2927-2938, 2017.
- DE LA CRUZ, V., Rodriguez-Ortiz, C. J., Balderas, I., & Bermudez-Rattoni, F. Medial temporal lobe structures participate differentially in consolidation of safe and aversive taste memories. **Eur J Neurosci**, 28, 1377-1381, 2008.

- DE VERA, N., Artigas, F., Serratos, J., & Martinez, E. Changes in polyamine levels in rat brain after systemic kainic acid administration: relationship to convulsant activity and brain damage. **J Neurochem**, 57, 1-8, 1991.
- DICOU, E. Neurotrophins and neuronal migration in the developing rodent brain. **Brain Res Rev**, 60, 408-417, 2009.
- DINEL, A. L., Joffre, C., Trifilieff, P., Aubert, A., Foury, A., Le Ruyet, P., & Laye, S. Inflammation early in life is a vulnerability factor for emotional behavior at adolescence and for lipopolysaccharide-induced spatial memory and neurogenesis alteration at adulthood. **J Neuroinflammation**, 11, 155, 2014.
- DUDAI, Y. The restless engram: consolidations never end. **Annu Rev Neurosci**, 35, 227-247. 2012.
- DUDAS, R. B., Clague, F., Thompson, S. A., Graham, K. S., & Hodges, J. R. Episodic and semantic memory in mild cognitive impairment. **Neuropsychologia**, 43, 1266-1276, 2005.
- DUNZENDORFER, U., & Feller, H. The effect of alpha-difluoromethylornithine and tartaric acid on sperm count, seminal gamma GT, FSH, LH, testosterone and steroid excretion in patients with chronic prostatitis. **Andrologia**, 13, 100-107, 1981.
- DUVARCI, S., Nader, K., & LeDoux, J. E. De novo mRNA synthesis is required for both consolidation and reconsolidation of fear memories in the amygdala. **Learn Mem**, 15, 747-755, 2008.
- EKDAHL, C. T., Claasen, J. H., Bonde, S., Kokaia, Z., & Lindvall, O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 100, 13632-13637, 2003.
- ENNACEUR, A. One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. **Behav Brain Res**, 215, 244-254, 2010.
- ESTRADA, S. M., Thagard, A. S., Lane, A. D., Dehart, M. J., Burd, I., Napolitano, P. G., & Ieronimakis, N. Bacterial endotoxin exposure invokes transcriptional changes in embryonic murine neural stem cells. **Am J Obstet Gynecol**, 217, 488-489, 2017.
- FAN, H., Gao, J., Wang, W., Li, X., Xu, T., & Yin, X. Expression of NMDA receptor and its effect on cell proliferation in the subventricular zone of neonatal rat brain. **Cell Biochem Biophys**, 62, 305-316, 2012.
- FANG, H., Chartier, J., Sodja, C., Desbois, A., Ribocco-Lutkiewicz, M., Walker, P. R., & Sikorska, M. Transcriptional activation of the human brain-derived neurotrophic factor gene promoter III by dopamine signaling in NT2/N neurons. **J Biol Chem**, 278, 26401-26409, 2003.
- FANSELOW, M. S., & Dong, H. W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**, 65, 7-19, 2010.
- FERREIRA, F. F., Ribeiro, F. F., Rodrigues, R. S., Sebastiao, A. M., & Xapelli, S. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Role in Cannabinoid-Mediated Neurogenesis. **Front Cell Neurosci**, 12, 441, 2018.

- FIORITI, L. Myers, C., Huang, Y. Y. *et al.* The Persistence of Hippocampal- Based Memory Requires Protein Synthesis Mediated by the Prion-like Protein CPEB3. **Neuron**, v. 86, p. 1433–1448, 2015.
- FOLTRAN, R. B., & Diaz, S. L. BDNF isoforms: a round trip ticket between neurogenesis and serotonin? **J Neurochem**, 138, 204-221, 2016.
- FOX, N. C., Jenkins, R., Leary, S. M., Stevenson, V. L., Losseff, N. A., Crum, W. R., Harvey, R. J., Rossor, M. N., Miller, D. H., & Thompson, A. J. Progressive cerebral atrophy in MS: a serial study using registered, volumetric MRI. **Neurology**, 54, 807-812, 2000.
- FREY, U., Muller, M., & Kuhl, D. A different form of long-lasting potentiation revealed in tissue plasminogen activator mutant mice. **J Neurosci**, 16, 2057-2063, 1996.
- FRISEN, J. Neurogenesis and Gliogenesis in Nervous System Plasticity and Repair. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 32, 127-141, 2016.
- FRUHAUF, P. K., Ineu, R. P., Tomazi, L., Duarte, T., Mello, C. F., & Rubin, M. A. Spermine reverses lipopolysaccharide-induced memory deficit in mice. **J Neuroinflammation**, 12, 3, 2015.
- FULENWIDER, H. D., Smith, B. M., Nichenko, A. S., Carpenter, J. M., Nennig, S. E., Cheng, K., Rice, K. C., & Schank, J. R. Cellular and behavioral effects of lipopolysaccharide treatment are dependent upon neurokinin-1 receptor activation. **J Neuroinflammation**, 15, 60, 2018.
- FURINI, C. R., Rossato, J. I., Bitencourt, L. L., Medina, J. H., Izquierdo, I., & Cammarota, M.. Beta-adrenergic receptors link NO/sGC/PKG signaling to BDNF expression during the consolidation of object recognition long-term memory. **Hippocampus**, 20, 672-683, 2010.
- GHIANI, C. A., Beltran-Parrazal, L., Sforza, D. M., Malvar, J. S., Seksenyan, A., Cole, R., Smith, D. J., Charles, A., Ferchmin, P. A., & de Vellis, J. Genetic program of neuronal differentiation and growth induced by specific activation of NMDA receptors. **Neurochem Res**, 32, 363-376, 2007.
- GIOANNINI, T. L., Teghanemt, A., Zhang, D., Coussens, N. P., Dockstader, W., Ramaswamy, S., & Weiss, J. P. Isolation of an endotoxin-MD-2 complex that produces Toll-like receptor 4-dependent cell activation at picomolar concentrations. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 101, 4186-4191, 2004.
- GIRARDI, B. A., Ribeiro, D. A., Signor, C., Muller, M., Gais, M. A., Mello, C. F., & Rubin, M. A. Spermidine-induced improvement of reconsolidation of memory involves calcium-dependent protein kinase in rats. **Learn Mem**, 23, 21-28, 2016.
- GO, H. S., Shin, C. Y., Lee, S. H., Jeon, S. J., Kim, K. C., Choi, C. S., & Ko, K. H. Increased proliferation and gliogenesis of cultured rat neural progenitor cells by lipopolysaccharide-stimulated astrocytes. **Neuroimmunomodulation**, 16, 365-376, 2009.

- GOEL, R., Bhat, S. A., Hanif, K., Nath, C., & Shukla, R. Angiotensin II Receptor Blockers Attenuate Lipopolysaccharide-Induced Memory Impairment by Modulation of NF-kappaB-Mediated BDNF/CREB Expression and Apoptosis in Spontaneously Hypertensive Rats. **Mol Neurobiol**, 2017.
- GONIAS, S. L., Banki, M. A., Gilder, A. S., Azmoon, P., Campana, W. M., & Mantuano, E. PAI1 blocks NMDA receptor-mediated effects of tissue-type plasminogen activator on cell signaling and physiology. **J Cell Sci**, 131, 2018.
- GOULD, E. How widespread is adult neurogenesis in mammals? **Nat Rev Neurosci**, 8, 481-488, 2007.
- GROSS, R. E., Mehler, M. F., Mabie, P. C., Zang, Z., Santschi, L., & Kessler, J. A. Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. **Neuron**, 17, 595-606, 1996.
- GUAN, Z., & Fang, J. Peripheral immune activation by lipopolysaccharide decreases neurotrophins in the cortex and hippocampus in rats. **Brain Behav Immun**, 20, 64-71, 2006.
- 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.
- GUERRA, G. P., Rubin, M. A., & Mello, C. F. Modulation of learning and memory by natural polyamines. **Pharmacol Res**, 112, 99-118, 2016.
- GUGLIUCCI, A. Polyamines as clinical laboratory tools. **Clin Chim Acta**, 344, 23-35, 2004.
- GUIDOLIN, D., Fede, C., & Tortorella, C. Nerve cells developmental processes and the dynamic role of cytokine signaling. **Int J Dev Neurosci**, 2018.
- GUPTA, N., Zhang, H., & Liu, P. Behavioral and neurochemical effects of acute putrescine depletion by difluoromethylornithine in rats. **Neuroscience**, 161, 691-706, 2009.
- HANSEN, D. V., Hanson, J. E., & Sheng, M. Microglia in Alzheimer's disease. **J Cell Biol**, 217, 459-472, 2018.
- HEDDEN, T., GABRIELI, J. Insights into the ageing mind: a view from cognitive neuroscience. **Nat Rev Neurosci**. 5,87-96, 2004.

- HILL, J. D., Zuluaga-Ramirez, V., Gajghate, S., Winfield, M., & Persidsky, Y. Activation of GPR55 increases neural stem cell proliferation and promotes early adult hippocampal neurogenesis. **Br J Pharmacol**, 2018.
- HONG, H., Kim, B. S., & Im, H. I. Pathophysiological Role of Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases and Psychiatric Disorders. **Int Neurol J**, 20, S2-7, 2016.
- HORCH, H. W., & Katz, L. C. BDNF release from single cells elicits local dendritic growth in nearby neurons. **Nat Neurosci**, 5, 1177-1184, 2002.
- HUANG, E. J., & Reichardt, L. F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. **Annu Rev Neurosci**, 24, 677-736, 2001.
- HUIJBERS, W., Vannini, P., Sperling, R. A., C, M. P., Cabeza, R., & Daselaar, S. M. Explaining the encoding/retrieval flip: memory-related deactivations and activations in the posteromedial cortex. **Neuropsychologia**, 50, 3764-3774, 2012.
- IGARASHI, K., & Kashiwagi, K. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. **Biochem Biophys Res Commun**, 271, 559-564, 2000a.
- IZQUIERDO, I. Memória. **Artmed**, 3. ed, Porto Alegre, 2018.
- IZQUIERDO, I., & Mcgaugh, J. L. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. **Behav Pharmacol**, 11, 517-534, 2000.
- IZQUIERDO, I., & MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 68, p. 285-316, 1997
- JANOWSKA, J., Gargas, J., Ziemka-Nalecz, M., Zalewska, T., Buzanska, L., & Sypecka, J. Directed glial differentiation and transdifferentiation for neural tissue regeneration. **Exp Neurol**, 2018.
- JANSSON, L. C., & Akerman, K. E. The role of glutamate and its receptors in the proliferation, migration, differentiation and survival of neural progenitor cells. **J Neural Transm (Vienna)**, 121, 819-836, 2014.
- JANSSON, L. C., Louhivuori, L., Wigren, H. K., Nordstrom, T., Louhivuori, V., Castren, M. L., & Akerman, K. E. Effect of glutamate receptor antagonists on migrating neural progenitor cells. **Eur J Neurosci**, 37, 1369-1382, 2013.
- JONAKAIT, G. M. The effects of maternal inflammation on neuronal development: possible mechanisms. **Int J Dev Neurosci**, 25, 415-425, 2007.
- JOO, J. Y., Kim, B. W., Lee, J. S., Park, J. Y., Kim, S., Yun, Y. J., Lee, S. H., Lee, S. H., Rhim, H., & Son, H. Activation of NMDA receptors increases proliferation and differentiation of hippocampal neural progenitor cells. **J Cell Sci**, 120, 1358-1370, 2007.
- KANDEL, E. R. The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses. **Biosci Rep**, 21, 565-611. 2001.

- KANDEL, E. R., Dudai, Y., & Mayford, M. R. The molecular and systems biology of memory. **Cell**, 157, 163-186, 2014.
- KAPLAN, D. R., & Miller, F. D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. **Curr Opin Neurobiol**, 10, 381-391, 2000.
- KENTROS, C. G., Agnihotri, N. T., Streater, S., Hawkins, R. D., & Kandel, E. R. Increased attention to spatial context increases both place field stability and spatial memory. **Neuron**, 42, 283-295, 2004.
- KERN, J. K., Geier, D. A., Sykes, L. K., & Geier, M. R. Relevance of Neuroinflammation and Encephalitis in Autism. **Front Cell Neurosci**, 9, 519, 2015.
- KHAN, M. S., Ali, T., Kim, M. W., Jo, M. H., Chung, J. I., & Kim, M. O. Anthocyanins Improve Hippocampus-Dependent Memory Function and Prevent Neurodegeneration via JNK/Akt/GSK3beta Signaling in LPS-Treated Adult Mice. **Mol Neurobiol**, 2018.
- KIDA, S., & Serita, T. Functional roles of CREB as a positive regulator in the formation and enhancement of memory. **Brain Res Bull**, 105, 17-24, 2014.
- KINOUCHI, R., Takeda, M., Yang, L., Wilhelmsson, U., Lundkvist, A., Pekny, M., & Chen, D. F. Robust neural integration from retinal transplants in mice deficient in GFAP and vimentin. **Nat Neurosci**, 6, 863-868, 2003.
- KISHI, A., Ohno, M., & Watanabe, S. Concurrent activation of hippocampal glycine and polyamine sites of the N-methyl-D-aspartate receptor synergistically reverses working memory deficits in rats. **Neurosci Lett**, 257, 131-134, 1998.
- KOPONEN, E., Voikar, V., Riekk, R., Saarelainen, T., Rauramaa, T., Rauvala, H., Taira, T., & Castren, E. Transgenic mice overexpressing the full-length neurotrophin receptor trkB exhibit increased activation of the trkB-PLCgamma pathway, reduced anxiety, and facilitated learning. **Mol Cell Neurosci**, 26, 166-181, 2004.
- KRANJAC, D., McLinden, K. A., Koster, K. M., Kaldenbach, D. L., Chumley, M. J., & Boehm, G. W. Peripheral administration of poly I:C disrupts contextual fear memory consolidation and BDNF expression in mice. **Behav Brain Res**, 228, 452-457, 2012.
- KWAK, Y. D., Hendrix, B. J., & Sugaya, K. Secreted type of amyloid precursor protein induces glial differentiation by stimulating the BMP/Smad signaling pathway. **Biochem Biophys Res Commun**, 447, 394-399, 2014.
- KYD, R. J., & Bilkey, D. K. Prefrontal cortex lesions modify the spatial properties of hippocampal place cells. **Cereb Cortex**, 13, 444-451, 2003.
- LAATU, S., Revonsuo, A., Jaykka, H., Portin, R., & Rinne, J. O. Visual object recognition in early Alzheimer's disease: deficits in semantic processing. **Acta Neurol Scand**, 108, 82-89, 2003.
- LAROCHE, S., Davis, S., & Jay, T. M. Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses: dual roles in working memory and consolidation. **Hippocampus**, 10, 438-446, 2000.

- LAUTERBORN, J. C., Lynch, G., Vanderklish, P., Arai, A., & Gall, C. M. Positive modulation of AMPA receptors increases neurotrophin expression by hippocampal and cortical neurons. **J Neurosci**, 20, 8-21, 2000.
- LEAL, G., Bramham, C. R., & Duarte, C. B. BDNF and Hippocampal Synaptic Plasticity. **Vitam Horm**, 104, 153-195, 2017.
- LECUYER, M. A., Saint-Laurent, O., Bourbonniere, L., Larouche, S., Larochelle, C., Michel, L., Charabati, M., Abadier, M., Zandee, S., Haghayegh Jahromi, N., Gowing, E., Pittet, C., Lyck, R., Engelhardt, B., & Prat, A. Dual role of ALCAM in neuroinflammation and blood-brain barrier homeostasis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 114, E524-E533, 2017.
- LEDO, J. H., Azevedo, E. P., Clarke, J. R., Ribeiro, F. C., Figueiredo, C. P., Foguel, D., De Felice, F. G., & Ferreira, S. T. Amyloid-beta oligomers link depressive-like behavior and cognitive deficits in mice. **Mol Psychiatry**, 18, 1053-1054, 2013.
- LEE, A. C., Rahman, S., Hodges, J. R., Sahakian, B. J., & Graham, K. S. Associative and recognition memory for novel objects in dementia: implications for diagnosis. **Eur J Neurosci**, 18, 1660-1670, 2003.
- LEE, B., Sur, B., Park, J., Kim, S. H., Kwon, S., Yeom, M., Shim, I., Lee, H., & Hahm, D. H. Ginsenoside rg3 alleviates lipopolysaccharide-induced learning and memory impairments by anti-inflammatory activity in rats. **Biomol Ther (Seoul)**, 21, 381-390. 2013.
- LEE, J. W., Lee, Y. K., Yuk, D. Y., Choi, D. Y., Ban, S. B., Oh, K. W., & Hong, J. T. Neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation. **J Neuroinflammation**, 5, 37, 2008.
- LEE, R., Kermani, P., Teng, K. K., & Hempstead, B. L. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. **Science**, 294, 1945-1948, 2001.
- LEE, Y. J., Choi, D. Y., Choi, I. S., Kim, K. H., Kim, Y. H., Kim, H. M., Lee, K., Cho, W. G., Jung, J. K., Han, S. B., Han, J. Y., Nam, S. Y., Yun, Y. W., Jeong, J. H., Oh, K. W., & Hong, J. T. Inhibitory effect of 4-O-methylhonokiol on lipopolysaccharide-induced neuroinflammation, amyloidogenesis and memory impairment via inhibition of nuclear factor-kappaB in vitro and in vivo models. **J Neuroinflammation**, 9, 35. 2012.
- LI, L., Jin, X., Zhang, H., & Yin, J. [Protective effect of picroliv against lipopolysaccharide-induced cognitive dysfunction and neuroinflammation by attenuating TLR4/NFkappaB pathway]. **Folia Neuropathol**, 56, 337-345, 2018.
- LI, Y. R., & Gupta, P. Immune aspects of the bi-directional neuroimmune facilitator TRPV1. **Mol Biol Rep**, 2018.
- LIANG, R., Yong, S., Huang, X., Kong, H., Hu, G., & Fan, Y. Aquaporin-4 Mediates the Suppressive Effect of Lipopolysaccharide on Hippocampal Neurogenesis. **Neuroimmunomodulation**, 23, 309-317, 2016.

- LIAO, L., Zhang, X. D., Li, J., Zhang, Z. W., Yang, C. C., Rao, C. L., Zhou, C. J., Zeng, L., Zhao, L. B., Fang, L., Yang, D. Y., & Xie, P. Pioglitazone attenuates lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors, modulates NF-kappaB/IL-6/STAT3, CREB/BDNF pathways and central serotonergic neurotransmission in mice. **Int Immunopharmacol**, 49, 178-186, 2017.
- LINNARSSON, S., Bjorklund, A., & Ernfors, P. Learning deficit in BDNF mutant mice. **Eur J Neurosci**, 9, 2581-2587, 1997.
- LIRAZ-ZALTSMAN, S., Yaka, R., Shabashov, D., Shohami, E., & Biegon, A. Neuroinflammation-Induced Memory Deficits Are Amenable to Treatment with D-Cycloserine. **J Mol Neurosci**, 60, 46-62, 2016.
- LISBOA, S. F., Niraula, A., Resstel, L. B., Guimaraes, F. S., Godbout, J. P., & Sheridan, J. F. Repeated social defeat-induced neuroinflammation, anxiety-like behavior and resistance to fear extinction were attenuated by the cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2. **Neuropsychopharmacology**, 2018.
- LIU, D. Y., Shen, X. M., Yuan, F. F., Guo, O. Y., Zhong, Y., Chen, J. G., Zhu, L. Q., & Wu, J. The Physiology of BDNF and Its Relationship with ADHD. **Mol Neurobiol**, 52, 1467-1476, 2015.
- LIU, P., Begley, M., Michowski, W., Inuzuka, H., Ginzberg, M., Gao, D., Tsou, P., Gan, W., Papa, A., Kim, B. M., Wan, L., Singh, A., Zhai, B., Yuan, M., Wang, Z., Gygi, S. P., Lee, T. H., Lu, K. P., Toker, A., Pandolfi, P. P., Asara, J. M., Kirschner, M. W., Sicinski, P., Cantley, L., & Wei, W. Cell-cycle-regulated activation of Akt kinase by phosphorylation at its carboxyl terminus. **Nature**, 508, 541-545, 2014.
- LIU, P., Gupta, N., Jing, Y., & Zhang, H. Age-related changes in polyamines in memory-associated brain structures in rats. **Neuroscience**, 155, 789-796, 2008.
- LU, B., Pang, P. T., & Woo, N. H. The yin and yang of neurotrophin action. **Nat Rev Neurosci**, 6, 603-614, 2005.
- LU, Y. C., Yeh, W. C., & Ohashi, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, 42, 145-151, 2008.
- LUKASZEWICZ, A., Savatier, P., Cortay, V., Kennedy, H., & Dehay, C. Contrasting effects of basic fibroblast growth factor and neurotrophin 3 on cell cycle kinetics of mouse cortical stem cells. **J Neurosci**, 22, 6610-6622, 2002.
- MADANI, R., Hulo, S., Toni, N., Madani, H., Steimer, T., Muller, D., & Vassalli, J. D. Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice. **EMBO J**, 18, 3007-3012, 1999.
- MALATERRE, J., Strambi, C., Aouane, A., Strambi, A., Rougon, G., & Cayre, M. A novel role for polyamines in adult neurogenesis in rodent brain. **Eur J Neurosci**, 20, 317-330, 2004.

- MAPLE, M., Edwards, H., Plummer, D., & Minichiello, V. Silenced voices: hearing the stories of parents bereaved through the suicide death of a young adult child. **Health Soc Care Community**, 18, 241-248, 2010.
- MAQSOOD, R., & Stone, T. W. The Gut-Brain Axis, BDNF, NMDA and CNS Disorders. **Neurochem Res**, 41, 2819-2835, 2016.
- MARSHALL, G. P., 2nd, Reynolds, B. A., & Laywell, E. D. Using the neurosphere assay to quantify neural stem cells in vivo. **Curr Pharm Biotechnol**, 8, 141-145, 2007.
- MARTIN, L. J. Mitochondrial and Cell Death Mechanisms in Neurodegenerative Diseases. **Pharmaceuticals (Basel)**, 3, 839-915, 2010.
- MARTINEZ-CERDENO, V., & Noctor, S. C. Neural Progenitor Cell Terminology. **Front Neuroanat**, 12, 104, 2018.
- MASUKO, T., Kusama-Eguchi, K., Sakata, K., Kusama, T., Chaki, S., Okuyama, S., Williams, K., Kashiwagi, K., & Igarashi, K. Polyamine transport, accumulation, and release in brain. **J Neurochem**, 84, 610-617, 2003.
- MAZARATI, A., Maroso, M., Iori, V., Vezzani, A., & Carli, M. High-mobility group box-1 impairs memory in mice through both toll-like receptor 4 and Receptor for Advanced Glycation End Products. **Exp Neurol**, 232, 143-148, 2011.
- MCALLISTER, A. K., Lo, D. C., & Katz, L. C. Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. **Neuron**, 15, 791-803, 1995.
- MCFARLAND, A. J., Davey, A. K., McDermott, C. M., Grant, G. D., Lewohl, J., & Anoopkumar-Dukie, S. Differences in statin associated neuroprotection corresponds with either decreased production of IL-1beta or TNF-alpha in an in vitro model of neuroinflammation-induced neurodegeneration. **Toxicol Appl Pharmacol**, 344, 56-73, 2018.
- MCGAUGH, J. L. Memory--a century of consolidation. **Science**, 287, 248-251. 2000.
- MCGAUGH, J. L. Consolidating memories. **Annual Review of Psychology**, v. 66, p. 1-24, 2015.
- MCGURK, J. F., Bennett, M. V., & Zukin, R. S. Polyamines potentiate responses of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in xenopus oocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 87, 9971-9974, 1990.
- MEDINA, J. H., Bekinschtein, P., Cammarota, M. *et al.* Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate? **Behavioural Brain Research**, v. 192, p. 61-69, 2008.
- MELO-SALAS, M. S., Perez-Dominguez, M., & Zepeda, A. Systemic Inflammation Impairs Proliferation of Hippocampal Type 2 Intermediate Precursor Cells. **Cell Mol Neurobiol**, 38, 1517-1528, 2018.
- 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., Niedopad, L., Polanska, A., & Gebka, J. Effects of acamprosate and some polyamine site ligands of NMDA receptor on short-term memory in rats. **Eur J Pharmacol**, 444, 83-96, 2002.
- MINICHELLO, L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. **Nat Rev Neurosci**, 10, 850-860, 2009.
- MINOIS, N., Carmona-Gutierrez, D., & Madeo, F. Polyamines in aging and disease. **Aging (Albany NY)**, 3, 716-732, 2011.
- MIWA, M., Tsuboi, M., Noguchi, Y., Enokishima, A., Nabeshima, T., & Hiramatsu, M. Effects of betaine on lipopolysaccharide-induced memory impairment in mice and the involvement of GABA transporter 2. **J Neuroinflammation**, 8, 153, 2011.
- MOCHIZUKI, N., Takagi, N., Kurokawa, K., Kawai, T., Besshoh, S., Tanonaka, K., & Takeo, S. Effect of NMDA receptor antagonist on proliferation of neurospheres from embryonic brain. **Neurosci Lett**, 417, 143-148, 2007.
- MONJE, M. L., Toda, H., & Palmer, T. D. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. **Science**, 302, 1760-1765, 2003
- MONY, L., Zhu, S., Carvalho, S., & Paoletti, P. Molecular basis of positive allosteric modulation of GluN2B NMDA receptors by polyamines. **EMBO J**, 30, 3134-3146, 2011.
- MORRIS, R.G. Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-d-aspartate receptor antagonist AP5. **J. Neurosci.** 9, 3040–3057, 1989.
- MOWLA, S. J., Farhadi, H. F., Pareek, S., Atwal, J. K., Morris, S. J., Seidah, N. G., & Murphy, R. A. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. **J Biol Chem**, 276, 12660-12666, 2001.
- MUOTRI, A. R., & Gage, F. H. Generation of neuronal variability and complexity. **Nature**, 441, 1087-1093, 2006.
- NADEL, L., Hupbach, A., Gomez, R. *et al.* Memory formation, consolidation and transformation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 36, p. 1640–1645, 2012.
- NAGAHARA, A. H., Merrill, D. A., Coppola, G., Tsukada, S., Schroeder, B. E., Shaked, G. M., Wang, L., Blesch, A., Kim, A., Conner, J. M., Rockenstein, E., Chao, M. V., Koo, E. H., Geschwind, D., Masliah, E., Chiba, A. A., & Tuszynski, M. H. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. **Nat Med**, 15, 331-337, 2009.
- NAGAPPAN, G., Zaitsev, E., Senatorov, V. V., Jr., Yang, J., Hempstead, B. L., & Lu, B. Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 106, 1267-1272, 2009.

- NAKAZAWA, K., Sun, L. D., Quirk, M. C., Rondi-Reig, L., Wilson, M. A., & Tonegawa, S. Hippocampal CA3 NMDA receptors are crucial for memory acquisition of one-time experience. **Neuron**, 38, 305-315, 2003.
- NASROLAHI, A., Safari, F., Farhoudi, M., Khosravi, A., Farajdokht, F., Bastaminejad, S., Sandoghchian Shotorbani, S., & Mahmoudi, J. Immune system and new avenues in Parkinson's disease research and treatment. **Rev Neurosci**, 2019.
- NGUYEN, M. D., Julien, J. P., & Rivest, S. Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? **Nat Rev Neurosci**, 3, 216-227, 2002.
- NICOLAS, C., & Carter, C. Autoradiographic distribution and characteristics of high- and low-affinity polyamine-sensitive [3H]ifenprodil sites in the rat brain: possible relationship to NMDAR2B receptors and calmodulin. **J Neurochem**, 63, 2248-2258, 1994.
- NOORBAKHSHNIA, M., & Karimi-Zandi, L. *Portulaca oleracea* L. prevents lipopolysaccharide-induced passive avoidance learning and memory and TNF-alpha impairments in hippocampus of rat. **Physiol Behav**, 169, 69-73, 2017.
- NUMAKAWA, T., Odaka, H., & Adachi, N. Actions of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Glucocorticoid Stress in Neurogenesis. **Int J Mol Sci**, 18, 2017.
- OBERMEIER, B., Daneman, R., & Ransohoff, R. M. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. **Nat Med**, 19, 1584-1596, 2013.
- OBERMEIER, B., Verma, A., & Ransohoff, R. M. The blood-brain barrier. **Handb Clin Neurol**, 133, 39-59, 2016.
- OISHI, K., Ogawa, Y., Gamoh, S., & Uchida, M. K. Contractile responses of smooth muscle cells differentiated from rat neural stem cells. **J Physiol**, 540, 139-152, 2002.
- O'NEILL, L. A., Golenbock, D., & Bowie, A. G. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. **Nat Rev Immunol**, 13, 453-460, 2013.
- ORTEGA-MARTINEZ, S. A new perspective on the role of the CREB family of transcription factors in memory consolidation via adult hippocampal neurogenesis. **Front Mol Neurosci**, 8, 46, 2015.
- OUAMEUR, A. A., Mangier, E., Diamantoglou, S., Rouillon, R., Carpentier, R., & Tajmir-Riahi, H. A. Effects of organic and inorganic polyamine cations on the structure of human serum albumin. **Biopolymers**, 73, 503-509, 2004.
- PANG, P. T., Nagappan, G., Guo, W., & Lu, B. Extracellular and intracellular cleavages of proBDNF required at two distinct stages of late-phase LTP. **NPJ Sci Learn**, 1, 16003, 2016.
- PANG, P. T., Teng, H. K., Zaitsev, E., Woo, N. T., Sakata, K., Zhen, S., Teng, K. K., Yung, W. H., Hempstead, B. L., & Lu, B. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. **Science**, 306, 487-491, 2004.

- PARAMANIK, V., & Thakur, M. K. Role of CREB signaling in aging brain. **Arch Ital Biol**, 151, 33-42, 2013.
- PARK, H., Popescu, A., & Poo, M. M. Essential role of presynaptic NMDA receptors in activity-dependent BDNF secretion and corticostriatal LTP. **Neuron**, 84, 1009-1022, 2014.
- PATTERSON, S. L., Abel, T., Deuel, T. A., Martin, K. C., Rose, J. C., & Kandel, E. R. Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. **Neuron**, 16, 1137-1145, 1996.
- PAWLAK, R., Nagai, N., Urano, T., Napiorkowska-Pawlak, D., Ihara, H., Takada, Y., Collen, D., & Takada, A. Rapid, specific and active site-catalyzed effect of tissue-plasminogen activator on hippocampus-dependent learning in mice. **Neuroscience**, 113, 995-1001, 2002.
- PEDREIRA, M. E., Dimant, B., & Maldonado, H. Inhibitors of protein and RNA synthesis block context memory and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. **Pharmacol Biochem Behav**, 54, 611-617, 1996.
- PEGG, A. E. Functions of Polyamines in Mammals. **J Biol Chem**, 291, 14904-14912, 2016.
- PEGG, A. E., & Casero, R. A., Jr. Current status of the polyamine research field. **Methods Mol Biol**, 720, 3-35, 2011.
- PENG, S., Wu, J., Mufson, E. J., & Fahnstock, M. Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease. **J Neurochem**, 93, 1412-1421, 2005.
- PERRY, V. H. Contribution of systemic inflammation to chronic neurodegeneration. **Acta Neuropathol**, 120, 277-286, 2010.
- PETERS, A., Reisch, C., & Langemann, D. LTP or LTD? Modeling the Influence of Stress on Synaptic Plasticity. **eNeuro**, 5, 2018.
- PETSCH, D., & Anspach, F. B. Endotoxin removal from protein solutions. **J Biotechnol**, 76, 97-119, 2000.
- PILLAT, M. M., Cheffer, A., de Andrade, C. M., Morsch, V. M., Schetinger, M. R., & Ulrich, H. Bradykinin-induced inhibition of proliferation rate during neurosphere differentiation: consequence or cause of neuronal enrichment? **Cytometry A**, 87, 929-935, 2015.
- PURVES, D. **Neuroscience**. 3 ed. Sinauer Associates, Inc. Press, New York, 2004.
- QIN, L., Wu, X., Block, M. L., Liu, Y., Breese, G. R., Hong, J. S., Knapp, D. J., & Crews, F. T. (2007). Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. **Glia**, 55, 453-462.
- QUAN, N., & Herkenham, M. Connecting cytokines and brain: a review of current issues. **Histol Histopathol**, 17, 273-288, 2002.

- 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, B. A., & Weiss, S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. **Dev Biol**, 175, 1-13, 1996.
- RIBEIRO, D. A., Mello, C. F., Signor, C., & Rubin, M. A. Polyaminergic agents modulate the reconsolidation of conditioned fear. **Neurobiol Learn Mem**, 104, 9-15, 2013.
- RODIER, M., Prigent-Tessier, A., Bejot, Y., Jacquin, A., Mossiat, C., Marie, C., & Garnier, P. Exogenous t-PA administration increases hippocampal mature BDNF levels. plasmin- or NMDA-dependent mechanism? **PLoS One**, 9, e92416, 2014.
- ROLLS, A., Shechter, R., London, A., Ziv, Y., Ronen, A., Levy, R., & Schwartz, M. Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. **Nat Cell Biol**, 9, 1081-1088, 2007.
- ROLLS, E. T. The storage and recall of memories in the hippocampo-cortical system. **Cell Tissue Res**, 373, 577-604, 2018.
- ROWLAND, D. C., & Kentros, C. G. Potential anatomical basis for attentional modulation of hippocampal neurons. **Ann N Y Acad Sci**, 1129, 213-224, 2008.
- 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., 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.
- RUBIN, M. A., Wellmann, K. A., Lewis, B., Overgaauw, B. J., Littleton, J. M., & Barron, S. Difluoromethylornithine (DFMO) reduces deficits in isolation-induced ultrasonic vocalizations and balance following neonatal ethanol exposure in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, 92, 44-50, 2009.
- RUSZNAK, Z., Henskens, W., Schofield, E., Kim, W. S., & Fu, Y. Adult Neurogenesis and Gliogenesis: Possible Mechanisms for Neurorestoration. **Exp Neurobiol**, 25, 103-112, 2016.
- RUSZNAK, Z., Henskens, W., Schofield, E., Kim, W. S., & Fu, Y. Adult Neurogenesis and Gliogenesis: Possible Mechanisms for Neurorestoration. **Exp Neurobiol**, 25, 103-112, 2016.
- 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.

- SATOMOTO, M., Sun, Z., Adachi, Y. U., Kinoshita, H., & Makita, K. Sevoflurane preconditioning ameliorates lipopolysaccharide-induced cognitive impairment in mice. **Exp Anim**, 67, 193-200, 2018.
- SCHAIN, M., & Kreisl, W. C. Neuroinflammation in Neurodegenerative Disorders-a Review. **Curr Neurol Neurosci Rep**, 17, 25, 2017.
- SCHILD, S., Endres, T., Lessmann, V., & Edelman, E. Acute and chronic interference with BDNF/TrkB-signaling impair LTP selectively at mossy fiber synapses in the CA3 region of mouse hippocampus. **Neuropharmacology**, 71, 247-254, 2013.
- SCHLETT, K. Glutamate as a modulator of embryonic and adult neurogenesis. **Curr Top Med Chem**, 6, 949-960, 2006.
- SCHRODER, N., Figueiredo, L. S., & de Lima, M. N. Role of brain iron accumulation in cognitive dysfunction: evidence from animal models and human studies. **J Alzheimers Dis**, 34, 797-812, 2013.
- SCHWARZ, C., Stekovic, S., Wirth, M., Benson, G., Royer, P., Sigrist, S. J., Pieber, T., Dammbroek, C., Magnes, C., Eisenberg, T., Pendl, T., Bohlken, J., Kobe, T., Madeo, F., & Floel, A. Safety and tolerability of spermidine supplementation in mice and older adults with subjective cognitive decline. **Ageing (Albany NY)**, 10, 19-33, 2018.
- SEILER, N., & Schmidt-Glenewinkel, T. Regional distribution of putrescine, spermidine and spermine in relation to the distribution of RNA and DNA in the rat nervous system. **J Neurochem**, 24, 791-795, 1975.
- SEILER, N., Bolkenius, F. N., & Rennert, O. M. Interconversion, catabolism and elimination of the polyamines. **Med Biol**, 59, 334-346, 1981.
- SEILER, N., Delcros, J. G., & Moulinoux, J. P. Polyamine transport in mammalian cells. An update. **Int J Biochem Cell Biol**, 28, 843-861, 1996.
- SIGNOR, C., Mello, C. F., Porto, G. P., Ribeiro, D. A., & Rubin, M. A. Spermidine improves fear memory persistence. **Eur J Pharmacol**, 730, 72-76, 2014.
- SIGNOR, C., Temp, F. R., Mello, C. F., Oliveira, M. S., Girardi, B. A., Gais, M. A., Funck, V. R., & Rubin, M. A. Intrahippocampal infusion of spermidine improves memory persistence: Involvement of protein kinase A. **Neurobiol Learn Mem**, 131, 18-25, 2016.9
- SIGNOR, C., Girardi, B. A., Lorena Wendel, A., Fruhauf, P. K. S., Pillat, M. M., Ulrich, H., Mello, C. F., & Rubin, M. A., 2017. Spermidine improves the persistence of reconsolidated fear memory and neural differentiation in vitro: Involvement of BDNF. **Neurobiol. Learn. Mem.** 140, 82-91.
- SLOTKIN, T. A., & Bartolome, J. Role of ornithine decarboxylase and the polyamines in nervous system development: a review. **Brain Res Bull**, 17, 307-320, 1986.

- SPARKMAN, N. L., Kohman, R. A., Garcia, A. K., & Boehm, G. W. Peripheral lipopolysaccharide administration impairs two-way active avoidance conditioning in C57BL/6J mice. **Physiol Behav**, 85, 278-288, 2005.
- SUZUKI, A., Fukushima, H., Mukawa, T., Toyoda, H., Wu, L. J., Zhao, M. G., Xu, H., Shang, Y., Endoh, K., Iwamoto, T., Mamiya, N., Okano, E., Hasegawa, S., Mercaldo, V., Zhang, Y., Maeda, R., Ohta, M., Josselyn, S. A., Zhuo, M., & Kida, S. Upregulation of CREB-mediated transcription enhances both short- and long-term memory. **J Neurosci**, 31, 8786-8802, 2011.
- SUZUKI, W. A., & Amaral, D. G. Functional neuroanatomy of the medial temporal lobe memory system. **Cortex**, 40, 220-222, 2004.
- TABOR, C. W., & Tabor, H. Polyamines. **Annu Rev Biochem**, 53, 749-790, 1984.
- TANG, Y. P., Shimizu, E., Dube, G. R., Rampon, C., Kerchner, G. A., Zhuo, M., Liu, G., & Tsien, J. Z. Genetic enhancement of learning and memory in mice. **Nature**, 401, 63-69, 1999.
- TANILA, H. The role of BDNF in Alzheimer's disease. **Neurobiol Dis**, 2016.
- TENG, H. K., Teng, K. K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R. D., Kermani, P., Torkin, R., Chen, Z. Y., Lee, F. S., Kraemer, R. T., Nykjaer, A., & Hempstead, B. L. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. **J Neurosci**, 25, 5455-5463, 2005.
- 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.
- TONKISS, J., Morris, R. G., & Rawlins, J. N. Intra-ventricular infusion of the NMDA antagonist AP5 impairs performance on a non-spatial operant DRL task in the rat. **Exp Brain Res**, 73, 181-188, 1988.
- TRUJILLO, C. A., Negraes, P. D., Schwindt, T. T., Lameu, C., Carromeu, C., Muotri, A. R., Pesquero, J. B., Cerqueira, D. M., Pillat, M. M., de Souza, H. D., Turaca, L. T., Abreu, J. G., & Ulrich, H. Kinin-B2 receptor activity determines the differentiation fate of neural stem cells. **J Biol Chem**, 287, 44046-44061, 2012.
- VANN SD, Albasser MM. Hippocampus and neocortex: Recognition and spatial memory. **Curr Opin Neurobiol** 21:440–445, 2011.
- 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.
- WALLACE, H. M. Polyamines and their role in human disease--an introduction. **Biochem Soc Trans**, 31, 354-355, 2003.

- WALLACE, H. M., & Fraser, A. V. Inhibitors of polyamine metabolism: review article. **Amino Acids**, 26, 353-365, 2004.
- WANG, J. X., Rogers, L. M., Gross, E. Z., Ryals, A. J., Dokucu, M. E., Brandstatt, K. L., Hermiller, M. S., & Voss, J. L. Targeted enhancement of cortical-hippocampal brain networks and associative memory. **Science**, 345, 1054-1057, 2014.
- WANG, T., Ding, Y. X., He, J., Ma, C. J., Zhao, Y., Wang, Z. H., & Han, B. Hydroxysafflor Yellow A Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Neurotoxicity and Neuroinflammation in Primary Mesencephalic Cultures. **Molecules**, 23, 2018.
- WARBURTON, E. C., & Brown, M. W. Findings from animals concerning when interactions between perirhinal cortex, hippocampus and medial prefrontal cortex are necessary for recognition memory. **Neuropsychologia**, 48, 2262-2272, 2010.
- WATERHOUSE, E. G., An, J. J., Orefice, L. L., Baydyuk, M., Liao, G. Y., Zheng, K., Lu, B., & Xu, B. BDNF promotes differentiation and maturation of adult-born neurons through GABAergic transmission. **J Neurosci**, 32, 14318-14330, 2012.
- WHITE, T. L., & Youngentob, S. L. The effect of NMDA-NR2B receptor subunit over-expression on olfactory memory task performance in the mouse. **Brain Res**, 1021, 1-7, 2004.
- WHITLOCK JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. **Science** 313:1093–1097, 2006.
- WILLIAMS, K. Interactions of polyamines with ion channels. **Biochem J**, 325 (Pt 2), 289-297, 1997.
- WILLIAMS, K., Dawson, V. L., Romano, C., Dichter, M. A., & Molinoff, P. B. Characterization of polyamines having agonist, antagonist, and inverse agonist effects at the polyamine recognition site of the NMDA receptor. **Neuron**, 5, 199-208, 1990.
- WINTERS, B. D., Saksida, L. M., & Bussey, T. J. Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. **Neurosci Biobehav Rev**, 32, 1055-1070, 2008.
- WIRTH, M., Benson, G., Schwarz, C., Kobe, T., Grittner, U., Schmitz, D., Sigrist, S. J., Bohlken, J., Stekovic, S., Madeo, F., & Floel, A. The effect of spermidine on memory performance in older adults at risk for dementia: A randomized controlled trial. **Cortex**, 109, 181-188, 2018.
- WIRTH, M., Schwarz, C., Benson, G., Horn, N., Buchert, R., Lange, C., Kobe, T., Hetzer, S., Maglione, M., Michael, E., Marschenz, S., Mai, K., Kopp, U., Schmitz, D., Grittner, U., Sigrist, S. J., Stekovic, S., Madeo, F., & Floel, A. Effects of spermidine supplementation on cognition and biomarkers in older adults with subjective cognitive decline (SmartAge)-study protocol for a randomized controlled trial. **Alzheimers Res Ther**, 11, 36, 2019.

- WOO, N. H., Teng, H. K., Siao, C. J., Chiaruttini, C., Pang, P. T., Milner, T. A., Hempstead, B. L., & Lu, B. Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. **Nat Neurosci**, 8, 1069-1077, 2005.
- XU, B., Gottschalk, W., Chow, A., Wilson, R. I., Schnell, E., Zang, K., Wang, D., Nicoll, R. A., Lu, B., & Reichardt, L. F. The role of brain-derived neurotrophic factor receptors in the mature hippocampus: modulation of long-term potentiation through a presynaptic mechanism involving TrkB. **J Neurosci**, 20, 6888-6897, 2000.
- YAKA, R., Biegon, A., Grigoriadis, N., Simeonidou, C., Grigoriadis, S., Alexandrovich, A. G., Matzner, H., Schumann, J., Trembovler, V., Tsenter, J., & Shohami, E. D-cycloserine improves functional recovery and reinstates long-term potentiation (LTP) in a mouse model of closed head injury. **FASEB J**, 21, 2033-2041, 2007.
- YAMAGUCHI, M., Seki, T., Imayoshi, I., Tamamaki, N., Hayashi, Y., Tatebayashi, Y., & Hitoshi, S. Neural stem cells and neuro/gliogenesis in the central nervous system: understanding the structural and functional plasticity of the developing, mature, and diseased brain. **J Physiol Sci**, 66, 197-206, 2016.
- YAMASHIMA, T. 'PUFA-GPR40-CREB signaling' hypothesis for the adult primate neurogenesis. **Prog Lipid Res**, 51, 221-231, 2012.
- YANG, F., Je, H. S., Ji, Y., Nagappan, G., Hempstead, B., & Lu, B. Pro-BDNF-induced synaptic depression and retraction at developing neuromuscular synapses. **J Cell Biol**, 185, 727-741, 2009.
- YANG, J., Harte-Hargrove, L. C., Siao, C. J., Marinic, T., Clarke, R., Ma, Q., Jing, D., Lafrancois, J. J., Bath, K. G., Mark, W., Ballon, D., Lee, F. S., Scharfman, H. E., & Hempstead, B. L. proBDNF negatively regulates neuronal remodeling, synaptic transmission, and synaptic plasticity in hippocampus. **Cell Rep**, 7, 796-806, 2014.
- YEH, C. H., Hsieh, L. P., Lin, M. C., Wei, T. S., Lin, H. C., Chang, C. C., & Hsing, C. H. Dexmedetomidine reduces lipopolysaccharide induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. **PLoS One**, 13, e0191070, 2018.
- ZAFRA, F., Hengerer, B., Leibrock, J., Thoenen, H., & Lindholm, D. Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. **EMBO J**, 9, 3545-3550, 1990.
- ZARIFKAR, A., Choopani, S., Ghasemi, R., Naghdi, N., Maghsoudi, A. H., Maghsoudi, N., Rastegar, K., & Moosavi, M. Agmatine prevents LPS-induced spatial memory impairment and hippocampal apoptosis. **Eur J Pharmacol**, 634, 84-88, 2010.
- ZHANG, F., Luo, J., & Zhu, X. Ketamine ameliorates depressive-like behaviors by tPA-mediated conversion of proBDNF to mBDNF in the hippocampus of stressed rats. **Psychiatry Res**, 269, 646-651, 2018.
- ZHANG, F. X., & Xu, R. S. Juglanin ameliorates LPS-induced neuroinflammation in animal models of Parkinson's disease and cell culture via inactivating TLR4/NF-kappaB pathway. *Biomed Pharmacother*, 97, 1011-1019, 2018.

- ZHONG, Y., Zhu, Y., He, T., Li, W., Yan, H., & Miao, Y. Rolipram-induced improvement of cognitive function correlates with changes in hippocampal CREB phosphorylation, BDNF and Arc protein levels. **Neurosci Lett**, 610, 171-176, 2016.
- ZIGOVA, T., Pencea, V., Wiegand, S. J., & Luskin, M. B. Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. **Mol Cell Neurosci**, 11, 234-245, 1998.