

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

Shaiana Beck Fabbrin

**A MELHORA DA CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA INDUZIDA POR
ESPERMIDINA ENVOLVE A ATIVAÇÃO DA VIA PI3K/AKT**

Santa Maria, RS
2020

Shaiana Beck Fabbrin

**A MELHORA DA CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA INDUZIDA POR
ESPERMIDINA ENVOLVE A ATIVAÇÃO DA VIA PI3K/AKT**

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

Orientadora: Maribel Antonello Rubin

Santa Maria, RS
2020

Fabbrin, Shaiana Beck

A melhora da consolidação da memória induzida por espermidina envolve a ativação da via PI3K/Akt / Shaiana Beck Fabbrin.- 2020.

48 p.; 30 cm

Orientadora: Maribel Antonello Rubin

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, RS, 2020

1. Memória 2. Consolidação 3. Poliaminas 4. BDNF 5. PI3K/Akt I. Rubin, Maribel Antonello II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

© 2020

Todos os direitos autorais reservados a *Shaiana Beck Fabbrin*. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Av. Roraima, 1000, UFSM, Santa Maria, RS. CEP 97105-900.

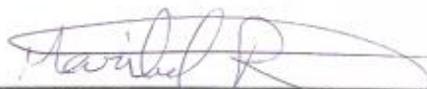
Fone (0xx) (55) 9 9171-6965; Endereço Eletrônico: shaiana.fabbrin@gmail.com

Shaiana Beck Fabbrin

**A MELHORA DA CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA INDUZIDA POR
ESPERMIDINA ENVOLVE A ATIVAÇÃO DA VIA PI3K/AKT**

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

Aprovado em 28 de outubro de 2020:



Maribel Antonello Rubin, Dr.^a (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Guilherme Vargas Bochi, Dr. (UFSM)



Gustavo Petri Guerra, Dr. (UNIPAMPA)

Santa Maria, RS
2020

AGRADECIMENTOS

À Deus pela proteção, por todas conquistas alcançadas e por guiar meu caminho.

Agradeço à minha família, por todo suporte, apoio, incentivo e por serem a base de toda a minha formação.

Ao meu namorado Robson pelo companheirismo, paciência, carinho, apoio e incentivo. Muito obrigada por estar sempre ao meu lado.

Às minhas amigas, Érica e Micheline, pela amizade, apoio e por todos os momentos de descontração, os quais deixaram essa caminhada muito mais leve.

À Professora Dr^a. Maribel Antonello Rubin por ter me acolhido no laboratório, pela confiança e por todo ensinamento transmitido durante todos esses anos. Muito obrigada pela orientação e por ter me proporcionado um grande crescimento científico. Ao Professor Dr. Carlos Fernando Mello, por toda colaboração na elaboração do trabalho.

Ao grupo LabNeuro pela amizade, companheirismo e parceria de todos os dias. Em especial as alunas da Professora Dr^a. Maribel, por toda ajuda e dedicação para realização desse trabalho.

Aos membros da banca, Professor Guilherme Vargas Bochi e Professor Gustavo Petri Guerra, pelas contribuições efetuadas para esse trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica pelo suporte acadêmico.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

À todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos a mim, me ajudando e incentivando nessa caminhada.

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos.”

(Paulo Beleki)

RESUMO

A MELHORA DA CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA INDUZIDA POR ESPERMIDINA ENVOLVE A ATIVAÇÃO DA VIA PI3K/AKT

AUTORA: Shaiana Beck Fabbrin

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

A consolidação da memória é um processo que depende de estruturas cerebrais específicas, como o hipocampo, síntese de novas proteínas, ativação de proteínas cinases e neurotrofinas, como o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF). O BDNF é considerado um modulador chave no processamento da memória, pois promove modulação da plasticidade sináptica e, através de sua ligação no receptor de tropomiosina cinase B (TrkB), ativa vias de sinalização intracelular que estão envolvidas nos processos de formação de novas memórias, como a via da fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) e proteína cinase B (PKB), também conhecida como Akt. A via PI3K/Akt está envolvida em diferentes processos fisiológicos importantes para a manutenção celular e aquisição e consolidação da memória. A espermidina (SPD) é uma poliamina presente endogenamente em todo o sistema nervoso central, e atua como modulador de canais iônicos, como o receptor glutamatérgico *N*-metil-D-aspartato (NMDAr). A administração de SPD promove melhora da consolidação, reconsolidação e persistência da memória em diferentes tarefas comportamentais em ratos. No entanto, não está elucidado o mecanismo de ação da SPD na consolidação da memória na tarefa de medo condicionado contextual. Dessa forma, o objetivo do estudo é investigar o envolvimento do receptor TrkB e da via PI3K/Akt na melhora da consolidação da memória induzida por SPD. Assim, ratos Wistar machos adultos foram treinados e testados na tarefa de medo condicionado contextual. Imediatamente ou 6 horas após o treino, os animais receberam infusão intra-hipocampal de SPD, ANA-12 (antagonista do receptor TrkB) ou LY294002 (inibidor da PI3K). A infusão de SPD (2 nmol) imediatamente após o treino melhorou, enquanto que ANA-12 e LY294002 prejudicaram a consolidação da memória. ANA-12 (0.3 pmol/sítio) e LY294002 (5 µg/sítio), em doses sem efeito *per se* sobre a memória, impediram o efeito facilitador da SPD sobre a consolidação da memória. A administração dos compostos 6 h após o treino não alterou a memória dos animais. Um grupo de animais foi eutanasiado 30 minutos após o treino para análise da fosforilação da Akt. A infusão de SPD aumentou os níveis de Akt fosforilada, e a infusão de LY294002 impediu esse aumento induzido por SPD. Assim, os resultados do estudo sugerem o envolvimento do receptor TrkB e da via PI3K/Akt, bem como, o aumento na fosforilação da Akt na melhora da consolidação da memória induzido por SPD.

Palavras-chave: Memória. Consolidação. Poliaminas. Medo condicionado contextual. BDNF. PI3K/Akt.

ABSTRACT

SPERMIDINE-INDUCED IMPROVEMENT OF CONSOLIDATION OF MEMORY INVOLVES PI3K/AKT VIA ACTIVATION

AUTHOR: Shaiana Beck Fabbrin
ADVISOR: Prof.^a Dr.^a Maribel Antonello Rubin

Memory consolidation is a process that depends on specific brain structures, such as the hippocampus, synthesis of new proteins, activation of protein kinases and neurotrophins, such as the brain-derived neurotrophic factor (BDNF). BDNF is considered a key modulator in memory processing, as it promotes modulation of synaptic plasticity and, through its connection to the tropomyosin kinase B (TrkB) receptor, activates intracellular signaling pathways that are involved in the formation of new memories, such as the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and protein kinase B (PKB) pathway, also known as Akt. The PI3K/Akt pathway is involved in different physiological processes important for cell maintenance and memory acquisition and consolidation. Spermidine (SPD) is a polyamine present endogenously throughout the central nervous system, and acts as a modulator of ion channels, such as the glutamatergic receptor N-methyl-D-aspartate (NMDAr). The administration of SPD promotes improved consolidation, reconsolidation and persistence of memory in different behavioral tasks in rats. However, the mechanism of action of SPD in the consolidation of memory in the task of contextual conditioned fear is not elucidated. Thus, the objective of the study is to investigate the involvement of the TrkB receptor and the PI3K/Akt pathway in improving SPD-induced memory consolidation. Thus, adult male Wistar rats were trained and tested in the contextual conditioned fear task. Immediately or 6 hours after training, animals received intra-hippocampal infusion of SPD, ANA-12 (TrkB receptor antagonist) or LY294002 (PI3K inhibitor). The infusion of SPD (2 nmol) immediately after training improved, while ANA-12 and LY294002 impaired memory consolidation. ANA-12 (0.3 pmol/site) and LY294002 (5 µg/site), in doses with no effect per se on memory, prevented the facilitating effect of SPD on memory consolidation. The administration of the compounds 6 h after training did not alter the animals' memory. A group of animals were euthanized 30 minutes after training to analyze Akt phosphorylation. The infusion of SPD increased the levels of phosphorylated Akt, and the infusion of LY294002 prevented this increase induced by SPD. Thus, the results of the study suggest the involvement of the TrkB receptor and the PI3K/Akt pathway, as well as the increase in Akt phosphorylation to improve SPD-induced memory consolidation.

Keywords: Memory. Consolidation. Polyamines. Contextual conditioned fear. BDNF. PI3K/Akt.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fases de formação da memória.	13
Figura 2 – Processo de consolidação de novas informações.	14
Figura 3 – Fases do processamento da memória.	15
Figura 4 – Vias de sinalização ativadas pela interação BDNF/TrkB.	18
Figura 5 – Efeitos da interação BDNF/TrkB.	19
Figura 6 – Estrutura das isoformas da Akt.	22
Figura 7 – Mecanismos de regulação da Akt.	22
Figura 8 – Efeitos da ativação da via PI3K/Akt.	24
Figura 9 – Envolvimento das vias BDNF/TrkB e PI3K/Akt na consolidação da memória.	26
Figura 10 – Estrutura química das poliaminas.	27
Figura 11 – Sítios de modulação alostérica do NMDAr.	28
Figura 12 – Mecanismo da melhora da memória induzido por SPD.	29
Figura 13 – Mecanismo da melhora da consolidação da memória induzido por espermidina.	39

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>)
AKT/PKB	Proteína cinase B
BDNF	Fator neurotrófico derivado do encéfalo (<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>)
CAMKII	Proteína cinase dependente de cálcio-calmodulina
CREB	Proteína de ligação responsiva ao AMPc
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular
LTP	Potenciação de longa duração (<i>Long-term potentiation</i>)
MAPK	Proteína ativada por mitógeno
mTORC	Alvo da rapamicina em mamíferos
mTORC2	Complexo 2 de mTOR
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato (<i>N-methyl-D-aspartate</i>)
PDK-1	Cinase-1 dependente de fosfoinositida
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinase
PIP2	Fosfatidil-inositol-2-fosfato
PIP3	Fosfatidil-inositol-3-fosfato
PKA	Proteína cinase dependente de AMPc
PKC	Proteína cinase cálcio-dependente
PLC- γ	Fosfolipase C γ
PP2A	Proteína fosfatase 2
Ser	Serina
SPD	Espermidina
Thr	Treonina
TrkB	Receptor de tropomiosina cinase B (<i>Tropomyosin kinase B</i>)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
1.1	MEMÓRIA.....	12
1.2	CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA.....	13
1.3	MEDO CONDICIONADO CONTEXTUAL	16
1.4	BDNF	17
1.5	BDNF E MEMÓRIA.....	18
1.6	VIA PI3K/AKT	20
1.7	VIA PI3K/AKT E MEMÓRIA.....	24
1.8	POLIAMINAS	26
1.9	ESPERMIDINA E MEMÓRIA.....	28
1.10	JUSTIFICATIVA	30
2	OBJETIVOS	30
2.1	OBJETIVO GERAL.....	30
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3	ARTIGO	32
4	CONCLUSÕES	38
4.1	CONCLUSÕES PARCIAIS	38
4.2	CONCLUSÃO GERAL	38
	REFERÊNCIAS	40

1. INTRODUÇÃO

1.1 MEMÓRIA

Segundo Izquierdo (2011), memória é definida como a capacidade de adquirir, armazenar e recuperar informações. Dessa forma, informações adquiridas podem ser estabilizadas em memórias permanentes através do processo de consolidação, para serem evocadas sempre que necessário.

De acordo com o tempo de armazenamento, as memórias podem ser classificadas como memória de trabalho, curta e longa duração. A memória de trabalho retém informações por um período muito curto de tempo, de segundos a alguns minutos. Por outro lado, informações disponíveis por um período de minutos a horas são denominadas memória de curta duração, as quais podem ser consolidadas por um período maior, por horas, meses ou anos, sendo classificadas como de longa duração (SQUIRE, 2004).

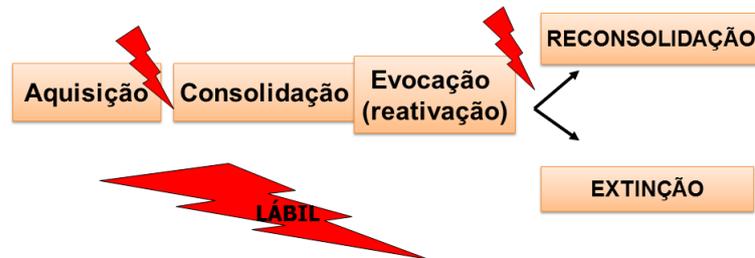
A memória de longa duração pode ser classificada em dois diferentes tipos, declarativa e não declarativa, que divergem tanto nos mecanismos cerebrais quanto nas estruturas anatômicas envolvidas. A memória declarativa é aquela evocada pelo consciente, a qual conseguimos verbalizar, sendo associada a fatos e eventos que ocorreram na nossa vida, como a lembrança de uma viagem (memória episódica), ou informações que adquirimos através da transmissão escrita, visual e sonora (memória semântica). A memória não declarativa, é também chamada de memória de procedimento, a qual é evocada pelo subconsciente, não sendo possível de verbalizada, pois armazena dados relacionados à aquisição de habilidades mediante a repetição de uma atividade, como andar de bicicleta (IZQUIERDO et al., 2002; STICKGOLD, 2005).

Para que as informações aprendidas sejam transformadas em memórias de longa duração, são necessários três processos: aquisição, consolidação e evocação (Figura 1). A aquisição refere-se ao processo de aprendizagem, onde uma nova informação é adquirida. Posteriormente, essa informação pode ser eliminada ou passar por processos de consolidação para tornar-se estável e permanente, podendo ser evocada sempre que necessário (NADEL et al., 2012).

Inicialmente, informações recém adquiridas encontram-se em um estado instável e susceptível a interferências por diversos meios, incluindo agentes farmacológicos (GLASER et al., 2010), fatores exógenos, endógenos ou neuro-hormonais, como o nível de cortisol

(ROOZENDAAL; MCEWEN; CHATTARJI, 2009), que podem alterar ou excluir essa informação.

Figura 1– Fases de formação da memória.



Fonte: (Girardi, 2015).

A consolidação da memória caracteriza-se por transformar informações lábeis em memórias estáveis e pouco sensíveis a interferências. Para isso ocorrer, são necessários processos moleculares e bioquímicos que promovem remodelações sinápticas que tornam a memória permanente e estável. A evocação refere-se ao retorno da memória estável, fase em que acessamos a informação previamente armazenada (MEI et al., 2011). A memória evocada sofre uma desestabilização, tornando-se lábil novamente, a qual pode seguir dois processos distintos: extinção ou reconsolidação (LEE et al., 2004; 2006).

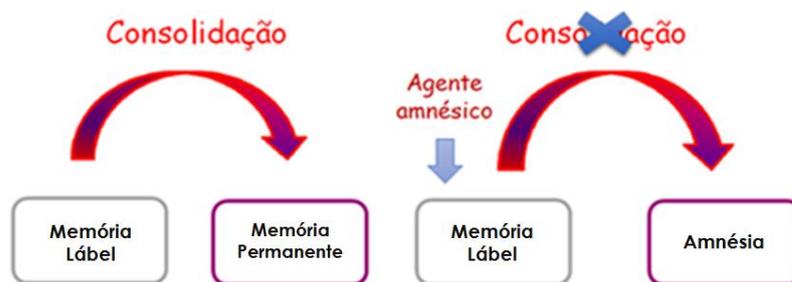
A extinção constitui no aprendizado de uma nova informação sobre a memória já existente, sendo capaz de inibir a evocação da memória original (FURINI et al., 2013). No entanto, esse processo não implica em seu esquecimento, visto que a mesma pode ser recuperada mediante situações de estresse, apresentação ao contexto e a estímulos fisiológicos que provoquem sensações semelhantes que a memória original provocava (FIORENZA et al., 2011, 2012; FURINI et al., 2013). Em contrapartida, curtas exposições aos estímulos que foram aprendidos durante o processo de aquisição, reforçam a memória original, estabilizando-a novamente, através do processo de reconsolidação (NADER, 2015).

1.2 CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA

A consolidação da memória é o processo de estabilização de uma informação lábil em uma memória de longa duração e estável (JOHANSEN et al., 2011). Novas informações que chegam ao nosso cérebro formam um circuito neural, ou seja, essa informação recebida ativa uma rede de neurônios que, caso seja reforçada, será retida resultando em uma memória permanente.

O processo de consolidação envolve principalmente modificações pós-traducionais de proteínas sinápticas, ativação de fatores de transcrição, modulação da expressão gênica, remodelação sináptica, que permitem a transformação da memória lábel em memória permanente (ALBERINI, 2009; MORRIS, 2006; RUEDIGER et al., 2011). Em contrapartida, a falta de reforços ou a utilização de agentes amnésicos, como a anisomicina, enquanto a memória encontra-se lábel, é capaz de interromper a consolidação, evitando a estabilização dessa memória e ocasionando um efeito amnésico (Figura 2) (GISQUET-VERRIER; RICCIO, 2018).

Figura 2 – Processo de consolidação de novas informações.



Fonte: Modificado de (GISQUET-VERRIER; RICCIO, 2018).

Portanto, o momento imediatamente após o aprendizado torna-se essencial para a formação de uma memória. Os processos moleculares e celulares que estão envolvidos na consolidação, são requeridos em janelas modulatórias diferentes, que duram em torno de 3-6 horas após o aprendizado (Figura 3). O processo de consolidação requer a ativação de vias de sinalização intracelulares acompanhada pela ativação bifásica de proteínas cinases, como a proteína cinase dependente de AMPc (PKA), proteína cinase dependente de cálcio (PKC), proteína de ligação responsiva ao AMPc (CREB), fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e síntese de novas proteínas (AHI; RADULOVIC; SPIESS, 2004; BERNABEU et al., 1997; IGAZ et al., 2002; IZQUIERDO et al., 2006; MARTÍNEZ-MORENO; RODRÍGUEZ-DURÁN; ESCOBAR, 2011).

Durante todo período da consolidação da memória, cada proteína cinase apresenta fosforilação em janelas temporais diferentes (MEDINA; CAMMAROTA, 2017), mas que apresentam papéis essenciais para esse processo. Proteínas cinases como a PKA, cinase regulada por sinalização extracelular (ERK) e BDNF são rapidamente liberados após o aprendizado, a fim de estabilizar essas novas informações. Em torno de 3 horas após, essas

proteínas são novamente sintetizadas e liberadas, a fim de induzir a formação de uma memória de longa duração (MEDINA; CAMMAROTA, 2017). A utilização de inibidores de proteíνας cinases bloqueia a ativação de outras vias de sinalização, prejudicando a aquisição de novas informações, e, principalmente, a consolidação de novas memórias (SHARIFZADEH et al., 2005).

Figura 3 – Fases do processamento da memória.



Fonte: Autora

A formação da memória envolve a atividade de diferentes regiões cerebrais, em diferentes momentos durante todo o processo. Inicialmente, a memória de curta duração é formada e armazenada no hipocampo, o qual desempenha papel fundamental na aprendizagem contextual e espacial (KITAMURA et al., 2017). Posteriormente, essa memória é gradualmente transferida ao córtex cerebral para seu armazenamento ao longo prazo (KITAMURA et al., 2017).

O hipocampo é uma estrutura subcortical bilateral do lobo temporal formado por duas regiões principais, o giro denteado e o corno de Ammon (CA), sendo esse último subdividido em CA1, CA2 e CA3. A região CA1, juntamente com a amígdala, apresenta função principal na conversão de uma memória de curto prazo em memória de longo prazo. Dessa forma, lesões no hipocampo, assim como manipulações farmacológicas, impedem a construção de novas memórias (RUBIN et al., 2000; LANA et al., 2017).

Acredita-se que o primeiro passo para a formação da memória seja um aumento na liberação de neurotransmissores, principalmente o glutamato (MCGAUGH; IZQUIERDO, 2000). Uma vez liberado na fenda sináptica, o glutamato liga-se aos receptores glutamatérgicos metabotrópicos ou ionotrópicos, principalmente o receptor Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) e *N*-metil-D-aspartato (NMDAr) (LEVENSON et al., 2002). O NMDAr é um receptor de membrana pertencente à família de receptores ionotrópicos glutamatérgicos, sendo constituído por subunidades denominadas GluN1 e GluN2, as quais

possuem sítios de ligação que permitem a interação de ligantes endógenos e exógenos, como o glutamato, glicina, magnésio, zinco e poliaminas.

No seu estado fisiológico, NMDAr encontra-se bloqueado por meio da ligação do Mg^{2+} no seu interior (LIU; ZHANG, 2000). Para ser ativado, é necessário ocorrer a despolarização da membrana pós-sináptica, ligação de seu co-agonista, glicina ou D-serina, e ligação do seu agonista, glutamato. Essas ações permitem o desbloqueio do Mg^{2+} , resultando na abertura do canal e induzindo o influxo de cálcio para o interior da célula. O cálcio intracelular é responsável por promover a ativação de proteínas cinases dependentes de cálcio, como a PKC e proteína cinase dependente de cálcio-calmodulina (CaMKII) (ROSENEGGER; LUKOWIAK, 2010; WAYMAN et al., 2011). A ativação das proteínas PKC e CaMKII, promovem a ativação de outras proteínas cinases, neurotrofinas, fatores de crescimento e receptores, responsáveis por processos moleculares e celulares que permitem a modulação da expressão gênica e plasticidade sináptica (BEKINSCHTEIN; CAMMAROTA; MEDINA, 2014; SRIVASTAVA et al., 2018; VECSEY et al., 2007).

A manipulação farmacológica do NMDAr, através da administração intra-amígdala e sistêmica de antagonistas, como AP5 (ROESLER et al., 2000) e MK-801 (CERETTA et al., 2008) impedem a consolidação, retenção (YAMADA et al., 2017) e extinção da memória (RADULOVIC; REN; GAO, 2019). Por outro lado, seu agonista parcial, D-cicloserina, facilita a consolidação da memória de medo em humanos (KALISCH et al., 2009), tornando o NMDAr um importante mediador nos processos de aprendizado e memória.

1.3 MEDO CONDICIONADO CONTEXTUAL

A memória de medo é conhecida por sua persistência, uma memória aversiva criada sobre eventos traumáticos que pode permanecer intacta por toda a vida (GALE et al., 2004). Esse tipo de memória pode representar um sintoma de fobias e patologias, como o transtorno do estresse pós-traumático, o qual é caracterizado por apresentar sentimentos de medo ou estresse mesmo em condições de segurança.

O condicionamento Pavloviano do medo, ou medo condicionado, é um modelo muito utilizado para estudar a aprendizagem associada ao medo (BERGSTROM; MCDONALD; JOHNSON, 2011). Essa tarefa baseia-se em um comportamento universal e inato, a aversão produzida pelo medo (BEKINSCHTEIN et al., 2008), onde um estímulo neutro torna-se ameaçador após o emparelhamento com outro estímulo que provoque medo.

Neste procedimento experimental, ocorre a associação de um estímulo neutro e não aversivo (estímulo condicionado, EC), o qual pode ser representado por uma luz, um tom ou o

próprio aparato experimental em que o animal é exposto (contexto), com um estímulo aversivo (estímulo incondicionado, EI), como o choque. Após o animal aprender a associação EC-EI, ao ser exposto novamente no contexto na ausência do EI, o EC que antes era visto como neutro, passa a ser aversivo e gera uma resposta condicionada, interpretada como o estado de freezing (congelamento). Essa resposta condicionada será mais fidedigna quando o animal for apresentado aos mesmos componentes do treino. Desta forma, durante o teste, o animal deve ser colocado no mesmo aparato utilizado no treino, no mesmo ambiente, com a mesma intensidade de luz e com o mesmo observador (IZQUIERDO, 2011).

Visto que a tarefa de medo condicionado contextual é capaz de mimetizar situações aversivas ou ameaçadoras que ocorrem em seres humanos, sua principal finalidade é investigar os mecanismos envolvidos no aprendizado e na formação de memórias relacionadas ao medo (KIM; JUNG, 2006).

1.4 BDNF

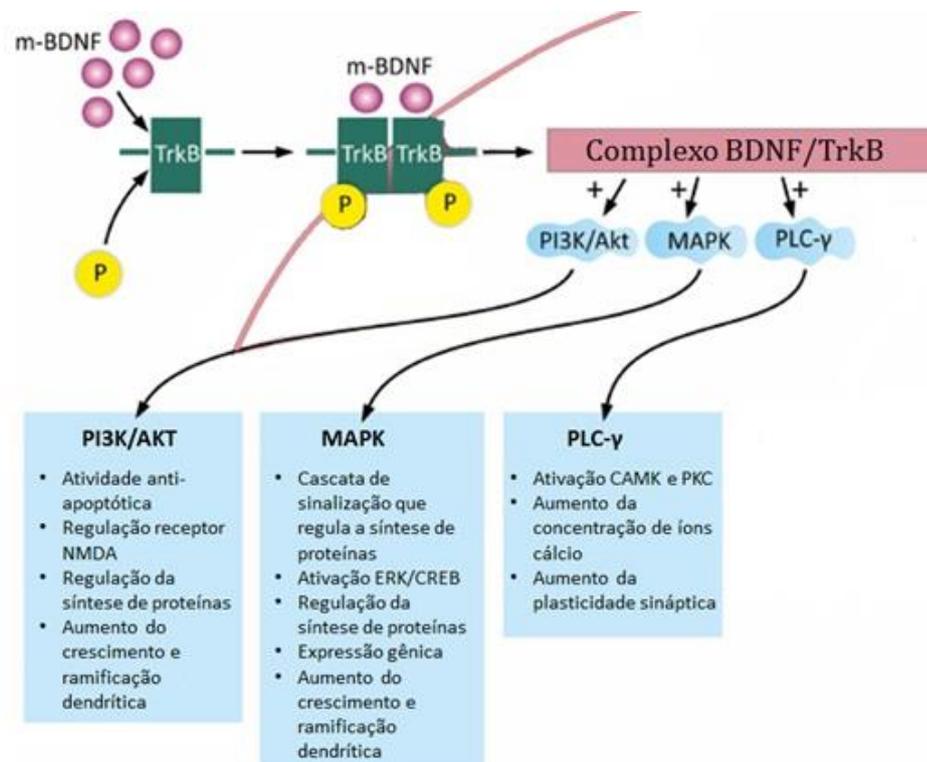
O fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) é um membro da família de neurotrofinas, que também inclui o fator de crescimento do nervo, neurotrofina 3 e neurotrofina 4 (HOHN et al., 1990; IP et al., 1992; MAISONPIERRE et al., 1990; ROSENTHAL et al., 1990). O BDNF se destaca entre os membros por ser amplamente expresso no sistema nervoso central, encontrando-se em maiores concentrações em regiões como o hipocampo, hipotálamo e córtex cerebral (MURER; YAN; RAISMAN-VOZARI, 2001).

O BDNF é sintetizado no retículo endoplasmático em sua forma precursora, pré-pró-BDNF. No complexo de Golgi essa forma é clivada dando origem ao pró-BDNF, o qual, posteriormente, é clivado originando o BDNF maduro (PANG et al., 2004). A síntese de BDNF maduro pode ocorrer tanto no meio intracelular, através da ação de furinas, quanto no meio extracelular por meio de plasminas ou metaloproteínas (JUNG et al., 2005; LU; PANG; WOO, 2005; PANG et al., 2004).

A atividade neuronal de sinapses glutamatérgicas induz a liberação do BDNF maduro de locais pré e pós-sinápticos de maneira dependente da atividade dessas sinapses (HARTMANN; HEUMANN; LESSMANN, 2001; MATSUDA et al., 2009). Uma vez liberado na fenda sináptica, o BDNF liga-se predominantemente ao receptor de tropomiosina cinase B (TrkB) o qual apresenta-se envolvido na regulação do crescimento e diferenciação celular (HUANG; REICHARDT, 2001), e manutenção da potenciação de longa duração (LTP) (LEAL; BRAMHAM; DUARTE, 2017; MINICHIELLO, 2009).

A partir da interação BDNF/TrkB ocorre a ativação de outras vias de sinalização intracelular, fosfolipase C γ (PLC- γ), fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) e proteína ativada por mitógeno (MAPK) (MIZUNO et al., 2003) (Figura 4). Essas vias são responsáveis por algumas respostas celulares importantes, como regulação da expressão gênica, síntese de proteínas, aumento da expressão de receptores glutamatérgicos e fosforilação de suas subunidades (PARK; POO, 2013; REICHARDT, 2006).

Figura 4 – Vias de sinalização ativadas pela interação BDNF/TrkB.



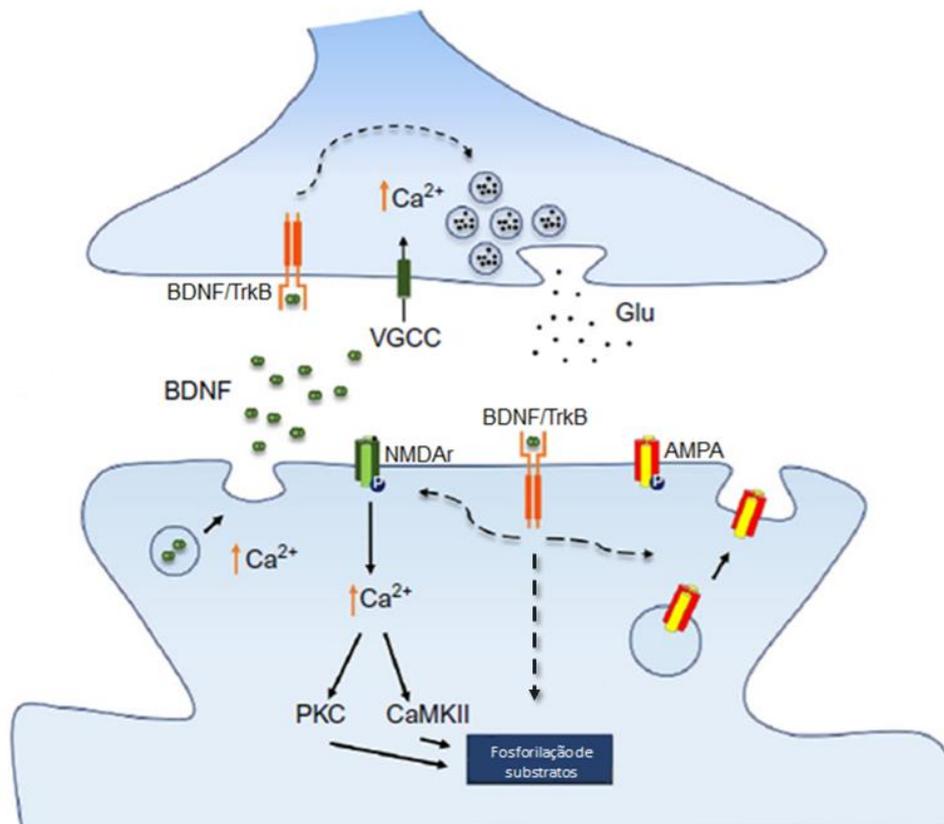
Fonte: Modificado de (Kowianski et al., 2018).

1.5 BDNF E MEMÓRIA

A despolarização da membrana, ativação do NMDAr e aumento do cálcio intracelular, induzem a liberação de BDNF das vesículas (Figura 5). O BDNF livre na fenda sináptica pode ligar-se a receptores TrkB contidos na membrana de neurônios pré e pós-sinápticos. A nível pré-sináptico, a sinalização BDNF/TrkB aumenta a liberação de neurotransmissores, como o glutamato, e em nível pós-sináptico, regula o tráfego de receptores AMPA, expressão do NMDAr (CALDEIRA et al., 2007) bem como aumento da fosforilação das subunidades desses receptores glutamatérgicos (ITAMI et al., 2003; YAMADA; NABESHIMA, 2003). Além

disso, a interação do BDNF com o receptor TrkB é responsável por fosforilar substratos intracelulares responsáveis por modular a síntese proteica, plasticidade sináptica, LTP e transcrição gênica (BRAMHAM; MESSAOUDI, 2005; LEAL et al., 2015; LEAL; COMPRIDO; DUARTE, 2014; MINICHIELLO, 2009; PARK; POO, 2013).

Figura 5 – Efeitos da interação BDNF/TrkB.



Fonte: Modificado de (LEAL et al., 2017).

Os efeitos resultantes da interação BDNF/TrkB promovem mudanças na plasticidade sináptica, importantes nos processos de aprendizado e memória, por conta disso, o BDNF tem sido considerado um importante modulador chave no processamento da memória. Estudos demonstram que o medo condicionado por si só é capaz de promover aumento nos níveis de fosforilação do BDNF e TrkB na amígdala, principalmente 30 minutos a 2 horas após o treino (OU; GEAN, 2006). Da mesma forma, o treino na esquiwa inibitória induz aumento nos níveis de BDNF imediatamente e 12 horas, mas não 9 horas e 24 horas após (BEKINSCHTEIN et al., 2008). Esses resultados sugerem que o envolvimento do BDNF é essencial para o estabelecimento de uma nova memória e para a persistência de memórias de longa duração.

A administração do antagonista do TrkB (ANA-12) antes e imediatamente após o treino na tarefa de esquivar inibitória, prejudica a aquisição e consolidação da memória (BLANK et al., 2016). Da mesma maneira, a administração de BDNF exógeno, antes e imediatamente após o treino, melhora o desempenho dos animais na mesma tarefa, e aumenta a fosforilação da ERK, alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), PI3K e proteína cinase B (Akt/PKB) (ALONSO et al., 2002; SLIPCZUK et al., 2009; LI et al., 2012). A infusão de anti-BDNF é capaz de reverter esses efeitos, impedindo o aumento na fosforilação dos substratos, prejudicando a consolidação (ALONSO et al., 2002; MIZUNO et al., 2003) e reconsolidação da memória (RADISKE et al., 2017).

Em conjunto, esses dados demonstram que a sinalização BDNF/TrkB é essencial, principalmente, para a consolidação da memória. Uma vez que a ativação do complexo BDNF/TrkB é responsável por induzir a iniciação de cascatas que regulam modificações moleculares e celulares que facilitam a remodelação sináptica, crucial para a formação de novas memórias.

1.6 VIA PI3K/AKT

A PI3K é uma família de proteínas cinases expressa praticamente em todas as células e possui papel essencial na sobrevivência e crescimento celular. Sua estrutura consiste de um complexo heterodimérico composto por uma subunidade reguladora (P85) e uma catalítica (P110), que controlam sua atividade (FRUMAN, 2010). A sua ativação depende de estímulos externos, como fatores de crescimento, ativação de receptores do tipo tirosina cinase e acoplado a proteína G (KATSO et al., 2001).

Essa família de enzimas é classificada em três diferentes classes, I, II, e III, as quais possuem diferentes funções na sinalização celular e levam a ativação de diferentes vias intracelulares que regulam o metabolismo, sobrevivência, crescimento e proliferação celular (ORCY et al., 2008). As enzimas PI3K-I são ativadas por receptores de tirosina cinase e acoplados a proteína G (CANTLEY, 2002), sendo responsáveis por promover a síntese de fosfatidilinositol-tri-fosfato (PIP3). A classe PI3K-II, diferente das demais classes, contém apenas a subunidade catalítica, e atuam na maioria das vezes como moléculas adaptadoras (FALASCA; MAFFUCCI, 2012). A PI3K-III é composta apenas pelo Vps34, possuindo um importante envolvimento na autofagia (BACKER, 2008).

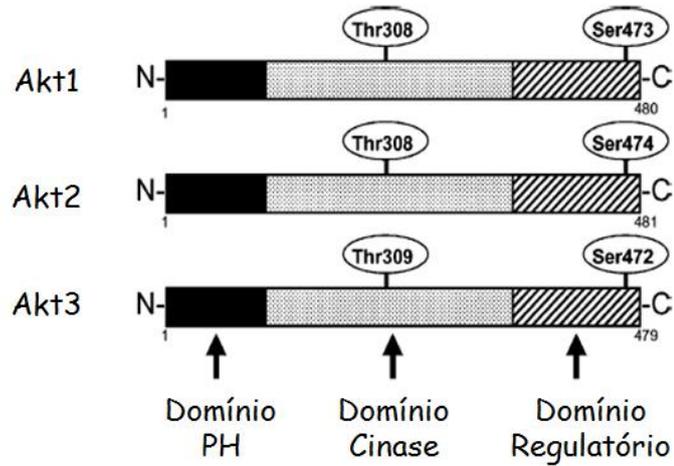
A PI3K-I é a classe mais amplamente estudada e a única descrita que possui a capacidade de fosforilar os lipídeos das membranas (ORCY et al., 2008), resultando na ativação de substratos que transmitem e coordenam a maioria dos efeitos intracelulares. Quando ativada,

a PI3K promove a fosforilação de fosfatidilinositol-bi-fosfato (PIP₂), gerando PIP₃ na membrana das células, que funciona como um segundo mensageiro recrutando e ativando moléculas que possuem domínio PH (homologia da pleckstrina) na sua estrutura, como a cinase-1 dependente de fosfoinositida (PDK-1) e Akt (CANTLEY, 2002; VANHAESEBROECK; STEPHENS; HAWKINS, 2012).

A proteína cinase B, também conhecida como Akt, é uma proteína cinase serina/treonina, que apresenta-se dividida em três isoformas: Akt1, Akt2 e Akt3, sendo igualmente expressas, mas com níveis e funções variadas entre os tecidos (OSAKI; OSHIMURA; ITO, 2004). A isoforma Akt1 apresenta-se mais expressa no cérebro, pulmões e coração, sendo associada ao crescimento e sobrevivência celular (OSAKI; OSHIMURA; ITO, 2004). A Akt2 é mais abundante em tecidos sensíveis à insulina, apresentando um importante papel no seu metabolismo, através da regulação da translocação do receptor GLUT-4 para a membrana (BOUCHER; KLEINRIDDERS; KAHN, 2014). A Akt3 é altamente expressa no cérebro, porém suas funções ainda não estão bem elucidadas. No entanto, sabe-se que desempenha um importante papel na sobrevivência e crescimento neuronal, assim como na plasticidade sináptica, influenciando no desenvolvimento e função cerebral (MANNING; CANTLEY, 2007).

As isoformas da Akt apresentam na sua estrutura três domínios funcionais e dois resíduos, os quais permitem a sua fosforilação e são críticos para a sua ativação (Figura 6). Sua estrutura apresenta uma região N-terminal com um domínio PH; um domínio cinase central, composto por um resíduo de treonina (Thr); e uma região C-terminal com um domínio regulatório, composto por um resíduo de serina (Ser) (OSAKI; OSHIMURA; ITO, 2004; PORTA; PAGLINO; MOSCA, 2014).

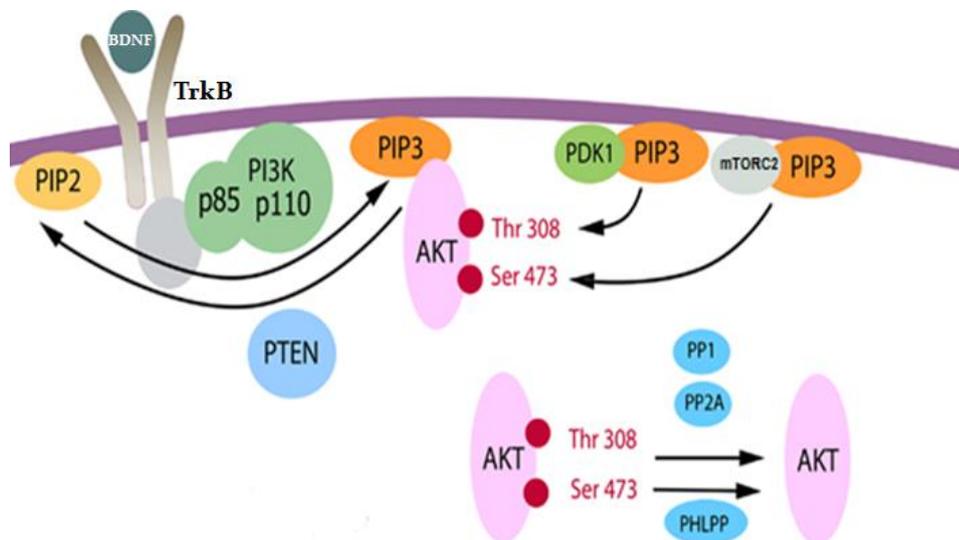
Figura 6 – Estrutura das isoformas da Akt.



Fonte: Modificado de (OSAKI; OSHIMURA; ITO, 2004).

Ao ocorrer um estímulo externo, como a ativação do receptor TrkB, a enzima PI3K torna-se ativa, fosforila e converte PIP2 em PIP3 na membrana plasmática (Figura 7). O PIP3, por sua vez, recruta a Akt citosólica inativa para a membrana plasmática, através do seu domínio PH. A interação PIP3-Akt promove mudanças conformacionais na estrutura da Akt, resultando na exposição de seus locais de fosforilação, Thr e Ser, tornando-a susceptível a fosforilação e permitindo sua ativação (ALESSI et al., 1996).

Figura 7 – Mecanismos de regulação da Akt.



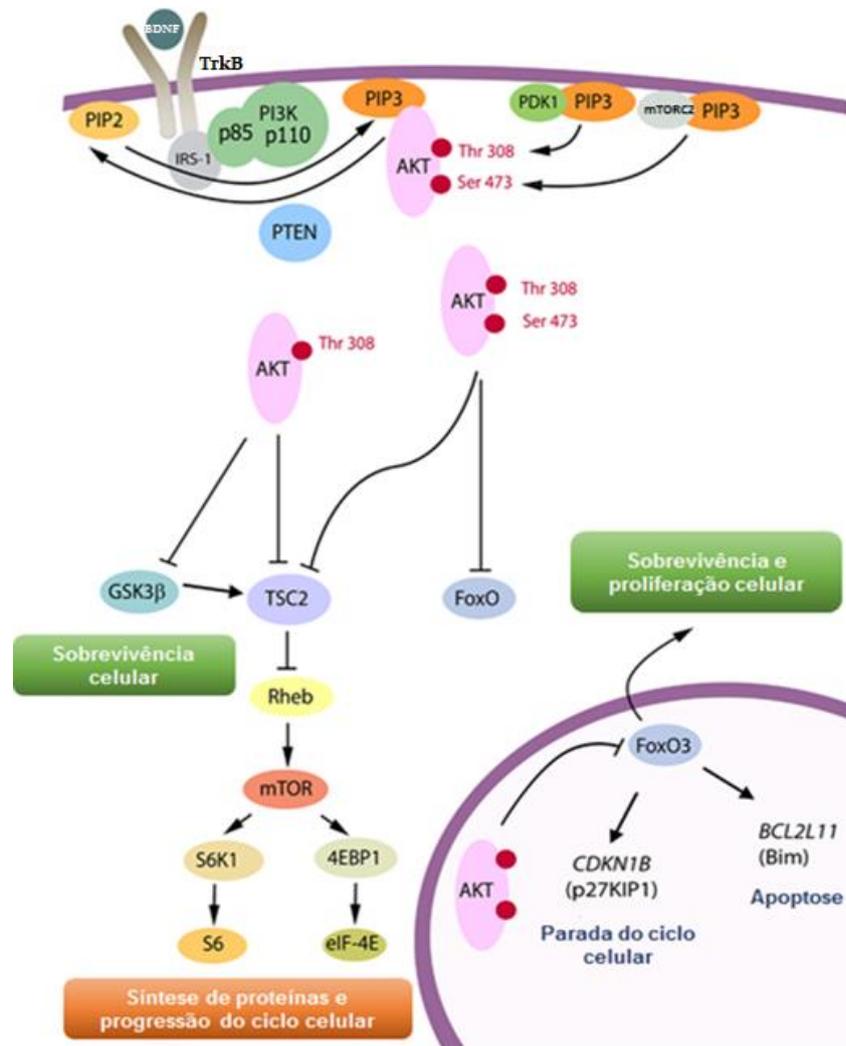
Fonte: Modificado de (ROBBINS; HAGUE, 2016).

A fosforilação do resíduo de Thr308 no domínio cinase da Akt é um requisito para a sua ativação, o qual ocorre por meio da proteína PDK-1, levando a estabilização da sua conformação ativa. No entanto, a fosforilação somente no resíduo de Thr ativa parcialmente a Akt, permitindo efeito sobre uma pequena quantidade de substratos. Para que sua atividade máxima seja alcançada, é necessário que juntamente com a fosforilação de Thr, ocorra a fosforilação do resíduo de Ser. Dessa forma, o complexo 2 do mTOR (mTORC2) é responsável por fosforilar o resíduo de Ser473 no domínio regulatório, levando a ativação total da Akt (ZONCU; EFEYAN; SABATINI, 2011).

Por outro lado, a sinalização da via PI3K/Akt é encerrada através da atividade de enzimas fosfatases, como a fosfatase homóloga a tensina, que promove a inativação de PIP3, através de sua conversão novamente em PIP2; ação da proteína fosfatase rica em leucina, que desfosforila o resíduo de Ser473 e ação da proteína fosfatase 2, que desfosforila o resíduo de Thr308, resultando na inativação da Akt (ANDJELKOVIC et al., 1996; BROGNARD et al., 2007).

Depois de ativada, a Akt se dissocia da membrana e transloca-se para o citosol e núcleo (Figura 8). No citosol, a Akt é responsável por fosforilar diversos substratos, tornando-os ativos ou inativos, que controlam a regulação metabólica, sobrevivência celular e síntese de proteínas. No núcleo, a Akt regula a expressão gênica, sobrevivência, proliferação celular, parada do ciclo celular e inibição da apoptose (CARNERO, 2010; ROBBINS; HAGUE, 2016; TSUCHIYA; KANNO; NISHIZAKI, 2014; VIVANCO; SAWYERS, 2002).

Figura 8 – Efeitos da ativação da via PI3K/Akt.



Fonte: Modificado de (ROBBINS; HAGUE, 2016).

O controle normal da ativação ou inibição da via de sinalização PI3K/Akt gera uma resposta fisiológica fundamental para o envelhecimento saudável (O'NEILL, 2013), uma vez que regula o metabolismo, crescimento e sobrevivência celular (KITAGISHI et al., 2012). Em contrapartida, a desregulação da via está envolvida na causa de várias doenças, como câncer, diabetes mellitus tipo 2, distúrbios neurocognitivos, neuropsiquiátricos e neurodegenerativos (MANNING; TOKER, 2017; O'NEILL, 2013).

1.7 VIA PI3K/AKT E MEMÓRIA

Tem sido estudado o efeito da via PI3K/Akt no desenvolvimento e função cerebral, envelhecimento, processos de aprendizagem e memória (BRUNET et al., 1999; MANNING;

TOKER, 2017). A via PI3K/Akt é responsável por fosforilar e ativar proteínas cinases responsáveis pela sobrevivência neuronal, manutenção da LTP, controle da plasticidade sináptica e síntese proteica (HOU; KLANN, 2004; LI et al., 2010; TANG et al., 2002).

A ativação da via PI3K/Akt induz a LTP e formação da memória do medo na amígdala (LIN et al., 2001), giro denteado (HORWOOD et al., 2006) e hipocampo (ROESLER et al., 2009). A administração do inibidor da PI3K (LY294002) antes e imediatamente após o treino de esquivas inibitórias, impede a formação da memória de curto e longo prazo no hipocampo (BARROS et al., 2001). O mesmo também ocorre na consolidação da memória de reconhecimento de objetos (HORWOOD et al., 2006) e formação da memória espacial (MIZUNO et al., 2003).

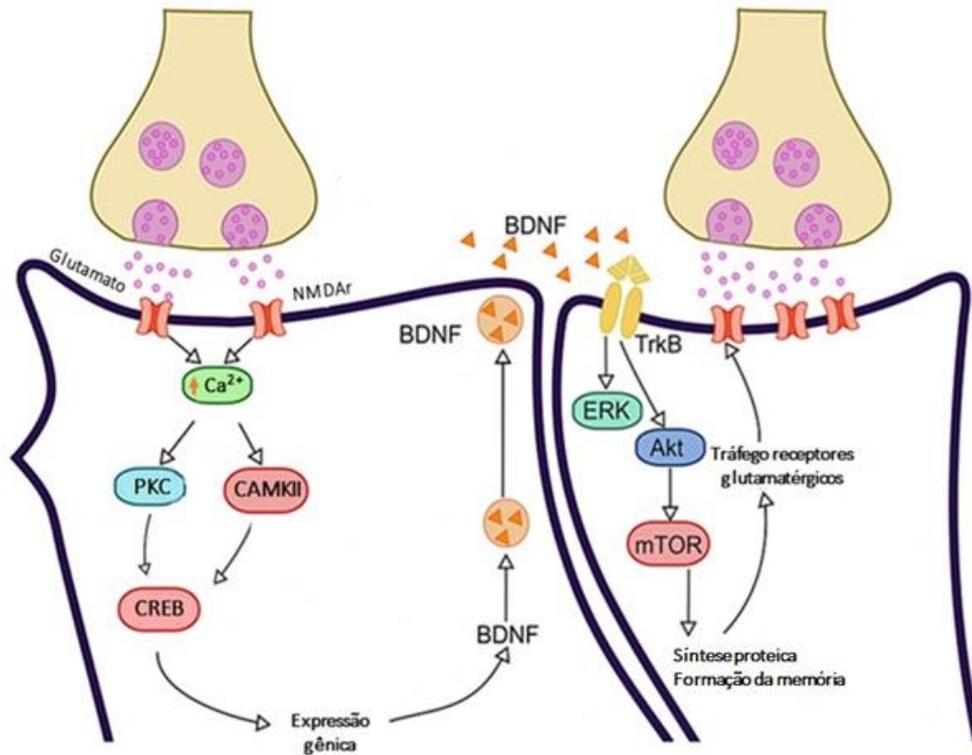
O processo de formação da memória de medo condicionado contextual induz, por si só, o aumento na expressão da PI3K (ZANCA et al., 2019) e também nos níveis de fosforilação da Akt, principalmente nos primeiros 40 minutos após o condicionamento (LIN et al., 2001; NAKAI et al., 2014). A utilização de wortmanina (inibidor não específico da PI3K), impede o aumento na fosforilação da Akt induzido pelo aprendizado, tanto na memória de medo (LIN et al., 2001) quanto na memória espacial (MIZUNO et al., 2003). Da mesma forma, a inibição da via PI3K/Akt resulta na diminuição dos níveis de fosforilação de proteínas como mTOR, ERK e CREB, gerando efeitos negativos sobre a aprendizagem e memória (CHEN et al., 2005; LIN et al., 2003, 2001). Com isso, a fosforilação e ativação da via PI3K/Akt é considerada um importante mediador na formação de novas memórias.

A formação da memória de medo condicionado contextual também aumenta a expressão do BDNF e do receptor TrkB (OU; GEAN, 2006). A ativação do BDNF também está relacionada com a ativação da via PI3K/Akt, sendo essa relação essencial para a formação da memória de medo (OU; GEAN, 2006). O tratamento com oligonucleotídeo antisense específico para o BDNF induz uma diminuição nos níveis de fosforilação da PI3K, bem como de seus outros substratos alvo, como MAPK, CAMKII e PLC- γ (MIZUNO et al., 2003). Em contrapartida, o tratamento com BDNF exógeno induz aumento na fosforilação da Akt, demonstrando relação positiva entre as duas vias para a formação da memória de medo e plasticidade sináptica no hipocampo (NAKAI et al., 2014).

Resumidamente, a consolidação da memória de medo induz a liberação de glutamato, ativação de receptores glutamatérgicos e aumento na expressão de diferentes proteínas cinases (Figura 9). A ativação do NMDAr induz aumento do cálcio intracelular e ativação de fatores de transcrição responsáveis pelo aumento da expressão gênica e liberação de BDNF na fenda sináptica e, conseqüentemente, ativação do receptor TrkB. O complexo BDNF/TrkB induz a

fosforilação e ativação da via PI3K/Akt, que por sua vez, é responsável por regular o tráfego e fosforilar as subunidades dos receptores glutamatérgicos, fosforilar e ativar ou inibir proteínas cinases responsáveis pela síntese proteica, tradução e transcrição de genes que contribuem para a consolidação da memória (IGNÁCIO et al., 2016).

Figura 9 – Envolvimento das vias BDNF/TrkB e PI3K/Akt na consolidação da memória.



Fonte: Modificado de (IGNÁCIO et al., 2016).

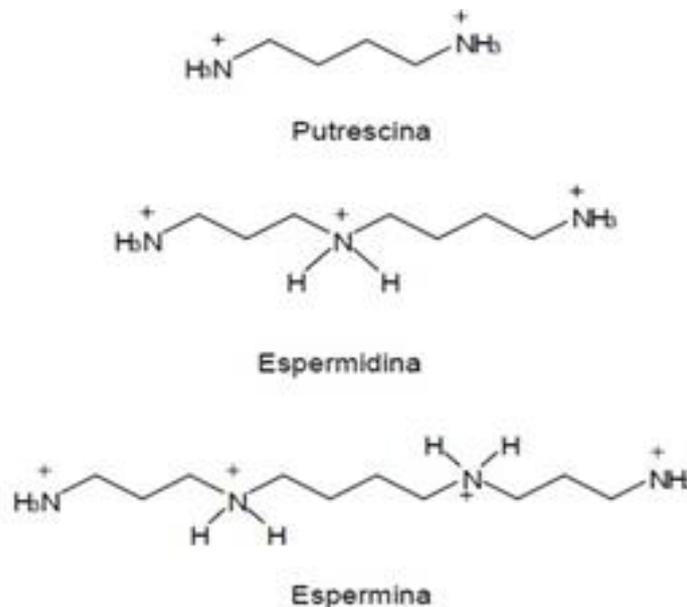
1.8 POLIAMINAS

As poliaminas são aminas alifáticas presentes endogenamente no organismo, sendo encontradas em seu estado protonado e em altas concentrações em estruturas cerebrais, como hipotálamo, hipocampo, bulbo e cerebelo (LIU et al., 2008). Além de variar suas concentrações entre regiões, as poliaminas também possuem variação entre as sub-regiões (CA1, CA2 e CA3 do hipocampo, por exemplo), da mesma forma também variam de acordo com a idade (LIU et al., 2008). A espermidina destaca-se entre os membros por apresentar maiores concentrações em regiões hipocámpais de ratos, como na região CA1 do hipocampo, seguida da espermina e em menores concentrações, putrescina.

As poliaminas endógenas são divididas em três tipos, compostas por uma, duas ou três cadeias carbonadas conectadas por grupos aminos, denominadas putrescina, espermidina (SPD)

e espermina (Figura 10). Devido a esses grupos aminos, as poliaminas apresentam um caráter fortemente básico, são solúveis em água e apresentam baixo peso molecular (CARTER, 1994). Seus níveis celulares são controlados por enzimas responsáveis pela sua biossíntese e catabolismo, no qual a desregulação afeta funções vitais essenciais para a célula, onde uma diminuição de seus níveis acarreta em prejuízo no crescimento celular, e um aumento pode ter efeitos citotóxicos (DAVIS, 1990).

Figura 10 – Estrutura química das poliaminas.



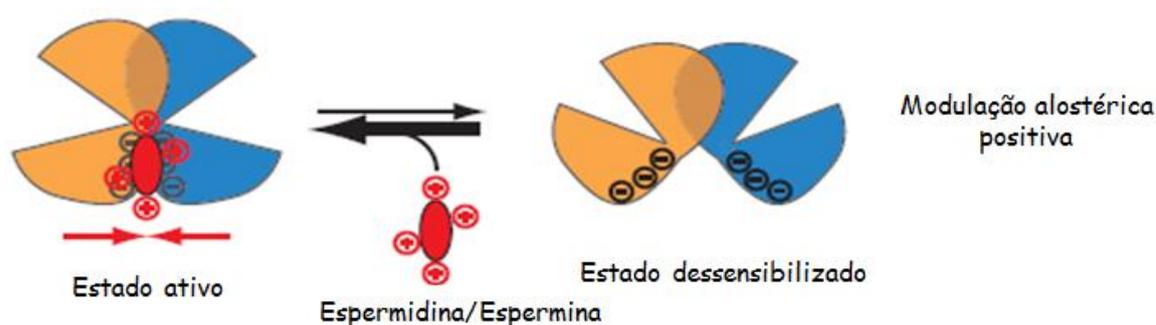
Fonte: Modificado de (KALAC; KRAUSOVÁ, 2005).

A interação das poliaminas com macromoléculas carregadas negativamente, como ácidos nucleicos, proteínas, fosfolípídeos e ATP, é o principal mecanismo para a maioria de suas funções biológicas. A partir dessa interação, as poliaminas são responsáveis por modular o crescimento e diferenciação celular (TABOR; TABOR, 1984), regular a expressão gênica (CELANO et al., 1989), síntese de proteínas (YOSHIDA et al., 1999), interação com canais iônicos, como o NMDAr (WILLIAMS, 1997). Além disso, também apresentam função essencial no aprendizado, memória e neuroproteção (COFFINO, 2001; WANG et al., 2003; GUGLIUCCI, 2004; GUERRA et al, 2016).

As poliaminas modulam o NMDAr devido a sua interação na interface das subunidades GluN1 e GluN2B do receptor (MONY et al., 2011). Essa modulação ocorre de maneira bifásica, ou seja, baixas concentrações de poliaminas aumentam a frequência de abertura do canal, enquanto que, altas concentrações inibem o receptor (WILLIAMS, 1997). As subunidades do

NMDAr podem alternar em dois estados conformacionais, ativo e dessensibilizado (Figura 11). No estado ativo, as duas subunidades estão abertas, o que mantém os lóbulos próximos, aumentando a probabilidade de ligação do agonista. Enquanto que no estado dessensibilizado, as cargas elétricas negativas mantêm os lóbulos afastados, provocando seu fechamento. Ao se ligar nas subunidades, as poliaminas agem estabilizando o receptor no seu estado ativo, aumentando a frequência de abertura do receptor, atuando como modulador alostérico positivo (MONY et al., 2011).

Figura 11 – Sítios de modulação alostérica do NMDAr.



Fonte: Modificado de (MONY et al., 2011).

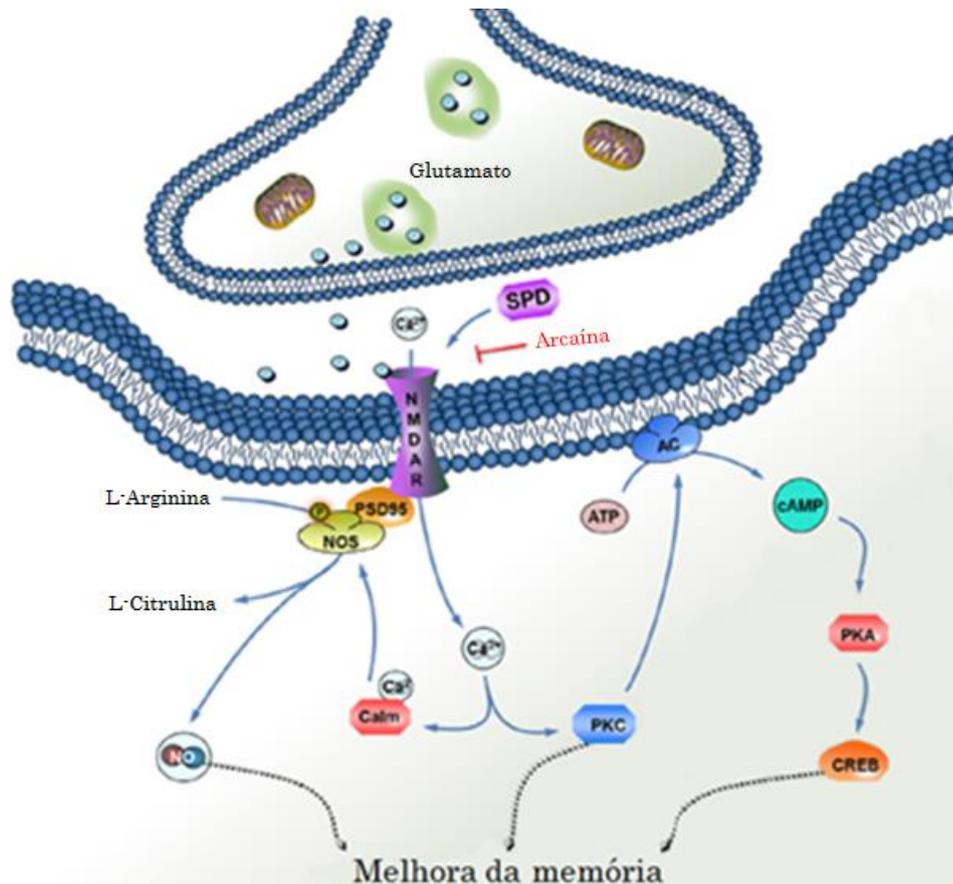
1.9 ESPERMIDINA E MEMÓRIA

Diversos estudos têm demonstrado o papel essencial das poliaminas nos processos de aprendizado e memória. A administração intra-hipocampal (BERLESE et al., 2005), intra-amígdala (RUBIN et al., 2001, 2004) e sistêmica (CAMERA et al., 2007; RIBEIRO et al., 2013) de SPD melhora o desempenho dos animais nas tarefas de esquiva inibitória e medo condicionado contextual, facilitando a consolidação, reconsolidação e extinção da memória. O efeito facilitador da SPD envolve a ativação de proteínas cinases, uma vez que a infusão de SPD induz aumento nos níveis de fosforilação de PKA, PKC, CREB e BDNF (GUERRA et al., 2012; SIGNOR et al., 2016, 2017).

Sugere-se que o mecanismo pelo qual as poliaminas exercem seu efeito sobre a memória seja por aumentar a frequência de abertura do NMDAr (Figura 12). Como consequência, é visto um aumento na fosforilação de proteínas cinases e fatores de transcrição (PKA, PKC, CREB e BDNF), que regulam mecanismos moleculares e celulares que culminam no aumento da transmissão de informações entre os neurônios e, conseqüentemente, melhora da memória. Essa hipótese é corroborada por estudos que demonstraram que a administração do antagonista do

sítio das poliaminas, arcaína, impede os efeitos positivos da SPD sobre a memória (RIBEIRO et al., 2013; RUBIN et al., 2004) e fosforilação da PKA induzida por SPD (GUERRA et al., 2011), impedindo a formação da memória.

Figura 12 – Mecanismo da melhora da memória induzido por SPD.



Fonte: Modificado de (GUERRA; RUBIN; MELLO, 2016).

Somado a isso, estudos demonstraram os efeitos benéficos da suplementação de SPD na dieta de idosos, o qual demonstrou ser eficaz em prevenir e/ou retardar déficits cognitivos relacionados com a idade (SCHWARZ et al., 2018). Dessa forma, a suplementação de SPD tem sido proposta como uma nova alternativa para a prevenção da perda de memória em idosos com riscos de demência (WIRTH et al., 2019).

Da mesma forma, já foi demonstrado o envolvimento do receptor TrkB nos efeitos positivos da SPD sobre a memória. Estudos demonstraram que a administração de ANA-12 imediatamente após a reativação, impede a melhora da persistência da memória reconsolidada induzida por SPD (SIGNOR et al., 2017). Assim como, foi demonstrado que a espermina

reverte déficits de memória induzido por lipopolissacarídeo (LPS) através da ativação da via BDNF/TrkB (FRUHAUF et al., 2018).

No entanto, ainda não estão bem elucidados os mecanismos pelos quais a SPD melhora a consolidação da memória de medo. Até então sabe-se que, a consolidação da memória é dependente da ação do receptor TrkB e da via PI3K/Akt; e que a SPD facilita a consolidação da memória. Contudo, ainda não foi demonstrado se o mecanismo pelo qual a SPD melhora a consolidação da memória é dependente da ativação do receptor TrkB e PI3K, assim como da fosforilação da Akt.

1.10 JUSTIFICATIVA

Atualmente grande parte da população apresenta memórias aversivas persistentes relacionadas a traumas, que desencadeiam doenças e afetam a qualidade de vida. Assim como várias doenças desencadeiam prejuízos na memória, causando neurodegeneração, como a Doença de Alzheimer. O medo condicionado contextual serve como um modelo animal utilizado a fim de compreender os mecanismos que ocorrem na consolidação da memória de medo. Com base nisso, elucidar o mecanismo e possíveis vias de sinalização envolvidas na formação dessas memórias, torna-se fundamental para auxiliar no tratamento dessas patologias.

Sabe-se que a administração de poliaminas está envolvida na memória de medo, no entanto, nenhum estudo abordou o envolvimento da administração intra-hipocampal de poliaminas na consolidação da memória de medo. Portanto, no presente estudo foram investigados os efeitos da administração intra-hipocampal de espermidina na consolidação da memória de medo, assim como as possíveis vias de sinalização envolvidos nesse efeito.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o mecanismo de ação da espermidina na consolidação da memória, utilizando a tarefa de medo condicionado contextual em ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos a serem alcançados são:

- Avaliar o efeito da infusão intra-hipocampal de SPD na consolidação da memória;
- Avaliar o envolvimento do receptor TrkB na consolidação da memória;

- Avaliar o envolvimento da via PI3K na consolidação da memória;
- Avaliar o envolvimento do receptor TrkB e da via PI3K na melhora da consolidação da memória induzida por SPD;
- Avaliar o efeito da infusão intra-hipocampal de SPD e ANA-12, 6 horas após o treino sobre a consolidação da memória;
- Avaliar o efeito da infusão intra-hipocampal de SPD sobre a fosforilação da Akt em células hipocâmpais.



Contents lists available at ScienceDirect

Brain Research Bulletin

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

Spermidine-induced improvement of memory consolidation involves PI3K/Akt signaling pathway

Shaiana Beck Fabbrin^a, Bruna Amanda Girardi^a, Arithane de Lorena Wendel^b,
 Carolina Coelho Ilha Valin^b, Micheli Mainardi Pillat^c, Fernanda Tibolla Viero^c,
 Carlos Fernando Mello^{c,*}, Maribel Antonello Rubin^{a,c,*}

^a Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Center of Exact and Natural Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

^b School of Pharmacy, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

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

ARTICLE INFO

Keywords:
 Memory
 Consolidation
 Polyamines
 Hippocampus
 BDNF
 Akt

ABSTRACT

Spermidine (SPD) is an endogenous polyamine that plays a facilitatory role in memory acquisition and consolidation. Memory consolidation occurs immediately after learning and again around 3–6 hours later. Current evidence indicates that the polyamine binding site at the NMDA receptor (NMDAR) mediates the effects of SPD on memory. While NMDAR activation increases brain-derived neurotrophic factor (BDNF) release, no study has investigated whether BDNF-activated signaling pathways, such as the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway play a role in SPD-induced improvement of memory consolidation. Therefore, the aim of the current study was to evaluate whether the TrkB receptor and the PI3K/Akt pathway are involved in the facilitatory effect of SPD on memory consolidation. Male Wistar rats were trained in the contextual conditioned fear task. SPD, ANA-12 (TrkB antagonist), and LY294002 (PI3K inhibitor) were administered immediately after training. The animals were tested 24 h after training. We found that SPD improved fear memory consolidation and that both ANA-12 and LY294002 prevented the facilitatory effect of SPD on memory. These results suggest that SPD-induced improvement of memory consolidation involves the activation of the TrkB receptor and PI3K/Akt pathway.

1. Introduction

Putrescine, spermine and spermidine (SPD) are endogenous aliphatic polyamines that are particularly abundant in the central nervous system. It has been reported that polyamines exert their effects through their interaction on the GluN1 and GluN2B subunits of the NMDA receptor (NMDAR) (Mony et al., 2011). In fact, accumulating evidence suggests that intra-amygdala (Rubin et al., 2004), intra-peritoneal (camera et al., 2007) and intra-hippocampal (i.h.) (Girardi et al., 2016; Gomes 2010) administration of SPD improves the acquisition and consolidation of the memory of inhibitory avoidance and fear conditioning. Likewise, facilitatory effects of polyamines on memory have also been reported in humans, as far as polyamine supplementation in the diet moderately improves memory in elderly people with subjective cognitive deficits

(Schwarz et al., 2018; Wirth 2019).

NMDAR activation causes calcium influx and activation of downstream protein kinases, such as cAMP-dependent protein kinase (PKA), calcium-dependent protein kinase (PKC), the cAMP response element binding protein (CREB) and expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Chetkovich et al., 1991; Ou and Gean, 2007; Park et al., 2014). Spermidine increases the frequency of opening of the receptor (Mony et al., 2011), which leads to an increase in the phosphorylation of these proteins at different stages of memory formation. It is important to note that the inhibition of these kinases impairs the facilitatory effect of SPD on memory consolidation and persistence (Guerra et al., 2011, 2012; Signor et al., 2016, 2017).

BDNF is a member of the family of neurotrophins that exert their effects through their binding to the tropomyosin kinase B (TrkB)

* Corresponding author at: Department of Biochemistry and Molecular Biology, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

** Corresponding author at: Department of Physiology and Pharmacology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.
 E-mail addresses: cf.mello@smail.ufsm.br (C.F. Mello), marubin@smail.ufsm.br (M.A. Rubin).

<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.08.018>

Received 17 March 2020; Received in revised form 18 August 2020; Accepted 19 August 2020

Available online 25 August 2020

0361-9230/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

receptor (Volosin et al., 2006). Current evidence suggests that TrkB/BDNF signaling is a key mediator in memory processing. In fact, the TrkB antagonist ANA-12 impairs the consolidation (Blank et al., 2016) and persistence (Signor et al., 2017) of contextual conditioned fear. TrkB/BDNF signaling activates three signaling pathways involved in learning and memory: phospholipase C gamma (PLC γ), mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) (Minichiello, 2009).

Subsequent activation of the PI3K/Akt pathway is responsible for numerous physiological responses (Vivanco and Sawyers, 2002). However, more importantly, the path has been associated with different effects on learning and memory. It is known that the PI3K/Akt pathway plays an important role in synaptic plasticity, maintaining long-term potentiation, becoming essential for the formation of memory (Lin et al., 2001; Opazo et al., 2003). In fact, the administration of PI3K inhibitor, LY294002, impairs the acquisition and consolidation of short and long term memory (Barros et al., 2001).

During the memory formation process, phosphorylated Akt levels increase over a period of 10–40 min after learning, proving to be an important mediator for memory consolidation (Lin et al., 2001; Nakai et al., 2014). In addition, BDNF and subsequent activation of the PI3K/Akt pathway appear to be essential for the establishment of contextual conditioned fear memory (Nakai et al., 2014).

Previous studies have shown that SPD improves fear memory persistence and that its effect depends on the involvement of BDNF and its TrkB receptor (Signor et al., 2017); however, no study has addressed the role of the TrkB receptor and the PI3K/Akt signaling pathway in the facilitatory effect of SPD on the consolidation of fear memory. Therefore, in the current study, we investigated whether the SPD-induced improvement of memory consolidation depends on the TrkB receptor and the PI3K/Akt pathway in the hippocampus.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Adult male Wistar rats (180–220 g), from the animal house of the Federal University of Santa Maria were used. The animals were housed four to a cage and maintained on a 12 h light/dark cycle at a temperature of 21 °C with access to water and food *ad libitum*. All experiments were carried out in the light phase and are in accordance with Brazilian law n°. 11.794/2008, which is in agreement with the Policies on the Use of Animals and Humans in Neuroscience Research and with the Institutional and National Regulations for Animal Research (process 7906080318).

2.2. Surgery

Rats were anaesthetized with an intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (8 mg/kg) and were implanted with two 27-gauge guide cannulae placed 1 mm above the CA1 region of the dorsal hippocampus at the following coordinates: A = 4 mm; L = 3.0 mm; and V = 2.0 mm (Paxinos and Watson, 1986). Placement of injections was histologically verified as described elsewhere (Rubin et al., 1997). Only data from the animals with correct cannulae placement were analyzed (Fig. 1).

2.3. Drugs

Rats were injected with saline (0.9 % NaCl), N-(3-aminopropyl)-1,4-butanediamine trihydrochloride (spermidine, SPD), (N2–2–2-Oxoazepan-3-yl amino) carbonyl phenyl benzo (b) thiophene-2-carboxamide (ANA-12) or 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-1(4 H)-benzopyran-4-one hydrochloride (LY-294002). SPD, ANA-12 and LY-294002 were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Phospho-Akt (Thr308) (C31E5E) was obtained from Cell Signaling Technology. All drug solutions were

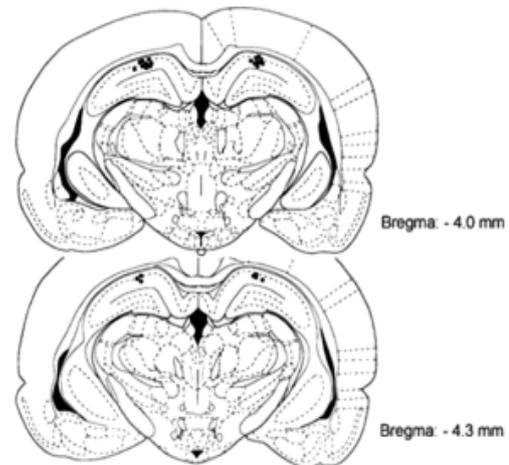


Fig. 1. Schematic representations of rat brain sections at two rostro caudal planes (-4.0 mm and -4.3 mm from bregma) taken from the atlas of Paxinos and Watson (1986). Dark squares indicate infusion sites in the CA1 region of the dorsal hippocampus.

prepared in saline (0.9 % NaCl). The injections were performed bilaterally into the CA1 region of hippocampus (0.5 μ l for 1 min) by using a 30-gauge needle fitted into the guide cannula. The tip of the injection needle protruded 1.0 mm beyond that of the guide cannula into the CA1 region in the dorsal hippocampus. The needles were left in place for an additional 60 s to minimize backflow.

2.4. Apparatus

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

2.5. Contextual fear conditioning

Each rat was subjected to a single fear-conditioning training and test session, as described previously (Signor et al., 2017). In brief, rats were placed in the conditioning chamber (conditioned stimulus, CS) and habituated to the apparatus for 3 min. Immediately after habituation, three 1 s, 0.4 mA foot shocks (unconditioned stimulus, US) were delivered and the shocks were 40 s apart. After the last CS/US pairing, rats were allowed to stay in the chamber for additional 60 s before returning to their home cages.

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

2.6. Flow cytometry analysis

The hippocampal tissue was gently homogenized with a Potter–Elvehjem tissue homogenizer (10 strokes up and down) at 4 °C with

1 mL of PBS. The homogenate were incubated with 4% PFA for 10 min. After that, samples were centrifuged (500 g, at 4 °C for 5 min), and the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in cold absolute ethanol for at least 4 h, for complete fixation.

Before flow cytometry analysis, the cells were washed with the solution 1 (1% fetal bovine serum in PBS containing 0.1 %Triton X-100) and centrifuged at 500 g, at 4 °C for 5 min. After that, the cells were incubated for 30 min with anti-phospho-Akt antibody (1:100; Cell Signaling Technology, Beverly, MA). Samples were washed twice with solution 1 and cells were incubated with Alexa Fluor 488 conjugated goat anti-rabbit IgG antibodies for 30 min. Cell were washed, and fluorescence intensities acquired at 525 nm in a flow cytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA). Mean fluorescence intensity (MFI) data were analyzed by Flowjo V10 software

2.7. Statistical analyses

Data were analyzed by t-test, one- or two-way analysis of variance (ANOVA) depending on the experimental design. *Post hoc* analyses were carried out by the Dunnett or Tukey test, when indicated. A $p < 0.05$ was considered significant.

2.8. Experimental groups

2.8.1. Experiment 1: Effect of intrahippocampal infusion of SPD on contextual fear conditioning

The dose of SPD was selected from previous studies of our group (Rubin et al., 2000). To confirm if the dose used improves contextual fear conditioning, the animals were trained and tested in the contextual fear conditioning task, as previously described. Immediately after training, the animals received intrahippocampal (i.h.) infusion of saline or SPD at a dose of 2 nmol/site. Twenty-four hours after training, the percentage of freezing was evaluated.

2.8.2. Experiment 2: Involvement of the TrkB receptor in the contextual fear conditioning

In order to investigate whether the TrkB receptor is involved in the contextual fear conditioning, we performed a dose-response curve of the selective TrkB antagonist, ANA-12. The animals were trained and immediately after training, the animals received an i.h. infusion of saline or ANA-12 at doses of 0.3; 3; 30; 300 pmol/site. Twenty-four hours after training, the animals were tested in the same apparatus.

2.8.3. Experiment 3: Involvement of the TrkB receptor in the improvement of contextual fear conditioning induced by spermidine

In order to investigate the involvement of the TrkB receptor in the effect of spermidine, the animals were trained in contextual fear conditioning apparatus and immediately after training received an i.h. infusion of saline or ANA-12 (0.3 pmol/site), and 5 min later an i.h. infusion of saline or spermidine (2 nmol/site). Twenty-four hours after training, the animals were tested in the same apparatus.

2.8.4. Experiment 4: Effect of intrahippocampal administration 6 h after training of spermidine or ANA-12 in contextual fear conditioning

In order to analyze the temporal modulation of memory consolidation, a control experiment was carried out. The animals were trained in the contextual fear conditioning apparatus and six hours after training ("delayed injection" control) received i.h. saline infusion, SPD (2 nmol/site) or ANA-12 (300 pmol/site). Twenty-four hours after training, the animals were tested in the same device.

2.8.5. Experiment 5: Involvement of the PI3K-Akt signaling pathway in the contextual fear conditioning

In order to evaluate whether the PI3K-Akt signaling pathway is involved in contextual fear conditioning, we performed a dose-response curve of the PI3K inhibitor, LY294002. The animals were trained in the

contextual fear conditioning task and immediately after training received an i.h. infusion of saline or LY294002 at doses of 0.5, 5 or 50 $\mu\text{g}/\text{site}$, according to Barros et al. (2001). Twenty-four hours after training, the animals were tested in the conditioned fear apparatus.

2.8.6. Experiment 6: Involvement of the PI3K-Akt signaling pathway in the improvement of contextual fear conditioning induced by spermidine

This experiment was performed to evaluate whether the PI3K-Akt pathway is involved in the facilitatory effect of spermidine on contextual fear conditioning consolidation. The animals were trained in the contextual fear conditioning apparatus and, immediately after training, received an i.h. infusion of saline or LY294002 (5 $\mu\text{g}/\text{site}$). Five minutes later they received an i.h. infusion of saline or spermidine (2 nmol/site). The animals were tested in the same apparatus 24 h later.

2.8.7. Experiment 7: Involvement of Akt phosphorylation in the improvement of contextual fear conditioning induced by spermidine

This experiment was conducted to investigate the effect of spermidine administration on phospho-Akt levels. Rats were trained in the contextual fear condition apparatus and immediately after training received i.h. infusion of saline or LY294002 (5 $\mu\text{g}/\text{site}$). Five minutes thereafter they were infused with saline or SPD (2 nmol/site). The animals were euthanized 30 min after training and the hippocampus was removed for analysis of Akt phosphorylation by the flow cytometry method.

3. Results

Fig. 1 shows the schematic representation of cannulae placement, referring to all the experiments performed.

Fig. 2 shows the effect of SPD (2 nmol/site, i.h.) immediately after training on the percentage of freezing during the test. Statistical analysis (t-test) revealed that the SPD increased the freezing percentage of the animals when compared to the control group ($t = 3.036$; $p = 0.0125$), indicating that SPD improves the consolidation of memory in the contextual fear conditioning task.

Fig. 3A shows the effect of ANA-12 (0.3, 3, 30 and 300 pmol/site, i.

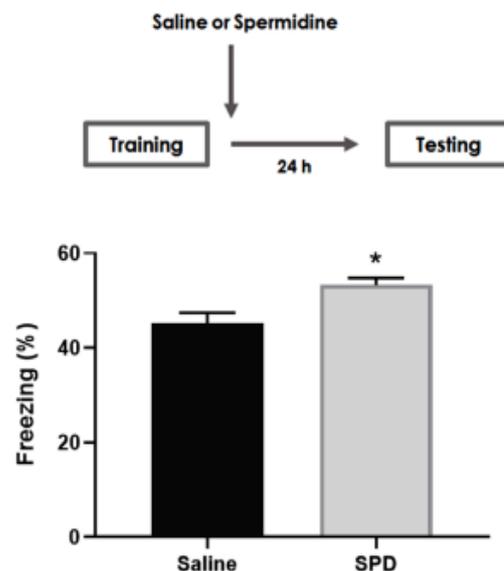


Fig. 2. Effect of the i.h. administration of spermidine on the consolidation of fear memory. Immediately after training, the animals received infusion of saline or spermidine (2 nmol/site), twenty-four hours later the test was performed and freezing of the animals was analyzed. Data are expressed as mean + S.E.M. (6 animals per group). * $P < 0.05$ compared to the saline group.

h.) immediately after training on the percentage of freezing during the test. Statistical analysis (one-way ANOVA) revealed a significant effect of pharmacological treatment [$F(4,25) = 17.65, p < 0.0001$]. *Post-hoc* analysis (Dunnnett's Test) showed that ANA-12, at the doses of 3, 30 and 300 pmol/site, decreases the percentage of freezing.

Fig. 3B shows the effect of ANA-12 (0.3 pmol/site, i.h.), on SPD-induced improvement of contextual fear conditioning. Statistical analysis (two-way ANOVA) revealed a significant pretreatment (saline or ANA-12) versus treatment (saline or SPD) interaction [$F(1,20) = 20.97, p = 0.0002$]. *Post-hoc* analysis (Tukey's Test) showed that ANA-12 prevents the improving effect of SPD on memory consolidation, suggesting that spermidine-induced memory improvement may involve the activation of TrkB receptor.

Fig. 4 shows the effect of i.h. administration of saline, SPD (2 nmol/

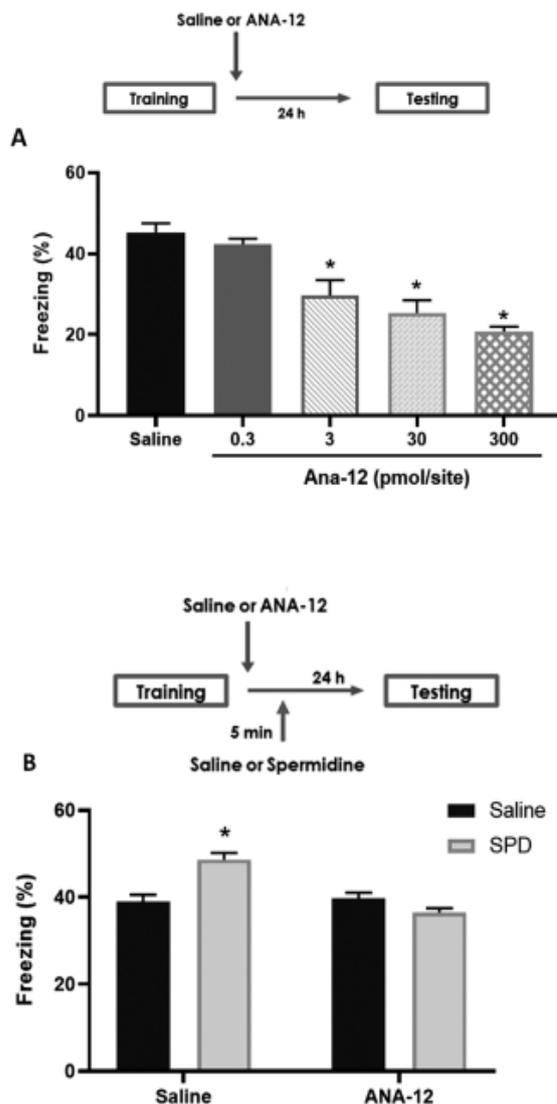


Fig. 3. Effect of the i.h. administration of ANA-12 (0.3, 3, 30 and 300 pmol/site) on the consolidation of fear memory (A). * $p < 0.05$ compared to the saline group. Effect of immediately post-training administration i.h. of saline or ANA-12 (0.3 pmol/site) and 5 min post-training i.h. infusion of saline or spermidine (2 nmol/site) on the consolidation of fear memory (B). * $p < 0.05$ compared to the ANA-12/SPD group. Data are expressed as mean \pm S.E.M (6 animals per group).

site) or ANA-12 (300 pmol/site) 6 h after the training on the percentage of freezing at test. Statistical analysis (one-way ANOVA) revealed no significant effect of pharmacological treatment [$F(2,21) = 0.1252, p = 0.88$]. These results suggest that pharmacological manipulation with SPD or ANA-12 6 h after training does not alter contextual fear conditioning.

Fig. 5A shows the effect of the i.h. infusion of LY294002 (0.5, 5 or 50 μ g/site) immediately after training on the percentage of freezing at test. Statistical analysis (one-way ANOVA) showed a significant effect of pharmacological treatment [$F(3,20) = 8.703, p = 0.0007$]. *Post hoc* analysis (Dunnnett's Test) revealed that LY294002 at the dose of 50 μ g/site impairs contextual fear conditioning.

Fig. 5B shows the effect of LY294002 (5 μ g/site, i.h.) on SPD-induced improvement of contextual fear conditioning. Statistical analysis (two-way ANOVA) revealed a significant pretreatment (saline or LY294002) versus treatment (saline or SPD) interaction [$F(1,20) = 15.12, p = 0.0008$]. *Post-hoc* analysis (Tukey's Test) showed that LY294002 prevented the facilitatory effect of SPD on memory consolidation, suggesting that SPD-induced memory improvement involves the activation of the PI3K/Akt signaling pathway.

Fig. 6 shows the effect of spermidine and LY294002 on Akt phosphorylation. Statistical analysis (two-way ANOVA) revealed a significant pretreatment (saline or LY294002) versus treatment (saline or SPD) interaction [$F(1,27) = 8.211, p = 0.008$]. *Post-hoc* analysis (Tukey's Test) showed that LY294002 prevented the SPD-induced increase of Akt phosphorylation.

4. Discussion

In the current study we showed that the i.h. administration of SPD immediately, but not 6 h, after training facilitates fear memory consolidation, evaluated 24 h after training (Figs. 2 and 4). These results indicate that SPD facilitates early consolidation of fear memory. These results are similar to those previously described in the inhibitory

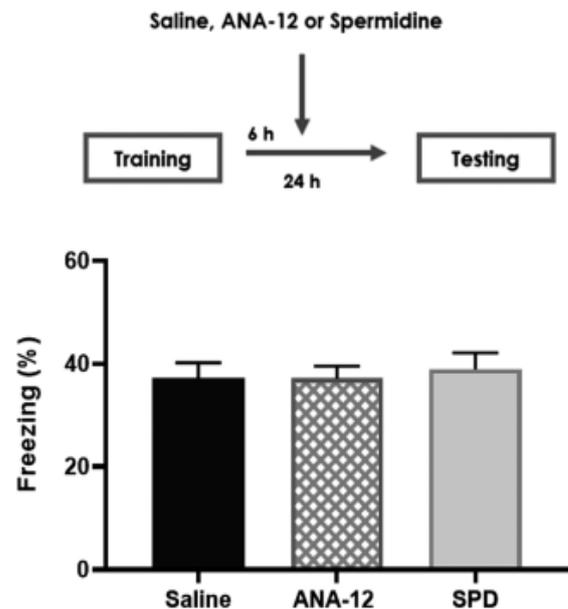


Fig. 4. Effect of the i.h. administration, 6 h after training, of saline, spermidine or ANA-12 on the consolidation of fear memory. Six hours after training, the animals received i.h. infusion of saline, spermidine (2 nmol) or ANA-12 (300 pmol/site), twenty-four hours after training the animals were submitted to the test and analyzed for their freezing. Data are expressed as mean \pm S.E.M (8 animals per group).

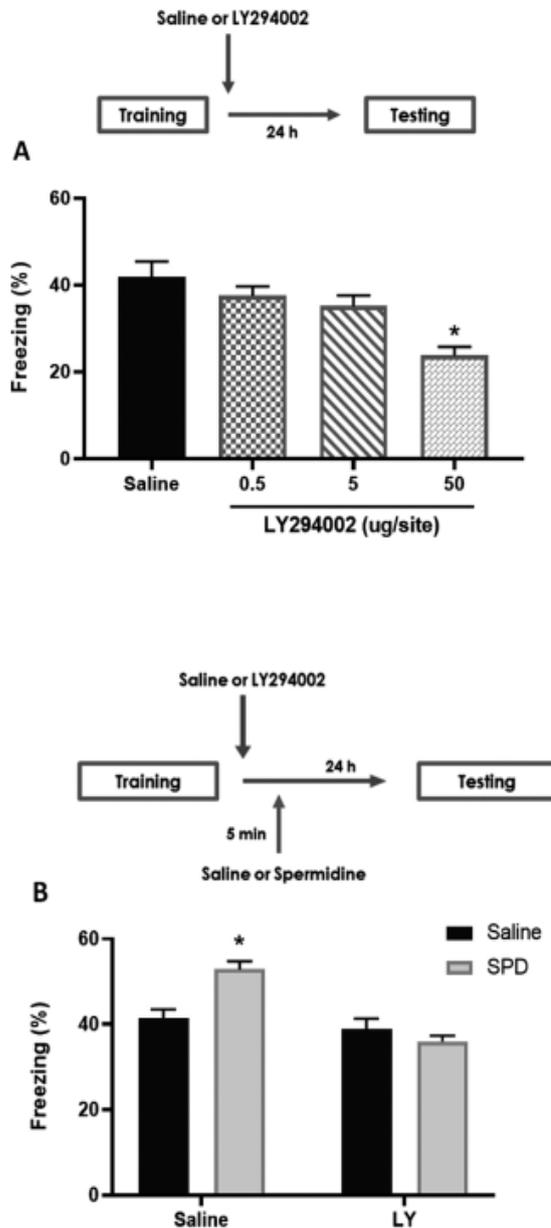


Fig. 5. Effect of the i.h. administration of LY294002 (0.5, 5 and 50 µg/site) on the consolidation of fear memory (A). * $p < 0.05$ compared to the saline group. Effect of the immediately post-training administration (i.h.) of saline or LY294002 (5 µg/site) and 5 min post-training (i.h.) administration of saline or spermidine (2 nmol/site) on the consolidation of fear memory (B). * $p < 0.05$ compared to the LY294002/SPD group. Data are expressed as mean \pm S.E.M (6 animals per group).

avoidance task (Berlese et al., 2005), in which no effect of SPD was found at 6 h after training, further suggesting an early time window for the facilitatory effect of SPD. ANA-12 prevented the facilitatory effect of SPD on memory consolidation, suggesting the involvement of TrkB in this effect of SPD (Fig. 3B). Likewise, we found that inhibition of PI3K prevents the facilitatory effect of SPD (Fig. 5B) and prevents the increase in SPD-induced Akt phosphorylation (Fig. 6), suggesting a role for the PI3K/Akt pathway in the effects of SPD on fear memory.

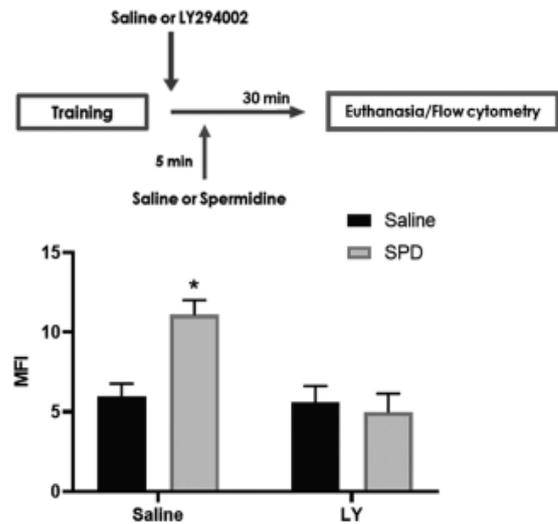


Fig. 6. Effect of the immediately post-training administration of saline or LY294002 (5 µg/site) and 5 min post-training (i.h.) administration of saline or spermidine (2 nmol/site) on the phosphorylated Akt levels. Phosphorylated Akt in the hippocampus was analyzed by flow cytometry and the mean fluorescence intensity (MFI) was analyzed. * $p < 0.05$ compared to the LY294002/SPD group. Data are expressed as mean \pm S.E.M (7–8 animals per group).

BDNF has been considered a key mediator for memory processing because it modulates glutamatergic receptor trafficking, synaptic plasticity and protein synthesis (Bekinschtein et al., 2014; Cunha et al., 2010). In addition, it seems to be essential for memory consolidation (Blank et al., 2016) and persistence (Signor et al., 2017). In this study we showed that a high dose of ANA-12 impairs memory consolidation, and that a dose that has no effect on memory on its own prevents SPD-induced improvement of memory consolidation. These results suggest that the SPD effects on memory consolidation in the hippocampus are dependent on the activation of the TrkB receptor.

Memory consolidation is a process that requires the activity of protein kinases, protein synthesis and synaptic plasticity, which occur soon after the acquisition of new information, being necessary again around 3–6 hours after learning (Igaz et al., 2002). According to Medina and colleagues, at first, the pre-existing BDNF is quickly released from pre-synaptic neurons in order to stabilize new information that reaches the hippocampus and, shortly thereafter, it would be synthesized and released again about 3–6 hours later training (Medina and Cammarota, 2017). However, we found that ANA-12, like SPD, does not alter the animals' performance when administered 6 h after training. Previous studies have reported that SPD administration 6 h after training does not alter the memory of inhibitory avoidance (Berlese et al., 2005), and this is the first study to show the same time window of effect of SPD in the fear conditioning task. Interestingly, the administration of SPD 12 h after training improves memory persistence (Signor et al., 2014) and increases hippocampal BDNF levels (Signor et al., 2017). Therefore, it seems that SPD and TrkB share the same time window for memory modulation.

It is suggested that the effects of BDNF on consolidation depend on the subsequent activation of the PI3K/Akt pathway (Nakai et al., 2014). It is well described that LY294002 impairs acquisition (Cui et al., 2010), consolidation (Roesler et al., 2009) and spontaneous fear recovery (Barros et al., 2001). Taking this into account, we investigated whether SPD-induced memory improvement would be dependent on the activation of PI3K. LY294002 prevented the facilitatory effect of SPD on memory consolidation, suggesting the involvement of PI3K in this effect. Accordingly, we found that SPD increases Akt phosphorylation in the hippocampus 30 min after training. These results are consistent with

previous studies that showed that Akt phosphorylation increases over a period of 10–40 min after conditioned fear training (Lin et al., 2001, Nakai2014).

In summary, this work showed that ANA-12 and LY294002 hinder SPD-induced improvement of fear memory. These findings suggest that TrkB receptor, PI3K and phosphorylation of Akt are involved in the facilitatory effect of SPD on fear memory.

Compliance with ethical standards

All experiments were carried out in the light phase and are in accordance with Brazilian law n°. 11.794/2008, which agrees with the Policies on the Use of Animals and Humans in Neuroscience Research and with the Institutional and National Regulations for Animal Research (process 7,906,080,318).

Funding

This study was supported by National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) (303417/2018-8; Financial assistance: 163693/2018-8) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) (Process number: 23038.005848/2018-31).

CRediT authorship contribution statement

Shaiana Beck Fabbrin: Methodology, Writing - original draft. Bruna Amanda Girardi: Methodology. Arithane de Lorena Wendel: Methodology. Carolina Coelho Ilha Valin: Methodology. Micheli Mainardi Pillat: Methodology. Fernanda Tibolla Viero: Methodology. Carlos Fernando Mello: Supervision. Maribel Antonello Rubin: Supervision.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that there are no conflict of interest in relation to the work described.

References

- Barros, D.M., et al., 2001. LY294002, an inhibitor of phosphoinositide 3-kinase given into rat hippocampus impairs acquisition, consolidation and retrieval of memory for one-trial step-down inhibitory avoidance. *Behav. Pharmacol.* 12 (8), 629–634.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Medina, J.H., 2014. BDNF and memory processing. *Neuropharmacology* 76 (PART C), 677–683.
- Berlese, D.B., et al., 2005. Time-dependent modulation of inhibitory avoidance memory by spermidine in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 83 (1), 48–53.
- Blank, M., et al., 2016. TrkB blockade in the hippocampus after training or retrieval impairs memory: protection from consolidation impairment by histone deacetylase inhibition. *J. Neural Transm.* 123 (3), 159–165.
- Camera, K., et al., 2007. Systemic administration of polyaminergic agents modulate fear conditioning in rats. *Psychopharmacology* 192 (4), 457–464.
- Chetkovich, D.M., et al., 1991. N-Methyl-D-aspartate receptor activation increases cAMP levels and voltage-gated Ca²⁺ channel activity in area CA1 of hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (15), 6467–6471.

- Cui, Y., et al., 2010. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-mammalian target of Rapamycin signaling pathway in the hippocampus is essential for the acquisition of morphine-induced place preference in rats. *Neuroscience* 171 (1), 134–143.
- Cunha, C., Brambilla, R., Thomas, K.L., 2010. A simple role for BDNF in learning and memory? *Front. Mol. Neurosci.* 3, 1.
- GIRARDI, B.A., et al., 2016. Spermidine-induced improvement of reconsolidation of memory involves calcium-dependent protein kinase in rats. *Learn. Mem.* 23 (1), 21–28.
- Gomes, G.M., et al., 2010. Polyaminergic agents modulate contextual fear extinction in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 93 (4), 589–595.
- Guerra, G.P., et al., 2011. Hippocampal PKA/CREB pathway is involved in the improvement of memory induced by spermidine in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 96 (2), 324–332.
- Guerra, G.P., et al., 2012. Spermidine-induced improvement of memory involves a cross-talk between protein kinases C and A. *J. Neurochem.* 122 (2), 363–373.
- Igaz, L.M., et al., 2002. Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *J. Neurosci.* 22 (15), 6781–6789.
- Lin, C.H., et al., 2001. A role for the Pi-3 kinase signaling pathway in fear conditioning and synaptic plasticity in the amygdala. *Neuron* 31 (5), 841–851.
- Medina, J.H., Cammarota, M., 2017. Multiple stages of memory formation and persistence. *Learning and Memory: A Comprehensive Reference* 4, 237–246.
- Minichiello, L., 2009. TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat. Rev. Neurosci.* 10 (12), 850–860.
- Mony, L., et al., 2011. Molecular basis of positive allosteric modulation of GluN2B NMDA receptors by polyamines. *EMBO J.* 30 (15), 3134–3146.
- Nakai, T., et al., 2014. Girdin phosphorylation is crucial for synaptic plasticity and memory: a potential role in the interaction of BDNF/TrkB/ Akt signaling with NMDA receptor. *J. Neurosci.* 34 (45), 14995–15008.
- Opazo, P., et al., 2003. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates the induction of long-term potentiation through extracellular signal-related kinase-independent mechanisms. *J. Neurosci.* 23 (9), 3679–3688.
- Ou, L., Gean, P., 2007. Transcriptional Regulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Amygdala during Consolidation of Fear Memory. *Mol. Pharmacol.* 72 (2), 350–358.
- Park, H., Popescu, A., Poo, Ming, M., 2014. Essential role of presynaptic NMDA receptors in activity-dependent BDNF secretion and corticostriatal LTP. *Neuron* 84 (5), 1009–1022.
- Paxinos, G., Watson, C., 1986. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd ed. Academic Press, Sydney, Orlando.
- Roesler, R., et al., 2009. Phosphoinositide 3-kinase is required for bombesin-induced enhancement of fear memory consolidation in the hippocampus. *Peptides* 30 (6), 1192–1196.
- Rubin, M.A., et al., 1997. Intrahippocampal GMP administration improves inhibitory avoidance performance through GABAergic and glutamatergic mechanisms in rats. *Prim. Sens. Neuron* 8 (17), 3713–3716.
- Rubin, M.A., et al., 2000. Intrahippocampal spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. *Behav. Pharmacol.* 11 (1), 57–61.
- Rubin, M.A., et al., 2004. Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats. *J. Neurosci.* 24 (9).
- Schwarz, C., et al., 2018. Safety and tolerability of spermidine supplementation in mice and older adults with subjective cognitive decline. *Aging* 10 (1), 19–33.
- Signor, C., et al., 2014. Spermidine improves fear memory persistence. *Eur. J. Pharmacol.* 730, 72–76.
- Signor, C., et al., 2016. Intrahippocampal infusion of spermidine improves memory persistence: involvement of protein kinase A. *Neurobiol. Learn. Mem.* 131, 18–25.
- Signor, C., et al., 2017. Spermidine improves the persistence of reconsolidated fear memory and neural differentiation in vitro: Involvement of BDNF. *Neurobiol. Learn. Mem.* 140, 82–91.
- Vivanco, I., Sawyers, C.L., 2002. The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in humancancer. *Nat. Rev. Cancer* 2 (7), 489–501.
- Volosin, M., et al., 2006. Interaction of survival and death signaling in basal forebrain neurons: roles of neurotrophins and proneurotrophins. *J. Neurosci.* 26 (29), 7756–7766.
- Wirth, M., et al., 2019. 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 (1), 1–17.

4 CONCLUSÕES

4.1 CONCLUSÕES PARCIAIS

As seguintes conclusões parciais foram obtidas:

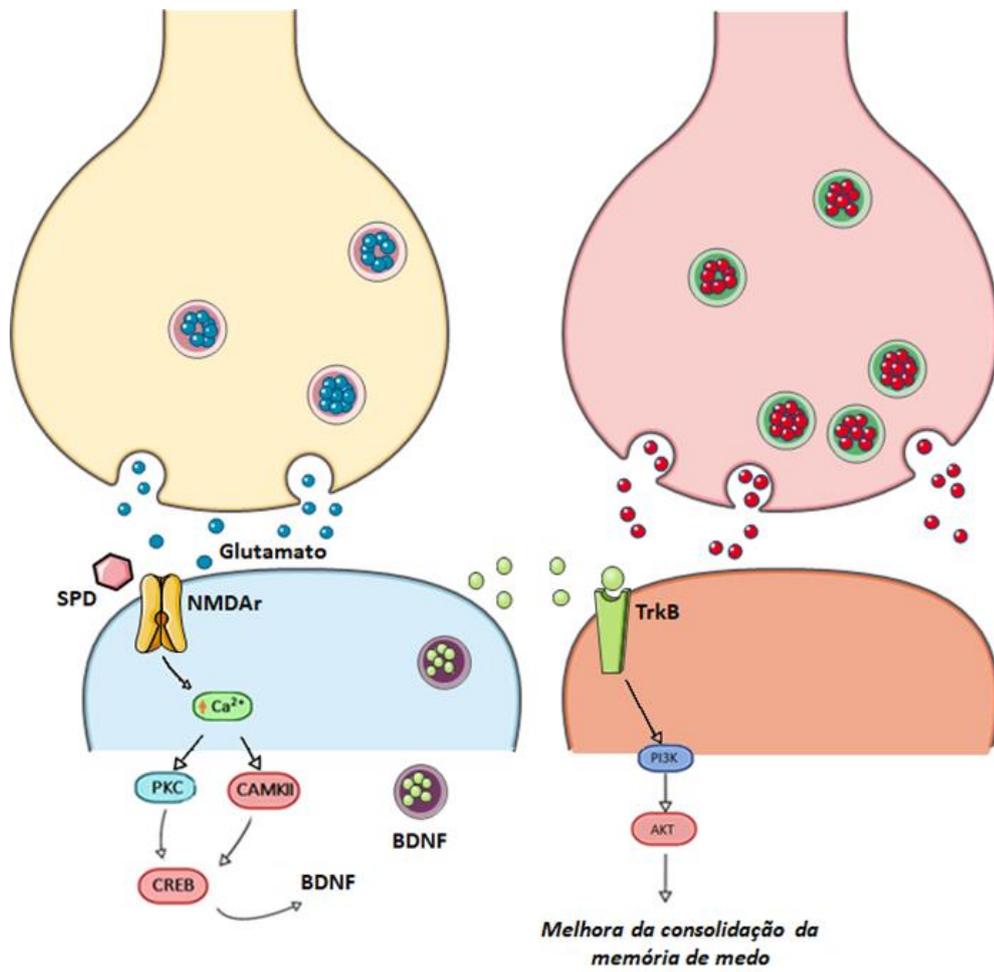
- A infusão intra-hipocampal de SPD, imediatamente após o treino, melhorou a consolidação da memória dos animais, na tarefa de medo condicionado contextual.
- A infusão de ANA-12, nas doses de 3, 30 e 300 pmol/sítio, prejudicou a consolidação da memória dos animais.
- A infusão de LY294002, na dose de 50 µg/sítio, prejudicou a consolidação da memória dos animais;
- A infusão de ANA-12 e LY294002, sem efeito per se, preveniram o efeito positivo da SPD sobre a consolidação da memória;
- A infusão intra-hipocampal de SPD e ANA-12, 6 horas após o treino, não alterou a consolidação da memória dos animais.
- A infusão intra-hipocampal de SPD, imediatamente após o treino, induz aumento na fosforilação da Akt, e a infusão de LY294002, preveniu o aumento de Akt fosforilada induzido por SPD.

4.2 CONCLUSÃO GERAL

Com base nos resultados do presente estudo, concluímos que a administração intra-hipocampal de SPD melhora a consolidação da memória de medo através da ativação do receptor TrkB e da via PI3K/Akt. Bem como, sua administração promoveu aumento nos níveis de Akt fosforilada no hipocampo de ratos.

Dessa forma, sugerimos que a partir da ligação da SPD no seu sítio de ligação no NMDAr, ocorre aumento da frequência de abertura do receptor e aumento da sua atividade, resultando em um aumento na concentração de cálcio intracelular. A partir disso, ocorre aumento na liberação de BDNF das vesículas sinápticas, e consequentemente, aumento da atividade do receptor TrkB. A interação BDNF/TrkB é responsável por induzir ativação da via PI3K e aumentar os níveis de fosforilação da Akt (Figura 13), resultando na melhora da consolidação da memória dos animais.

Figura 13 – Mecanismo da melhora da consolidação da memória induzido por espermidina.



Fonte: Autora.

REFERÊNCIAS

- AHI, J.; RADULOVIC, J.; SPIESS, J. The role of hippocampal signaling cascades in consolidation of fear memory. **Behavioural Brain Research**, v. 149, p. 17–31, 2004.
- ALBERINI, C. M. Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. **Physiological Reviews**, v. 89, p. 121–145, 2009.
- ALESSI, D. R. et al. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1: insulin signalling/phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/protein phosphorylation. **The EMBO Journal**, v. 15, p. 6541–6551, 1996.
- ALONSO, M. et al. BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. **Hippocampus**, v. 12, p. 551–560, 2002.
- ANDJELKOVIC, M. et al. Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 5699–5704, 1996.
- BACKER, J. M. The regulation and function of Class III PI3Ks: Novel roles for Vps34. **Biochemical Journal**, v. 410, p. 1–17, 2008.
- BARROS, D. M. et al. LY294002, an inhibitor of phosphoinositide 3-kinase given into rat hippocampus impairs acquisition, consolidation and retrieval of memory for one-trial step-down inhibitory avoidance. **Behavioural pharmacology**, v. 12, p. 629–34, 2001.
- BEKINSCHTEIN, P. et al. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 2711–6, 2008.
- BEKINSCHTEIN, P.; CAMMAROTA, M.; MEDINA, J. H. BDNF and memory processing. **Neuropharmacology**, v. 76, p. 677–683, 2014.
- BERGSTROM, H. C.; MCDONALD, C. G.; JOHNSON, L. R. Pavlovian Fear Conditioning Activates a Common Pattern of Neurons in the Lateral Amygdala of Individual Brains. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, p. e15698, 2011.
- BERLESE, D. B. et al. Time-dependent modulation of inhibitory avoidance memory by spermidine in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 83, p. 48–53, 2005.
- BERNABEU, R. et al. Involvement of hippocampal AMPA glutamate receptor changes and the cAMP/protein kinase A/CREB-P signalling pathway in memory consolidation of an avoidance task in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 961–965, 1997.
- BLANK, M. et al. TrkB blockade in the hippocampus after training or retrieval impairs memory: protection from consolidation impairment by histone deacetylase inhibition. **Journal of Neural Transmission**, v. 123, p. 159–165, 2016.
- BOUCHER, J.; KLEINRIDDER, A.; KAHN, C. R. Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 6, p. a009191, 2014.
- BRAMHAM, C. R.; MESSAOUDI, E. BDNF function in adult synaptic plasticity: The synaptic

consolidation hypothesis. **Progress in Neurobiology**, v. 76, p. 99–125, 2005.

BROGNARD, J. et al. PHLPP and a Second Isoform, PHLPP2, Differentially Attenuate the Amplitude of Akt Signaling by Regulating Distinct Akt Isoforms. **Molecular Cell**, v. 25, pp. 917–931, 2007.

BRUNET, A. et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. **Cell**, v. 96, p. 857–68, 1999.

CALDEIRA, M. V. et al. BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 35, p. 208–219, 2007.

CAMERA, K. et al. Systemic administration of polyaminergic agents modulate fear conditioning in rats. **Psychopharmacology**, v. 192, p. 457–464, 2007.

CANTLEY, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science**, v. 296, p. 1655–1657, 2002.

CARNERO, A. The PKB/AKT Pathway in Cancer. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, p. 34–44, 2010.

CARTER, C. **Neuropharmacology of polyamines**, 1nd ed. Academic Press, 1994.

CELANO, P. et al. Modulation of growth gene expression by selective alteration of polyamines in human colon carcinoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 165, p. 384–390, 1989.

CERETTA, A. P. C. et al. Arcaine and MK-801 make recall state-dependent in rats. **Psychopharmacology**, v. 201, p. 405–411, 2008.

CHEN, X. et al. PI3 kinase signaling is required for retrieval and extinction of contextual memory. **Nature Neuroscience**, v. 8, p. 925–931, 2005.

COFFINO, P. Regulation of cellular polyamines by antizyme. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, p. 188–194, 2001.

DAVIS, R. H. Management of polyamine pools and the regulation of ornithine decarboxylase. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 44, p. 199–205, 1990.

FALASCA, M.; MAFFUCCI, T. Regulation and cellular functions of class II phosphoinositide 3-kinases. **Biochemical Journal**, v. 443, p. 587–601, 2012.

FIORENZA, N. G. et al. Treatment of fear memories: interactions between extinction and reconsolidation. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, p. 1363–1372, 2011.

FIORENZA, N. G. et al. Modulation of the extinction of two different fear-motivated tasks in three distinct brain areas. **Behavioural Brain Research**, v. 232, p. 210–216, 2012.

FRÜHAUF, P. K. S. et al. Spermine protects from LPS-induced memory deficit via BDNF and TrkB activation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 149, p. 135–143, 2018

FRUMAN, D. A. Regulatory Subunits of Class IA PI3K. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 346, p. 225–244, 2010.

FURINI, C. R. G. et al. New frontiers in the study of memory mechanisms. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, p. 173–177, 2013.

GALE, G. D. et al. Role of the Basolateral Amygdala in the Storage of Fear Memories across the Adult Lifetime of Rats. **Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 3810–3815, 2004.

GIRARDI, B. A. **A melhora da reconsolidação da memória induzida por espermidina envolve a proteína cinase dependente de cálcio**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, p. 12, 2015.

GISQUET-VERRIER, P.; RICCIO, D. C. Memory integration: An alternative to the consolidation/reconsolidation hypothesis. **Progress in Neurobiology**, v. 171, p. 15–31, 2018.

GLASER, V. et al. The Intra-Hippocampal Leucine Administration Impairs Memory Consolidation and LTP Generation in Rats. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 30, p. 1067–1075, 2010.

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

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

GUERRA, G. P.; RUBIN, M. A.; MELLO, C. F. Modulation of learning and memory by natural polyamines. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 99–118, 2016.

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

HARTMANN, M.; HEUMANN, R.; LESSMANN, V. Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. **EMBO J.**, v. 20, p. 5887–5897, 2001.

HOHN, A. et al. Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. **Nature**, v. 344, p. 339–341, 1990.

HORWOOD, J. M. et al. Signalling mechanisms mediated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade in synaptic plasticity and memory in the rat. v. 23, n. April, p. 3375–3384, 2006.

HOU, L.; KLANN, E. Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. **Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 6352–6361, 2004.

HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. **Annual review of neuroscience**, v. 24, p. 677–736, 2001.

IGAZ, L. M. et al. Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. **Journal of Neuroscience**, v. 22, p. 6781–6789, 2002.

- IGNÁCIO, Z. M. et al. New perspectives on the involvement of mTOR in depression as well as in the action of antidepressant drugs. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 82, p. 1280–1290, 2016.
- IP, N. Y. et al. Mammalian neurotrophin-4: Structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, p. 3060–3064, 1992.
- ITAMI, C. et al. Brain-derived neurotrophic factor-dependent unmasking of “silent” synapses in the developing mouse barrel cortex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 13069–13074, 2003.
- IZQUIERDO, I. et al. Repetition of memories lost or never acquired. **Trends in Neurosciences**, v. 25, p. 77–78, 2002.
- IZQUIERDO, I. et al. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends in Neurosciences**, v. 29, p. 496–505, 2006.
- IZQUIERDO, I. Memória. **Artmed**, 2011.
- JOHANSEN, J. P. et al. Molecular mechanisms of fear learning and memory. **Cell**, v. 147, p. 509–524, 2011.
- JUNG, J. H. et al. Activation of the Trk signaling pathway by extracellular zinc. Role of metalloproteinases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 11995–12001, 2005.
- KALAC, P.; KRAUSOVÁ, P. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. **Food Chemistry**, v. 90, p. 219–230, 2005.
- KALISCH, R. et al. The NMDA Agonist D-Cycloserine Facilitates Fear Memory Consolidation in Humans. **Cerebral Cortex**, v. 19, p. 187–196, 2009.
- KATSO, R. et al. Cellular Function of Phosphoinositide 3-Kinases: Implications for Development, Immunity, Homeostasis, and Cancer. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 17, n. 1, p. 615–675, 2001.
- KIM, J. J.; JUNG, M. W. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 30, p. 188–202, 2006.
- KITAGISHI, Y. et al. Roles of PI3K/AKT/GSK3/mTOR Pathway in Cell Signaling of Mental Illnesses. **Depression Research and Treatment**, v. 2012, p. 752563-752570, 2012.
- KITAMURA, T. et al. Engrams and Circuits Crucial for Systems Consolidation of a Memory. **Science**, v. 356, p. 73–78, 2017.
- KOWIAŃSKI, P. et al. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 38, n. 3, p. 579–593, 2018.
- LANA, D. et al. Rapamycin inhibits mTOR/p70S6K activation in CA3 region of the hippocampus of the rat and impairs long term memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 137, p. 15–26, 2017.

LEAL, G.; COMPRIDO, D.; DUARTE, C. B. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. **Neuropharmacology**, v. 76, p. 639–656, 2014.

LEAL, G. et al. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF. **Brain Research**, v. 1621, p. 82–101, 2015.

LEAL, G.; BRAMHAM, C. R.; DUARTE, C. B. BDNF and Hippocampal Synaptic Plasticity. **Vitamins and Hormones**, v. 104, p. 153–195, 2017.

LEE, J. L. C.; EVERITT, B. J.; THOMAS, K. L. Independent Cellular Processes for Hippocampal Memory Consolidation and Reconsolidation. **Science**, v. 304, p. 839–843, 2004.

LEE, J. L. C.; MILTON, A. L.; EVERITT, B. J. Reconsolidation and extinction of conditioned fear: inhibition and potentiation. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, p. 10051–10056, 2006.

LEVENSON, J. et al. Long-term potentiation and contextual fear conditioning increase neuronal glutamate uptake. **Nature Neuroscience**, v. 5, p. 155–161, 2002.

LI, M. et al. Infusion of BDNF into the nucleus accumbens of aged rats improves cognition and structural synaptic plasticity through PI3K-ILK-Akt signaling. **Behavioural Brain Research**, v. 231, p. 146–153, 2012.

LI, N. et al. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. **Science**, v. 329, p. 959–964, 2010.

LIN, C. H. et al. A role for the PI-3 kinase signaling pathway in fear conditioning and synaptic plasticity in the amygdala. **Neuron**, v. 31, p. 841–51, 2001.

LIN, C.H. et al. The similarities and diversities of signal pathways leading to consolidation of conditioning and consolidation of extinction of fear memory. **The Journal of neuroscience**, v. 23, p. 8310–8317, 2003.

LIU, P. et al. Age-related changes in polyamines in memory-associated brain structures in rats. **Neuroscience**, v. 155, p. 789–796, 2008.

LIU, Y.; ZHANG, J. Recent development in NMDA receptors. **Chinese Medical Journal**, v. 113, p. 948–956, 2000.

LU, B.; PANG, P. T.; WOO, N. H. The yin and yang of neurotrophin action. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 8, p. 603–614, 2005.

MAISONPIERRE, P. C. et al. Neurotrophin-3: A neurotrophic factor related to NGF and BDNF. **Science**, v. 247, p. 1446–1451, 1990.

MANNING, B. D.; CANTLEY, L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. **Cell**, v. 129, p. 1261–1274, 2007.

MANNING, B. D.; TOKER, A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. **Cell**, v. 169, p. 381–405, 2017.

MARTÍNEZ-MORENO, A.; RODRÍGUEZ-DURÁN, L. F.; ESCOBAR, M. L. Late protein

synthesis-dependent phases in CTA long-term memory: BDNF requirement. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 5, p. 61, 2011.

MATSUDA, N. et al. Differential activity-dependent secretion of brain-derived neurotrophic factor from axon and dendrite. **Journal of Neuroscience**, v. 29, p. 14185–14198, 2009.

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

MEDINA, J. H.; CAMMAROTA, M. Multiple Stages of Memory Formation and Persistence. **Learning and Memory: A Comprehensive Reference**, v. 4, p. 237–246, 2017.

MEI, B. et al. NMDA Receptors Are Not Required for Pattern Completion During Associative Memory Recall. **PLoS ONE**, v. 6, p. 2011.

MINICHIELLO, L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, p. 850–860, 2009.

MIZUNO, M. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase: A molecule mediating BDNF-dependent spatial memory formation. **Molecular Psychiatry**, v. 8, p. 217–224, 2003.

MONY, L. et al. Molecular basis of positive allosteric modulation of GluN2B NMDA receptors by polyamines. **The EMBO Journal**, v. 30, p. 3134–3146, 2011.

MORRIS, R. G. M. Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: The role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. **European Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 2829–2846, 2006.

MURER, M. .; YAN, Q.; RAISMAN-VOZARI, R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 63, p. 71–124, 2001.

NADEL, L. et al. Memory formation, consolidation and transformation. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 36, p. 1640–1645, 2012.

NADER, K. Reconsolidation and the dynamic nature of memory. **Novel Mechanisms of Memory**, v.7, p. 1–20, 2015.

NAKAI, T. et al. Girdin phosphorylation is crucial for synaptic plasticity and memory: A potential role in the interaction of BDNF/TrkB/ Akt signaling with NMDA receptor. **Journal of Neuroscience**, v. 34, p. 14995–15008, 2014.

O'NEILL, C. PI3-kinase/Akt/mTOR signaling: Impaired on/off switches in aging, cognitive decline and Alzheimer's disease. **Experimental Gerontology**, v. 48, p. 647–653, 2013.

ORCY, R. B. et al. Signalization of Akt/PKB in the placenta, skeletal muscle and adipose tissue of preeclampsia patients. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 66, p. 231–236, 2008.

OSAKI, M.; OSHIMURA, M.; ITO, H. PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer. **Apoptosis**, v. 9, p. 667–676, 2004.

- OU, L. C.; GEAN, P. W. Regulation of amygdala-dependent learning by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol-3-kinase. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 2, p. 287–296, 2006.
- PANG, P. T. et al. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. **Science**, v. 306, p. 487–491, 2004.
- PARK, H.; POO, M. M. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, p. 7–23, 2013.
- PORTA, C.; PAGLINO, C.; MOSCA, A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 4, p. 64, 2014.
- RADISKE, A. et al. BDNF controls object recognition memory reconsolidation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 142, p. 79–84, 2017.
- RADULOVIC, J.; REN, L. Y.; GAO, C. N-Methyl D-aspartate receptor subunit signaling in fear extinction. **Psychopharmacology**, v. 236, n. 1, p. 239–250, 2019.
- REICHARDT, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 361, p. 1545–1564, 2006.
- RIBEIRO, D. A. et al. Polyaminergic agents modulate the reconsolidation of conditioned fear. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 104, p. 9–15, 2013.
- ROBBINS, H. L.; HAGUE, A. The PI3K/Akt pathway in tumors of endocrine tissues. **Frontiers in Endocrinology**, v. 6, p. 188, 2016.
- ROESLER, R. et al. Infusions of AP5 into the basolateral amygdala impair the formation, but not the expression, of step-down inhibitory avoidance. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 33, p. 829–34, 2000.
- ROESLER, R. et al. Phosphoinositide 3-kinase is required for bombesin-induced enhancement of fear memory consolidation in the hippocampus. **Peptides**, v. 30, p. 1192–1196, 2009.
- ROOZENDAAL, B.; MCEWEN, B. S.; CHATTARJI, S. Stress, memory and the amygdala. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, p. 423–433, 2009.
- ROSENEGGER, D.; LUKOWIAK, K. The participation of NMDA receptors, PKC, and MAPK in the formation of memory following operant conditioning in *Lymnaea*. **Molecular Brain**, v. 3, p. 24, 2010.
- ROSENTHAL, A. et al. Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor. **Neuron**, v. 4, p. 767–773, 1990.
- RUBIN, M. A. et al. Intrahippocampal spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. **Behavioural pharmacology**, v. 11, p. 57–61, 2000.
- RUBIN, M. A. et al. Intra-amygdala spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 423, p. 35–39, 2001.
- RUBIN, M. A. et al. Intra-Amygdala Administration of Polyamines Modulates Fear

Conditioning in Rats. **Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 2328-2334, 2004.

RUEDIGER, S. et al. Learning-related feedforward inhibitory connectivity growth required for memory precision. **Nature**, v. 473, p. 514–518, 2011.

SCHWARZ, C. et al. Safety and tolerability of spermidine supplementation in mice and older adults with subjective cognitive decline. **Aging**, v. 10, p. 19–33, 2018.

SHARIFZADEH, M. et al. Posttraining intrahippocampal infusion of a protein kinase AII inhibitor impairs spatial memory retention in rats. **Journal of Neuroscience Research**, v. 79, p. 392–400, 2005.

SIGNOR, C. et al. Intrahippocampal infusion of spermidine improves memory persistence: Involvement of protein kinase A. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 131, p. 18–25, 2016.

SIGNOR, C. et al. Spermidine improves the persistence of reconsolidated fear memory and neural differentiation in vitro: Involvement of BDNF. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 140, p. 82–91, 2017.

SLIPCZUK, L. et al. BDNF Activates mTOR to Regulate GluR1 Expression Required for Memory Formation. **PLoS ONE**, v. 4, p. 6007, 2009.

SQUIRE, L. R. Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 82, p. 171–177, 2004.

SRIVASTAVA, P. et al. PI3K/Akt/GSK3 β induced CREB activation ameliorates arsenic mediated alterations in NMDA receptors and associated signaling in rat hippocampus: Neuroprotective role of curcumin. **NeuroToxicology**, v. 67, p. 190–205, 2018.

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

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

TANG, S. J. et al. A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 467–472, 2002.

TSUCHIYA, A.; KANNO, T.; NISHIZAKI, T. PI3 kinase directly phosphorylates Akt1/2 at Ser473/474 in the insulin signal transduction pathway. **The Journal of endocrinology**, v. 220, p. 49–59, 2014.

VANHAESEBROECK, B.; STEPHENS, L.; HAWKINS, P. PI3K signalling: The path to discovery and understanding. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, p. 195–203, 2012.

VECSEY, C. G. et al. Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, p. 6128–6140, 2007.

VIVANCO, I.; SAWYERS, C. L. The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in humancancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 489–501, 2002.

WANG, C. et al. Defining the Molecular Requirements for the Selective Delivery of Polyamine Conjugates into Cells Containing Active Polyamine Transporters. **Journal of medicinal chemistry**, v. 46, p. 5129–5138, 2003.

WAYMAN, G. A. et al. Analysis of CaM-kinase signaling in cells. **Cell Calcium**, v. 50, p. 1–8, 2011.

WILLIAMS, K. Interactions of polyamines with ion channels. **Biochem. J**, v. 325, p. 289–297, 1997.

WIRTH, M. et al. Effects of spermidine supplementation on cognition and biomarkers in older adults with subjective cognitive decline (SmartAge) - Study protocol for a randomized controlled trial. **Alzheimer's Research and Therapy**, v. 11, p. 1–17, 2019.

YAMADA, K. et al. Involvement of hippocampal NMDA receptors in encoding and consolidation, but not retrieval, processes of spontaneous object location memory in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 331, p. 14–19, 2017.

YAMADA, K.; NABESHIMA, T. Current Perspective Brain-Derived Neurotrophic Factor / TrkB Signaling in Memory Processes. **J Pharmacol Sci**, v. 91, p. 267–270, 2003.

YOSHIDA, M. et al. Polyamine stimulation of the synthesis of oligopeptide-binding protein (OppA). Involvement of a structural change of the Shine-Dalgarno sequence and the initiation codon aug in OppA mRNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 22723–22728, 1999.

ZANCA, R. M. et al. Contextual fear memory modulates PSD95 phosphorylation, AMPAR subunits, PKM ζ and PI3K differentially between adult and juvenile rats. **Neurobiology of Stress**, v. 10, p. 100139, 2019.

ZONCU, R.; EFEYAN, A.; SABATINI, D. M. MTOR: From growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, p. 21–35, 2011.