

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

EFEITOS DA ESPERMINA SOBRE PARÂMETROS
MOTORES, COGNITIVOS E NEUROMORFOLÓGICOS EM
UM MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE
HUNTINGTON

TESE DE DOUTORADO

NÁDIA ALÉSSIO VELLOSO BELLÉ

Santa Maria, RS, Brasil

2008

EFEITOS DA ESPERMINA SOBRE PARÂMETROS
MOTORES, COGNITIVOS E NEUROMORFOLÓGICOS EM
UM MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE
HUNTINGTON

por

Nádia Aléssio Velloso Bellé

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica,
da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para
a obtenção do grau de **Doutor em Bioquímica Toxicológica**.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello

Co-orientadora: Prof^a Maribel Antonello Rubin

Santa Maria, RS, Brasil

2008

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado

**EFEITOS DA ESPERMINA SOBRE PARÂMETROS MOTORES, COGNITIVOS E
NEUROMORFOLÓGICOS EM UM MODELO EXPERIMENTAL
DA DOENÇA DE HUNTINGTON**

elaborada por

Nádia Aléssio Velloso Bellé

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Bioquímica Toxicológica

Comissão Examinadora

Carlos Fernando de Mello, Dr.
(Presidente/Orientador)

Felipe Dal-Pizzol, Dr.
(UNESC)

Nadja Schröder, Dra.
(PUC-RS)

Eduardo Furtado Flores, Dr.
(UFSM)

Michele Rechia Fighera, Dra.
(UFSM)

Santa Maria, 07 de agosto de 2008

Dedico este trabalho aos meus pais, Paulo e Elda, cujos estímulos me impulsionaram a buscar vida nova a cada dia, por terem se privado de minha companhia mostrando-me a importância dos estudos, por concederem a mim a oportunidade de me realizar ainda mais.

AGRADECIMENTOS

A concretização desta tese de doutorado não seria possível sem a colaboração de várias pessoas e instituições, às quais eu gostaria de exprimir os meus sinceros agradecimentos:

Aos meus orientadores, Carlos e Maribel, pela oportunidade de crescimento, pelos conhecimentos e disponibilidade.

Ao professor Rodrigo Cunha, pela oportunidade de trabalhar sob sua orientação em seu laboratório na Universidade de Coimbra, Portugal. Nunca aprendi tanto em tão pouco tempo.

Aos professores componentes da banca, Felipe Dal-Pizzol, Nadja Schröder, Eduardo Furtado Flores e Michele Rechia Fighera, por aceitarem participar da avaliação deste trabalho.

Ao professor Juliano, pela constante disponibilidade, sugestões, exemplo e pela enorme ajuda para a redação do meu primeiro artigo de doutorado.

Ao professor Aron pelo auxílio, interesse, incentivo, confiança e amizade ao longo de todos estes anos.

À minha família, base do que sou hoje, pelo incentivo, apoio, dedicação, confiança, força, enfim ... por fornecerem todos os requisitos fundamentais para minha aventura neste mundo da pesquisa, inclusive a “bolsa família”.

Ao Emerson, pelo apoio, compreensão, companheirismo e paciência ao longo de todos os anos dedicados à minha formação acadêmica.

Aos amigos do laboratório, por me “ambientarem” nesta terra de bahs e tchês, tornando a minha jornada mais fácil; em especial à Gerusa, minha eterna papãozinha ... sem a sua ajuda eu não teria conseguido.

À toda a gente que me auxiliou em solo lusitano, especialmente à portuguesa Paula Canas pela amizade, pelo essencial auxílio, imenso tempo dedicado a mim durante o estágio e pela parceria de viagens e copos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa do Programa de Doutorado com Estágio no Exterior (PDEE) durante o período do estágio.

À Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade de crescimento e aprendizagem.

Àqueles que, embora não referidos aqui, tiveram algum tipo de participação direta ou indireta relacionada ao presente trabalho.

E por fim, porém não menos importante, à Deus ... por ter me dado a vida, a vocação e um espírito inquieto em busca de respostas; por criar um universo de maravilhosos mistérios nos dando a oportunidade de desvendá-los.

"Todo hombre puede, por sí solo, ser el escultor de su propio cerebro (...)
Toda obra grande, en arte como en ciencia, es el resultado de una gran pasión
puesta al servicio de una gran idea."

Santiago Ramón y Cajal

RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

EFEITOS DA ESPERMINA SOBRE PARÂMETROS MOTORES, COGNITIVOS E NEUROMORFOLÓGICOS EM UM MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE HUNTINGTON

Autor: Nádia Aléssio Velloso Bellé

Orientador: Carlos Fernando de Mello

Local e data da defesa: Santa Maria, 07 de agosto de 2008.

A espermina (SPM) é uma amina alifática, contendo quatro centros nucleofílicos e é encontrada em todas as células eucarióticas, incluindo células nervosas. Ela pertence ao grupo das poliaminas, moléculas responsáveis tanto por efeitos neuroprotetores quanto neurotóxicos. O objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos da SPM sobre alguns parâmetros de toxicidade induzidos pela administração estriatal de ácido quinolínico (AQ), um modelo experimental da doença de Huntington em ratos Wistar machos adultos. A administração intraestriatal unilateral de AQ (180 nmol/sítio) induziu o aparecimento de rotações contralaterais e aumento do percentual de balanços corporais contralaterais. A prévia administração estriatal de SPM mostrou efeitos diversos: na dose de 0,1 nmol/sítio aumentou o número de rotações; porém na dose de 10 nmol/sítio ela diminuiu tanto o número de rotações quanto o percentual de balanços corporais contralaterais induzidos pelo AQ. O mecanismo pelo qual a SPM diminui estas alterações motoras é, provavelmente, devido à sua interação com o receptor NMDA, uma vez que sua co-administração com a arcaína (antagonista do sítio das poliaminas neste receptor) reverteu o efeito protetor da mesma. A administração de 10 nmol/sítio de SPM preveniu o aumento do conteúdo de proteína carbonil induzida pela injeção de AQ (180 nmol/sítio) no estriado de ratos. Além disso, foi observado prejuízo cognitivo na tarefa de reconhecimento de objetos após a injeção estriatal bilateral de AQ (180 nmol/sítio). A administração estriatal pós-treino de SPM (0,1 e 1 nmol/sítio) reverteu este déficit cognitivo induzido pelo AQ. Para avaliação das alterações neuromorfológicas neste modelo foram observadas degeneração neuronal e reação astrocitária. O AQ aumentou significativamente a degeneração de neurônios estriatais e a astrogliose reativa. A SPM, na menor dose que melhorou o desempenho cognitivo (0,1 nmol/sítio), não teve efeito sobre a degeneração neuronal estriatal; no entanto, ela foi capaz de reverter a intensa reação astrocitária induzida pela injeção de AQ. Estes resultados sugerem que a SPM tem propriedades neuroprotetoras, que apresentam um padrão dependente da dose da poliamina, neste modelo experimental da doença de Huntington.

Palavras-chave: espermina; poliaminas; ácido quinolínico; receptor NMDA; neuroproteção; doença de Huntington.

ABSTRACT

Thesis of Doctor's Degree
Graduating Program in Toxicological Biochemistry
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil
EFFECTS OF SPERMINE ON MOTOR, COGNITIVE AND
NEUROMORPHOLOGICAL PARAMETERS IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF
HUNTINGTON'S DISEASE

Author: Nádia Aléssio Velloso Bellé

Advisor: Carlos Fernando de Mello

Place and date of the defense: Santa Maria, August 07st, 2008.

Spermine (SPM) is an aliphatic amine which contains four nucleophilic centers and is found in all eukaryotic cells, including nervous cells. It belongs to the group of polyamines, which are molecules associated with both neuroprotection and neurotoxicity. The aim of this study was to investigate the effects of spermine on some parameters of toxicity induced by striatal administration of quinolinic acid (QA), an experimental model of Huntington's disease in adult and male Wistar rats. The intrastriatal administration of QA (180 nmol/site) induced contralateral rotations and increase the number of contralateral body swings. The previous striatal administration of SPM caused mixed effects: at the dose of 0.1 nmol/site increased the number of contralateral rotations; but at 10 nmol/site it reduced both the number of rotations and the contralateral body swings induced by QA. The mechanism by which SPM decreases these motor alterations is probably through its interaction with the NMDA receptor, since the co-administration with arcaine (antagonist of polyamine binding sites on this receptor) reversed its protective effect. The increase of protein carbonyl content induced by QA (180 nmol/site) in striatum of rats was prevented by the administration of 10 nmol/site of SPM. Besides, the bilateral striatal injection of QA (180 nmol/site) impaired the performance in the recognition memory task. The post-training striatal administration of SPM (0.1 and 1 nmol/site) reversed the QA-induced cognitive deficit. It was also evaluated whether spermine prevented QA-induced neuromorphological alterations. QA caused striatal neuronal degeneration and reactive astrogliosis. SPM, at the dose that improved the cognitive performance (0.1 nmol/site), had no effect on striatal neuronal degeneration but reversed the intense astrocytic reaction induced by QA. These results suggest that SPM has neuroprotective properties, presenting a dose dependent pattern of polyamine, in this experimental model of Huntington disease.

Keywords: spermine; polyamines; quinolinic acid; NMDA receptor; neuroprotection, Huntington's disease.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 1. Representação das estruturas moleculares das poliaminas	7
Figura 2. Rota de biossíntese das poliaminas	9
Figura 3. Catabolismo das poliaminas	10
Figura 4. Curva do efeito bifásico das poliaminas	12
Figura 5. Estrutura dos receptores NMDA	15
Figura 6. Modulação do receptor NMDA pelas poliaminas	16

CAPÍTULO 3

ARTIGO

<i>Figure 1. A representative coronal sections from rats with unilateral injections on the striatum</i>	33
<i>Figure 2. Effect of intrastriatal administration of SPM on (A) the total number of contralateral rotations induced by QA and (B) the contralateral-biased swings induced by QA</i>	33
<i>Figure 3. Effect of intrastriatal administration of ARC on (A) the total number of contralateral rotations induced by QA and (B) the contralateral-biased swings induced by QA</i>	34
<i>Figure 4. Effect of intrastriatal administration of SPM plus ARC on (A) the total number of contralateral rotations induced by QA and (B) the contralateral-biased swings induced by QA</i>	34

<i>Figure 5. Effect of intrastriatal administration of SPM on the QA-induced protein carbonylation</i>	35
--	----

CAPÍTULO 4

MANUSCRITO

<i>Figure 1. Timeline of the behavioral procedures</i>	68
<i>Figure 2. Effect of pre-training intrastriatal administration of QA (90, 180 and 360 nmol/site) on discrimination score in the object recognition task</i>	68
<i>Figure 3. Effect of post-training intrastriatal administration of SPM (0.1, 1 and 10 nmol/site) on discrimination score and on impairment of discrimination score induced by striatal lesion (180 nmol/site of QA) in the object recognition task</i>	69
<i>Figure 4. Quantification of neuronal degeneration of the striatal cells (labelled with Fluoro-Jade C) 7 days after pretreatment with QA (180 nmol/site). ...</i>	70
<i>Figure 5. Detection of neuronal degeneration with the fluorescent marker Fluoro-Jade C</i>	71
<i>Figure 6. Quantification of GFAP-immunoreactivity in the striatum 7 days after pretreatment with QA (180 nmol/site)</i>	72
<i>Figure 7. Representative photomicrographs of GFAP-immunoreactivity in the striatum of rats</i>	73

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 3

ANEXO DO ARTIGO

Tabela 1. Efeito da administração intraestriatal de SPM e AQ (180 nmol/sítio) sobre alguns parâmetros comportamentais observados no campo aberto, como número de cruzamentos, número de respostas de levantar e tempo de limpeza.....	40
Tabela 2. Efeito da administração intraestriatal de ARC e AQ (180 nmol/sítio) sobre alguns parâmetros comportamentais observados no campo aberto, como número de cruzamentos, número de respostas de levantar e tempo de limpeza	41
Tabela 3. Efeito da administração intraestriatal de SPM+ARC e AQ (180 nmol/sítio) sobre alguns parâmetros comportamentais observados no campo aberto, como número de cruzamentos, número de respostas de levantar e tempo de limpeza.....	42

CAPÍTULO 4

MANUSCRITO

<i>Table 1. Effect of SPM (0.1, 1 and 10 nmol/site) and QA (180 nmol/site) on locomotor activity (crossing scores).</i>	74
<i>Table 2. Effect of SPM (0.1, 1 and 10 nmol/site) and QA (180 nmol/site) on vertical exploratory activity (rearing scores).</i>	75

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDA	Ácido (RS)-1-aminoindan-1,5-dicarboxílico
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato
AQ	Ácido Quinolínico
ARC	Arcaína
CPP	Ácido (\pm)-3-(2-carboxipiperazina-4-il)-propil-1-fosfônico
DH	Doença de Huntington
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
KA	Kainato
LTP	Long term potentiation
MK-801	Maleato de (+) 5-metil-10,11-diidro-5H-dibenzo[a,d]-ciclohepteno-5-10-imino
NEM	Neurônios espinhosos médios
NMDA	N-metil-D-aspartato
ODC	Ornitina descarboxilase
SAM-D	S-adenosil metionina descarboxilada
SNC	Sistema nervoso central
SPM	Espermina
TCP	N-[1-(2-tienil)ciclohexil] piperidina

SUMÁRIO

Agradecimentos	v
Resumo	viii
Abstract	ix
Lista de Figuras	x
Lista de Tabelas	xii
Lista de Abreviaturas	xiii
CAPÍTULO 1	
1. Introdução	2
2. Objetivos	4
CAPÍTULO 2	
Revisão Bibliográfica	6
1. Poliaminas	6
1.2. Funções das Poliaminas	17
2. Doença de Huntington & Ácido Quinolínico – Modelo Experimental	23
CAPÍTULO 3	
ARTIGO 1	32
<i>Spermine attenuates behavioral and biochemical alterations induced by quinolinic acid in the striatum of rats</i>	32
Abstract	32
1. Introduction	33
2. Results	34
3. Discussion	35

4. Experimental procedures	36
References	38
CAPÍTULO 4	
Manuscrito	44
<i>Spermine improves recognition memory deficit in a rodent model of Huntington's disease</i>	44
Abstract	45
1. Introduction	46
2. Results	48
3. Discussion	50
4. Materials and Methods	54
References	59
CAPÍTULO 5	
Discussão Geral	77
CAPÍTULO 6	
Conclusões Gerais	87
Referências Bibliográficas	88

APRESENTAÇÃO

No **CAPÍTULO 1** está descrita uma sucinta introdução ao assunto referido nesta tese. No **CAPÍTULO 2** encontra-se uma breve revisão bibliográfica sobre os temas trabalhados.

Nos **CAPÍTULOS 3 e 4** estão os resultados que fazem parte desta tese, apresentados sob a forma de artigo e manuscrito, respectivamente. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas encontram-se nos próprios artigo e manuscrito e representam a íntegra deste estudo.

Nos **CAPÍTULOS 5 e 6** estão os itens Discussão Geral e Conclusões Gerais, os quais apresentam interpretações e comentários gerais sobre os resultados contidos neste trabalho. As Referências Bibliográficas, encontrada no final da tese, referem-se somente às citações que aparecem nos capítulos 1, 2 e 3.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

A doença de Huntington é de origem neurodegenerativa sendo caracterizada por morte seletiva de neurônios estriatais (Aubeeluck & Wilson, 2008). A compreensão do mecanismo patogênico bem como a investigação de possíveis abordagens terapêuticas a serem testadas em modelos experimentais desta doença é de fundamental interesse. Dentre os diversos modelos experimentais já descritos, sabe-se que a administração intraestriatal de ácido quinolínico (AQ) constitui um modelo adequado para a doença, mimetizando suas características histológicas e neuroquímicas (Schwarcz et al., 1983; Beal et al., 1986). Devido estas similaridades, têm-se sugerido a participação deste ácido nas fases iniciais do processo neurodegenerativo da doença de Huntington (Guidetti et al., 2006).

O AQ é uma excitotoxina endógena, uma vez que é encontrado em cérebro de mamíferos (Schwarcz & Pellicciari, 2002). Este ácido é estruturalmente análogo ao glutamato e sua significância fisiológica e farmacológica só foi reconhecida com a descoberta de sua habilidade em ativar seletivamente uma subpopulação de receptores neuronais glutamatérgicos sensíveis ao *N*-metil-D-aspartato (NMDA) (Stone & Perkins, 1981). O resultado desta ativação é a excitação excessiva dos neurônios, fenômeno conhecido como excitotoxicidade, que pode levar à morte neuronal (Zeron et al., 2002; Estrada Sánchez et al., 2008). Alguns estudos têm investigado o prejuízo cognitivo conseqüente das lesões estriatais induzidas pelo AQ. Foi observado que este ácido prejudica o aprendizado de animais em diversas tarefas mnemônicas (Furtado & Mazurek, 1996; Misztal et al., 1996;

Shear et al., 1998a; 1998b; Francis et al., 2000; Joel et al., 2003; Ayalon et al., 2004; Featherstone & McDonald, 2004; Trueman et al., 2005).

Já está bem caracterizada na literatura a importância dos receptores NMDA em processos de aprendizagem e memória. O receptor NMDA é um canal iônico seletivamente permeável a cátions (sódio, potássio e cálcio) e que pode ser modulado de maneira bifásica pelas poliaminas (Williams et al., 1991). Estas poliaminas são constituídas basicamente por espermina, espermidina e putrescina, sendo encontradas em todas as células eucarióticas. A arcaína, por sua vez, é uma poliamina de origem sintética, sendo considerada antagonista do sítio das poliaminas no receptor NMDA (Reynolds, 1990). Estas aminas estão envolvidas em um grande número de funções biológicas. Contudo, no sistema nervoso central, onde se verificou a presença de elevadas concentrações de espermina (faixas micromolares), a função exata destes compostos permanece obscura (Shaw & Pateman, 1973). Alguns estudos têm mostrado que elas podem ter uma função neuroprotetora tanto em experimentos *in vitro* (Ferchmin et al., 2000; Gugliucci & Menini, 2003; Bellé et al., 2004) quanto *in vivo* (Gilad & Gilad, 1991; Coert et al., 2000; Clarkson et al., 2004; Shirhan et al., 2004). Por outro lado, alguns estudos mostram o contrário, os quais consideram as poliaminas neurotóxicas (Bourdiol et al., 1992; Conway, 1998; Takano et al., 2003; 2005).

Desta forma, a presente tese versa sobre esta característica dual da espermina, investigando uma possível função neuroprotetora desta poliamina contra os efeitos deletérios induzidos pela injeção intraestriatal de AQ em ratos, um modelo experimental da doença de Huntington.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral investigar um possível efeito neuroprotetor bem como o mecanismo de ação da espermina sobre algumas alterações deletérias induzidas pela administração intraestriatal de ácido quinolínico em ratos machos adultos.

Visando atingir o objetivo geral, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Verificar o efeito da administração estriatal prévia de espermina em diferentes doses sobre as alterações motoras estereotipadas (rotações e percentual de balanços corporais contralaterais) induzidas pelo AQ;
- Investigar o mecanismo de ação da espermina, através da co-administração estriatal prévia de arcaína e espermina sobre as alterações motoras induzidas pelo AQ;
- Investigar o efeito da administração de espermina contra o aumento do conteúdo de proteína carbonil induzido pelo AQ;
- Avaliar o efeito da administração estriatal pós-treino de diferentes doses de espermina sobre o déficit mnemônico apresentado por ratos com lesões estriatais induzidas por AQ;
- Investigar o efeito da administração estriatal de espermina sobre a morte neuronal e alterações astrocitárias induzidas pelo AQ no estriado de ratos.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. POLIAMINAS:

As poliaminas foram descritas pela primeira vez há mais de 300 anos, especificamente em 1678. Neste ano, Antoni van Leeuwenhoek relatou a presença de certos cristais em amostras de esperma seco. Duzentos anos após, Schreiner identificou estes cristais como fosfatos de uma nova base orgânica, embora ele tenha proposto a fórmula errada. Em 1888, estes cristais foram batizados por Landenburg e Abel, tornando-se conhecidos como cristais de espermina. Foi somente em 1926 que a síntese das poliaminas seria finalmente estabelecida. Dudley, além de sintetizar espermina, também descobriu que estas aminas eram encontradas em tecidos orgânicos (Carter, 1994).

Hoje se sabe que as poliaminas naturais – putrescina, espermidina e espermina – são ubíquas na natureza, sendo encontradas em todas as células procarióticas e eucarióticas. Elas podem ser definidas como aminas que contêm duas ou três cadeias de carbono alifáticas e flexíveis conectadas por átomos de nitrogênio. Estas moléculas ainda carregam dois grupamentos amino primários em cada extremidade da cadeia e, em virtude disto, apresentam uma natureza alcalina. A caracterização das suas estruturas químicas (Figura 1) revela que a putrescina é uma diamina (1,4-diaminobutano), a espermidina é uma triamina (mono-*N*-3-aminopropil-1,4-diaminobutano) e a espermina é uma tetramina (bis-*N*-3-aminopropil-1,4-diaminobutano) (Teti et al., 2002).

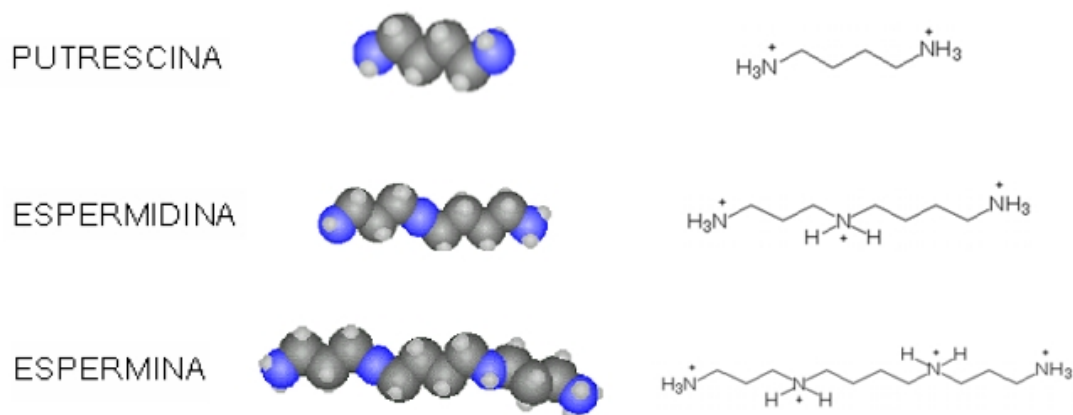


Figura 1. Representação esquemática das estruturas moleculares das poliaminas (adaptado de Gugliucci, 2004 e Williams, 1997).

O nível celular adequado de poliaminas é alcançado por meio de um balanço entre a sua biossíntese (síntese *de novo*), degradação (retroconversão) e captação.

- a) Biossíntese ou síntese *de novo*: o principal precursor das poliaminas é o aminoácido ornitina, um intermediário do ciclo da uréia formado a partir da clivagem hidrolítica do aminoácido arginina em uma reação catalisada pela arginase (Figura 2) (Seiler, 1994; Carter, 1994). Em mamíferos, a ornitina formada é então descarboxilada por ação da ornitina descarboxilase (ODC) dando origem a putrescina. A partir daí, a enzima espermidina sintase transfere um grupamento aminopropil de uma molécula de S-adenosil-metionina descarboxilada (SAM-D) para a putrescina, dando origem a espermidina. A espermidina formada pode sofrer ação da enzima espermina sintase, a qual transfere um segundo

grupamento aminopropil de outra molécula de SAM-D para a espermidina originando a espermina (Tabor & Tabor, 1984; Seiler, 1994).

- b) Retroconversão e degradação: a rota de síntese de poliaminas descrita acima é interconversível, ou seja, a espermina pode ser convertida em espermidina e esta em putrescina (Figura 3). O primeiro passo da interconversão é a acetilação da espermina na posição N1. Após, a poliamina acetilada sofre quebra oxidativa, liberando os grupos aminopropil provenientes da SAM-D por ação da enzima poliamina oxidase (Seiler, 1994). Juntamente com o transporte das poliaminas, essa rota regula sua homeostase intracelular. O catabolismo final destas aminas é catalisado por amino-oxidases dependentes de cobre, as quais convertem as mesmas a aldeídos que, posteriormente, são transformados em aminoácidos. Os produtos do catabolismo final bem como poliaminas acetiladas ou até mesmo não modificadas podem ser excretadas pela via renal.
- c) Captação: bactérias do trato gastrointestinal são capazes de metabolizar aminoácidos da dieta e produzir poliaminas. Além disso, alimentos de origem animal (leite, ovos, peixe, carne), frutas, verduras e produtos fermentados (queijo, cerveja, chucrute, molho de soja fermentado) são particularmente ricos em poliaminas (Bardocz et al., 1996). Tanto as poliaminas sintetizadas por bactérias como as provenientes da dieta são parcialmente absorvidas pelo trato gastrointestinal e podem, subseqüentemente, ser transportadas para o interior das células por meio de carreadores.

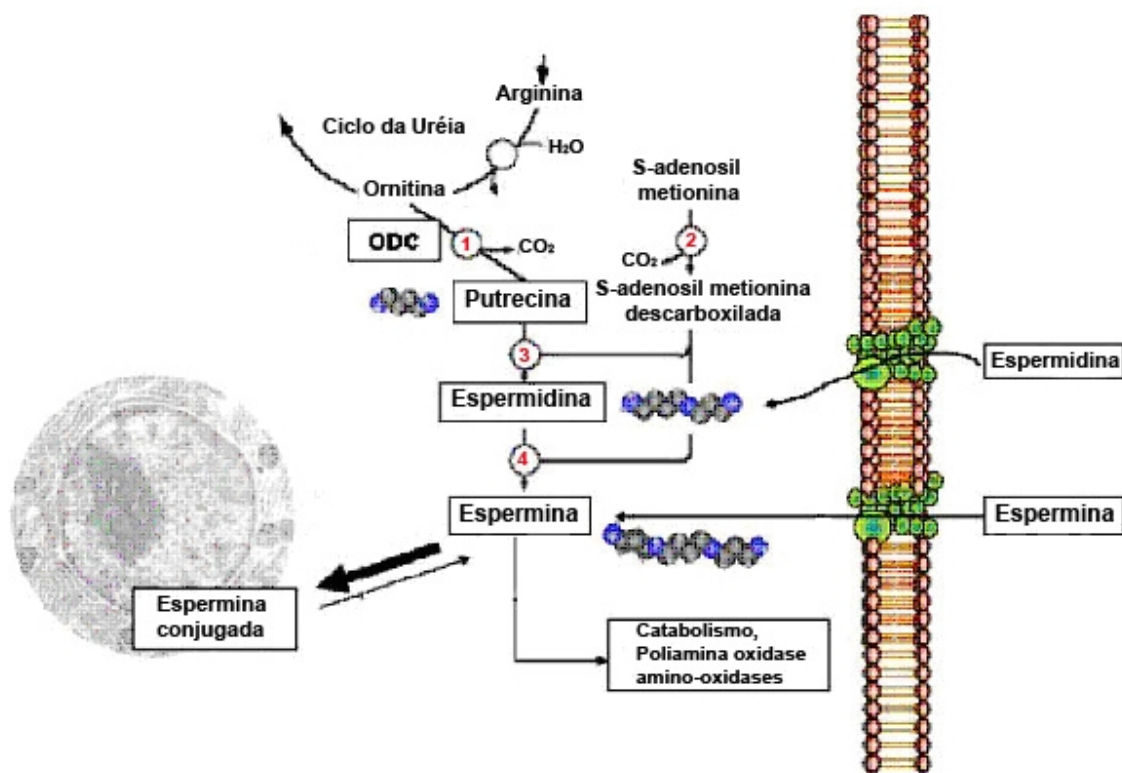


Figura 2. Rota de biossíntese das poliaminas: 1) ornitina descarboxilase, 2) S-adenosil-metionina-decarboxilase, 3) espermidina sintase, 4) espermina sintase. Note a ligação entre a rota de síntese das poliaminas com o ciclo da uréia e a participação essencial da S-adenosil-metionina como um doador de grupamento aminopropil (adaptado de Gugliucci, 2004).

Nos vertebrados, as poliaminas estão amplamente distribuídas em todos os tecidos. No interior das células, elas podem ser encontradas tanto ligadas a macromoléculas (principalmente ácidos nucleicos) quanto em sua forma livre, a qual se estima esteja em torno dos 7 – 10% do conteúdo celular total dessas aminas (Seiler, 1990; Jänne et al., 1991). Elas também são encontradas, em altas concentrações intracelulares, no sistema nervoso central (SNC) (Shaw & Pateman, 1973).

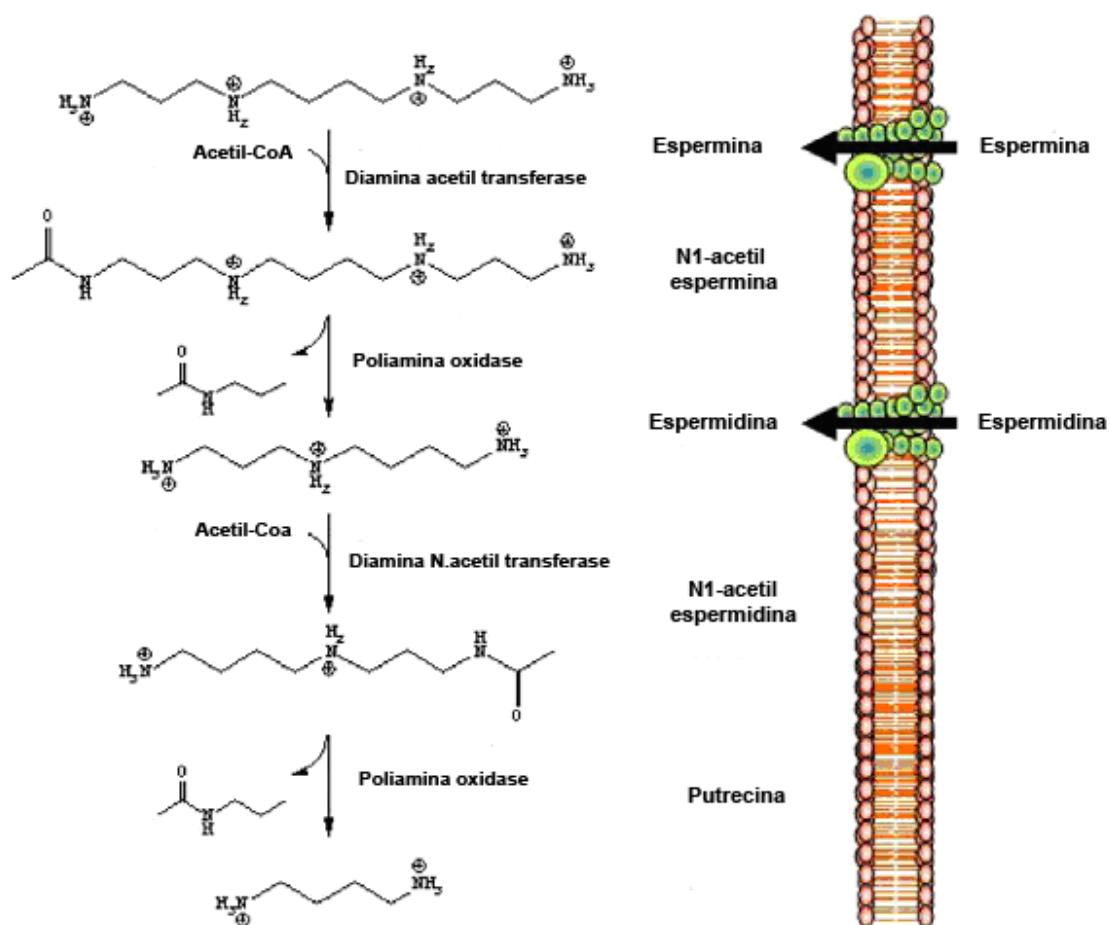


Figura 3. Catabolismo das poliaminas (adaptado de Gugliucci, 2004).

No SNC, evidências indicam que a espermina e a espermidina podem exercer a função de neurotransmissores ou neuromoduladores, pois: a) são encontradas em altas concentrações intracelulares (Tabor & Tabor, 1984; Seiler, 1991), b) são liberadas de maneira dependente de cálcio após estimulação química ou elétrica (Harman & Shaw, 1981a; Fage et al., 1992), c) existe um sistema de recaptção de alta afinidade para regular os níveis extracelulares de

poliaminas (Harman & Shaw, 1981b; Gilad & Gilad, 1991) e d) as poliaminas interagem com canais iônicos no SNC, regulando a sua atividade.

Dentre as interações mais importantes pode-se citar o bloqueio de alguns tipos de canais de potássio e de receptores glutamatérgicos por poliaminas intracelulares, bem como a modulação de outros tipos de receptores glutamatérgicos por poliaminas extracelulares (Williams, 1997). Nesta última categoria, destaca-se o receptor glutamatérgico *N*-metil-D-aspartato (NMDA).

O receptor NMDA é um complexo formado por receptor e canal (Cotman et al., 1995) e a sua ativação resulta no influxo de cálcio (Ca^{2+}) e sódio (Na^+) e no efluxo de potássio (K^+), ocasionando a despolarização celular (Scatton, 1993; Ozawa et al., 1998). Este tipo de receptor apresenta diversas propriedades que o distingue dos demais receptores glutamatérgicos. Por exemplo, a ativação dos receptores NMDA requer a ligação não somente do glutamato, mas também do seu co-agonista, a glicina, em um sítio separado. Além disso, em potenciais de repouso, eles encontram-se bloqueados por íons de magnésio (Mg^{2+}) extracelulares, o qual bloqueia a livre passagem das correntes iônicas através do canal. O Mg^{2+} sai do poro somente quando a membrana é previamente despolarizada. Portanto, as correntes iônicas neste receptor são dependentes de voltagem, além de serem ativadas por transmissor (Bear et al., 2002). Este bloqueio voltagem-dependente do canal do NMDA por Mg^{2+} pode ser visto como um mecanismo protetor intrínseco contra a entrada excessiva de Ca^{2+} na célula e subsequente toxicidade neuronal (Scatton et al., 1991).

Os efeitos das poliaminas sobre o receptor NMDA foram inicialmente relatados por Ransom e Stec (1988), os quais mostraram que baixas

concentrações de espermina e espermidina aumentam a ligação do [³H] MK-801 a este receptor. Por outro lado, altas concentrações destas poliaminas não foram tão efetivas no aumento da ligação do [³H] MK-801 ao receptor NMDA, levando a uma redução do aumento da ligação e resultando, desta forma, em uma curva concentração-resposta bifásica (Figura 4).

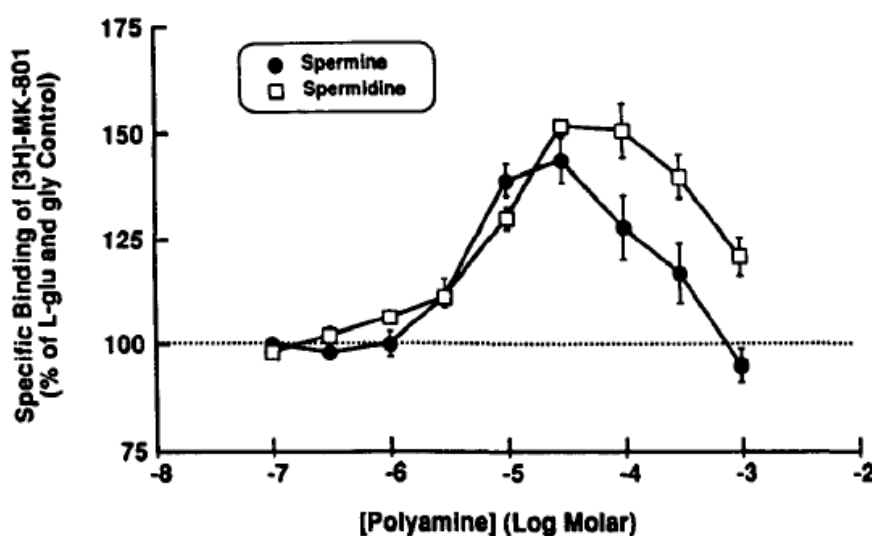


Figura 4. Aumento concentração-dependente da ligação específica do [³H] MK-801 por espermina e espermidina em membranas de cérebro de ratos na presença de concentrações saturantes de glutamato e glicina (retirado de Williams et al., 1989).

A partir deste estudo, vários grupos mostraram resultados similares em preparações diversas (Williams et al., 1989; Sacaan & Johnson, 1990; Yoneda et al., 1991; Steele et al., 1990; Romano et al., 1991; Bakker et al., 1991). Adicionalmente, estudos eletrofisiológicos respaldam este achado. Rock e Macdonald (1992) mostraram que a espermina, em baixas concentrações, aumenta a condutância do receptor NMDA por aumentar a freqüência de abertura

do canal. No entanto, em altas concentrações, ela induz uma redução voltagem-dependente na condutância do canal e reduz o tempo médio de abertura do mesmo. A partir da observação destes efeitos distintos apresentados pelas poliaminas, foi proposta a hipótese da existência de diferentes sítios de ligação para as mesmas no receptor NMDA (Rock & Macdonald, 1992; Sharma & Reynolds, 1998). Sendo assim, sua complexa atividade modulatória ocorre devido à presença de pelo menos três sítios de ligação neste receptor (Singh et al., 1990; Yoneda & Ogita, 1991; Johnson, 1996; Worthen et al., 2001), onde há dois sítios para agonistas e um sítio para antagonistas poliaminérgicos:

- a) Sítio 1 ou sítio de alta afinidade: é o sítio pelo qual as poliaminas potencializam a ligação do [¹²⁵I] MK-801 ao receptor NMDA.
- b) Sítio 2 ou sítio de baixa afinidade: em concentrações maiores que 100 µM, as poliaminas inibem a ligação do [¹²⁵I] MK-801 ao receptor.
- c) Sítio 3: é o sítio inibitório predominante, no qual se ligam os antagonistas poliaminérgicos (Sharma & Reynolds, 1998).

Sendo assim, as poliaminas agem potencializando ou inibindo as respostas mediadas pelo glutamato e pela glicina no receptor NMDA, não o ativando diretamente. Essa modulação do receptor NMDA ocorre por, pelo menos, quatro mecanismos diferentes:

- a) estimulação independente de glicina: em concentrações saturantes de glicina, as poliaminas aumentam o fluxo das correntes iônicas induzidas pelo glutamato;

- b) estimulação dependente de glicina: ocorre em concentrações subsaturantes de glicina; neste caso, as poliaminas aumentam a afinidade do receptor pela glicina;
- c) inibição dependente de voltagem: onde há redução na condutância do receptor uma vez que as poliaminas podem interagir com resíduos carregados negativamente na entrada do canal, resultando num bloqueio do mesmo (similar àquela produzida pelos íons Mg^{2+});
- d) inibição da afinidade do receptor pelo glutamato (Rock & Macdonald, 1995; Johnson, 1996).

Receptores NMDA nativos são hetero-oligômeros compostos por combinações entre as subunidades NR1, NR2 e NR3. Dessa forma, cada receptor deve conter pelo menos duas cópias da subunidade NR1 associadas com várias combinações de um, dois ou mais tipos diferentes da subunidade NR2 ou NR3, perfazendo um total de cinco subunidades em cada receptor (Figura 5). Os diversos arranjos entre as subunidades do receptor NMDA resultam em características farmacológicas distintas. Atualmente, são conhecidas oito formas da subunidade NR1 (NR1_{A-H}), quatro formas da subunidade NR2 (NR2_{A-D}) e duas formas da subunidade NR3 (NR3_{A-B}) (Paoletti & Neyton, 2007). A subunidade NR1 tem ampla distribuição no SNC, enquanto a subunidade NR2 tem distribuição diferenciada no SNC de adultos. Além disso, a subunidade NR2 exibe um padrão diferenciado de expressão durante o desenvolvimento, por exemplo: NR2_B e NR2_D são encontrados no período pré-natal enquanto NR2_A e NR2_C são encontrados na época do nascimento. Em adultos, NR2_A e NR2_B são encontrados

principalmente nas regiões cerebrais enquanto NR2_C é encontrado principalmente no cerebelo. Os níveis de NR2_D no SNC de adultos são baixos e eles são encontrados principalmente no mesencéfalo e na medula espinhal (Rock & Macdonald, 1995; Williams, 1997).

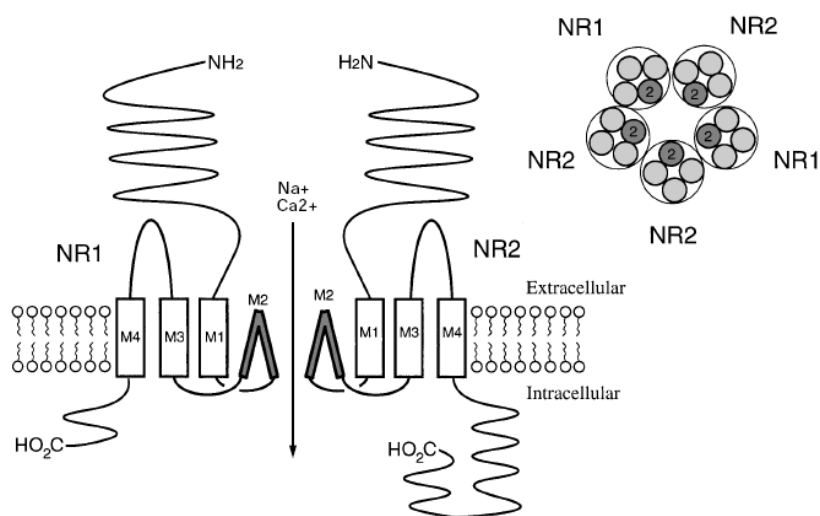
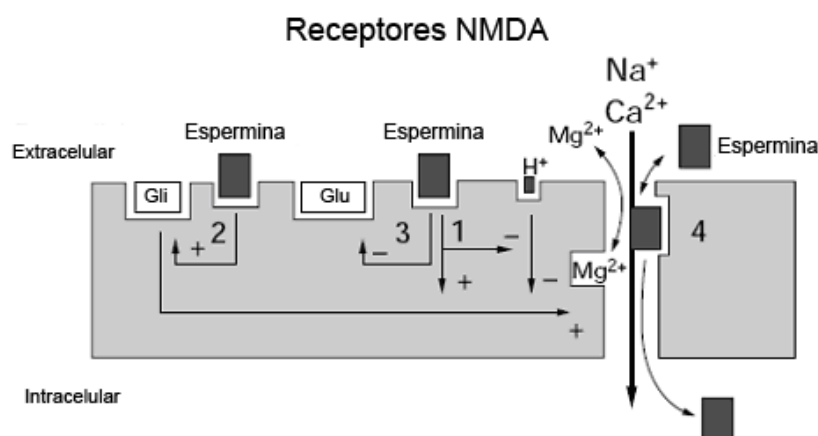


Figura 5. Estrutura hipotética dos receptores NMDA. As subunidades do receptor NMDA têm um grande domínio N-terminal extracelular, três domínios intermembrana (M1, M3 e M4) e uma dobra inserida na membrana (M2) que forma parte do poro (Williams, 1997).

Estudos prévios, utilizando sistemas de expressão heteróloga de receptores NMDA, mostraram que as poliaminas têm efeitos diferentes, os quais dependem da subunidade variante de NR1 e de NR2 expressas nos receptores. Por exemplo, a estimulação independente de glicina produzida pelas poliaminas é observada somente nos receptores contendo NR1_A e NR2_B enquanto receptores contendo NR1_B e NR2_A, NR2_C ou NR2_D não exibem este tipo de estimulação. Em adição, o

bloqueio dependente de voltagem produzido pelas poliaminas é fraco ou ausente em receptores contendo NR2_C ou NR2_D, sendo que não foi observada a influência da subunidade NR1 neste tipo de efeito. A figura 6 mostra os principais efeitos das poliaminas sobre as diferentes composições do receptor NMDA. Desse modo, os efeitos modulatórios das poliaminas (estimulatório ou inibitório) dependem basicamente da composição das subunidades no receptor NMDA e também da variedade de sítios de ligação para as mesmas neste receptor, o que pode ajudar a explicar a confusão e efeitos aparentemente contraditórios destas amins em receptores NMDA (Rock & Macdonald, 1995; Johnson, 1996; Williams, 1997).



Efeito da Espermina	Composição de subunidades				
	NR1A/ NR2A	NR1A/ NR2B	NR1A/ NR2C	NR1A/ NR2D	NR1A/ NR2B
1. Estimulação independente de glicina	-	+	-	-	-
2. Estimulação dependente de glicina (aumento da afinidade por agonistas)	+	+	-	-	+
3. Redução da afinidade por agonistas	-	+	-	-	?
4. Inibição voltagem-dependente	+	+	-	-	+

Figura 6. Modulação do receptor NMDA pelas poliaminas (adaptado de Williams, 1997).

1.2. FUNÇÕES DAS POLIAMINAS:

Apesar de terem sido descobertas há mais de 300 anos, estudos acerca das funções e propriedades das poliaminas se intensificaram somente nas últimas três décadas. Durante este período, uma grande quantidade de informações foi acumulada indicando algumas funções destes compostos. As poliaminas estão envolvidas nos processos de crescimento e diferenciação celulares por ativação da síntese do RNA e da síntese protéica (Campbell et al., 1978; Tabor & Tabor, 1984; Grilo, 1985). Elas também participam de outros processos tais como regulação da expressão gênica (Celano et al., 1989) e também apoptose (Ha et al., 1997).

Além das funções no ciclo celular, estudos *in vitro* mostram que as poliaminas apresentam atividade antioxidante e seqüestrante de radicais livres (Kitada et al., 1979; Drolet et al., 1986; Tadolini, 1988; Lovaas & Carlin, 1991; Khan et al., 1992a; 1992b; Farbiszewski et al., 1995; Lovaas, 1997; Ha et al., 1998; Bellé et al., 2004). Neste contexto, foi visto que a administração de espermina e espermidina reduzem a peroxidação lipídica induzida após um evento isquêmico (Farbiszewski et al., 1995) bem como a induzida por diferentes agentes pró-oxidantes em homogeneizados de cérebros de ratos (Tadolini, 1988; Bellé et al., 2004), protegem proteínas contra danos estruturais e funcionais induzidos por agentes glicantes (Gugliucci & Menini, 2003) e também protegem o DNA contra a ação de radicais livres (Ha et al., 1998). Entre algumas hipóteses propostas para o mecanismo pelo qual as poliaminas têm um efeito antioxidante, a mais aceita é a que sugere que as mesmas interajam com os fosfolipídios, carregados negativamente, estabilizando as membranas celulares (Kitada et al., 1979;

Tadolini, 1988). Outro estudo respalda esta observação ao mostrar que altas concentrações de Ca^{2+} , que competem com as poliaminas pelas cargas negativas dos fosfolípidios da membrana, previnem ou revertem parcialmente o efeito antioxidante das mesmas (Apelbaum et al., 1981). Além disso, a espermina (em concentração milimolar) protege os neurônios da anóxia e da toxicidade do N-metil-D-aspartato em fatias de hipocampo por prevenir a despolarização neuronal, inibindo a transmissão sináptica bem como a entrada de correntes de Ca^{2+} através do receptor NMDA (Ferchmin et al., 2000).

Contudo, outros estudos mostram que as poliaminas também podem ser tóxicas para determinadas células do SNC. Takano e colaboradores (2003) mostram que a espermina e a espermidina (em concentrações micromolares) são letais para cultura de microglia, mas não de astrócitos. Num estudo posterior, eles ainda mostram que o responsável pela toxicidade das poliaminas é um subproduto de seu metabolismo, a acroleína, que causa dano oxidativo às células uma vez que este foi atenuado por alguns antioxidantes (Takano et al., 2005). Adicionalmente, a injeção de espermina e espermidina (30 – 300 nmol) no estriado de ratos produz um decréscimo dose-dependente de marcadores neuronais como a glutamato descarboxilase e a colina acetiltransferase, além de reduzir a densidade de receptores NMDA, sugerindo um papel neurotóxico para as poliaminas (Bourdiol et al., 1992).

A despeito destes estudos, uma grande gama de evidências em estudos *in vivo* vem adicionar informações aos achados *in vitro*, mostrando que as poliaminas protegem os neurônios da degeneração após diversas injúrias. O tratamento sistêmico com poliaminas exógenas reduz significativamente o volume do infarto

em diversos modelos de isquemia/hipóxia cerebral (Gilad & Gilad, 1991; Coert et al., 2000; Clarkson et al., 2004; Shirhan et al., 2004), acelera a regeneração após esmagamento de nervos simpáticos pré- e pós-ganglionares do gânglio cervical superior em ratos adultos (Dornay et al., 1986), previne efeitos neurodegenerativos causados por glutamato monossódico na retina de ratos (Gilad & Gilad, 1989) e acelera a recuperação da função motora após lesão do nervo facial em ratos (Gilad et al., 1996). Além disso, tratamento com inibidor da ODC aumenta a morte de células nervosas após injúria axonal de neurônios simpáticos, sugerindo que a síntese das poliaminas é uma etapa essencial para a progressão da regeneração axonal (Gilad & Gilad, 1983a). Em adição, alguns derivados de poliaminas também são considerados neuroprotetores uma vez que protegem cultura de neurônios cerebelares contra a toxicidade do NMDA, previnem a morte de células hipocâmpais de cobaias após isquemia cerebral global e recuperam as funções motoras após isquemia cerebral focal em ratos (Gilad & Gilad, 1999).

Com base em suas observações, Gilad e Gilad (1983a, 1983b) desenvolveram uma teoria que sugere que as poliaminas participam de um “programa de sobrevivência” neuronal após insultos ao SNC. Sabe-se que neurônios que sofrem qualquer tipo de injúria (injúrias mecânicas, neurotoxinas ou disfunções cerebrovasculares) reagem rapidamente para manter a sua sobrevivência, ativando mecanismos moleculares e bioquímicos específicos, isto é, o “programa de sobrevivência” (Gilad & Gilad, 1983a; 1992). De modo defensivo, determinadas reações bioquímicas são ativadas para combater processos deletérios, tais como acúmulo de radicais livres e de cálcio livre

intracelular, os quais podem levar à degradação descontrolada de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Meldrum et al., 1985; Hall & Braughler, 1986). Entre estas reações bioquímicas, foi observado um aumento rápido, precoce e transitório da síntese de poliaminas, a chamada “resposta poliaminérgica”, que parece ser essencial para este programa de sobrevivência neuronal (Gilad & Gilad, 1983b). Esta teoria foi elaborada a partir da observação do aumento da atividade da ODC após axotomia pós-ganglionar do nervo simpático: 2 h após o evento a atividade enzimática aumentou em torno de 200 %, atingindo um pico de 453% de aumento da atividade 10 h após; declinando a 200% em 24 h, permanecendo assim durante 5 dias e então retornando aos níveis do controle somente 10 dias após a axotomia (Gilad & Gilad, 1983b). Em contrapartida, Adibhatla e colaboradores (2002) mostraram uma redução dos níveis de espermina e espermidina na ocorrência de isquemia cerebral focal transitória em ratos. Neste estudo, a dosagem dos níveis de poliaminas foi realizada nas regiões cerebrais atingidas pela isquemia às 6 e 24 h após os eventos isquêmicos. O tratamento com espermina exógena restaurou os níveis tanto de espermina quanto de espermidina no hemisfério ipsilateral. A perda de espermina e espermidina pode acarretar várias conseqüências que contribuem para a injúria isquêmica, incluindo desestabilização da cromatina, redução da capacidade de tamponamento de Ca^{2+} mitocondrial e aumento da susceptibilidade ao estresse oxidativo (Adibhatla et al., 2002).

Além deste efeito neuroprotetor, as poliaminas também têm mostrado exercer algumas ações em nível comportamental. Neste contexto, foi mostrado que a administração sistêmica de espermina, espermidina e putrecina produziu, de

forma dependente da dose, uma depressão da atividade motora. Neste estudo, a depressão da atividade motora induzida por NMDA foi utilizada como ferramenta para elucidar as interações entre as poliaminas e o receptor NMDA. Mesmo em doses não ativas, as poliaminas potencializaram o efeito depressor do NMDA. Entretanto, a administração de MK-801 aboliu o efeito depressor tanto do NMDA quanto das poliaminas, mesmo nas doses tóxicas. Desta forma, conclui-se que o receptor NMDA possa ser um alvo para mediar os efeitos motores induzidos pelas poliaminas (Gimenez-Llort et al., 1996).

Ainda com relação aos receptores NMDA, diversas evidências apontam para a participação crucial dos mesmos em processos de aprendizado e memória. Estudos mostram um declínio nos níveis de expressão deste receptor (da subunidade NR2B, especificamente) em ratos velhos (Ulas et al., 1992; Clayton & Browning, 2001) e em pacientes com Doença de Alzheimer (Ulas et al., 1992). Em contrapartida, ratos com alta capacidade de aprendizado mostram níveis aumentados do receptor NMDA (Stecher et al., 1997; Xu et al., 2005). Adicionalmente, a administração de antagonistas deste receptor prejudica (Morris et al., 1986; Izquierdo et al., 1992; Castellano et al., 1999; Roesler et al., 2000; Lima et al., 2005; Roesler et al., 2006) enquanto a administração de agonistas favorece o desempenho de animais em diversas tarefas cognitivas (Flood et al., 1990; Izquierdo & Medina, 1995; Rubin et al., 1997). Portanto, o estudo dos efeitos das poliaminas sobre o receptor NMDA em tarefas cognitivas torna-se de especial interesse, uma vez que estas interagem com este receptor modulando sua atividade.

Assim sendo, o efeito bifásico das poliaminas sobre o receptor NMDA, anteriormente relatado em estudos neuroquímicos e eletrofisiológicos, também é observado em estudos comportamentais (Kishi et al., 1998a; 1998b; Rubin et al., 2000; 2001; Mikolajczak et al., 2002a; 2002b; Rubin et al., 2004; Guerra et al., 2006; Camera et al., 2007). Neste contexto, tem sido mostrado que a administração de baixas doses de poliaminas melhoram enquanto altas doses prejudicam o desempenho dos animais em tarefas cognitivas. Por exemplo, a administração intracerebral (Rubin et al., 2000; 2001; 2004; Guerra et al., 2006) e sistêmica (Mikolajczak et al., 2002a; 2002b; Camera et al., 2007) de espermidina melhora o desempenho de ratos em tarefas como esquiva inibitória, medo condicionado e reconhecimento social. Além disso, as poliaminas mostram efeitos positivos também em modelos nos quais os animais apresentam déficit de memória. Kishi e colaboradores (1998a) relatam que a administração intrahipocampal de espermidina atenua o déficit da memória de trabalho induzido por administração tanto de escopolamina (antagonista muscarínico) quanto de ácido (RS)-1-aminoindan-1,5-dicarboxílico (AIDA, um antagonista glutamatérgico). Ainda nesta linha de estudo, os mesmos autores relatam que a administração intrahipocampal de espermidina associada com D-ciclosserina (agonista do sítio da glicina no receptor NMDA) reverte o déficit da memória de trabalho induzido por MK-801 (antagonista do receptor NMDA) (Kishi et al., 1998b). Além destes achados, mostrou-se que a administração sistêmica de espermina em associação com a D-ciclosserina reverte completamente o déficit de memória induzido por ácido (\pm)-3-(2-carboxipiperazina-4-il)-propil-1-fosfônico (CPP, um antagonista do

receptor NMDA) (Meyer et al., 1998). Por outro lado, a administração intracerebroventricular de espermina em doses altas (125 e 250 nmol) prejudica o aprendizado de ratos no labirinto aquático de Morris (Conway, 1998). Além disso, foi mostrado que a administração sistêmica de espermidina (80 mg/kg) potencializa o prejuízo de aprendizado induzido por MK-801 em ratos no labirinto de 14 braços em T (Shimada et al., 1994).

Em adição aos estudos comportamentais, experimentos eletrofisiológicos mostram que a espermina facilita a geração da LTP (long-term potentiation) e que isto ocorre devido à sua interação com receptores NMDA, uma vez que a sua administração concomitante com ifenprodil (antagonista do sítio das poliaminas no receptor NMDA), numa concentração sem efeito *per se*, bloqueia a geração da LTP induzida pela espermina (Chida et al., 1992).

2. DOENÇA DE HUNTINGTON & ÁCIDO QUINOLÍNICO – MODELO EXPERIMENTAL:

A doença de Huntington (DH) foi primeiramente descrita na literatura médica em 1872 por George Huntington, de Long Island, Nova Iorque. A doença afeta homens e mulheres indiscriminadamente, atingindo cerca de 1/10.000 pessoas, tendo maior incidência em indivíduos da raça caucasiana. É uma doença de origem hereditária autossômica dominante e progressiva. O aparecimento dos primeiros sintomas ocorre normalmente entre os 30 – 50 anos de idade e progride inexoravelmente para a morte. Dez a 25 anos após o aparecimento dos primeiros sintomas, os pacientes podem morrer por pneumonia, problemas cardíacos ou outras complicações da doença (Aubeeluck & Wilson, 2008). Os

pacientes com DH exibem uma grande variedade de sinais clínicos e sintomas, os quais podem ser agrupados em 3 categorias: sinais motores, sintomas cognitivos e psiquiátricos:

a) Sinais motores: contorções, torções, espasmos musculares, tiques, rigidez, quedas, dificuldade física de iniciar um diálogo e, nos estágios mais avançados da doença, dificuldade de deglutição (com perda significativa de peso).

b) Sintomas cognitivos: alteração da organização e lentidão no processamento da informação. Isto, por sua vez, pode levar ao prejuízo de novos aprendizados bem como da percepção do espaço, à dificuldade de planejamento e priorização, dificuldade de realização de multi-tarefas e de organização das palavras (gerando problemas de comunicação).

c) Sintomas psiquiátricos: depressão é a alteração mais comum; outros sintomas incluem alterações da personalidade, apatia, ansiedade, irritabilidade, obsessão com certas atividades, delírio, mania e negação.

A DH é causada por uma mutação no gene IT15, localizado no braço curto do cromossomo 4. Nos pacientes com DH o gene mutante contém cópias extras do trinucleotídeo CAG, códon de codificação da glutamina. Indivíduos saudáveis têm de 11 a 35 repetições enquanto pacientes com esta doença apresentam de 37 a 240 repetições. O grau de repetição do trinucleotídeo está inversamente correlacionado com a idade do aparecimento dos sintomas. Assim, quanto maior a quantidade de repetições do trinucleotídeo mais cedo será o aparecimento dos primeiros sintomas. A repetição excessiva do trinucleotídeo CAG é, conseqüentemente, traduzida em repetição excedente de glutaminas na porção N-terminal da proteína huntintina (Aubeeluck & Wilson, 2008). A huntintina, uma

proteína de aproximadamente 350 kDa, é encontrada na maioria dos neurônios (dendritos, corpos celulares e terminais nervosos) e parece estar associada com vesículas da membrana e com proteínas do citoesqueleto (DiFiglia et al., 1995). Embora a sua função normal permaneça desconhecida, estudos recentes sugerem que a huntintina esteja envolvida na regulação do trânsito de vesículas sinápticas e na expressão ou função de determinadas proteínas de membrana, por meio de interações com o citoesqueleto (Metzler et al., 2001; Legendre-Guillemin et al., 2002).

A huntintina mutante inicia uma seqüência de alterações celulares progressivas no cérebro, que levam à neurodegeneração seletiva de determinados tipos celulares de algumas áreas cerebrais. O principal alvo celular da degeneração na DH são os neurônios espinhosos médios (NEM) GABAérgicos presentes no corpo estriado (caudado e putâmem). Com a progressão da doença, outras estruturas também podem ser afetadas como córtex, tálamo, hipotálamo e substância nigra *pars compacta* (DiFiglia, 1990). Embora ainda não se saiba exatamente o porquê dos NEM GABAérgicos estriatais serem o alvo preferencial para a degeneração, um grande número de evidências aponta para a vulnerabilidade destes neurônios à morte celular excitotóxica mediada pela liberação de glutamato dos aferentes corticais e ativação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos: NMDA, α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA) e kainato (KA) (DiFiglia, 1990; Beal, 1992). Experimentos realizados em modelos genéticos da DH sugerem a existência de uma ligação entre a huntintina mutante com a excitotoxicidade (Zeron et al., 2002; Li et al., 2003), que é um mecanismo de morte neuronal caracterizado por estimulação

excessiva de receptores para aminoácidos excitatórios com subsequente elevação anormal dos níveis intracelulares de cálcio livre (Estrada Sánchez et al., 2008).

Neste contexto, algumas evidências sugerem que os receptores NMDA são mais seletivos e efetivos para induzir dano excitotóxico nos NEM estriatais que outros receptores glutamatérgicos ionotrópicos. Resultados de estudos *post mortem* de ligação específica em tecido cerebral de pacientes com DH mostram que existe uma perda desproporcional de receptores glutamatérgicos estriatais e que a ligação para o receptor NMDA diminui significativamente nesta região (em torno de 93%) (Young et al., 1988; Albin et al., 1990). Interessantemente, a expressão da subunidade NR2B em relação às outras subunidades NR2 é maior em NEM estriatais de cérebro de ratos (Landwehrmeyer et al., 1995; Ghasemzadeh et al., 1996; Kuppenbender et al., 1999), ao contrário de outras partes do cérebro que não expressam a subunidade NR2B, cujas células são resistentes à degeneração na DH. Isto pode explicar, em parte, a vulnerabilidade seletiva dos NEM nesta doença.

Os primeiros estudos utilizando o modelo excitotóxico mostram que a administração intraestriatal de ácido kaínico em ratos resulta na morte da maioria dos neurônios, preservando somente células da glia e aferentes (Coyle & Schwarcz, 1976). Embora estes experimentos tenham sido marcos no desenvolvimento de um modelo para a DH, os investigadores observaram que o ácido kaínico não era a excitotoxina ideal para esta finalidade. Assim, testaram ainda o ácido ibotênico e, somente na década de 1980, iniciaram os primeiros experimentos com o ácido quinolínico (AQ). Descobriu-se então que a administração estriatal do AQ, um agonista do receptor NMDA, causa

neurodegeneração seletiva dos NEM estriatais em ratos (Foster et al., 1984; Beal et al., 1986; Bordelon et al., 1997; Ribeiro et al., 2006), camundongos (McLin et al., 2006) e primatas (Kendall et al., 2000; Emerich et al., 2006), de maneira muito semelhante àquela observada na DH. Desta forma, o AQ foi eleito como o modelo excitotóxico mais adequado para a DH devido ao padrão de alterações neuroquímicas e histológicas, tornando-se inclusive um candidato como agente etiológico da doença (Beal et al., 1986). De fato, algumas evidências apontam nesta direção. Animais neonatos são resistentes enquanto animais adultos são suscetíveis à toxicidade do AQ; o que está de acordo com o início típico da DH na meia idade. Outra evidência que contribui para essa suspeita é que o estriado, o globo pálido e o hipocampo são particularmente vulneráveis à neurotoxicidade do AQ enquanto o cerebelo, substância nigra, amígdala, septo e hipotálamo são menos suscetíveis (Schwarcz et al., 1984). Muitas destas regiões são afetadas na DH embora o local de maior prejuízo neuronal seja o estriado. Isso sugere que outros fatores, como aferências glutamatérgicas, influenciem na topografia da patologia. Recentemente, Guidetti e colaboradores (2004) encontraram níveis elevados de AQ no estriado e córtex de camundongos transgênicos para a DH, fortalecendo a hipótese da participação do AQ nesta doença. Além da degeneração neuronal seletiva, a administração estriatal de AQ também altera o estado normal das células da glia, produzindo uma intensa astrogliose reativa e proliferação microglial com alterações morfológicas, que aparecem num período que varia de 3 a 10 dias após a injúria (Popoli et al., 1994; Dihné et al., 2001; Popoli et al., 2002; Ryu et al., 2004; Ryu & McLarnon, 2008).

Além das observações neuromorfológicas, foi observado ainda que a injeção estriatal de AQ resulta em anormalidades motoras e comportamentais, que também mimetizam algumas das alterações observadas na DH. Em roedores, a lesão estriatal unilateral provocada por AQ causa comportamento rotacional assimétrico (Vecsei & Beal, 1991; Rossato et al., 2002) e também rotações assimétricas em resposta a agonistas dopaminérgicos (Borlongan et al., 1995; Vazey et al., 2006). Este comportamento rotacional é resultado de um desbalanço de excitabilidade e/ou neurotransmissores entre os dois hemisférios. De modo similar, no teste do balanço do corpo elevado, quando ratos com lesões estriatais unilaterais induzidas por AQ são suspensos pela cauda, eles tentam alcançá-la balançando o corpo somente para um lado, ao contrário de animais sem lesão, que tentam alcançar a cauda balançando o corpo para ambos os lados (Borlongan et al., 1995).

Adicionalmente às alterações motoras, estudos prévios têm mostrado que lesões estriatais produzidas pelo AQ em roedores e primatas também produzem déficits em tarefas cognitivas (Popoli et al., 1994; Furtado & Mazurek, 1996; Misztal, et al., 1996; Shear et al., 1998a; Shear et al., 1998b; Francis et al., 2000; Joel et al., 2003; Ayalon et al., 2004; Featherston & McDonald, 2004; Featherstone & McDonald, 2005; Trueman et al., 2005), destacando, adicionalmente, para a importante participação do estriado em determinadas tarefas cognitivas. Neste contexto, atualmente existe uma ampla gama de estudos que corroboram com esta hipótese visto que, além dos trabalhos acima citados, outros mostram que lesões estriatais (de qualquer natureza) prejudicam o desempenho dos animais em diversas tarefas cognitivas (Packard et al., 1989; Packard & McGaugh, 1992;

Packard et al., 2001; Sargolini et al., 2003; Ferreira et al., 2003; He et al., 2006; Broadbent et al., 2007).

Embora não existam atualmente tratamentos que possam parar ou reverter a degeneração neuronal provocada pela DH, a busca por terapias que possam amenizar alguns dos sintomas ou até mesmo retardar a progressão da doença é de fundamental importância. Sabendo-se da participação da excitotoxicidade mediada pelos receptores NMDA na progressão desta doença, tratamentos que tenham este receptor como alvo podem apresentar um potencial terapêutico. As poliaminas, além de modularem a atividade dos receptores NMDA, também são neuroprotetoras em alguns modelos de injúria neuronal. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da espermina no modelo excitotóxico da DH, buscando uma possível abordagem terapêutica.

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de artigo e manuscrito, respectivamente, conforme descrito abaixo:

CAPÍTULO 3: *Spermine attenuates behavioral and biochemical alterations induced by quinolinic acid in the striatum of rats.*

ANEXO: este anexo apresenta uma parte do trabalho experimental referente ao artigo acima e que não é exibido no mesmo.

CAPÍTULO 4: *Spermine improves recognition memory deficit in a rodent model of Huntington's disease a ser submetido para o periódico *Learning and Memory*.*

CAPÍTULO 3

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/brainres**BRAIN
RESEARCH**

Research Report

Spermine attenuates behavioral and biochemical alterations induced by quinolinic acid in the striatum of rats

Nádia Aléssio Velloso^a, Gerusa Duarte Dalmolin^a, Graciela Fonini^a,
Valéria Dornelles Gindri Senhorin^a, Aron Ferreira da Silveira^c,
Maribel Antonello Rubin^a, Carlos Fernando Mello^{b,*}

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

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

^cDepartment of Morphology, Center of Health Sciences, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 18 December 2007

Available online 3 January 2008

Keywords:

Spermine

Arcaine

Quinolinic acid

Striatum

Motor asymmetry

NMDA receptor

ABSTRACT

Polyamines are aliphatic amines containing nucleophilic centers that are found in all eukaryotic cells, including brain cells. These compounds determine neuroprotection in experimental models of cerebral ischemia and neurotoxicity. In the current study we investigated the protective effects of spermine, an agonist of the polyamine binding site at the *N*-methyl-*D*-aspartate receptor, against the behavioral and neurochemical alterations induced by quinolinic acid. The unilateral intrastriatal injection of quinolinic acid (180 nmol/site into the dorsal striatum) induced stereotypical motor asymmetries, assessed by the open field and elevated body swing tests. Spermine modulated quinolinic acid-induced rotational behavior biphasically. While the previous intrastriatal administration of spermine at the dose of 0.1 nmol/site increased, the administration of spermine at the dose of 10 nmol/site reduced quinolinic acid-induced rotational behavior. Spermine (10 nmol/site) also decreased the contralateral swing behavior induced by quinolinic acid. Furthermore, the effect of 10 nmol of spermine was counteracted by the co-administration of arcaine (10 nmol), a selective antagonist of the polyamine binding site at the *N*-methyl-*D*-aspartate receptor. In addition, spermine (10 nmol) protected against quinolinic acid-induced protein carbonylation in the rat striatum, further suggesting an antioxidant role for this polyamine. These results provide evidence that the behavioral and biochemical alterations induced by quinolinic acid are attenuated or prevented by spermine through its interaction with *N*-methyl-*D*-aspartate receptor and/or its antioxidant function.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author. Fax: +55 55 3220 8031.

E-mail address: cf.mello@smail.ufsm.br (C.F. Mello).

Abbreviations: EBST, elevated body swing test; SPM, spermine; QA, quinolinic acid; NMDA, *N*-methyl-*D*-aspartate; ARC, arcaine; CNS, central nervous system; MK-801, (5*R*,10*S*)(-)-5-methyl 10,11-dihydro-5*H*-dibenzo[*a,d*]cyclohepten-5,10 imine hydrogen maleate; DNPH, 2,4-dinitrophenylhydrazine; SDS, sodium dodecyl sulfate; ANOVA, analysis of variance

0006-8993/\$ – see front matter © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.brainres.2007.12.056

1. Introduction

Polyamines, such as spermine, spermidine and putrescine, are naturally occurring aliphatic cations with nucleophilic centers, which are fully protonated at physiological pH values (Bachrach, 2005). Polyamines are present in every cell of the body and the concentration of spermine (SPM) can reach the high micromolar range in the central nervous system (Shaw and Pateman, 1973). These amines are synthesized from the amino acid ornithine, and ornithine decarboxylase is the rate-controlling enzyme of the polyamine biosynthetic pathway (Carter, 1994). While polyamines are involved with a large number of biological functions, accumulating evidence suggests that polyamines can act as neuroprotective agents. Accordingly, *in vitro* studies have shown that SPM and spermidine reduce lipid peroxidation in rat brain homogenates (Bellé et al., 2004) and protect proteins from structural and functional damage (Gugliucci and Menini, 2003), suggesting an antioxidant and free radical scavenger role for these compounds. In addition, polyamines recover population spikes of hippocampal slices treated with *N*-methyl-*D*-aspartate or exposed to anoxia (Ferchmin et al., 2000), and administration of SPM provides neuroprotection in cerebral ischemia models (Gilad and Gilad, 1991; Coert et al., 2000; Clarkson et al., 2004; Shirhan et al., 2004). However, it is not known whether polyamines protect against the excitotoxic effects of quinolinic acid *in vivo*.

Rock and Macdonald (1992) have shown that polyamines have multiple effects on NMDA receptor currents: at low con-



Fig. 1 – A representative coronal sections (25x) from rats with unilateral (left side) injections on the striatum. Photomicrographs from rats with unilateral sal/QA (A) and SPM/QA (B) administrations. Note the correct placement of cannula and injection needle in the dorsal striatum.

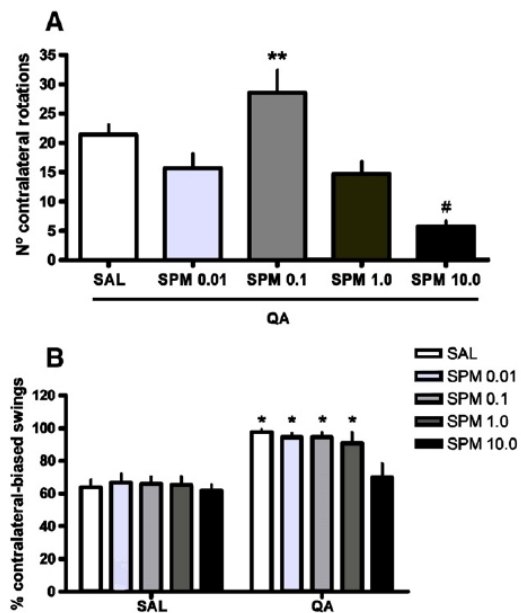


Fig. 2 – Effect of intrastratial administration of SPM (0.01, 0.1, 1.0 and 10 nmol/site) on (A) the total number of contralateral rotations induced by QA (180 nmol/site). Data are expressed as mean ± S.E.M. ($n = 13$ – 15 per group), * $P < 0.001$; # $P < 0.001$, compared with sal/QA group; and (B) the contralateral-biased swings induced by QA (180 nmol/site) in EBST. Each bar corresponds to mean ± S.E.M. of percentage of contralateral-biased swings ($n = 14$ – 15 per group). * $P < 0.001$, compared with sal/sal group.

centrations they enhance NMDA-evoked currents, whereas at high concentrations they produce less enhancement, or inhibit NMDA receptor currents. Initial studies have revealed that polyamines bind to the NR2B subunit of the *N*-methyl-*D*-aspartate (NMDA) receptor and modulate its activity (Gallagher et al., 1997) by potentiating or inhibiting glutamate-mediated responses. Further studies have revealed that heteromeric NR1₀₁₁/NR2B receptors exhibit spermine potentiation by two mechanisms: by increasing glycine affinity and by increasing current through receptors with bound *N*-methyl-*D*-aspartate and glycine. NR1₀₁₁/NR2A receptors exhibit only the increase in glycine affinity, and NR1₀₁₁/NR2C receptors exhibit neither. As for NR1₁₀₀ homomers, NR1₁₀₀/NR2B and NR1₁₀₀/NR2A receptors exhibit spermine potentiation only by increasing the glycine affinity, while spermine produces no potentiation of NR1₀₀/NR2C receptors (Zhang et al., 1994). In addition, the voltage-dependent block by spermine is weak or absent in receptors containing NR2C or NR2D compared with receptors containing NR2A or NR2B (Williams, 1997).

Quinolinic acid (QA) is an endogenous glutamate analogue that received increasing attention since the discovery of its ability to activate NMDA receptors, increase neuronal firing rate (Stone and Perkins, 1981) and cause excitotoxic damage (Beal et al., 1989). It has been suggested that acute intrastratial injections of QA in rats reproduce the early symptoms and

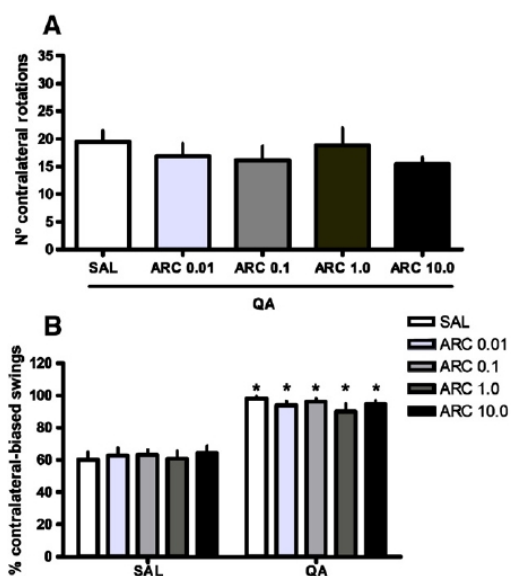


Fig. 3 – Effect of intrastratial administration of ARC (0.01, 0.1, 1.0 and 10 nmol/site) on (A) the total number of contralateral rotations induced by QA (180 nmol/site). Data are expressed as mean \pm S.E.M ($n=15$ per group); and (B) the contralateral-biased swings induced by QA (180 nmol/site) in EBST. Data are expressed as mean \pm S.E.M of percentage of contralateral-biased swings ($n=5$ per group). * $P < .001$, compared with sal/sal group.

neuropathological findings of Huntington's disease (Bordelon and Chesselet, 1999) since this treatment causes selective loss of medium spiny neurons, while medium aspiny neurons and large cholinergic neurons are preserved (Schwarcz et al., 1983; Beal et al., 1986). The acute striatal administration of QA causes stereotypical motor alterations in rats, such as rotational behavior (Vecsei and Beal, 1991; Rossato et al., 2002) and body asymmetry (Borlongan et al., 1995). In addition, Susel et al. (1989) have shown that QA-induced rotational behavior may provide means to evaluate the functional integrity of the striatum, since this behavior is accompanied by significant biochemical alterations.

Although polyamines, as well as QA, interact with NMDA receptors (at different binding sites) no study has addressed if they protect against the insults induced by QA in vivo. Besides, polyamines protect against deleterious effects of QA in vitro. Therefore, in this study, we investigated whether SPM protects against the QA-induced motor asymmetries and protein carbonylation.

2. Results

We assessed the correct placement of cannula in the dorsal striatum by histological analysis. A representative photomicrograph of this analysis is shown in Fig. 1. All data from animals that presented incorrect cannula placement were

discarded. In addition, microscopic examination of the coronal sections was made. The histological analysis reveals that ipsilateral side appears similar to the contralateral side, which was used as control, showing cellular integrity and maintenance of the striatal citoarchitecture on both groups (sal vs. QA and SPM vs. QA).

The administration of SPM (0.01, 0.1, 1.0 and 10.0 nmol) or arcaine (ARC) (0.01, 0.1, 1.0 and 10 nmol) into the dorsal striatum of rats did not cause behavioral alterations compared to control animals, which received 0.9% NaCl (data not shown).

The effect of intrastratial injection of SPM on the total number of contralateral rotations induced by QA is shown in Fig. 2A. Statistical analysis revealed a significant pretreatment (1 μ L of 0.9% NaCl or SPM) vs. treatment (1 μ L of 0.9% NaCl or 180 nmol of QA) interaction [$F_{(4,134)}=12.71$; $P < 0.001$]. The injection of QA into dorsal striatum induced contralateral rotations in 100% of the animals [$F_{(1,134)}=262.34$; $P < 0.001$; $n=14-15$]. Post hoc analysis showed that SPM modulated QA-induced behavioral alterations biphasically. The administration of 0.1 nmol of SPM increased the number of contralateral rotations induced by QA. As the dose of SPM increased to 10.0 nmol, the contralateral rotations induced by QA decreased below basal levels, yielding an inverted U-shaped dose–effect curve. In this figure only the animals injected with QA (plus SPM 0.01, 0.1, 1 or 10 nmol) are shown, since the animals injected with saline

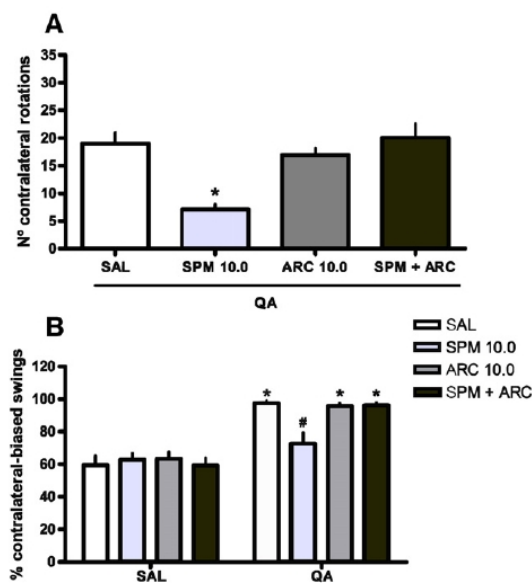


Fig. 4 – Effect of intrastratial administration of SPM plus ARC (10 nmol/site) on (A) the total number of contralateral rotations induced by QA (180 nmol/site). Data are expressed as mean \pm S.E.M ($n=15$ per group). * $P < 0.001$, compared with sal/QA group; and (B) the contralateral-biased swings induced by QA (180 nmol/site) in EBST. Each bar corresponds to mean \pm S.E.M of percentage of contralateral-biased swings ($n=14-15$ per group). * $P < 0.001$, compared with sal/sal group; # $P < 0.05$, compared with sal/QA group.

(plus SPM 0.01, 0.1, 1 or 10 nmol) did not present contralateral rotations.

The animals intrastrially injected with QA exhibited a marked contralateral-biased swing behavior compared with control animals [$F_{(4,134)}=62.21$; $P<0.001$; $n=14-15$; Fig. 2B]. Statistical analysis of data revealed a significant main effect of pretreatment (0.9% NaCl or SPM) [$F_{(4,134)}=3.32$; $P<0.05$]. Post hoc analysis showed that pretreatment with 10 nmol of SPM decreased the percentage of contralateral-biased swings induced by QA, while at 0.01, 0.1 and 1.0 nmol had no effect. It is clear from the graphics that SPM did not cause a biphasic effect on elevated body swing test (EBST), as it did in the open field test. This occurred because QA-injected animals presented EBST scores close to 100%, causing a ceiling effect, i.e., it was not possible to further increase the scores. In addition, SPM had no effect on EBST per se.

The lack of effect of the intrastriatal injection of ARC on the rotational behavior and contralateral-biased swings induced by QA is shown in Figs. 3A and B, respectively. In Fig. 3A, only the groups injected with QA (plus ARC 0.01, 0.1, 1 or 10 nmol) are shown, since animals injected with saline (plus ARC 0.01, 0.1, 1 or 10 nmol) did not present contralateral rotations.

In order to obtain pharmacological evidence of the participation of the NMDA receptor polyamine binding site in the attenuation of QA-induced rotational responses by SPM, we investigated whether the co-injection of ARC (at a dose that had no effect per se on rotational behavior) antagonized the effect of the polyamine.

In this experiment, SPM (10 nmol) decreased the number of contralateral rotations and contralateral-biased swings induced by QA, reproducing the results of the experiment shown in Fig. 2. The co-injection of ARC antagonized the effect of SPM [$F_{(1,112)}=18.04$; $P<0.001$; Fig. 4A and $F_{(1,106)}=7.61$; $P<0.01$; Fig. 4B, for number of contralateral rotations and percentage of contralateral-biased swings, respectively], suggesting the involvement of the NMDA receptor polyamine binding site in the effects of the polyamine.

In addition, the effect of the intrastriatal injection of SPM (10 nmol/site) and QA on the total protein carbonylation of the injected and non-injected striata was evaluated (Fig. 5). Statis-

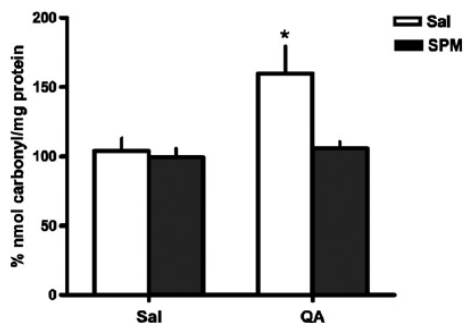


Fig. 5 – Effect of intrastriatal administration of SPM (10 nmol/site) on the QA-induced (180 nmol/site) protein carbonylation. Each bar corresponds to percentage of nmol carbonyl/mg protein of the injected side with regard to the non-injected side. Data are expressed as mean \pm S.E.M ($n=6$ per group). * $P<0.05$, compared with sal/sal group.

tical analysis of the carbonyl content data revealed a significant pretreatment (0.9% NaCl or 10 nmol of SPM) vs. treatment (0.9% NaCl or 180 nmol of QA) interaction [$F_{(1,20)}=4.48$; $P<0.05$]. Post hoc analysis revealed that previous striatal injection of SPM significantly reduced QA-induced protein carbonylation.

3. Discussion

There are lines of evidence suggesting that polyamines, particularly SPM, cause neuroprotection in animal models of cerebral ischemia (Gilad and Gilad, 1991; Coert et al., 2000; Clarkson et al., 2004; Shirhan et al., 2004). However, despite these neuroprotective properties and their high concentrations in CNS, there are no studies concerning the effects of polyamines on the behavioral alterations induced by the injection of QA into the striatum. The present study showed that SPM attenuates or potentiates the behavioral alterations induced by the unilateral injection of QA into the striatum, depending on the dose of the polyamine.

It well known that the intrastriatal administration of QA (Vecsei and Beal, 1991; Rossato et al., 2002), as well as other glutamate receptor agonists, such as alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid, NMDA (Ossowska and Wolfarth, 1995; Smith et al., 1996) and kainic acid (Vecsei and Beal, 1991; Ossowska and Wolfarth, 1995; Smith et al., 1996), causes rotational behavior towards the non-injected hemisphere. Rotational behavior is accompanied by characteristic body asymmetry (Borlongan and Sanberg, 1995; Borlongan et al., 1995). The EBST has been shown to be a valuable behavioral tool to identify early effects of excitatory compounds and behavioral changes in unilateral neurotoxic animal models. Rats with unilateral intrastriatal lesions displayed a swing behavior activity (Borlongan et al., 1995). The possible mechanism involved in the display of biased swing behavior may be similar to those implicated in the rotational behavior (Borlongan and Sanberg, 1995). In fact, in this study, the animals injected with QA into the striatum displayed a typical contralateral rotational response and body asymmetry, which seems to result from an imbalance in the neuronal activity between the two sides of the brain (Glick et al., 1976; Carlson and Glick, 1996).

The biological effects of polyamines are complex, since both neuroprotective (Gilad and Gilad, 1991, 1992; Coert et al., 2000; Ferchmin et al., 2000; Clarkson et al., 2004) and neurotoxic roles (Gilad and Gilad, 1987; Bourdiol et al., 1992; Otsuki et al., 1995; Conway, 1998) have been attributed to these compounds. These apparent conflicting findings are probably due to the biphasic effect of polyamines on the NMDA receptor (Maciver et al., 1991; Rock and Macdonald, 1995). Electrophysiological studies have indicated that, at low concentrations, polyamines enhance NMDA receptor whole-cell current by increasing channel opening frequency. On the other hand, high concentrations of these amines produce fewer enhancements, or inhibit NMDA receptor currents, by a voltage-dependent reduction in single-channel conductance and average open duration (Rock and Macdonald, 1992). In agreement with this view, we observed that 0.1 nmol of SPM increased the contralateral rotations induced by QA, whereas 10 nmol of SPM decreased both the number of contralateral rotations and the percentage of contralateral-biased swings. Therefore, it is possible that SPM, at the dose of 0.1 nmol,

stimulates, while at the dose of 10 nmol inhibits NMDA receptor-mediated responses.

Arcaïne has been reported to be a competitive antagonist of the polyamine binding site at the NMDA receptor based on its ability to dose-dependently reduce the potency of spermidine to enhance [3 H]MK-801 and [3 H]N-(1-[thienyl]cyclohexyl) piperidine binding to brain membranes (Reynolds, 1990a,b; Saccaan and Johnson, 1990). Arcaïne has little or no effect on receptor-binding assays in the absence of polyamines and, therefore, has the profile of a polyamine antagonist (Rock and Macdonald, 1995). Considering that spermine, at high concentrations, inhibits [3 H]MK-801 binding (Williams et al., 1989; Marvizón and Baudry, 1994) and NMDA receptor conductance (Rock and Macdonald, 1992), and that these effects are presumed to occur via an interaction with an inhibitory site, one might argue that if arcaïne blocked the effect of spermine on the inhibitory binding site, it could revert the inhibitory effect of high doses of this polyamine. While there is evidence that arcaïne may block the inhibitory binding site (Marvizón and Baudry, 1994), there are also reports that arcaïne does not affect the inhibitory phase of the spermine (Reynolds, 1990a,b) on MK-801 binding, and that arcaïne reduces NMDA currents by a mechanism which is independent of spermine, suggesting that spermine and arcaïne act at distinct sites in the NMDA receptor (Maciver et al., 1991). Our results are compatible with the view that arcaïne antagonizes the effect of polyamines at the inhibitory binding site of the NMDA receptor. However, given the contradictory results in the literature regarding this matter, the exact mechanism by which arcaïne blocks the protective effects of high doses of spermine remains to be elucidated. In what regards the current lack of effect of arcaïne per se in this study, it is worth mentioning that it has been previously found that arcaïne may cause significant behavioral effects per se in some cerebral structures (Rubin et al., 2001, 2004), and no effect in others (Rubin et al., 2000). However, even causing no effect per se, arcaïne was able to prevent the effect of spermidine in those studies. Considering that the biological action of an antagonist in a biological system results from preventing agonists (other drugs or endogenous regulatory molecules) from binding to and activating receptors, these findings have suggested that there may exist an endogenous “polyaminergic tonus” in some cerebral structures (such as amygdala), and that such a tonus may be decreased or absent in others, such as hippocampus (Rubin et al., 2000) and striatum (this study).

The sustained stimulation of NMDA receptor induces the production of reactive species and consequent oxidative stress (Haberny et al., 2002). The currently reported QA-induced increase of protein carbonylation is in agreement with this view and reinforces the study by Santamaría and Rios (1993), who have shown that the intrastriatal injection of QA increases lipid peroxidation, which is completely prevented by pretreatment with MK-801, a NMDA receptor antagonist. Interestingly, the putative involvement of the NMDA receptor in the carbonylation induced by QA is further supported by its prevention by doses of SPM known to decrease NMDA receptor-mediated behavioral effects (Fig. 4).

Proteins or peptides containing reactive carbonyl groups can be generated by: 1) direct reactions of proteins with reactive oxygen species; 2) secondary reactions of primary amino groups of lysine residues to proteins with reducing sugars or

their oxidation products and Michael-addition reactions of histidine, lysine or cysteine residues with (α,β -unsaturated aldehydes formed during the peroxidation of poly-unsaturated fatty acids. In view of the fact that the formation of protein carbonyl groups is orders of magnitude greater than other oxidative modifications, the level of protein carbonyl groups has become the most widely used marker of protein oxidation during oxidative stress, aging, and diseases (For reviews, see Butterfield and Stadtman (1997); Stadtman and Levine (2003)). However, further studies are required to determine the specific proteins that are oxidatively modified in this model, as well as the physiopathological consequences of such modifications.

It is important to emphasize that polyamines have other actions, as main inducers of eukaryotic cell growth and proliferation (Janne et al., 2005) and as putative antioxidant agents, preventing oxidative damage on lipids (Tadolini, 1988; Bellé et al., 2004), proteins (Gugliucci and Menini, 2003) and DNA (Khan et al., 1992; Ha et al., 1998). In fact, while increasing polyamine synthesis protects against UV radiation-induced cell damage, the inhibition of polyamine synthesis increases cell damage in vitro (von Deutsch et al., 2005). Accordingly, free radical scavenging activity has been described for these compounds, although they may paradoxically increase oxidative damage induced by beta-amyloid peptide (Yatin et al., 2001), one of whose mechanisms of neurotoxicity may involve activation of the NMDA receptor (Harkany et al., 1999). These conflicting data fit well with the view that polyamines may contribute to both the cell survival and death, and that the final result depends on the pathways activated in the target cell, as well as on the intensity of the cellular response elicited.

4. Experimental procedures

4.1. Reagents

All reagents were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). SPM (N,N'-bis [3-aminopropyl] 1,4-butanediamine), ARC (1,4-diguanidinobutane) and QA (2,3 pyridinedicarboxylic acid) were dissolved in 0.9% NaCl solution and had their pH adjusted to 7.4.

4.2. Animals

Adult male Wistar rats (250–300 g) from the animal house of the Universidade Federal de Santa Maria were used in this study. They were given standard laboratory chow (Guabi, Santa Maria, RS, Brazil) and water ad libitum and kept in a regulated environment (22 ± 1 °C) with a 12:12 h light/dark cycle. All animal procedures were in accordance with the Policies on the Use of Animals and Humans in Neuroscience research, revised and approved by the Society for Neuroscience Research in January 1995 and with the Institutional and National regulations for animal research (process 0206). In all experiments, every effort was made to reduce the number and suffering of the animals used.

4.3. In vivo study

4.3.1. Surgical procedure

Rats were anesthetized with Equithesin (1% phenobarbital, 2% magnesium sulfate, 4% chloral hydrate, 42% propylene glycol,

11% ethanol; 3 mL/kg, i.p.) and then placed in a rodent stereotaxic apparatus. Under stereotaxic guidance, a cannula was inserted unilaterally into the right striatum (coordinates relative to bregma: AP, 0 mm; ML, 3.0 mm; V, 2.5 mm from the dura) (Paxinos and Watson, 1986). Chloramphenicol (200 mg/kg, i.p.) was administered before the surgical procedure. The postsurgical recovery period was 5 days in all experiments.

4.3.2. Administration of drugs

Experiment 1: dose–response curve. Rats were injected with 0.9% NaCl (1 μ L, intrastriatal) or with SPM (0.01, 0.1, 1.0 and 10.0 nmol/site, 1 μ L) or with ARC (0.01, 0.1, 1.0 and 10 nmol/site, 1 μ L). After 15 min, a second intrastriatal injection of 0.9% NaCl (1 μ L) or QA (180 nmol/site, 1 μ L) was performed. All drugs were injected at a flow rate of 0.5 μ L/min and all injection needles were left in place for 1 min after infusion. The injections were performed using a cannula (30 gauge) that was fitted into the guide cannula (27 gauge), with the tip of the infusion cannula protruding 1.0 mm beyond that of the guide cannula and, therefore, aimed the striatum.

Experiment 2: co-administration of SPM and ARC. After the postsurgical recovery period, the animals were intrastriatally injected with 0.9% NaCl (1 μ L) or with SPM (10 nmol/site, 1 μ L) or with ARC (10 nmol/site, 1 μ L) or with SPM (20 nmol/site, 0.5 μ L) plus ARC (20 nmol/site, 0.5 μ L). After 15 min, a second intrastriatal injection of 0.9% NaCl (1 μ L) or QA (180 nmol/site, 1 μ L) was performed.

4.3.3. Behavioral procedures

Immediately after injections the animals were individually placed in a round open field (56 cm of internal diameter) with the floor divided into 11 equal sections. The open field session lasted 20 min and, during this period, the animals were observed for appearance of rotational responses (a rotational response was considered as a 360° movement comprising no more than three sections). The crossing responses (number of sections crossed with the four paws), total number of rearing and time spent grooming were also observed.

After the open field session, animals were transferred to an acrylic box (20.5 × 20.5 × 20.5 cm) and the EBST was performed as described by Borlongan and Sanberg (1995). After 2 min of habituation, the animal was elevated an inch above the ground by holding its tail. When the animal moved its head directed more than 10° to either side of the vertical axis a swing was counted. The direction and the frequency of each swing were observed. The test session for each animal lasted for 1 min. The results were expressed in % contralateral-biased swings, calculated as follows: % contralateral-biased swings = $[n^\circ \text{ contralateral swings} / (n^\circ \text{ ipsilateral swings} + n^\circ \text{ contralateral swings})] \times 100$. The criterion for biased swing behavior was set at 70% or higher.

The EBST has been shown to be a valuable behavioral tool to identify early effects of excitatory compounds and behavioral changes in unilateral neurotoxic animal models, since rats unilaterally injected with excitatory compounds display a swing behavior (Borlongan et al., 1995; Prauchner et al., 2004). The mechanisms involved in biased swing behavior may be similar to those implicated in rotational behavior (Borlongan

and Sanberg, 1995). In fact, in this study, the animals injected with QA into the striatum displayed a typical contralateral rotational response and body asymmetry, which seems to result from an imbalance in the neuronal activity between the two hemispheres (Glick et al., 1976; Carlson and Glick, 1996).

4.4. Ex vivo study

4.4.1. Protein carbonyl content determination

This assay was performed immediately after the behavioral evaluation. Rats were decapitated and a punch of the injected striatum was rapidly obtained using a stainless steel puncher 5 mm in internal diameter around the site of cannula placement. The punch was placed on ice and weighed. The contralateral hemisphere was subjected to the same procedure and served as internal control. Tissues were immediately homogenized in 10 volumes (w/v) of cold 10 mM Tris–HCl (pH 7.4) using a glass homogenizer and its protein carbonyl content was determined (Yan et al., 1995 — adapted to brain tissue), as indicated below. In brief, homogenates were diluted to 750–800 μ g/mL of protein in each sample, and 1 mL aliquots were mixed with 0.2 mL of 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH, 10 mM) or 0.2 mL HCl (2 M). After incubation at room temperature for 1 h in a dark environment, 0.6 mL of denaturing buffer (150 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8, containing 3% SDS), 1.8 mL of heptane (99.5%) and 1.8 mL of ethanol (99.8%) were added sequentially, mixed by vortex shaking for 40 s and centrifuged for 15 min. Next, the protein isolated from the interface was washed twice with 1 mL of ethyl acetate/ethanol 1:1 (v/v) and suspended in 1 mL of denaturing buffer. Each DNPH sample was read at 370 nm in a Hitachi U-2001 spectrophotometer against the corresponding HCl sample (blank), and total carbonylation calculated using a molar extinction coefficient of 22,000 $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$, according to Levine and co-workers (1990).

4.4.2. Protein determination

Protein content for biochemical experiments was measured by the method of Bradford (1976) by using bovine serum albumin (1 mg/mL) as standard.

4.4.3. Histology

Immediately after the behavioral evaluation, one set of animals was anesthetized with equitiesin (3 mL/kg, i.p.). Transcardiac perfusion was made with about 200 mL of 0.9% NaCl followed by 200 mL of 10% formaldehyde in phosphate buffer, pH 7.4. The whole brain was removed and fixed in 10% formaldehyde, and paraffin blocks were made. Sections were cut at the site of injection, stained with hematoxylin and eosin with the purpose to determinate whether the cannula was correctly placed in the dorsal striatum and to verify any histological alteration.

4.5. Statistical analysis

Data were analyzed statistically by two-way or three-way ANOVA, followed by Student–Newman–Keuls test when appropriate. Differences between groups were considered to be significant when $P < 0.05$.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Juliano Ferreira for the helpful suggestions and Dr. Luis Francisco Irigoyen for the histological evaluation. This study was supported by CNPq (475131/04-5, 500120/2003-0, 500096/2003-1). C.F. Mello and M.A. Rubin are recipients of CNPq productivity fellowships.

REFERENCES

- Bachrach, U., 2005. Naturally occurring polyamines: interaction with macromolecules. *Curr. Protein Pept. Sci.* 6, 559–566.
- Beal, M.F., Kowall, N.W., Ellison, D.W., Mazurek, M.F., Swartz, K.J., Martin, J.B., 1986. Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 321, 168–171.
- Beal, M.F., Kowall, N.W., Swartz, K.J., Ferrante, R.J., Martin, J.B., 1989. Differential sparing of somatostatin-neuropeptide Y and cholinergic neurons following striatal excitotoxin lesions. *Synapse* 3, 38–47.
- Bellé, N.A.V., Dalmolin, G.D., Fonini, G., Rubin, M.A., Rocha, J.B.T., 2004. Polyamines reduces lipid peroxidation induced by different pro-oxidant agents. *Brain Res.* 1008, 245–251.
- Bordelon, Y.M., Chesselet, M.F., 1999. Early effects of intrastriatal injections of quinolinic acid on microtubule-associated protein-2 and neuropeptides in rat basal ganglia. *Neuroscience* 93, 843–853.
- Borlongan, C.V., Sanberg, P.R., 1995. Elevated body swing test: a new behavioral parameter for rats with 6-hydroxydopamine-induced hemiparkinsonism. *J. Neurosci* 15, 5372–5378.
- Borlongan, C.V., Randall, T.S., Cahill, D.W., Sanberg, P.R., 1995. Asymmetrical motor behavior in rats with unilateral striatal excitotoxic lesions as revealed by the elevated body swing test. *Brain Res.* 676, 231–234.
- Bourdiol, F., Fage, D., Serrano, A., Carter, C., Benavides, J., Scatton, B., 1992. Neurotoxic effects of the intrastriatal injection of spermine and spermidine: lack of involvement of NMDA receptors. *Brain Res.* 596, 183–188.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Butterfield, D.A., Stadtman, E.R., 1997. Protein oxidation processes in aging brain. *Adv. Cell Aging Gerontol.* 2, 161–191.
- Carlson, J.N., Glick, S.D., 1996. Circling behavior in rodents. Methodology, biology and functional implications. In: Totowa, N.J. (Ed.), *Motor Activity and Movement Disorders. Research Issues and Applications. Contemporary Neuroscience.* Humana Press, pp. 269–300.
- Carter, C., 1994. *Neuropharmacology of Polyamines.* Londres, Academic Press.
- Clarkson, A.N., Liu, H., Pearson, L., Kapoor, M., Harrison, J.C., Sammut, I.A., Jackson, D.M., Appleton, I., 2004. Neuroprotective effects of spermine following hypoxic-ischemic-induced brain damage: a mechanistic study. *FASEB J.* 18, 1114–1116.
- Coert, B.A., Anderson, R.E., Meyer, F.B., 2000. Exogenous spermine reduces ischemic damage in a model of focal cerebral ischemia in the rat. *Neurosci. Lett.* 282, 5–8.
- Conway, E.L., 1998. Brain lesions and delayed water maze learning deficits after intracerebroventricular spermine. *Brain Res.* 800, 10–20.
- Ferchmin, P.A., Pérez, D., Biello, M., 2000. Spermine is neuroprotective against anoxia and N-methyl-D-aspartate in hippocampal slices. *Brain Res.* 859, 273–279.
- Gallagher, M.J., Huang, H., Grant, E.R., Lynch, D.R., 1997. The NR2B-specific interactions of polyamines and protons with the N-methyl-D-aspartate receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 24971–24979.
- Gilad, G.M., Gilad, V.H., 1987. Neurotoxicity of polyamines in rat cerebellar cultures. *Prog. Clin. Biol. Res.* 253, 193–206.
- Gilad, G.M., Gilad, V.H., 1991. Polyamines can protect against ischemia-induced nerve cell death in gerbil forebrain. *Exp. Neurol.* 111, 349–355.
- Gilad, G.M., Gilad, V.H., 1992. Polyamines in neurotrauma Ubiquitous molecules in search of a function. *Biochem. Pharmacol.* 44, 401–407.
- Glick, S.D., Jerussi, T.P., Fleisher, L.N., 1976. Turning in circles: the neuropharmacology of rotation. *Life Sci.* 18, 889–896.
- Gugliucci, A., Menini, T., 2003. The polyamines spermine and spermidine protect proteins from structural and functional damage by AGE precursors: a new role for old molecules? *Life Sci* 72, 2603–2616.
- Ha, H.C., Sirisoma, N.S., Kuppusamy, P., Zweier, J.L., Woster, P.M., Casero Jr., R.A., 1998. The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 11140–11145.
- Haberny, K.A., Paule, M.G., Scallet, A.C., Sistare, F.D., Lester, D.S., Hanig, J.P., Slikker Jr., W., 2002. Ontogeny of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor system and susceptibility to neurotoxicity. *Toxicol. Sci.* 68, 9–17.
- Harkany, T., Mulder, J., Sasvari, M., Abraham, I., Konya, C., Zarándi, M., Penke, B., Luiten, P.G., Nyakas, C., 1999. N-Methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 and radical scavengers protect cholinergic nucleus basalis neurons against beta-amyloid neurotoxicity. *Neurobiol. Dis.* 6 (2), 109–121.
- Janne, J., Alhonen, L., Keinanen, T.A., Pietila, M., Uimari, A., Pirinen, E., Hyvonen, M.T., Jarvinen, A., 2005. Animal disease models generated by genetic engineering of polyamine metabolism. *J. Cell Mol. Med.* 9, 865–882.
- Khan, A., Mascio, P., Medeiros, M., Wilson, T., 1992. Spermine and spermidine protection of plasmid DNA against single-strand breaks induced by singlet oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 11428–11430.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G.I., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Method Enzymol* 186, 464–478.
- Maciver, C.R., Bednar, D.L., Karbon, E.W., 1991. Opposite effects of spermine and arcaine on responses of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Neurosci. Lett.* 132, 146–150.
- Marvizón, J.C., Baudry, M., 1994. [³H]dizocilpine association kinetics distinguish stimulatory and inhibitory polyamine sites of N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Neurochem.* 63 (3), 963–971.
- Ossowska, K., Wolfarth, S., 1995. Stimulation of glutamate receptors in the intermediate/caudal striatum induces contralateral turning. *Eur. J. Pharmacol.* 273, 89–97.
- Otsuki, M., Davidson, M., Goodenough, S., Wilce, P.A., Tase, C., Matsumoto, I., 1995. In vivo pharmacological study of spermine-induced neurotoxicity. *Neurosci. Lett.* 196, 81–84.
- Paxinos, G., Watson, C., 1986. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd edn. San Diego, Academic Press.
- Prauchner, C.A., Agostini, A.N., Morimoto, A., Augusti, P.R., Unfer, T.C., Zeni, G., Mello, C.F., Emanuelli, T., 2004. Dimethyl sulfoxide and ebselen prevent convulsions induced by 5-aminolevulinic acid. *Neurochem. Res.* 29, 1793–1800.
- Reynolds, I.J., 1990a. Arcaine uncovers dual interactions of polyamines with the N-methyl-D-aspartate receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255, 1001–1007.
- Reynolds, I.J., 1990b. Arcaine is a competitive antagonist of the polyamine site on the NMDA receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 177, 215–216.

- Rock, D.M., Macdonald, R.L., 1992. Spermine and related polyamines produce a voltage-dependent reduction of N-methyl-D-aspartate receptor single-channel conductance. *Mol. Pharmacol.* 42, 157–164.
- Rock, D.M., Macdonald, R.L., 1995. Polyamine regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35, 463–482.
- Rossato, J.I., Zeni, G., Mello, C.F., Rubin, M.A., Rocha, J.B.T., 2002. Ebselen blocks the quinolinic acid reactive species but does not prevent the behavioral alterations produced by intra-striatal quinolinic acid administration in the rat. *Neurosci Lett* 318, 137–140.
- Rubin, M.A., Boemo, R.L., Jurach, A., Rojas, D.B., Zanolla, G.R., Obregon, A.D.C., Souza, D.O., Mello, C.F., 2000. Intra-hippocampal spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. *Behav. Pharmacol.* 11, 57–62.
- Rubin, M.A., Stiegemeier, J.A., Volkweis, M.A., Oliveira, D.M., Fenili, A.C., Boemo, R.L., Jurach, A., Mello, C.F., 2001. Intra-amygdala spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 423, 35–39.
- Rubin, M.A., Berlese, D.B., Stiegemeier, J.A., Volkweis, M.A., Oliveira, D.M., dos Santos, T.L., Fenili, A.C., Mello, C.F., 2004. Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats. *J. Neurosci.* 24, 2328–2334.
- Sacaan, A.I., Johnson, K.M., 1990. Competitive inhibition of magnesium-induced [³H]N-(1-[thienyl] cyclohexyl)piperidine binding by arcaine: evidence for a shared spermidine-magnesium binding site. *Mol. Pharmacol.* 38, 705–710.
- Santamaria, A., Rios, C., 1993. MK-801, a N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum. *Neurosci Lett.* 159, 51–54.
- Schwarcz, R., Whetsell, W.O., Mangano, R.M., 1983. Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science* 219, 316–318.
- Shaw, G.G., Pateman, A.J., 1973. The regional distribution of the polyamine spermidine and spermine in brain. *J. Neurochem.* 20, 1225–1230.
- Shirhan, M.D., Mochhala, S.M., Ng, P.-Y., Lu, J., Ng, K.C., Teo, A.L., Yap, E., Ng, I., Hwang, P., Lim, T., Sitoh, Y.Y., Rumpel, H., Jose, R., Ling, E., 2004. Spermine reduces infarction and neurological deficit following a rat model of middle cerebral artery occlusion: a magnetic resonance imaging study. *Neuroscience* 124, 299–304.
- Smith, I.D., Todd, M.J., Beninger, R.J., 1996. Glutamate receptor agonist injections into the dorsal striatum cause contralateral turning in the rat: involvement of kainate and AMPA receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 301, 7–17.
- Stadtman, E.R., Levine, R.L., 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25, 207–218.
- Stone, T.W., Perkins, M.N., 1981. Quinolinic acid: a potent endogenous excitant amino acid receptors in CNS. *Eur. J. Pharmacol.* 72, 411–412.
- Susel, Z., Engber, T.M., Chase, T.N., 1989. Behavioral evaluation of the anti-excitotoxic properties of MK-801: comparison with neurochemical measurements. *Neurosci. Lett.* 104, 125–129.
- Tadolini, B., 1988. Polyamine inhibition of lipoperoxidation—the influence of polyamines on iron oxidation in the presence of compounds mimicking phospholipids polar heads. *Biochem J.* 249, 33–36.
- Vecsei, L., Beal, M.F., 1991. Comparative behavioral and neurochemical studies with striatal kainic acid- or quinolinic acid-lesioned rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 39, 473–478.
- von Deusch, A.W., Mitchell, C.D., Williams, C.E., Dutt, K., Silvestrov, N.A., Klement, B.J., Abukhalaf, I.K., von Deusch, D.A., 2005. Polyamines protect against radiation-induced oxidative stress. *Gravit. Space Biol. Bull.* 18, 109–110.
- Williams, K., Romano, C., Molinoff, P.B., 1989. Effects of polyamines on the binding of [³H]MK-801 to the N-methyl-D-aspartate receptor: pharmacological evidence for the existence of a polyamine recognition site. *Mol. Pharmacol.* 36, 575–581.
- Williams, K., 1997. Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem. J.* 325, 289–297.
- Yan, L.J., Traber, M.G., Packer, L., 1995. Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. *Anal. Biochem.* 228, 349–351.
- Yatin, S.M., Yatin, M., Varadarajan, S., Ain, K.B., Butterfield, D.A., 2001. Role of spermine in amyloid beta-peptide-associated free radical-induced neurotoxicity. *J. Neurosci. Res.* 63, 395–401.
- Zhang, L., Zheng, X., Paupard, M.C., Wang, A.P., Santchi, L., Friedman, L.K., Zukin, R.S., Bennett, M.V., 1994. Spermine potentiation of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors is affected by subunit composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 10883–10887.

TABELA 1. Efeito da administração intraestriatal de SPM e AQ (180 nmol/sítio) sobre alguns parâmetros comportamentais observados no campo aberto, como número de cruzamentos, número de respostas de levantar e tempo de limpeza.

Pré-tratamento	Tratamento	Número de cruzamentos	Número de respostas de levantar	Tempo de limpeza (s)
Salina	Salina	48.20 ± 5.0	19.33 ± 3.5	199.53 ± 46.6
SPM 0.01 nmol	Salina	44.57 ± 4.7	15.64 ± 1.9	132.28 ± 21.7
SPM 0.1 nmol	Salina	47.14 ± 7.4	21.71 ± 2.6	140.42 ± 22.1
SPM 1.0 nmol	Salina	54.50 ± 5.7	25.40 ± 2.3	178.57 ± 31.2
SPM 10 nmol	Salina	50.93 ± 5.7	22.21 ± 4.1	187.13 ± 15.7
Salina	AQ	65.06 ± 8.0	22.86 ± 3.0	164.13 ± 36.7
SPM 0.01 nmol	AQ	57.35 ± 8.8	22.14 ± 5.2	174.64 ± 24.8
SPM 0.1 nmol	AQ	66.57 ± 6.2	19.07 ± 4.3	150.14 ± 21.0
SPM 1.0 nmol	AQ	52.71 ± 12.0	18.71 ± 1.8	137.92 ± 18.6
SPM 10 nmol	AQ	36.53 ± 5.3	15.46 ± 2.7	146.26 ± 28.0

Dados expressos como média ± erro padrão, $n = 13 - 15$.

TABELA 2. Efeito da administração intraestriatal de ARC e AQ (180 nmol/sítio) sobre alguns parâmetros comportamentais observados no campo aberto, como número de cruzamentos, número de respostas de levantar e tempo de limpeza.

Pré-tratamento	Tratamento	Número de cruzamentos	Número de respostas de levantar	Tempo de limpeza (s)
Salina	Salina	47.60 ± 7.3	18.60 ± 4.1	187.40 ± 37.4
ARC 0.01 nmol	Salina	45.33 ± 7.2	16.60 ± 2.6	108.26 ± 21.3
ARC 0.1 nmol	Salina	40.40 ± 6.6	19.53 ± 2.2	113.86 ± 20.45
ARC 1.0 nmol	Salina	47.93 ± 6.0	18.06 ± 2.1	144.86 ± 29.8
ARC 10 nmol	Salina	64.26 ± 9.7	23.60 ± 2.5	174.93 ± 23.5
Salina	AQ	61.00 ± 8.0	15.80 ± 3.3	134.06 ± 26.1
ARC 0.01 nmol	AQ	54.20 ± 9.0	25.33 ± 5.2	149.06 ± 17.0
ARC 0.1 nmol	AQ	35.86 ± 9.8	12.80 ± 3.0	130.93 ± 21.3
ARC 1.0 nmol	AQ	61.20 ± 9.7	20.40 ± 1.0	167.13 ± 28.9
ARC 10 nmol	AQ	62.60 ± 7.4	17.66 ± 2.7	152.60 ± 26.9

Dados expressos como média ± erro padrão, $n = 15$.

TABELA 3. Efeito da administração intrastriatal de SPM + ARC e AQ (180 nmol/sítio) sobre alguns parâmetros comportamentais observados no campo aberto, como número de cruzamentos, número de respostas de levantar e tempo de limpeza.

Pré-tratamento	Tratamento	Número de cruzamentos	Número de respostas de levantar	Tempo de limpeza (s)
Salina	Salina	55.66 ± 10.0	22.20 ± 4.7	187.00 ± 37.5
SPM 10 nmol	Salina	45.86 ± 7.6	21.80 ± 3.0	216.33 ± 30.6
ARC 10 nmol	Salina	59.93 ± 9.8	22.93 ± 2.5	182.53 ± 28.0
SPM + ARC	Salina	60.40 ± 8.3	24.46 ± 3.4	140.86 ± 23.6
Salina	AQ	59.26 ± 5.4	19.33 ± 1.5	126.93 ± 22.3
SPM 10 nmol	AQ	44.93 ± 10.3	15.26 ± 3.2	134.60 ± 27.4
ARC 10 nmol	AQ	58.33 ± 7.5	14.80 ± 2.9	126.86 ± 27.0
SPM + ARC	AQ	62.00 ± 7.5	18.33 ± 1.6	108.33 ± 11.3

Dados expressos como média ± erro padrão, $n = 15$.

CAPÍTULO 4

SPERMINE IMPROVES RECOGNITION MEMORY DEFICIT IN A
RODENT MODEL OF HUNTINGTON'S DISEASE

Nádia Aléssio Velloso¹, Paula Canas², Gerusa Duarte Dalmolin¹, Guilherme Gomes¹, Maribel Antonello Rubin¹, Rodrigo Antunes Cunha², & Carlos Fernando Mello^{3,4}

¹Department of Chemistry, Center of Exact and Natural Sciences, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria 97105-900, RS, Brazil; ²Center of Neuroscience of Coimbra, Institute of Biochemistry, Faculty of Medicine, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal; ³Department of Physiology and Pharmacology, Center of Health Sciences, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria 97105-900, RS, Brazil.

⁴Corresponding author:

Dr. Carlos Fernando Mello

Department of Physiology and Pharmacology, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS., Brazil. FAX: +55 55 3220 8031, email:

cf.mello@smail.ufsm.br

Abstract

Huntington's disease (HD) is a progressive neurodegenerative disorder associated to motor and cognitive impairment. Intrastriatal administration of quinolinic acid (QA) causes neurodegeneration, glial proliferation and cognitive impairment in animals, which are similar to those seen in human HD. Since polyamines improve memory in cognitive tasks, in the present study we investigated whether the post-training intrastriatal administration of spermine (SPM), an agonist of the polyamine site at the NMDA receptor, would reverse the deficits in the object recognition task and morphological alterations induced by QA. Bilateral striatal injections of QA (180 and 360 nmol/site) caused object recognition impairment, neuronal death and reactive astrogliosis. Spermine (0.1 and 1.0 nmol/site) reversed QA-induced impairment of object recognition task. SPM (0.1 nmol/site) inhibited the QA-induced reactive astrogliosis, but did not alter neuronal death. These results suggest that polyamine binding sites may be a therapeutic target to prevent reactive astrogliosis and mnemonic deficits in HD.

Keywords: spermine; quinolinic acid; striatum; Huntington's disease; memory; object discrimination.

Introduction

Huntington's disease (HD) is a progressive neurodegenerative disorder caused by a genetic mutation with consequent expanded trinucleotide (CAG) repeat in the gene that encodes the protein huntingtin, leading to very characteristic neuropathological alterations through mechanisms that are currently unknown (Aubeeluck & Wilson, 2008). The most striking changes are found within the striatum, which presents severe neuronal degeneration, accompanied by emotional, motor and cognitive impairment (Lawrence et al., 2000). Hence, various studies have focused on the participation of striatum in the cognitive deficit observed in patients and in animal models of the disease (Packard et al., 1989; Packard and MacGaugh, 1992; Furtado and Mazurek, 1996; Shear et al., 1998a; Lawrence et al., 2000; Packard et al., 2001; Ferreira et al., 2003). There is a bulk of evidence suggesting that basal ganglia play a role in both complex visual object cognition and visuospatial cognition in primates (Yeterian and Pandya, 1995; Lawrence et al., 2000). In fact, while lesioning of the tail of caudate and putamen impairs the performance of animals in visual discrimination tasks (Divac et al., 1967; Buerger et al., 1974), HD patients (who also present striatal damage) exhibit deficits of visuospatial recognition memory (Lawrence et al., 2000).

Intrastratial injections of quinolinic acid (QA) reproduce many histopathological and neurochemical features of HD neuropathology in rodents and nonhuman primates, including loss of striatal projection neurons and sparing NADPH-diaphorase neurons (Beal et al., 1986; Ferrante et al., 1993). Furthermore, rats given intrastratial injections of QA present memory deficits in water- (Furtado and Mazurek, 1996; Shear et al., 1998b) and T-maze (Ayalon et al., 2004) tasks.

These characteristics contributed to the popularity of the QA model of HD, which has been frequently used to study the mechanisms of selective neuron death and to evaluate neuroprotective strategies for HD. QA is pharmacologically recognized as an agonist for N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor whose mechanism of neurotoxicity seems to involve the overactivation of this receptor, which in turn produces intracellular calcium increase and excitotoxicity (McDonald and Johnston, 1993; Haberny et al., 2002).

There is a large body of evidence indicating that the NMDA receptor is crucial for the induction of activity-dependent synaptic plasticity and formation of memory of several tasks in rodents, including aversive conditioning (Kim et al., 1991; Fanselow and Kim, 1994; Stote and Fanselow, 2004), spatial memory (Furtado and Mazurek, 1996; Shear et al., 1998a; Packard et al., 2001) and visual recognition memory (Xu et al., 2005; de Lima et al., 2005). The NMDA receptor is modulated by several compounds, including its main transmitter glutamate, glycine and polyamines (Williams et al., 1991).

Polyamine actions in the CNS have been extensively studied, particularly its modulatory role on NMDA receptors and on memory. It has been demonstrated that spermidine and spermine (SPM) improve memory in several tasks. Accordingly, spermidine improves inhibitory avoidance learning and fear conditioning (Rubin et al., 2001; 2004; Guerra et al., 2006; Camera et al., 2007), and attenuates working memory deficits caused by muscarinic and NMDA receptors blockade in the hippocampus (Kishi et al., 1998). In line with this view, spermine attenuates T-maze learning impairment induced by a noncompetitive NMDA antagonist (Meyer et al., 1998). However, to our knowledge, there are no

studies concerning the effects of polyamines on memory deficits caused by QA. Therefore, in the present study we investigate whether SPM prevents the impairment of recognition memory induced by QA rats, a recognized animal model of HD.

Results

Figure 2 shows the effect of the intrastriatal administration of QA (90, 180 and 360 nmol/site) on discrimination score. Statistical analysis (one-way ANOVA followed by SNK Test) revealed that striatal injections of 180 and 360 nmol of QA decreased the discrimination score at testing ($F_{3,41} = 4.0, p < 0.05$) compared with control group, indicating a memory impairment in QA-treated animals.

Figure 3 depicts the effect of post-training intrastriatal administration of SPM (0.1, 1 or 10 nmol/site) on the discrimination score of animals previously treated with sal or QA (180 nmol/site). Statistical analysis (two-way ANOVA followed by SNK Test) revealed a significant pre-treatment (sal or QA 180 nmol/site) by treatment (sal or SPM) interaction ($F_{3,88} = 3.1, p < 0.05$). *Post hoc* analysis showed that SPM, at the doses of 0.1 and 1.0 nmol/site, reversed QA-induced impairment of object recognition memory. SPM had no effect *per se* on the discrimination score.

Since the discrimination score may be affected by locomotor alterations unrelated to the mnemonic component of the task, we monitored the number of crossing and rearing responses in all behavioural sessions. Table 1 and 2 show that neither QA nor SPM injections altered exploratory activity measured by crossing and rearing responses. Data from habituation and training sessions were

combined and presented as pre-retention scores since, at this point, the animals were under the same treatment conditions.

Seven days after the injection of sal or QA (180 nmol/site), the integrity of striatal neurons was assessed by examining fluoro-jade C labelled cells. Figure 4 shows the mean density of labelled fluoro-jade C cells in the striatum. Statistical analysis (two-way ANOVA) revealed a significant main effect of pre-treatment (sal or QA 180 nmol/site; $F_{1,16} = 5.28$, $p < 0.05$), indicating that QA increased the density of fluoro-jade C staining in the striatum (QA/sal and QA/SPM_{0.1} nmol/site groups), compared with control group. Figures 5A-D show representative photomicrographs of the striatum of sal/sal (5A), sal/SPM 0.1 nmol/site (5B), QA/sal (5C) and QA/SPM 0.1 nmol/site (5D) groups, in which a significant increase in QA-induced fluoro-jade C staining was observed.

Figure 6 shows the mean density of striatal GFAP-immunoreactive cells in animals subjected to QA and SPM injections, and their respective controls. Statistical analysis (two-way ANOVA) revealed a significant pre-treatment (sal or QA 180 nmol/site) by treatment (sal or SPM 0.1 nmol/site) interaction ($F_{1,16} = 25.66$, $p < 0.001$). *Post hoc* comparisons showed that QA increased GFAP labelled cells, an effect that was reverted by the intrastriatal injection of SPM (0.1 nmol/site). Figures 7A-D show representative photomicrographs of the striatum of sal/sal (7A), sal/SPM 0.1 nmol/site (7B), QA/sal (7C) and QA/SPM 0.1 nmol/site (7D) groups, in which QA-induced increase of GFAP immunoreactivity was reverted by SPM.

Discussion

In the current study, we showed that intrastriatal injection of QA (180 and 360 nmol/site) impairs learning on objects recognition task, in a dose-dependent manner, and that the post-training intrastriatal administration of SPM reverses QA-induced performance deficits on this task. There is a significant body of evidence suggesting that the intrastriatal administration of the NMDA agonist QA causes striatal damage and cognitive impairment in diverse mnemonic tasks (Furtado and Mazurek, 1996; Shear et al., 1998; Francis et al., 2000; Joel et al., 2003; Trueman et al., 2005). Since it has been demonstrated that NMDA receptors play a key role in synaptic plasticity, learning and memory (Castellano et al., 2001; Riedel et al., 2003), it is reasonable to propose that the pre-training administration of QA impairs learning by overactivation of NMDA receptors followed by neuronal death with consequent reduction in the glutamatergic transmission in the rat striatum. In fact, a significant number of striatal neurons died after the injection of QA, as shown in sections stained with fluoro-jade C, a fluorescent marker for dying neurons (Fig 3). Previous works have suggested that NMDA receptor overactivation may be involved in degeneration of medium spiny striatal (MSS) neurons in HD (DiFiglia, 1990; Beal, 1992; Li et al., 2003). These MSS neurons are more vulnerable to death than other cell types because they have high expression of NMDA receptors (particularly with the NR2B subunit) (Zeron et al., 2002). In addition, QA-induced apoptosis is prevented by MK-801 but not by NBQX, supporting that striatal cell death occurs via NMDA receptor (Qin et al., 2002). Moreover, our results suggest that the activation of NMDA receptors in the striatum is a basic requisite for encoding recognition processes (de Lima et al., 2005; Nilsson et al., 2007).

It has been suggested that polyamines play an important role as modulators of learning and memory processing. Studies from our group have demonstrated that intrahippocampal, intra-amygdalar or systemic administrations of spermidine improve performance in fear conditioning and inhibitory avoidance tasks (Rubin et al., 2000; 2001; 2004; Guerra et al., 2006; Camera et al., 2007). Moreover, arcaine (the antagonist of the polyamine binding site at the NMDA receptor) impairs memory and reverses the facilitatory effect of spermidine on memory (Rubin et al., 2004). However, there are no studies investigating whether polyamines improve the learning deficit induced by excitotoxic striatal lesions, a question that bears important clinical consequences, since excitotoxicity has been implicated as a convergent mechanism for several neurodegenerative diseases, including HD.

One of the most interesting properties of polyamines is its biphasic effect on the NMDA receptor. In fact, there is convincing neurochemical and electrophysiological evidence that polyamines dually modulate the NMDA receptor (Williams et al., 1991; Rock and Macdonald, 1995). At low micromolar concentrations, they enhance [³H] MK-801 and [³H] TCP binding to NMDA receptor channel, whereas higher concentrations do not alter the binding of these ligands (Ransom and Stec, 1988; Sacaan and Johnson, 1990; Williams, 1997). Accordingly, low concentrations of polyamines enhance NMDA-evoked currents, whereas higher concentrations produce less enhancement of, or inhibit, NMDA receptor currents through controlling the channel opening frequency (McGurk et al., 1990; Sprosen and Woodruff, 1990; Rock and Macdonald, 1995). Therefore, it is reasonable to suggest that the low doses of SPM used on this study (0.1 and 1.0

nmol/site) improved the consolidation of memory by modulating NMDA receptors in remaining neurons of striatum. Interestingly, polyamine enhancement and inhibition of NMDA receptor currents occurs basically with combined NR1/NR2A and NR1/NR2B subunits, while receptors containing NR2C and NR2D subunits these amines produces weak or absent effects (reviewed by Williams, 1997). In fact, previous studies have implicated selected NMDA receptor subunits in the recognition memory processing, particularly the NR2B. In this context, rats showing superior object recognition performance presented higher levels of the NR1 and NR2B subunits in the striatum than rats with poor recognition performance (Xu et al., 2005). In line with this result, a study using genetic approaches has shown that mice overexpressing NR2B subunits in the forebrain performed better than wild-type animals in this task (Tang et al., 1999). It is remarkable that NR2B subunit expression is increased in MSS neurons, a finding that is in full agreement with the currently reported improvement of memory by the intrastriatal injection of polyamines, which selectively bind to this subunit (Landwehrmeyer et al., 1995; Ghasemzadeh et al., 1996; Rigby et al., 1996).

Considering that basal ganglia are directly associated with motor control, a special care was taken to discard pharmacologically-induced motor impairment as a potential bias in the test. Neither QA nor SPM altered crossing and rearing activities in the present study. These findings are in agreement with Scattoni et al. (2004), who have shown that QA does not alter locomotor and rearing activity until 2 weeks post-lesion.

Alterations of the functional state of glial cells in almost all brain pathologies (Selkoe et al., 1982; Borlongan et al., 1995; Binder and Steinhäuser, 2006; Sugaya et al., 2008) and also after CNS injury (Hill-Felberg et al., 1999; Norton, 1999) have been reported. Although microglia and astrocytes secrete important growth factors for neurons, their role after CNS injury seems detrimental for neuronal survival and regeneration (Fawcett, 1997; Ridet et al., 1997; Cassiani-Ingoni et al., 2007). In this context, some studies have shown that QA induces secondary molecular changes that are followed by neuronal death, microglial activation and reactive astrogliosis (Dihné et al., 2001; Ryu et al., 2004; Ryu and McLarnon, 2008). Reactive astrogliosis is characterized by hyperplasia, hypertrophy and increase in GFAP immunostaining. In full agreement with these studies, our investigations showed a significant increase in GFAP immunoreactivity 6 days after QA-injection in the striatum.

There are *in vivo* studies showing that pharmacological treatments that inhibit the glial proliferation after CNS injury are neuroprotective (Ryu et al., 2004) and facilitate cognitive recovery (Di Giovanni et al., 2005). In the current study, we found that a single administration of SPM (0.1 nmol/site) completely inhibited QA-induced increase of GFAP immunoreactivity in the striatum. The administration of SPM occurred five days after QA injection, when astrogliosis ensues (Dihné et al., 2001). Since there is a delayed time course of glial proliferation following CNS injury, it is reasonable to suggest that SPM modified the normal course of glial events after striatal QA-administration.

Altogether, our findings suggest that SPM protects against both behavioural and morphological alterations induced by QA. However, further studies are necessary to determine the mechanisms by which SPM decreases QA-induced glial proliferation and cognitive impairment.

Materials and Methods

Subjects

A total of 148 adult male Wistar rats (250 – 300 g) were used. Animals were housed four per cage in a room at a constant temperature (22 ± 1 ° C) and maintained on a 12:12 h light:dark cycle with free access to standard laboratory food (Supra, Santa Maria, RS, Brazil) and water. All animal procedures were carried out in accordance with the Policies on the Use of Animals and Humans in Neuroscience research, revised and approved by the Society for Neuroscience Research in January 1995 and with the Institutional and National regulations for animal research (process 0206).

Surgery

Rats were anesthetized with Equithesin (1% Phenobarbital, 2% magnesium sulphate, 4% chloral hydrate, 42% propylene glycol, 11% ethanol; 3 mL/kg, i.p.) and then placed in a rodent stereotaxic apparatus. Under stereotaxic guidance, cannulas were inserted bilaterally into the striata (coordinates relative from bregma: AP, 0 mm; ML, 3.0 and -3.0 mm; V, 2.5 mm from the dura) (Paxinos and Watson, 1986). Chloramphenicol (200 mg/kg, i.p.) was administered before the

surgical procedure. The post surgical recovery period was 5 days in all experiments.

Design

Experiment 1

On day 1, animals received bilateral intrastriatal injections of saline (0.9%, 1 μ L/site) or QA (90, 180 or 360 nmol, 1 μ L/site). On day 5, the animals were habituated to the open field apparatus and on days 6 and 7 animals were subjected to the object recognition task (Fig 1).

Experiment 2

On day 1, rats were injected with saline (0.9%, 1 μ L/site) or QA (180 nmol, 1 μ L/site) bilaterally into the striata. On day 5, the animals were habituated to the open field apparatus, and on day 6 the animals were subjected to the training session of the object recognition task. Immediately after training the animals were injected with saline (0.9%, 1 μ L/site) or SPM (0.1, 1 or 10 nmol, 1 μ L/site) bilaterally into the striata.

All drugs were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) and dissolved in 0.9% saline (pH adjusted to 7.4). SPM (N,N'-bis [3-aminopropyl] 1,4-butanediamine) and QA (2,3 pyridinedicarboxylic acid) were injected at a flow rate of 0.5 μ L/min. The injections were left in place for 1 min after infusion to avoid reflux and were performed using a cannula (30 gauge) that was fitted into the guide cannula (27

gauge), with the tip of the infusion cannula protruding 1.0 mm beyond that of the guide cannula and, therefore, aimed the striatum.

Object recognition task

The object recognition task takes advantage of the rats' spontaneous tendency to explore the environment and does not require punishment or reward (Ennaceur and Delacour, 1988). It consisted of three sessions: habituation, training and retention. Animals were left to freely explore for 10 min a round open field (56 cm of internal diameter, which had its floor divided into 10 areas of the same size) in the absence of objects. Twenty-four hours after habituation, training was conducted by placing individual rats for 10 min into the field, in which two identical objects (object A1 and A2) were positioned in two adjacent sides. In the retention session, carried out 24 hours after training, the rats were allowed to explore for 10 min the open field, in which one of the familiar objects used during training was replaced by a novel object (object B). Objects were made of odourless plastic and similar in size. Between each trial, the objects and the field were cleaned with a 30% ethanol solution. The total time spent sniffing or touching each object with the nose and/or forepaws and the number of rearing and crossing responses were recorded by an observer who was not aware of the animal's pharmacological treatment. Recognition memory was assessed by a discrimination score, calculated as the difference between the times spent exploring the novel (B) and the familiar object (A).

Perfusion and histological processing of tissue

A subset of the animals from experiment 2 was chosen to evaluate whether SPM protected from the morphological alterations induced by the intrastriatal injection of QA (sal/sal, sal/SPM 0.1 nmol, QA/sal and QA/SPM 0.1 nmol groups). Seven days after the first injection (sal or QA 180 nmol), the animals were deeply anesthetized with Equithesin (3 mL/kg, i.p.) and the heart was perfused through the ascending aorta with 0.15 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) followed by a solution of 4% paraformaldehyde in PBS (pH 7.4). The whole brain was removed, post fixed in the same fixative for 24 h at 4° C and then cryoprotected in a 20% sucrose solution for 24 h at 4° C. They were then cryosectioned in the coronal plane (20- μ m thick) and stored in PBS at 4° C until processed. The brain sections were mounted on gelatine-coated slides and divided into two sets: I) fluoro-jade C staining – a histofluorescent method to detect neuronal degeneration – and II) immunohistochemical staining for glial fibrillary acidic-protein (GFAP).

I) Histochemical staining for the detection of neuronal degeneration: fluoro-jade C. Slides were immersed in 0.1% NaOH in 80% ethanol for 5 min followed by 1 min each in 70% alcohol and 2 min in distilled water. The slides were then transferred to a solution of 0.06% potassium permanganate and were gently shaken for 10 min. After rinsing twice with distilled water for 1 min, the slides were incubated in a dark environment for 10 min in a 0.001% fluoro-jade C solution made in 0.1% acetic acid. After staining, the sections were rinsed three times with distilled water (1 min each), dried at 37° C, dehydrated in xylene and coverslipped with DPX mountant.

II) Immunohistochemical staining: GFAP. The slides were rinsed for 5 min in PBS (pH 7.4) and immersed for 30 min in 0.05 M Tris-buffered saline (TBS, pH 7.4)

under gentle agitation to remove traces of fixative. They were rinsed three times with 1% Triton X-100 in 0.05 M TBS (15 min each) and incubated for 60 min with 10% fetal calf serum in 0.05 M TBS to block antibody non-specific binding. The slides were then incubated overnight at 4° C with monoclonal anti-GFAP antibody (1:1000, mouse Dako Cytomation, DK, Z0334). After incubation, the slides were washed five times with 0.05 M TBS (15 min each), dehydrated in an ascending ethanol series followed by xylene and coverslipped with prolong anti-fade.

Quantification and statistical analysis

Images of representative regions of striatum were examined under a Zeiss (PG-HITEC, Mem Martins, Portugal) Axioskop 2 plus microscope equipped with a EBQ100 isolated fluorescent lamp. Analyses were performed using the Axiovision Release 4.2 software. A set of three sections, taken from the same region in all groups, throughout the rostrocaudal extend of the striatum was analyzed. The mean of density of labelled cells (fluoro-jade C and GFAP) in the three sections from each animal was expressed as counts/mm³.

Behavioral and morphological data were analyzed by one or two-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keuls test when appropriate. Differences between groups were considered to be significant when $p < 0.05$.

References

- Aubeeluck, A. and Wilson, E. 2008. Huntington's disease. Part 1: essential background and management. *Br J Nurs.* **17**: 146 – 151.
- Ayalon, L., Doron, R., Weiner, I., and Joel, D., 2004. Amelioration of behavioural deficits in a rat model of Huntington's disease by excitotoxic lesion of the globus pallidus. *Exp Neurol.* **186**: 46 – 58.
- Beal, M.F., Kowall, N.W., Ellison, D.W., Mazurek, M.F., Swartz, K.J., and Martin, J.B. 1986. Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature.* **321**: 168 – 171.
- Beal, M.F. 1992. Mechanisms of excitotoxicity in neurological diseases. *FASEB J.* **6**: 3338 – 3344.
- Binder, D.K. and Steinhäuser, C. 2006. Functional changes in astroglial cells in epilepsy. *Glia.* **54**: 358 – 368.
- Borlongan, C.V., Koutouzis, T.K., Randall, T.S., Freeman, T.B., Cahill, D.W., and Sanberg, P.R. 1995. Systemic 3-nitropropionic acid: behavioral deficits and striatal damage in adult rats. *Brain Res Bull.* **36**: 549 – 556.
- Buerguer, A.A., Gross, C.G., and Rocha-Miranda, C.E. 1974. Effects of ventral putamen lesions on discrimination learning by monkeys. *J Comp Physiol Psychol.* **86**: 440 – 446.
- Camera, K., Mello, C.F., Ceretta, A.P.C., and Rubin, M.A. 2007. Systemic administration of polyaminergic agents modulate fear conditioning in rats. *Psychopharmacology.* **192**: 457 – 464.

- Castellano, C., Cestari, V., and Ciamei, A. 2001. NMDA receptors and learning and memory processes. *Curr Drug Targets*. **2**: 273 – 283.
- Cassiani-Ingoni, R., Muraro, P.A., Magnus, T., Reichert-Scriver, S., Schmidt, J., Huh, J., Quandt, J.A., Bratincsak, A., Shahar, T., Eusebi, F., Sherman, L.S., Mattson, M.P., Martin, R., and Rao, M.S. 2007. Disease progression after bone marrow transplantation in a model of multiple sclerosis is associated with chronic microglial and glial progenitor response. *J Neuropathol Exp Neurol*. **66**: 637 – 649.
- de Lima, M.N.M, Laranja, D.C., Bromberg, E., Roesler, R., and Schröder, N. 2005. Pré- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behav Brain Res*. **156**: 139 – 143.
- DiFiglia, M. 1990. Excitotoxic injury of the neostriatum: a model for Huntington's disease. *Trends Neurosci*. **13**: 286 – 289.
- Di Giovanni, S., Movsesyan, V., Ahmed, F., Cernak, I., Schinelli, S., Stoica, B., and Faden, A.I. 2005. Cell cycle inhibition provides neuroprotection and reduces glial proliferation and scar formation after traumatic brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. **102**: 8333 – 8338.
- Dihné, M., Block, F., Korr, H., and Töpper, R. 2001. Time course of glial proliferation and glial apoptosis following excitotoxic CNS injury. *Brain Res*. **902**: 178 – 189.
- Divac, I., Rosvold, H.E., and Szwarcbart, M.K. 1967. Behavioral effects of selective ablation of the caudate nucleus. *J Comp Physiol Psychol*. **63**: 184 – 190.

- Ennaceur, A. and Delacour, J. 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res.* **31**: 47 – 59.
- Fanselow, M.S. and Kim, J.J. 1994. Acquisition of contextual Pavlovian fear conditioning is blocked by application of an NMDA receptor antagonist D,L-2-amino-5-phosphonovaleric acid to the basolateral amygdala. *Behav Neurosci.* **108**: 210 – 212.
- Fawcett, J.W. 1997. Astrocytic and neuronal factors affecting axon regeneration in the damaged central nervous system. *Cell Tissue Res.* **290**: 371 – 377.
- Ferrante, R.J., Kowall, N.W., Cipolloni, P.B., Storey, E., and Beal, M.F. 1993. Excitotoxin lesions in primates as a model for Huntington's disease: histopathologic and neurochemical characterization. *Exp Neurol.* **119**: 46 – 71.
- Ferreira, T.L., Moreira, K.M., Ikeda, D.C., Bueno, O.F.A., and Oliveira, M.G.M. 2003. Effects of dorsal striatum lesions in tone fear conditioning and contextual fear conditioning. *Brain Res.* **987**: 17 – 24.
- Francis, L., Cruz, R., Antúnez, I., and Rozillo, J.C. 2000. Behavioral characterization of a model of Huntington's disease in rats, induced by quinolinic acid. *Rev Neurol.* **30**: 1016 – 1021.
- Furtado, J.C.S. and Mazurek, M.F. 1996. Behavioral characterization of quinolinate-induced lesions of the medial striatum: relevance for Huntington's disease. *Exp Neurol.* **138**: 158 – 168.
- Ghasemzadeh, M.B., Sharma, S., Surmeier, D.J., Eberwine, J.H., and Chesselet, M.F. 1996. Multiplicity of glutamate receptor subunits in single striatal neurons: an RNA amplification study. *Mol Pharmacol.* **49**: 852 – 859.

- Groenewegen, H.J. 2003. The basal ganglia and motor control. *Neural Plast.* **10**: 107 – 120.
- Haberny, K.A., Paule, M.G., Scallet, A.C., Sistare, F.D., Lester, D.S., Hanig, J.P., and Slikker, W. Jr. 2002. Ontogeny of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor system and the susceptibility to neurotoxicity. *Toxicol Sci.* **68**: 9 – 17.
- Hill-Felberg, S.J., McIntosh, T.K., Oliver, D.L., Raghupathi, R., and Barbarese, E. 1999. Concurrent loss and proliferation of astrocytes following lateral fluid percussion brain injury in the adult rat. *J Neurosci Res.* **57**: 271 – 279.
- Joel, D., Ayalon, L., Tarrasch, L., and Weiner, I. 2003. Deficits induced by quinolinic acid lesion to the striatum in a position discrimination and reversal task are ameliorated by permanent and temporary lesion to the globus pallidus: a potential novel treatment in a rat model of Huntington's disease. *Mov Disord.* **18**: 1499 – 1507.
- Kim, J.J., DeCola, J.P., Landeira-Fernandez, J., and Fanselow, M.S. 1991. N-methyl-D-aspartate receptor antagonist APV blocks acquisition but not expression of fear conditioning. *Behav Neurosci.* **105**: 126 – 133.
- Kishi, A., Ohno, M., and Watanabe, S. 1998. Spermidine, a polyamine site agonist, attenuates working memory deficits caused by blockade of hippocampal muscarinic receptors and mGluRs in rats. *Brain Res.* **793**: 311 – 314.
- Landwehrmeyer, G.B., Standaert, D.G., Testa, C.M., Penney Jr, J.B., and Young A.B. 1995. NMDA receptor subunit mRNA expression by projection neurons and interneurons in rat striatum. *J Neurosci.* **15**: 5297 – 5307.
- Lawrence, A.D., Watkins, L.H.A., Sahakian, B.J., Hodges, J.R., and Robbins, T.W. 2000. Visual object and visuospatial cognition in Huntington's disease:

- implications for information processing in corticostriatal circuits. *Brain*. **123**: 1349 – 1364.
- Li, L., Fan, M., Icton, C.D., Chen, N., Leavitt, B.R., Hayden, M.R., Murphy, T.H., and Raymond, L.A. 2003. Role of NR2B-type NMDA receptors in selective neurodegeneration in Huntington disease. *Neurobiol Aging*. **24**: 1113 – 1121.
- McDonald, J.W. and Johnston, M.V. 1993. Excitatory amino acid neurotoxicity in the developing brain. *NIDA Res Monogr*. **133**: 185 – 205.
- McGurk, J.F., Bennet, M.V.L., and Zukin, R.S. 1990. Polyamines potentiate responses of N-methyl-D-aspartate receptor expressed in *Xenopus oocytes*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **87**: 9971 – 9974.
- Meyer, R.C., Knox, J., Purwin, D.A., Spangler, E.L., and Ingram, D.K. 1998. Combined stimulation of the glycine and polyamine sites of the NMDA receptor attenuates NMDA-blockade induced learning deficits of rats in a 14-unit T-maze. *Psychopharmacology*. **135**: 290 – 295.
- Norton, W.T. 1999. Cell reactions following acute brain injury: a review. *Neurochem Res*. **24**: 213 – 218.
- Packard, M.G., Hirsh, R., and White, N.M. 1989. Differential effects of fornix and caudate nucleus lesions on two radial maze tasks: evidence for multiple memory systems. *J Neurosci*. **9**: 1465 – 1472.
- Packard, M.G. and McGaugh, J.L. 1992. Double dissociation of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: further evidence for multiple memory systems. *Behav Neurosci*. **106**: 439 – 446.

- Packard, M.G., Vecchioli, S.F., Schroeder, J.P., and Gasbarri, A. 2001. Task-dependent role for dorsal striatum metabotropic glutamate receptors in memory. *Learn Mem.* **8**: 96 – 103.
- Paxinos, G. and Watson, C. 1986. The rat brain in stereotaxic coordinates, Ed 2. San Diego: Academic.
- Qin, Z.H., Wang, Y.W., and Chase, T.N. 1996. Stimulation of N-Methyl-D-aspartate receptors induces apoptosis in rat brain. *Brain Res.* **725**: 166 – 176.
- Ransom, R.W. and Stec, N.L. 1988. Cooperative modulation of [³H] MK-801 binding to the N-methyl-D-aspartate receptor ion channel complex by L-glutamate, glycine, and polyamines. *J Neurochem.* **51**: 830 – 836.
- Ridet, J.L., Malhotra, S.K., Privat, A., and Gage, F.H. 1997. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* **20**: 570 – 577.
- Riedel, G., Platt, B., and Micheau, J. 2003. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res.* **140**: 1 – 47.
- Rigby, M., Le Bourdelles, B., Heavens, R.P., Kelly, S., Smith D., Butler, A., Hammans, R., Hills, R., Xuereb, J.H., Hill, R.G., Whiting, P.J., and Sirinathsinghji, D.J. 1996. The messenger RNAs for the N-methyl-D-aspartate receptor subunits show region-specific expression of different subunit composition in the human brain. *Neuroscience.* **73**: 429 – 447.
- Rock, D.M. and Macdonald, R.L. 1995. Polyamine regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **35**: 463 – 482.
- Rubin, M.A., Boemo, R.L., Jurach, A., Rojas, D.B., Zanolla, G.R., Obregon, A.D., Souza, D.O., and Mello, C.F. 2000. Intrahippocampal spermidine administration

- improves inhibitory avoidance performance in rats. *Behav Pharmacol.* **11**: 57 – 61.
- Rubin, M.A., Stiegemeier, J.A., Volkwes, M.A, Oliveira, D.M., Fenili, A.C., Boemo, R.L., Jurach, A., and Mello, C.F. 2001. Intra-amygdala spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. *Eur J Pharmacol.* **423**: 35 – 39.
- Rubin, M.A., Berlese, D.B., Stiegemeier, J.A., Volkweis, M.A., Oliveira, D.M., dos Santos, T.L.B, Fenili, A.C., and Mello, C.F. 2004. Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats. *J Neurosci.* **24**: 2328 – 2334.
- Ryu, J.K., Kim, S.U., and McLarnon, J.G. 2004. Blockade of quinolinic acid-induced neurotoxicity by pyruvate is associated with inhibition of glial activation in a model of Huntington's disease. *Exp Neurol.* **187**: 150 – 159.
- Ryu, J.K. and McLarnon, J.G. 2008. VEGF receptor antagonist Cyclo-VEGF reduces inflammatory reactivity and vascular leakiness and is neuroprotective against acute excitotoxic striatal insult. *J Neuroinflammation.* **5**: 18.
- Sacaan, A.I. and Johnson, K.M. 1990. Characterization of the stimulatory and inhibitory effects of polyamines on [³H] N-(1-[thienyl]cyclohexyl) piperidine binding to the N-methyl-D-aspartate receptor ionophore complex. *Mol Pharmacol.* **37**: 572 – 577.
- Sprosen, T. and Woodruff, G.N. 1990. Polyamines potentiate NMDA induced whole-cell currents in cultured striatal neurons. *Eur J Pharmacol.* **179**: 477 – 478.
- Scattoni, M.L., Valanzano, A., Popoli, P., Pezzola, A., Reggio, R., and Calamandrei, G. 2004. Progressive behavioral changes in the spatial open-field

- in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease. *Behav Brain Res.* **152**: 375 – 383.
- Selkoe, D.J., Salazar, F.J., Abraham, C., and Kosik, K.S. 1982. Huntington's disease: changes in striatal proteins reflect astrocytic gliosis. *Brain Res.* **245**: 117 – 125.
- Shear, D.A., Dong, J., Haik-Creguer, K.L., Bazzett, T.J., Albin, R.L., and Dunbar, G.L. 1998a. Chronic administration of quinolinic acid in the rat striatum causes spatial learning deficits in a radial arm water maze task. *Exp Neurol.* **150**: 305 – 311.
- Shear, D.A., Dong, J., Gundy, C.D., Haik-Creguer, K.L., and Dunbar, G.L. 1998b. Comparison of intrastriatal injections of quinolinic acid and 3-nitropropionic acid for use in animal models of Huntington's disease. *Prog Neuro-Psichopharmacol & Biol Psychiat.* **22**: 1217 – 1240.
- Stote, D.L and Fanselow, M.S. 2004. NMDA receptor modulation of incidental learning in Pavlovian context conditioning. *Behav Neurosci.* **118**: 253 – 257.
- Sugaya, K. 2008. Mechanism of glial differentiation of neural progenitor cells by amyloid precursor protein. *Neurodegener Dis.* **5**: 170 – 172.
- Tang, Y.P., Shimizu, E., Dube, G.R., Rampon, C., Kerchner, G.A., Zhuo, M., Liu, G., and Tsien, J.Z. 1999. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature.* **401**: 63 – 69.
- Trueman, R.C., Brooks, S.P. and Dunnett, S.B. 2005. Implicit learning in a serial choice visual discrimination task in the operant 9-hole box by intact and striatal lesioned mice. *Behav Brain Res.* **159**: 313 – 322.

- Williams, K., Romano, C., Dichter, M.A., and Molinoff, P.B. 1991. Modulation of the NMDA receptor by polyamines. *Life Sci.* **48**: 469 – 498.
- Williams, K. 1997. Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem J.* **325**: 289 – 297.
- Yeterian, E.H. and Pandya, D.N. 1995. Corticostriatal connections of extrastriate visual areas in rhesus monkeys. *J Comp Neurol.* **352**: 436 – 457.
- Xu, S.J., Chen, Z., Zhu, L.J., Shen, H.Q., and Luo, J.H. 2005. Visual recognition memory is related to basic expression level of NMDA receptor NR1/NR2B subtype in hippocampus and striatum of rats. *Acta Pharmacol Sin.* **26**: 177 – 180.
- Zeron, M. M., Hansson, O., Chen, N., Wellington, C.L., Leavitt, B.R., Brundin, P., Hayden, M.R., and Raymond, L.A. 2002. Increased sensitivity to N-Methyl-D-Aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron.* **33**: 849 – 860.

Figures

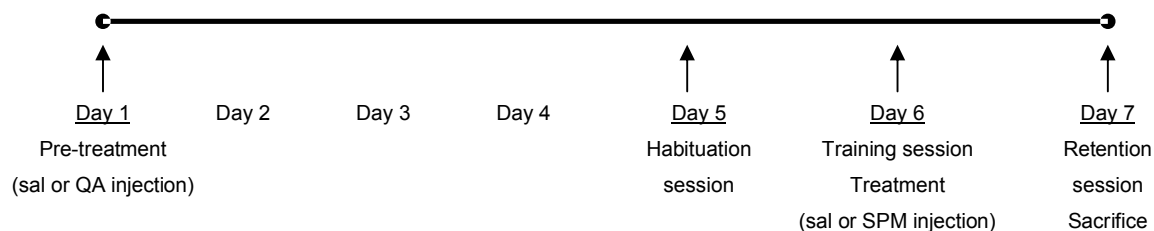


Figure 1. Timeline of the behavioral procedures.

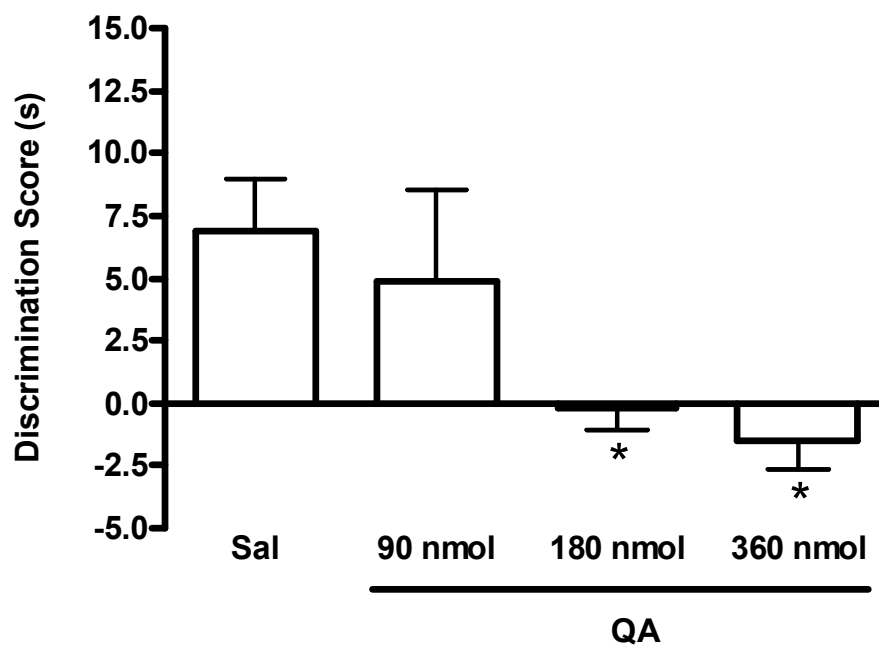


Figure 2. Effect of pre-training intrastriatal administration of QA (90, 180 and 360 nmol/site) on discrimination score in the object recognition task. Data are expressed as means \pm S.E.M. ($n = 9 - 12$ per group), * $p < 0.05$ compared with sal group.

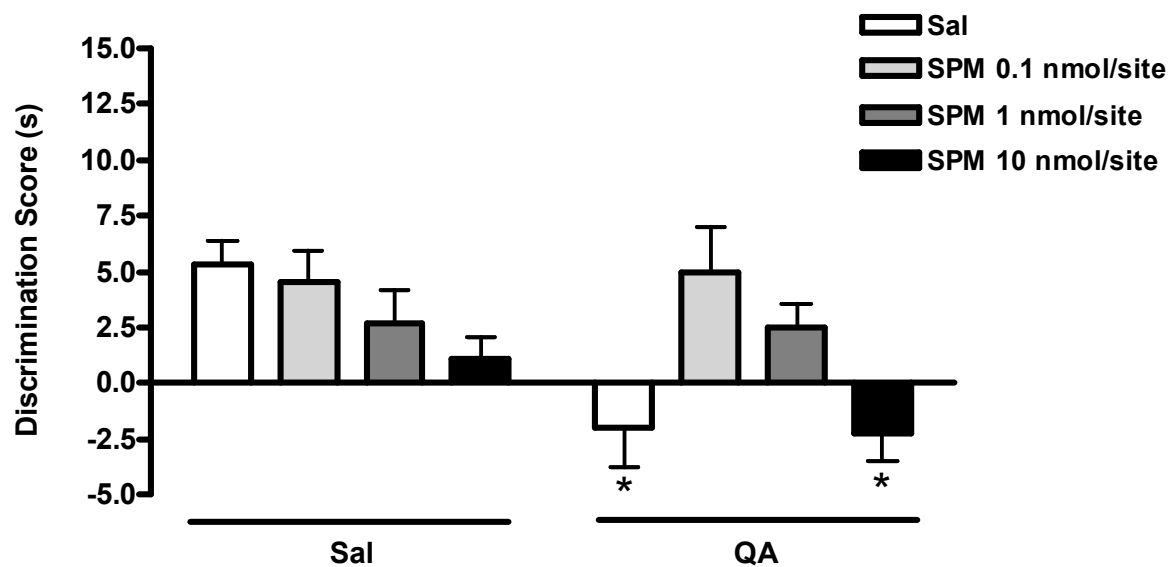


Figure 3. Effect of post-training intrastratial administration of SPM (0.1, 1 and 10 nmol/site) on discrimination score and on impairment of discrimination score induced by striatal lesion (180 nmol/site of QA) in the object recognition task. Data are expressed as means \pm S.E.M. ($n = 12$ per group), $*p < 0.05$ compared with sal/sal group.

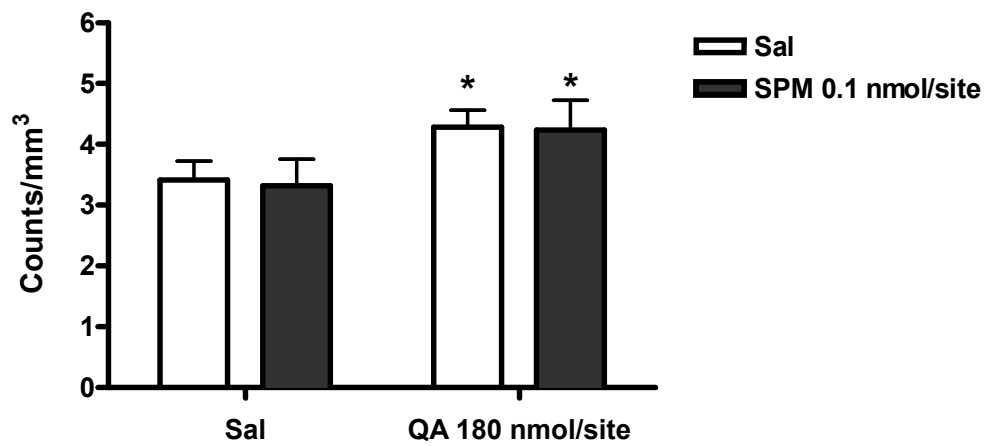


Figure 4. Quantification of neuronal degeneration of the striatal cells (labelled with Fluoro-Jade C) 7 days after pretreatment with QA (180 nmol/site). Treatment with SPM (0.1 nmol/site) was made 5 days after pretreatment with QA. Data are expressed as means \pm S.E.M. (n = 4 per group), * p < 0.05 compared with sal/sal group.

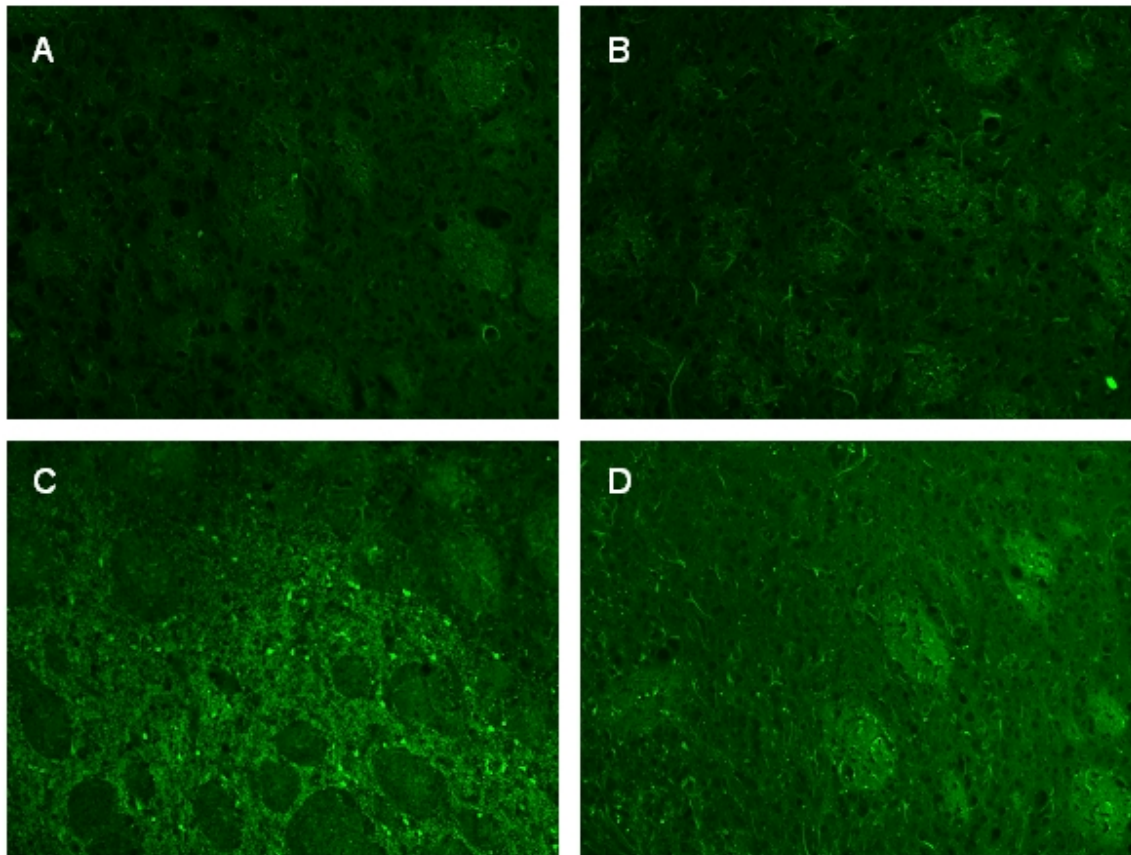


Figure 5. Detection of neuronal degeneration with the fluorescent marker Fluoro-Jade C. Photomicrographs show coronal sections at level of the striatum of rats treated with (A) saline/saline, (B) saline/SPM 0.1 nmol/site, (C) QA 180 nmol/site/saline and (D) QA 180 nmol/site/SPM 0.1 nmol/site.

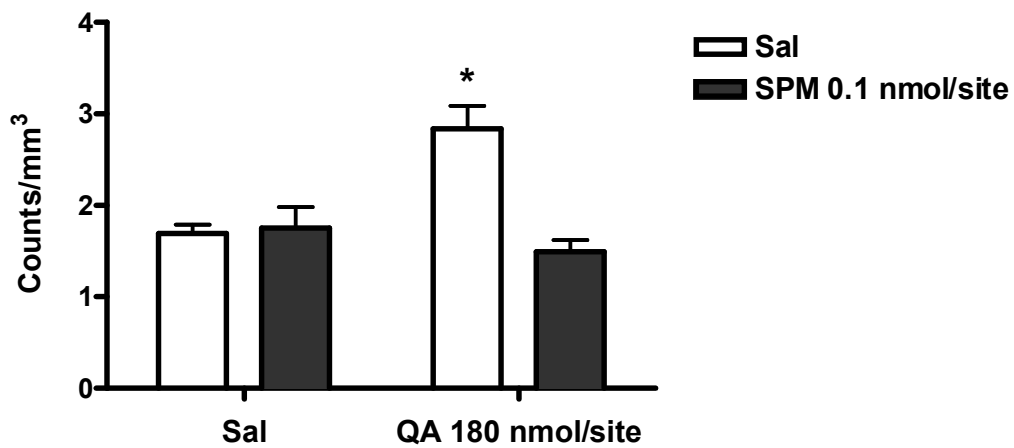


Figure 6. Quantification of GFAP-immunoreactivity in the striatum 7 days after pretreatment with QA (180 nmol/site). Treatment with SPM (0.1 nmol/site) was made 5 days after pretreatment with QA. Data are expressed as means \pm S.E.M. ($n = 4$ per group), * $p < 0.001$ compared with sal/sal group.

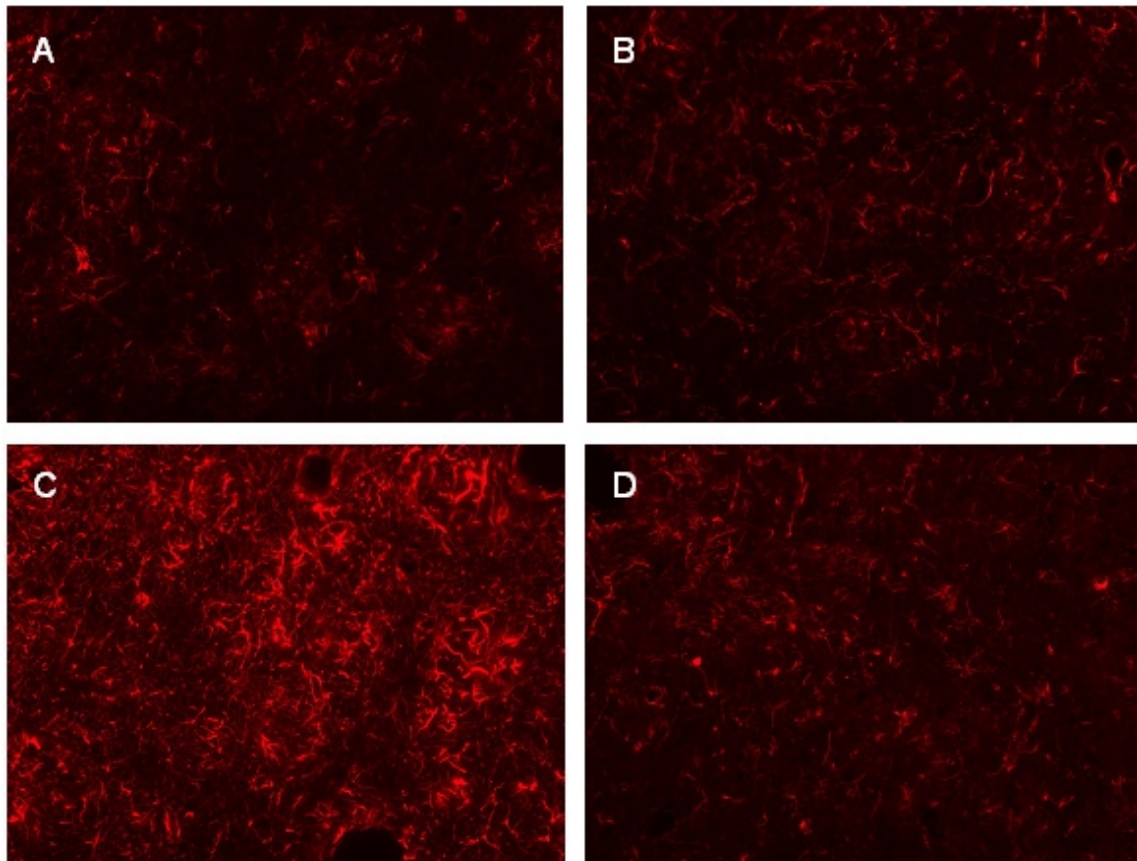


Figure 7. Representative photomicrographs of GFAP-immunoreactivity in the striatum of rats treated with (A) saline/saline, (B) saline/SPM 0.1 nmol/site, (C) QA 180 nmol/site/saline and (D) QA 180 nmol/site/SPM 0.1 nmol/site.

TABLE 1. Effect of SPM (0.1, 1 and 10 nmol/site) and QA (180 nmol/site) on locomotor activity (crossing scores).

Groups	Pre-retention session	Retention session
sal/sal	53.4 ± 8.4	40.4 ± 8.7
sal/SPM 0.1nmol/site	54.0 ± 10	51.7 ± 6.8
sal/SPM 1nmol/site	42.0 ± 6.5	30.0 ± 6.3
sal/SPM 10nmol/site	49.8 ± 6.1	30.6 ± 4.3
QA/sal	55.0 ± 10.2	50.5 ± 9.5
QA/SPM 0.1nmol/site	47.7 ± 7.5	34.4 ± 6.9
QA/SPM 1nmol/site	45.3 ± 8.5	36.0 ± 7.5
QA/SPM 10 nmol/site	41.6 ± 5.4	37.0 ± 5.3

Data from the habituation and training sessions were combined and expressed as pre-retention session. Data are expressed as means ± SEM, n = 12 in each group.

TABLE 2. Effect of SPM (0.1, 1 and 10 nmol/site) and QA (180 nmol/site) on vertical exploratory activity (rearing scores).

Groups	Pre-retention session	Retention session
sal/sal	25.1 ± 3.9	20.3 ± 4.8
sal/SPM 0.1nmol/site	25.8 ± 4.7	19.8 ± 3.2
sal/SPM 1nmol/site	22.3 ± 3.8	16.7 ± 2.8
sal/SPM 10nmol/site	22.7 ± 4.1	15.3 ± 3.1
QA/sal	27.0 ± 8.3	23.9 ± 5.6
QA/SPM 0.1nmol/site	24.0 ± 4.5	16.9 ± 4.3
QA/SPM 1nmol/site	22.1 ± 4.0	19.3 ± 4.9
QA/SPM 10 nmol/site	22.6 ± 3.9	19.8 ± 3.3

Data from the habituation and training sessions were combined and expressed as pre-retention session. Data are expressed as means ± SEM, n = 12 in each group.

CAPÍTULO 5

DISCUSSÃO GERAL

Este trabalho teve como propósito avaliar um possível efeito neuroprotetor da espermina sobre algumas alterações induzidas por administração intraestriatal de AQ, uma neurotoxina utilizada como modelo da DH.

Sabe-se que os efeitos biológicos das poliaminas são complexos uma vez que lhe são atribuídos tanto efeitos neuroprotetores (Dornay et al., 1986; Gilad & Gilad, 1989; 1991; 1992; Coert et al., 2000; Ferchmin et al., 2000; Clarkson et al., 2004; Shirhan et al., 2004) quanto neurotóxicos (Gilad & Gilad, 1987; Bourdiol et al., 1992; Otsuki et al., 1995; Conway, 1998; Takano et al., 2003; 2005). Como ressaltado anteriormente, essa ampla gama de efeitos diversos ocorre devido o efeito bifásico das poliaminas no receptor NMDA.

Concordando com este preceito elaborado a partir de estudos *in vitro*, os achados do presente trabalho mostraram que a espermina exibiu este mesmo efeito dual também em tarefas comportamentais. Foi observado que a administração intraestriatal prévia de 0,1 nmol/sítio de espermina aumentou o número de rotações contralaterais induzidas por AQ, enquanto 10 nmol/sítio da mesma reduziu tanto o número de rotações quanto o percentual de balanços contralaterais. Além disso, também foi observado que a administração intraestriatal pós-treino de 0,1 e 1 nmol/sítio de espermina reverteu o prejuízo cognitivo induzido por lesão estriatal enquanto 10 nmol/sítio da mesma não teve efeito. Desta forma, é possível que a espermina, nas menores doses testadas (0,1 e 1 nmol/sítio) estimule a condutância dos receptores NMDA estriatais, enquanto a maior dose testada (10 nmol/sítio) iniba as respostas mediadas por este receptor.

Com a finalidade de investigar essa possibilidade foi utilizada a arcaína. Estudos prévios têm mostrado que a arcaína, na ausência das poliaminas, possui pouco ou nenhum efeito em estudos de ligação específica sobre o receptor NMDA. No entanto, o aumento da ligação do [³H] MK-801 e do [³H] TCP no receptor NMDA induzido por espermidina é reduzido por arcaína, de forma concentração-dependente, caracterizando um antagonista competitivo do sítio das poliaminas no receptor NMDA (Reynolds, 1990; Sacaan & Johnson, 1990). Corroborando com a literatura, os resultados obtidos neste trabalho mostram que a administração intraestriatal de arcaína não alterou, em nenhuma das doses testadas, o número de rotações e nem o percentual de balanços contralaterais induzidos por AQ. No entanto, quando co-administrada com a espermina, a arcaína reverteu o efeito inibitório de 10 nmol/sítio de espermina sobre as alterações motoras induzidas por AQ.

No que diz respeito ao efeito da arcaína sobre o sítio de ligação das poliaminas no receptor NMDA os dados são conflitantes. Ao mesmo tempo em que existem evidências que mostram que a arcaína bloqueia o sítio inibitório das poliaminas (Marvizón & Baudry, 1994), também existem relatos mostrando que a arcaína não afeta a fase inibitória da espermina sobre a ligação do [³H] MK-801 (Reynolds, 1990) e que a arcaína reduz as correntes através do receptor NMDA por um mecanismo que é independente de espermina, sugerindo que a espermina e a arcaína atuem em sítios diferentes neste receptor (Maciver et al., 1991). Os resultados do presente trabalho sugerem que a arcaína provavelmente interaja num sítio diferente (sítio 3, onde se ligam os antagonistas poliaminérgicos – vide introdução) ao da espermina, impedindo, de alguma forma (talvez por alterações

conformacionais ou até mesmo estéricas), a ligação da poliamina no sítio inibitório (sítio 2) no receptor NMDA.

Estudos prévios mostram que as poliaminas têm um grande potencial no que diz respeito à melhora do desempenho cognitivo. Sabe-se que a administração intra-hipocampal (Rubin et al., 2000; Berlese et al., 2005; Guerra et al., 2006), intra-amigdalár (Rubin et al., 2001; 2004) e sistêmica (Mikolajczak et al., 2002a, 2002b; Camera et al., 2007) de espermidina melhora o desempenho de ratos em tarefas como esquivas inibitórias, medo condicionado e reconhecimento social. Além disso, foi mostrado ainda que a arcaína, além de induzir déficit de memória, também reverte o efeito facilitatório da espermidina na esquivas inibitórias e no medo condicionado (Rubin et al., 2001; 2004; Câmera et al., 2007). Em concordância com estes estudos, foi observado no presente trabalho que a administração intraestriatal pós-treino de baixas doses de espermina (0,1 e 1 nmol/sítio) melhorou a consolidação da memória na tarefa de reconhecimento de objetos, provavelmente através da modulação dos receptores NMDA.

Interessantemente, o efeito modulatório das poliaminas no receptor NMDA ocorre basicamente em receptores com as combinações de subunidades NR1/NR2A e NR1/NR2B, enquanto nos receptores contendo as subunidades NR2C e NR2D os efeitos destas amins são muito fracos ou ausentes (Williams, 1997). Adicionalmente, tem sido mostrada a seletividade de certas subunidades componentes do receptor NMDA no processamento da memória de reconhecimento, particularmente a subunidade NR2B. Neste contexto, ratos que exibem um melhor desempenho na tarefa de reconhecimento de objetos têm níveis mais elevados das subunidades NR1 e NR2B no estriado que ratos com

pior desempenho (Xu et al., 2005). Outro estudo mostra que camundongos transgênicos com maior expressão da subunidade NR2B no cérebro têm melhor desempenho que animais selvagens na tarefa de reconhecimento de objetos (Tang et al., 1999). Outro dado que merece destaque é que a expressão da subunidade NR2B é maior em relação às demais subunidades do receptor NMDA em NEM estriatais (Landwehrmeyer et al., 1995; Ghasemzadeh et al., 1996; Küppenbender et al., 1999), o que vem complementar e reforçar a hipótese do atual trabalho, o qual mostra a reversão de um prejuízo cognitivo através da administração intraestriatal de espermina, que se liga seletivamente à subunidade NR2B.

O AQ é um metabólito da rota das quinureninas, a principal rota de degradação do aminoácido triptofano em mamíferos. No cérebro, a rota das quinureninas encontra-se localizada principalmente nas células gliais (Schwarcz & Pellicciari, 2002). Existem várias anormalidades no metabolismo da rota das quinureninas em cérebros de pacientes com a DH (Schwarcz & Albin, 2002). Guidetti e colaboradores (2006) mostraram que os níveis de AQ encontram-se elevados no estriado e no córtex de camundongos transgênicos contendo a huntintina mutante, sugerindo que esta proteína leve às alterações do metabolismo da rota das quinureninas cerebrais aumentando, por conseguinte, a concentração daquele metabólito extremamente tóxico para os neurônios.

Embora o mecanismo exato de morte celular na DH ainda não esteja totalmente elucidado, existem grandes correntes na literatura defendendo o envolvimento da morte celular excitotóxica induzida por glutamato. No cérebro de pacientes com DH há produção reduzida de ATP, o que leva ao prejuízo da função

da atividade da bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase, a qual funciona normalmente para manter os gradientes eletrônicos através das membranas celulares durante potenciais de ação (Beal, 1992). Desta forma, nos cérebros destes pacientes a membrana celular permanece “cronicamente” despolarizada após o disparo de um potencial de ação, permitindo a expulsão do Mg^{2+} que normalmente bloqueia os receptores NMDA. Quando estes receptores permanecem abertos por longos períodos, ocorre um grande aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} , levando ao dano oxidativo entre outros eventos (Beal, 1992). Neste contexto, sugere-se que o AQ age de maneira similar em modelos animais, visto que a administração de AQ no estriado causa aumento do influxo de Ca^{2+} , redução da produção de ATP e morte celular excitotóxica correspondente, em certos aspectos, à neurodegeneração na DH humana. Além disso, a neurotoxicidade produzida pelo AQ pode também depender, em parte, da formação de espécies reativas visto que sua atividade neurotóxica é prevenida por reagentes “spin-trap” como a α -fenil-*t*-butilnitrona (Nakao & Brundin, 1997) e por seqüestradores de radicais livres (Nakai et al., 1999).

Desta forma, a lesão estriatal induzida pelo AQ pode ser considerada uma ferramenta útil para estudar os possíveis mecanismos de degeneração neuronal seletiva e também para a avaliação de estratégias neuroprotetoras. Tendo isto em vista, procurou-se determinar o potencial neuroprotetor da espermina através da análise dos seus efeitos sobre alguns parâmetros como estresse oxidativo, degeneração neuronal e alterações gliais induzidas pelo AQ.

Para tanto, a carbonilação de proteínas foi utilizada como um parâmetro de estresse oxidativo. A administração intraestriatal de AQ induziu um aumento da

carbonilação protéica, o que corrobora com a hipótese de ativação excessiva do receptor NMDA e conseqüente produção de estresse oxidativo. Reforçando esta hipótese, Santamaría e Rios (1993) demonstraram que a administração intraestriatal de AQ aumenta a peroxidação lipídica (outro parâmetro de estresse oxidativo), a qual é completamente prevenida por pré-tratamento com MK-801. Adicionalmente, este aumento da carbonilação protéica induzida por AQ vem ao encontro de um estudo que mostra que pacientes com a DH apresentam um aumento do conteúdo da carbonilação de proteínas no estriado e córtex, sugerindo que o estresse oxidativo e o dano a macromoléculas específicas podem participar da progressão da doença (Sorolla et al., 2008). Interessantemente, a prévia administração de espermina, numa dose que atenuou as alterações motoras (10 nmol/sítio), preveniu a carbonilação aumentada pelo AQ. Desta forma, os resultados deste estudo embasam, por sua vez, o suposto envolvimento dos receptores NMDA na geração de estresse oxidativo. Além disso, não se pode descartar a atividade antioxidante e seqüestrante de radicais livres das poliaminas (vide introdução), que também pode estar favorecendo a redução da carbonilação protéica induzida por AQ.

Relativamente à degeneração neuronal, foi observado no atual trabalho que a administração de AQ provocou um aumento significativo da morte de neurônios estriatais, 6 dias após sua injeção. A espermina, administrada *in situ* no 5º dia após a injúria e na menor dose que teve efeito sobre a tarefa de reconhecimento de objetos (0,1 nmol/sítio), não foi capaz de alterar o percurso de morte neuronal induzida pelo AQ. Este fato nos leva a concluir que a melhora cognitiva induzida

pela SPM neste trabalho se deve à estimulação de receptores NMDA presentes em neurônios remanescentes do estriado.

Além das observações do efeito tóxico do AQ em neurônios, há também relatos do seu efeito deletério sobre a funcionalidade das células gliais, induzindo ativação microglial e astrogliose reativa (Dihné et al., 2001; Ryu et al., 2004; Ryu and McLarnon, 2008). A astrogliose reativa é caracterizada por hiperplasia, hipertrofia e aumento da marcação imunológica para GFAP. Embora a microglia e os astrócitos secretem fatores de crescimento importantes para os neurônios, a sua intensa atividade após injúrias ao SNC parece ser prejudicial para a sobrevivência e regeneração neuronal (Fawcett, 1997; Ridet et al., 1997; Cassiani-Ingoni et al., 2007). Baseando-se nestas observações, alguns estudos mostram que tratamentos farmacológicos que inibem esta intensa proliferação glial após injúrias ao SNC, além de se mostrarem neuroprotetores, também levam à recuperação cognitiva (Ryu et al., 2004; Di Giovanni et al., 2005). As investigações deste trabalho mostraram um aumento significativo da imuno-reatividade para GFAP, 6 dias após a administração de AQ no estriado dos ratos, sugerindo que houve uma reação astrocitária em resposta à injúria. No entanto, uma única injeção estriatal de espermina (0,1 nmol/sítio) inibiu completamente o aumento da imuno-reatividade para GFAP induzida por AQ. O tratamento com espermina ocorreu no 5º dia após a injeção do AQ, exatamente no momento em que se dá o início da propagação da astrogliose (Dihné et al., 2001). Uma vez que existe certo “atraso” para o início da proliferação glial após uma injúria ao SNC, é razoável sugerir que a espermina modificou o curso normal dos eventos gliais após a administração estriatal de AQ.

No presente trabalho, foi mostrado que a injeção intraestriatal de AQ (180 e 360 nmol/sítio) prejudica o aprendizado na tarefa de reconhecimento de objetos, de uma forma dose-dependente. Existe um número significativo de trabalhos mostrando que a administração intraestriatal de AQ causa prejuízo cognitivo em várias tarefas tais como o labirinto aquático de Morris (Popoli et al., 1994; Furtado & Mazurek, 1996; Francis et al., 2000; Ayalon et al., 2004), labirinto aquático radial (Shear et al., 1998a; Shear et al., 1998b), labirinto em T (Miszta et al., 1996; Ayalon et al., 2004) e discriminação visual (Joel et al., 2003; Featherstone & McDonald, 2004; Featherstone & McDonald, 2005; Trueman et al., 2005). Lawrence e colaboradores (1998) mostram que pacientes com disfunções dos gânglios da base, como é o caso de pacientes com DH, são caracterizados clinicamente pela tríade de distúrbios motores, emocionais e cognitivos. Relativamente a este último aspecto, foi relatado naquele trabalho que estes pacientes exibem déficits principalmente nas funções executivas e na memória de reconhecimento visual. A partir da descoberta que uma área visual no lobo temporal também é um alvo de eferências do estriado, renovou-se o interesse em reavaliar as funções visuais dos gânglios da base. Estudos eletrofisiológicos e metabólicos confirmam que os gânglios da base têm um importante papel no processamento visual, incluindo a memória visual de curto prazo. Em concordância, pacientes com DH, mesmo nos estágios precoces da doença, apresentam déficits de reconhecimento visual (Lawrence et al., 1999; Lang et al., 2000; Lawrence et al., 2000). Adicionalmente a estes achados, outros estudos mostram a importância da integridade estriatal em diversas tarefas cognitivas como labirinto radial (Packard et al., 1989), esquiva inibitória (Packard et al.,

2001), medo condicionado (Ferreira et al., 2003) e, de especial interesse, em tarefas de discriminação (Packard & McGaugh, 1992; Sargolini et al., 2003; Featherstone & McDonald, 2005; Trueman et al., 2005; Xu et al., 2005; He et al., 2006; Broadbent et al., 2007). Neste contexto, Packard e McGaugh (1992) mostram que o estriado medeia um determinado tipo de memória independente do hipocampo sugerindo, desta forma, a existência de uma dissociação entre os sistemas de memória hipocampal e estriatal. Neste estudo, os autores mostram que lesões no fórnix (mas não no núcleo caudado) prejudicam a aquisição da versão espacial do labirinto aquático em relação aos animais controle. No entanto, lesões no núcleo caudado (mas não no fórnix) prejudicam a aquisição da versão de discriminação visual da mesma tarefa. Desta forma, verifica-se a importância e a participação do estriado no processamento de determinados tipos de memórias não classicamente atribuídas a esta estrutura.

É importante ainda salientar que tanto o AQ quanto a espermia não alteraram o número de cruzamentos e nem as respostas de levantar dos animais testados neste trabalho. Considerando-se que os gânglios basais, do qual o estriado faz parte, estão diretamente associados com o controle motor, foi tomado um cuidado especial sobre este aspecto para descartar qualquer influência de uma possível alteração motora nos testes. De fato, estes resultados estão de acordo com um estudo que mostra que o AQ altera as atividades locomotora e exploratória somente 2 semanas após a lesão (Scattoni et al., 2004).

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES GERAIS

Mediante a análise dos resultados obtidos no presente trabalho é possível concluir:

- A administração estriatal de espermina, na dose de 0,1 nmol/sítio, aumentou o número de rotações contralaterais, enquanto na dose de 10 nmol/sítio diminuiu o número de rotações bem como o percentual de balanços contralaterais induzidos por AQ;
- Os efeitos da espermina sobre as alterações motoras induzidas por AQ ocorreram via receptores NMDA estriatais uma vez que a arcaína (numa dose sem efeito *per se*: 10 nmol/sítio), quando co-administrada com a espermina (10 nmol/sítio), reverteu o efeito desta última;
- A espermina (10 nmol/sítio) preveniu a carbonilação protéica induzida por AQ em estriado de ratos, mostrando potencial antioxidante;
- A administração pós-treino de espermina, nas doses de 0,1 e 1 nmol/sítio, reverteu o déficit mnemônico induzido por AQ na tarefa de reconhecimento de objetos. Já a dose de 10 nmol/sítio de espermina não alterou este déficit;
- A administração estriatal pós-injúria de espermina (na dose que tem efeito sobre a memória: 0,1 nmol/sítio) não apresentou efeito sobre a morte neuronal induzida por AQ. No entanto, esta mesma dose de espermina reverteu a intensa reação astrocitária induzida pelo AQ.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adibhatla, R.M., Hatcher, J.F., Sailor, K., Dempsey, R.J. Polyamines and central nervous system injury: spermine and spermidine decrease following transient focal cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. **Brain Res.** 938: 81 – 86, 2002.

Albin, R.L., Young, A.B., Penney, J.B., Handelin, B., Balfour, R., Anderson, K.D., Markel, D.S., Tourtellotte, W.W., Reiner, A. Abnormalities of striatal projection neurons and N-methyl-D-aspartate receptors in presymptomatic Huntington's disease. **N England J Med.** 322: 1293 – 1298, 1990.

Apelbaum, A., Burgoon, A.C., Anderson, J.D., Lieberman, M. Polyamines inhibit biosynthesis of ethylene in higher plant tissue and fruit protoplasts. **Plant Physiol.** 68: 453 – 456, 1981.

Aubeeluck, A., Wilson, E. Huntington's disease. Part 1: essential background and management. **Br J Nurs.** 17: 146 – 151, 2008.

Ayalon, L., Doron, R., Weiner, I., Joel, D. Amelioration of behavioural deficits in a rat model of Huntington's disease by excitotoxic lesion of the globus pallidus. **Exp Neurol.** 186: 46 – 58, 2004.

Bakker, M.H., McKernan, R.M., Wong, E.H., Foster, A.C. [³H]MK-801 binding to N-methyl-D-aspartate receptors solubilized from rat brain: effects of glycine site ligands, polyamines, ifenprodil, and desipramine. **J Neurochem.** 57: 39 – 45, 1991.

Bardocz, S., White, A., Grant, G., Brown, D.S., Duguid, T.G., Pusztai, A. Uptake and bioavailability of dietary polyamines. **Biochem Soc Trans.** 24: 226S.

Beal, M.F., Kowall, N.W., Ellison, D.W., Mazurek, M.F., Swartz, K.J., Martin, J.B. Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. **Nature.** 321: 168 – 171, 1986.

Beal, M.F. Role of excitotoxicity in human neurological disease. **Curr Opin Neurobiol.** 2: 657 – 662, 1992.

Bear, M.F., Connors, B.W., Paradiso, M.A. Neurociências: desvendando o sistema nervoso. Editora Artmed, 2^a edição, p. 150 – 153, 2002.

Bellé, N.A., Dalmolin, G.D., Fonini, G., Rubin, M.A., Rocha, J.B. Polyamines reduces lipid peroxidation induced by different pro-oxidant agents. **Brain Res.** 1008: 245 – 251, 2004.

Berlese, D.B., Sauzem, P.D., Carati, M.C., Guerra, G.P., Stiegemeier, J.A., Mello, C.F., Rubin, M.A. Time-dependent modulation of inhibitory avoidance memory by spermidine in rats. **Neurobiol Learn Mem.** 83: 48 – 53, 2005.

Bordelon, Y.M., Chesselet, M.F., Nelson, D., Welsh, F., Erecinska, M. Energetic dysfunction in quinolinic acid-lesioned rat striatum. **J Neurochem.** 69: 1629 – 1639, 1997.

Borlongan, C.V., Randall, T.S., Cahill, D.W., Sanberg, P.R. Asymmetrical motor behavior in rats with unilateral striatal excitotoxic lesions as revealed by the elevated body swing test. **Brain Res.** 676: 231 – 234, 1995.

Bourdiol, F., Fage, D., Serrano, A., Carter, C., Benavides, J., Scatton, B. Neurotoxic effects of the intrastriatal injection of spermine and spermidine: lack of involvement of NMDA receptors. **Brain Res.** 596: 183 – 188, 1992.

Broadbent, N.J., Squire, L.R., Clark, R.E. Rats depend on habit memory for discrimination learning and retention. **Learn Mem.** 14: 145 – 151, 2007.

Camera, K., Mello, C.F., Ceretta, A.P., Rubin, M.A. Systemic administration of polyaminergic agents modulate fear conditioning in rats. **Psychopharmacology.** 192: 457 – 464, 2007.

Campbell, R.A., Bartos, D., Morris, D.R., Daves, G.D. Jr., Bartos, F. Advances in polyamine research. Editora Raven Press, New York, 1ª edição, p. 1 – 10, 1978.

Carter, C. The neuropharmacology of polyamines. Editora Academic Press, London, 1ª Edição, p. 318, 1994.

Cassiani-Ingoni, R., Muraro, P.A., Magnus, T., Reichert-Scriver, S., Schmidt, J., Huh, J., Quandt, J.A., Bratincsak, A., Shahar, T., Eusebi, F., Sherman, L.S., Mattson, M.P., Martin, R., Rao, M.S. Disease progression after bone marrow transplantation in a model of multiple sclerosis is associated with chronic microglial and glial progenitor response. **J Neuropathol Exp Neurol.** 66: 637 – 649, 2007.

Castellano, C., Cestari, V., Ciamei, A., Pavone, F. MK-801-induced disruptions of one-trial inhibitory avoidance are potentiated by stress and reversed by naltrexone. **Neurobiol Learn Mem.** 72: 215 – 229, 1999.

Celano, P., Baylin, S.B., Casero Jr., R.A. Polyamines differentially modulate the transcription of growth-associated genes in human colon carcinoma cells. **J Biol Chem.** 264: 8922 – 8927, 1989.

Chida, N., Saito, H., Abe, K. Spermine facilitates the generation of long-term potentiation of evoked potential in the dentate gyrus of anesthetized rats. **Brain Res.** 593: 57 – 62, 1992.

Clarkson, A.N., Liu, H., Pearson, L., Kapoor, M., Harrison, J.C., Sammut, I.A., Jackson, D.M., Appleton, I. Neuroprotective effects of spermine following hypoxic-ischemic-induced brain damage: a mechanistic study. **FASEB J.** 18: 1114 – 1116, 2004.

Clayton, D.A., Browning, M.D. Deficits in the expression of the NR2B subunit in the hippocampus of aged Fisher 344 rats. **Neurobiol Aging.** 22: 165 – 168.

Coert, B.A., Anderson, R.E., Meyer, F.B. Exogenous spermine reduces ischemic damage in a model of focal cerebral ischemia in the rat. **Neurosci Lett.** 282: 5 – 8, 2000.

Conway, E.L. 1998. Brain lesions and delayed water maze learning deficits after intracerebroventricular spermine. **Brain Res.** 800: 10 – 20.

Cotman, C.W., Kahle, J.S., Miller, S.E., Ulas, J., Bridges, R.J. 1995. Excitatory amino acid neurotransmission. In *Psychopharmacology: The Forth Generation of Progress*. Floyd, E., Bloom and Kupfer, D.J. Editora Raven Press, New York, pp. 75 – 85, 1995.

Coyle, J.T., Schwarcz, R. Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. **Nature**. 263: 244 – 246, 1976.

DiFiglia, M. Excitotoxic injury of the neostriatum: a model for Huntington's disease. **Trends Neurosci**. 13: 286 – 289, 1990.

DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K., Schwarz, C., Meloni, A., Young, C., Martin, E., Vonsattel, J.P., Carraway, R., Reeves, S.A., Boyce, F.M., Aronin, N. Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. **Neuron**. 14: 1075 – 1081, 1995.

Dihné, M., Block, F., Korr, H., Töpfer, R. Time course of glial proliferation and glial apoptosis following excitotoxic CNS injury. **Brain Res**. 902: 178 – 189, 2001.

Di Giovanni, S., Movsesyan, V., Ahmed, F., Cernak, I., Schinelli, S., Stoica, B., Faden, A.I. Cell cycle inhibition provides neuroprotection and reduces glial proliferation and scar formation after traumatic brain injury. **Proc Natl Acad Sci USA**. 102: 8333 – 8338, 2005.

Dornay, M., Gilad, V.H., Shiler, I., Gilad, G.M. Early polyamine treatment accelerates regeneration of rat sympathetic neurons. **Exp Neurol**. 92: 665 – 674, 1986.

Drolet, G., Dumbroff, E.B., Legge, R.L., Thompson, J.E. Radical scavenging properties of polyamines. **Phytochemistry**. 25: 367 – 371, 1986.

Emerich, D.F., Thanos, C.G., Goddard, M., Skinner, S.J., Geany, M.S., Bell, W.J., Bintz, B., Schneider, P., Chu, Y., Babu, R.S., Borlongan, C.V., Boekelheide, K., Hall, S., Bryant, B., Kordower, J.H. Extensive neuroprotection by choroid plexus transplants in excitotoxin lesioned monkeys. **Neurobiol Dis**. 23: 471 – 480, 2006.

Estrada Sánchez, A.M., Mejía-Toiber, J., Massieu, L. Excitotoxic neuronal death and the pathogenesis of Huntington's disease. **Arch Med Res**. 39: 265 – 276, 2008.

Fage, D., Voltz, C., Scatton, B., Carter, C. Selective release of spermine and spermidine from the rat striatum by *N*-methyl-D-aspartate receptor activation in vivo. **J Neurochem**. 58: 2170 – 2175, 1992.

Farbyszewski, R., Bielawski, K., Bielawska, A., Sobaniec, W. Spermine protects in vivo the antioxidant enzymes in transiently hypoperfused rat brain. **Acta Neurobiol Exp**. 55: 253 – 258, 1995.

Fawcett, J.W. Astrocytic and neuronal factors affecting axon regeneration in the damaged central nervous system. **Cell Tissue Res**. 290: 371 – 377, 1997.

Featherstone, R.E, McDonald, R.J. Dorsal striatum and stimulus-response learning: lesions of the dorsolateral, but not dorsomedial, striatum impair acquisition of a simple discrimination task. **Behav Brain Res.** 150: 15 – 23, 2004.

Featherstone, R.E, McDonald, R.J. Lesions of the dorsolateral or dorsomedial striatum impair performance of a previously acquired simple discrimination task. **Neurobiol Learn Mem.** 84: 159 – 167, 2005.

Ferchmin, P.A., Pérez, D., Biello, M. Spermine is neuroprotective against anoxia and N-methyl-D-aspartate in hippocampal slices. **Brain Res.** 859: 273 – 279, 2000.

Ferreira, T.L., Moreira, K.M., Ikeda, D.C., Bueno, O.F.A., Oliveira, M.G.M. Effects of dorsal striatum lesions in tone fear conditioning and contextual fear conditioning. **Brain Res.** 987: 17 – 24, 2003.

Flood, J.F., Baker, M.L., Davis, J.L. Modulation of memory processing by glutamic acid receptor agonists and antagonists. **Brain Res.** 521: 197 – 202, 1990.

Foster, A.C., Vezzani, A., French, E.D., Schwarcz, R. Kynurenic acid blocks neurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid. **Neurosci Lett.** 48: 273 – 278, 1984.

Francis, L., Cruz, R., Antúnez, I., Rozillo, J.C. Behavioral characterization of a model of Huntington's disease in rats, induced by quinolinic acid. **Rev Neurol.** 30: 1016 – 1021, 2000.

Furtado, J.C.S., Mazurek, M.F. Behavioral characterization of quinolinate-induced lesions of the medial striatum: relevance for Huntington's disease. **Exp Neurol.** 138: 158 – 168, 1996.

Ghasemzadeh, M.B., Sharma, S., Surmeier, D.J., Eberwine, J.H., Chesselet, M.F. Multiplicity of glutamate receptor subunits in single striatal neurons: an RNA amplification study. **Mol Pharmacol.** 49: 852 – 859, 1996.

Gilad, G.M., Gilad, V.H. Polyamine biosynthesis is required for survival of sympathetic neurons after axonal injury. **Brain Res.** 273: 191 – 194, 1983a.

Gilad, G.M., Gilad, V.H. Early rapid and transient increase in ornithine decarboxylase activity within sympathetic neurons after axonal injury. **Exp Neurol.** 81: 158 – 166, 1983b.

Gilad, G.M., Gilad, V.H. Neurotoxicity of polyamines in rat cerebellar cultures. **Prog Clin Biol Res.** 253: 193 – 206, 1987.

Gilad, G.M., Gilad, V.H. Treatment with polyamines can prevent monosodium glutamate neurotoxicity in the rat retina. **Life Sci.** 44: 1963 – 1969, 1989.

Gilad, G.M., Gilad, V.H. Polyamines can protect against ischemia-induced nerve cell death in gerbil forebrain. **Exp Neurol.** 111: 349 – 355, 1991.

Gilad, G.M., Gilad, V.H. Polyamines in neurotrauma. Ubiquitous molecules in search of a function. **Biochem Pharmacol.** 44: 401 – 407, 1992.

Gilad, V.H., Tetzlaff, W.G., Rabey, J.M., Gilad, G.M. Accelerated recovery following polyamines and aminoguanidine treatment after facial nerve injury in rats. **Brain Res.** 724: 141 – 144, 1996.

Gilad, G.M., Gilad, V.H. Novel polyamine derivatives as neuroprotective agents. **J Pharmacol Exp Ther.** 291: 39 – 43, 1999.

Giménez-Llort, L., Ferré, S., de Vera, N., Martínez, E. Motor depressant effects of systemically administered polyamines in mice: involvement of central NMDA receptors. **Eur J Pharmacol.** 318: 231 – 238, 1996.

Grilo, M.A. Metabolism and function of polyamines. **Int J Biochem Cell Biol.** 17: 943 – 948, 1985.

Guerra, G.P., Mello, C.F., Sauzem, P.D., Berlese, D.B., Furian, A.F., Taberelli, Z., Rubin, M.A. Nitric oxide is involved in the memory facilitation induced by spermidine in rats. **Psychopharmacology.** 186: 150 – 158, 2006.

Gugliucci, A., Menini, T. The polyamines spermine and spermidine protect proteins from structural and functional damage by AGE precursors: a new role for old molecules? **Life Sci.** 72: 2603 – 2616, 2003.

Gugliucci, A. Polyamines as clinical laboratory tools. **Clin Chim Acta.** 344:23 – 35, 2004.

Guidetti, P., Luthi-Carter, R.E., Augood, S.J., Schwarcz, R. Neostriatal and cortical quinolinate levels are increased in early grade Huntington's disease. **Neurobiol Dis.** 17: 455 – 461, 2004.

Guidetti, P., Bates, G.P., Graham, R.K., Hayden, M.R., Leavitt, B.R., MacDonald, M.E., Slow, E.J., Wheeler, V.C., Woodman, B., Schwarcz, R. Elevated brain 3-hydroxykynurenine and quinolinate levels in Huntington disease mice. **Neurobiol Dis.** 23: 190 – 197, 2006.

Ha, H.C., Woster, P.M., Yager, J.D., Casero Jr., R.A. The role polyamines catabolism in polyamine analogue-induced programmed cell death. **Proc Natl Acad Sci USA.** 94: 11557 – 11562, 1997.

Ha, H.C., Sirisoma, N.S., Kuppisamy, P., Zweier, J.L., Woster, P.M., Casero Jr., R.A. The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. **Proc Natl Acad Sci USA.** 95: 11140 – 11145, 1998.

Hall, E.D., Braugher, J.M. Role of lipid peroxidation in post-traumatic spinal cord degeneration: a review. **CNS Trauma**. 3: 281 – 294, 1986.

Harman, R.J., Shaw, G.G. The spontaneous and evoked release of spermine from rat brain in vitro. **Br J Pharmacol**. 73: 165 – 174, 1981a.

Harman, R.J., Shaw, G.G. High-affinity uptake of spermine by slices of rat cerebral cortex. **J Neurochem**. 36: 1609 – 1615, 1981b.

He, J., Yang, Y., Yu, Y., Li, X., Li, X.M. The effects of chronic administration of quetiapine on the methamphetamine-induced recognition memory impairment and dopaminergic terminal deficit in rats. **Behav Brain Res**. 172: 39 – 45, 2006.

Izquierdo, I, da Cunha, C., Rosat, R., Jerusalinsky, D., Ferreira, M.B., Medina, J.H. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. **Behav Neural Biol**. 58: 16 – 26, 1992.

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

Jänne, J., Alhonen, L., Leinonen, P. Polyamines: from molecular biology to clinical applications. **Ann Med.** 23: 241 – 259, 1991.

Joel, D., Ayalon, L., Tarrasch, L., Weiner, I. Deficits induced by quinolinic acid lesion to the striatum in a position discrimination and reversal task are ameliorated by permanent and temporary lesion to the globus pallidus: a potential novel treatment in a rat model of Huntington's disease. **Mov Disord.** 18: 1499 – 1507, 2003.

Johnson, T.D. Modulation of channel function by polyamines. **Trends Pharmacol Sci.** 17: 22 – 27, 1996.

Kendall, A.L., David, F., Rayment, G., Torres, E.M., Annett, L.E., Dunnett, S.B. The influence of excitotoxic basal ganglia lesions on motor performance in the common marmoset. **Brain.** 123: 1442 – 1458, 2000.

Khan, A., Mei, Y., Wilson, T. A proposed function for spermine and spermidine: protection of replicating DNA against damage by oxygen singlet. **Proc Natl Acad Sci USA.** 89: 11426 – 11427, 1992a.

Khan, A., Mascio, P., Medeiros, M., Wilson, T. Spermine and spermidine protection of plasmid DNA against single-strand breaks induced by singlet oxygen. **Proc Natl Acad Sci USA.** 89: 11428 – 11430, 1992b.

Kishi, A., Ohno, M., Watanabe, S. Spermidine, a polyamine site agonist, attenuates working memory deficits caused by blockade of hippocampal muscarinic receptors and mGluRs in rats. **Brain Res.** 793: 311 – 314, 1998a.

Kishi, A., Ohno, M., Watanabe, S. Concurrent activation of hippocampal glycine and polyamine sites of the N-methyl-D-aspartate receptor synergistically reverses working memory deficits in rats. **Neurosci Lett.** 257: 131 – 134, 1998b.

Kitada, M., Igarashi, K., Hirose, S., Kitagawa, H. Inhibition by polyamines of lipid peroxide formation in rat liver microsomes. **Biochem Biophys Res Commun.** 87: 388 – 394, 1979.

Küppenbender, K.D., Albers, D.S., Iadarola, M.J., Landwehrmeyer, G.B., Standaert, D.G. Localization of alternatively spliced NMDAR1 glutamate receptor isoforms in rat striatal neurons. **J Comp Neurol.** 415: 204 – 217, 1999.

Landwehrmeyer, G.B., Standaert, D.G., Testa, C.M., Penney Jr, J.B., Young A.B. NMDA receptor subunit mRNA expression by projection neurons and interneurons in rat striatum. **J Neurosci.** 15: 5297 – 5307, 1995.

Lang, C.J., Majer, M., Balan, P. Recall and recognition in Huntington's Disease. **Arch Clin Neuropsychol.** 15: 361 – 371, 2000.

Lawrence, A.D., Sahakian, B.J., Robbins, T.W. Cognitive functions and corticostriatal circuits: insights from Huntington's disease. **Trends Cogn Sci.** 2: 379 – 388, 1998.

Lawrence, A.D., Sahakian, B.J., Rogers, R.D., Hodge, J.R., Robbins, T.W. Discrimination, reversal, and shift learning in Huntington's disease: mechanisms of impaired response selection. **Neuropsychologia.** 37: 1359 – 1374, 1999.

Lawrence, A.D., Watkins, L.H.A., Sahakian, B.J., Hodges, J.R., Robbins, T.W.. Visual object and visuospatial cognition in Huntington's disease: implications for information processing in corticostriatal circuits. **Brain.** 123: 1349 – 1364, 2000.

Legendre-Guillemain, V., Metzler, M., Charbonneau, M., Gan, L., Chopra, V., Philie, J., Hayden, M.R., McPherson, P.S. HIP1 and HIP12 display differential binding to F-actin, AP2, and clathrin. Identification of a novel interaction with clathrin light chain. **J Biol Chem.** 277: 19897 – 19904, 2002.

Lima, M.N. de, Laranja, D.C., Bromberg, E., Roesler, R., Schröder, N. Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. **Behav Brain Res.** 156: 139 – 143.

Lovaas, E., Carlin, G. Spermine: an anti-oxidant and anti-inflammatory agent. **Free Radic Biol Med.** 11: 455 – 461, 1991.

Loovas, E. Antioxidative and metal-chelating effects of polyamines. **Adv Pharmacol.** 38: 119 – 149, 1997.

Maciver, C.R., Bednar, D.L., Karbon, E.W. Opposite effects of spermine and arcaine on responses of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. **Neurosci Lett.** 132: 146 – 150, 1991.

Marvizón, J.C., Baudry, M. [3H]dizocilpine association kinetics distinguish stimulatory and inhibitory polyamine sites of N-methyl-D-aspartate receptors. **J Neurochem.** 63: 963 – 971, 1994.

McLin, J.P., Thompson, L.M., Steward, O. Differential susceptibility to striatal neurodegeneration induced by quinolinic acid and kainate in inbred, outbred and hybrid mouse strains. **Eur J Neurosci.** 24: 3134 – 3140, 2006.

Meldrum, B., Evans, M., Griffiths, T., Simon, R. Ischaemic brain damage: the role of excitatory activity and of calcium entry. **Br J Anaesth.** 57: 44 – 46, 1985.

Metzler, M., Legendre-Guillemain, V., Gan, L., Chopra, V., Kwok, A., McPherson, P.S., Hayden, M.R. HIP1 functions in clathrin-mediated endocytosis through binding to clathrin and adaptor protein 2. **J Biol Chem.** 276: 39271 – 39276, 2001.

Meyer, R.C., Knox, J., Purwin, D.A., Spangler, E.L., Ingram, D.K. Combined stimulation of the glycine and polyamine sites of the NMDA receptor attenuates NMDA blockade-induced learning deficits of rats in a 14-unit T-maze. **Psychopharmacology**. 135: 290 – 295, 1998.

Mikokajczak, P., Okulicz-Kozaryn, I., Polanska, A., Szczawinska, K., Bobkiewicz-Kozłowska, T. Effect of multiple ifenprodil or spermidine treatment on social recognition in rats. **J Basic Clin Physiol Pharmacol**. 13: 61 – 67, 2002a.

Mikokajczak, P., Okulicz-Kozaryn, I., Kaminska, E., Niedopad, L., Polanska, A., Gebka, J. Effects of acamprosate and some polyamine site ligands of NMDA receptor on short-term memory in rats. **Eur J Pharmacol**. 444: 83 – 96, 2002b.

Misztal, M., Frankiewicz, T., Parsons, C.G., Danysz, W. Learning deficits induced by chronic intraventricular infusion of quinolinic acid--protection by MK-801 and memantine. **Eur J Pharmacol**. 296: 1 – 8, 1996.

Morris, R.G., Anderson, E., Lynch, G.S., Baudry, M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. **Nature**. 319: 774 – 776, 1986.

Nakai, M., Qin, Z.H., Wang, Y., Chase, T.N. Free radical scavenger OPC-14117 attenuates quinolinic acid-induced NF-kappaB activation and apoptosis in rat striatum. **Brain Res Mol Brain Res.** 64: 59 – 68, 1999.

Nakao, N., Brundin, P. Effects of alpha-phenyl-tert-butyl nitron on neuronal survival and motor function following intrastriatal injections of quinolinate or 3-nitropropionic acid. **Neuroscience.** 76: 749 – 761, 1997.

Otsuki, M., Davidson, M., Goodenough, S., Wilce, P.A., Tase, C., Matsumoto, I. In vivo pharmacological study of spermine-induced neurotoxicity. **Neurosci Lett.** 196: 81 – 84, 1995.

Ozawa, S., Kamiya, H., Tsuzuki, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog Neurobiol.** 54: 581 – 618, 1998.

Packard, M.G., Hirsh, R., White, N.M. Differential effects of fornix and caudate nucleus lesions on two radial maze tasks: evidence for multiple memory systems. **J Neurosci.** 9: 1465 – 1472, 1989.

Packard, M.G., McGaugh, J.L. Double dissociation of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: further evidence for multiple memory systems. **Behav Neurosci.** 106: 439 – 446, 1992.

Packard, M.G, Vecchioli, S.F., Schroeder, J.P., Gasbarri, A. Task-dependent role for dorsal striatum metabotropic glutamate receptors in memory. **Learn Mem.** 8: 96 – 103, 2001.

Paoletti, P., Neyton, J. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. **Curr Opin Pharmacol.** 7: 39 – 47, 2007.

Popoli, P., Pèzzola, A., Domenici, M.R., Sagratella, S., Diana, G., Caporali, M.G., Bronzetti, E., Vega, J., Scotti de Carolis, A. Behavioral and electrophysiological correlates of the quinolinic acid rat model of Huntington's disease in rats. **Brain Res Bull.** 35: 329 – 335, 1994.

Popoli, P., Pintor, A., Domenici, M.R., Frank, C., Tebano, M.T., Pèzzola, A., Scarchilli, L., Quarta, D., Reggio, R., Malchiodi-Albedi, F., Falchi, M., Massotti, M. Blockade of striatal adenosine A2A receptor reduces, through a presynaptic mechanism, quinolinic acid-induced excitotoxicity: possible relevance to neuroprotective interventions in neurodegenerative diseases of the striatum. **J Neurosci.** 22: 1967 – 1975, 2002.

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

Reynolds, I.J. Arcaine is a competitive antagonist of the polyamine site on the NMDA receptor. **Eur J Pharmacol.** 177: 215 – 216, 1990.

Ribeiro, C.A., Grando, V., Dutra Filho, C.S., Wannmacher, C.M., Wajner, M. Evidence that quinolinic acid severely impairs energy metabolism through activation of NMDA receptors in striatum from developing rats. **J Neurochem.** 99: 1531 – 1542, 2006.

Ridet, J.L., Malhotra, S.K., Privat, A., Gage, F.H. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. **Trends Neurosci.** 20: 570 – 577, 1997.

Rock, D.M., Macdonald, R.L. Spermine and related polyamines produce a voltage-dependent reduction of N-methyl-D-aspartate receptor single-channel conductance. **Mol Pharmacol.** 42: 157 – 164, 1992.

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

Roesler, R., Vianna, M.R., De-Paris, F., Quevedo, J., Walz, R., Bianchin, M. Infusions of AP5 into the basolateral amygdala impair the formation, but not the expression, of step-down inhibitory avoidance. **Braz J Med Biol Res.** 33: 829 – 834, 2000.

Roesler, R., Vianna, M.R., Schröder, N., Ferreira, M.B., Quevedo, J. Aversive learning under different training conditions: effects of NMDA receptor blockade in area CA1 of the hippocampus. **Neurochem Res.** 31: 679 – 683, 2006.

Romano, C., Williams, K., Molinoff, P.B. Polyamines modulate the binding of [³H]MK-801 to the solubilized N-methyl-D-aspartate receptor. **J Neurochem.** 57: 811 – 818, 1991.

Rossato, J.I., Zeni, G., Mello, C.F., Rubin, M.A., Rocha, J.B. Ebsele blocks the quinolinic acid-induced production of thiobarbituric acid reactive species but does not prevent the behavioral alterations produced by intra-striatal quinolinic acid administration in the rat. **Neurosci Lett.** 318: 137 – 140, 2002.

Rubin, M.A., Jurach, A., Zanolla, G.R., Boemo, R.L., Souza, D.O., Mello, C.F. Intrahippocampal GMP administration improves inhibitory avoidance performance through GABAergic and glutamatergic mechanisms in rats. **Neuroreport.** 8: 3713 – 3716, 1997.

Rubin, M.A., Boemo, R.L., Jurach, A., Rojas, D.B., Zanolla, G.R., Obregon, A.D., Souza, D.O., and Mello, C.F. Intrahippocampal spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. **Behav Pharmacol.** 11: 57 – 61, 2000.

Rubin, M.A., Stiegemeier, J.A., Volkwes, M.A, Oliveira, D.M., Fenili, A.C., Boemo, R.L., Jurach, A., and Mello, C.F. Intra-amygdala spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. **Eur J Pharmacol.** 423: 35 – 39, 2001.

Rubin, M.A., Berlese, D.B., Stiegemeier, J.A., Volkweis, M.A., Oliveira, D.M., dos Santos, T.L.B, Fenili, A.C., and Mello, C.F. Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats. **J Neurosci.** 24: 2328 – 2334, 2004.

Ryu, J.K., Kim, S.U., McLarnon, J.G. Blockade of quinolinic acid-induced neurotoxicity by pyruvate is associated with inhibition of glial activation in a model of Huntington's disease. **Exp Neurol.** 187: 150 – 159, 2004.

Ryu, J.K., McLarnon, J.G. VEGF receptor antagonist Cyclo-VEGI reduces inflammatory reactivity and vascular leakiness and is neuroprotective against acute excitotoxic striatal insult. **J Neuroinflammation.** 5: 18, 2008.

Sacaan, A.I., Johnson, K.M. Characterization of the stimulatory and inhibitory effects of polyamines on [³H] N-(1-[thienyl]cyclohexyl) piperidine binding to the N-methyl-D-aspartate receptor ionophore complex. **Mol Pharmacol.** 37: 572 – 577, 1990.

Santamaría, A., Rios, C. MK-801, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum. **Neurosci Lett.** 159: 51 – 54, 1993.

Sargolini, F., Roullet, P., Oliverio, A., Mele, A. Effects of intra-accumbens focal administrations of glutamate antagonists on object recognition memory in mice. **Behav Brain Res.** 138: 153 – 163, 2003.

Scatton, B., Frost, J., George, P., Carter, C., Benavides, J. Present developments in NMDA receptor antagonists against cerebral ischaemia. **Curr Opin Ther Pathol.** 4: 523 – 545, 1991.

Scatton, B. The NMDA receptor complex. **Fundam Clin Pharmacol.** 7: 389 – 400, 1993.

Scattoni, M.L., Valanzano, A., Popoli, P., Pezzola, A., Reggio, R., Calamandrei, G. Progressive behavioral changes in the spatial open-field in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease. **Behav Brain Res.** 152: 375 – 383, 2004.

Schwarcz, R., Whetsell, W.O. Jr, Mangano, R.M. Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. **Science.** 219: 318 – 318, 1983.

Schwarcz, R., Foster, A.C., French, E.D., Whetsell, W.O. Jr., Köhler, C. Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. **Life Sci.** 35: 19 – 32, 1984.

Schwarcz, R., Albin, R.L. Huntington's disease. In: Lodge, D., Danysz, W., Parsons, C.G. (Eds.), *Ionotropic Glutamate Receptors as Therapeutic Targets*. Graham Publishing Co., TN, pp. 587 – 610, 2002.

Schwarcz, R., Pellicciari, R. Manipulation of brain kynurenes: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. **J Pharmacol Exp Ther.** 303: 1 – 10, 2002.

Seiler, N. Polyamine metabolism. **Digestion.** 2: 319 – 330, 1990.

Seiler, N. Pharmacological properties of the natural polyamines and their depletion by biosynthesis inhibitors as a therapeutic approach. **Prog Drug Res.** 37: 107 – 159, 1991.

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

Sharma, T.A., Reynolds, I.J. Complex polyamine effects on [³H]MDL 105,519 binding to the NMDA receptor glycine site. **Neurochem Int.** 33: 155 – 159, 1998.

Shaw, G.G., Pateman, A.J. The regional distribution of the polyamine spermidine and spermine in brain. **J Neurochem.** 20: 1225 – 1230, 1973.

Shear, D.A., Dong, J., Haik-Creguer, K.L., Bazzett, T.J., Albin, R.L., Dunbar, G.L. Chronic administration of quinolinic acid in the rat striatum causes spatial learning deficits in a radial arm water maze task. **Exp Neurol.** 150: 305 – 311, 1998a.

Shear, D.A., Dong, J., Gundy, C.D., Haik-Creguer, K.L., Dunbar, G.L. Comparison of intrastriatal injections of quinolinic acid and 3-nitropropionic acid for use in animal models of Huntington's disease. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiat.** 22: 1217 – 1240, 1998b.

Shimada, A., Spangler, E.L., London, E.D., Ingram, D.K. Spermidine potentiates dizocilpine-induced impairment of learning performance by rats in a 14-unit T-maze. **Eur J Pharmacol.** 263: 293 – 300, 1994.

Shirhan, M.D., Moochhala, S.M., Ng, P.Y., Lu, J., Ng, K.C., Teo, A.L., Yap, E., Ng, I., Hwang, P., Lim, T., Sitoh, Y.Y., Rumpel, H., Jose, R., Ling, E. Spermine reduces infarction and neurological deficit following a rat model of middle cerebral artery occlusion: a magnetic resonance imaging study. **Neuroscience.** 124: 299 – 304, 2004.

Singh, L., Oles, R., Woodruff, G. In vivo interaction of a polyamine with the NMDA receptor. **Eur J Pharmacol.** 180: 391 – 392, 1990.

Sorolla, M.A., Reverter-Branchat, G., Tamarit, J., Ferrer, I., Ros, J., Cabiscol, E. Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease. **Free Radic Biol Med.** 45: 667 – 678, 2008.

Stecher, J., Müller, W.E., Hoyer, S. Learning abilities depend on NMDA-receptor density in hippocampus in adult rats. **J Neural Transm.** 104: 281 – 289, 1997.

Steele, J.E., Bowen, D.M., Francis, P.T., Green, A.R., Cross, A.J. Spermidine enhancement of [³H]MK-801 binding to the NMDA receptor complex in human cortical membranes. **Eur J Pharmacol.** 189: 195 – 200, 1990.

Stone, T.W., Perkins, M.N. Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS. **Eur J Pharmacol.** 72: 411 – 412, 1981.

Tabor, C.W., Tabor, H. Polyamines. **Annu Rev Biochem.** 53: 749 – 790, 1984.

Tadolini, B. Polyamine inhibition of lipoperoxidation – The influence of polyamines on iron oxidation in the presence of compounds mimicking phospholipid polar heads. **Biochem J.** 249: 33 – 36, 1988.

Takano, K., Nakamura, Y., Yoneda, Y. Microglial cell death induced by a low concentration of polyamines. **Neuroscience**. 120: 961 – 967.

Takano, K., Ogura, M., Yoneda, Y., Nakamura, Y. Oxidative metabolites are involved in polyamine-induced microglial cell death. **Neuroscience**. 134: 1123 – 1131, 2005.

Tang, Y.P., Shimizu, E., Dube, G.R., Rampon, C., Kerchner, G.A., Zhuo, M., Liu, G., Tsien, J.Z. Genetic enhancement of learning and memory in mice. **Nature**. 401: 63 – 69, 1999.

Teti, D., Visalli, M., McNair, H. Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**. 781: 107 – 149, 2002.

Trueman, R.C., Brooks, S.P., Dunnett, S.B. Implicit learning in a serial choice visual discrimination task in the operant 9-hole box by intact and striatal lesioned mice. **Behav Brain Res**. 159: 313 – 322, 2005.

Ulas, J., Brunner, L.C., Geddes, J.W., Choe, W., Cotman C.W. N-methyl-D-aspartate receptor complex in the hippocampus of elderly, normal individuals and those with Alzheimer's disease. **Neuroscience**. 49: 45 – 61, 1992.

Vazey, E.M., Chen, K., Hughes, S.M., Connor, B. Transplanted adult neural progenitor cells survive, differentiate and reduce motor function impairment in a rodent model of Huntington's disease. **Exp Neurol.** 199: 384 – 396, 2006.

Vécsei, L., Beal, M.F. Comparative behavioral and neurochemical studies with striatal kainic acid- or quinolinic acid-lesioned rats. **Pharmacol Biochem Behav.** 39: 473 – 478, 1991.

Williams, K., Romano, C., Molinoff, P.B. Effects of polyamines on the binding of [³H]MK-801 to the N-methyl-D-aspartate receptor: pharmacological evidence for the existence of a polyamine recognition site. **Mol Pharmacol.** 36: 575 – 581, 1989.

Williams, K., Romano, C., Dichter, M.A., Molinoff, P.B. Modulation of the NMDA receptor by polyamines. **Life Sci.** 48: 469 – 498, 1991.

Williams, K. Interactions of polyamines with ion channels. **Biochem J.** 325: 289 – 297, 1997.

Worthen, D.R., Gibson, D.A., Rogers, D.T., Bence, A.K., Fu, M., Littleton, J.M., Crooks, P.A. Endogenous indoles as novel polyamine site ligands at the N-methyl-D-aspartate receptor complex. **Brain Res.** 890: 343 – 346, 2001.

Yoneda Y., Ogita, K., Enomoto, R. Characterization of spermidine-dependent [³H](+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine (MK-801) binding in brain synaptic membranes treated with Triton X-100. **J Pharmacol Exp Ther.** 256: 1161 – 1172, 1991.

Yoneda, Y., Ogita, K. Novel fourth binding sites of [³H]spermidine within the NMDA receptor complex. **Adv Exp Med Biol.** 287: 455 – 475, 1991.

Young, A.B., Greenamyre, J.T., Hollingsworth, Z., Albin, R., D'amato, C., Shoulson, I., Penney, J.B. NMDA receptor losses in putamen from patients with Huntington's disease. **Science.** 241: 981 – 983, 1988.

Xu, S.J., Chen, Z., Zhu, L.J., Shen, H.Q., Luo, J.H. Visual recognition memory is related to basic expression level of NMDA receptor NR1/NR2B subtype in hippocampus and striatum of rats. **Acta Pharmacol Sin.** 26: 177 – 180, 2005.

Zeron, M. M., Hansson, O., Chen, N., Wellington, C.L., Leavitt, B.R., Brundin, P., Hayden, M.R., Raymond, L.A. Increased sensitivity to N-Methyl-D-Aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. **Neuron.** 33: 849 – 860, 2002.