

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
FARMACOLOGIA

**ENVOLVIMENTO DO SISTEMA OPIÓIDE NA  
DEPENDÊNCIA DE ESTADO INDUZIDA PELA  
ARCAÍNA EM RATOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Raquele Kipper Mariani**

**Santa Maria, 02 de Março de 2011**

# **ENVOLVIMENTO DO SISTEMA OPIÓIDE NA DEPENDÊNCIA DE ESTADO INDUZIDA PELA ARCAÍNA EM RATOS**

**por**

**Raquele Kipper Mariani**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria, RS, como  
requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Farmacologia**

**Orientador: Maribel Antonello Rubin**

**Santa Maria, 02 de Março de 2011**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
FARMACOLOGIA

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação  
de Mestrado

**ENVOLVIMENTO DO SISTEMA OPIÓIDE NA DEPENDÊNCIA DE  
ESTADO INDUZIDA PELA ARCAÍNA EM RATOS**

Elaborada por

**Raquele Kipper Mariani**

Como requisito parcial para obtenção do grau de

**Mestre em Farmacologia**

**Comissão Examiadora**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maribel Antonello Rubin (UFSM)**

Presidente/Orientadora

---

**Prof. Dr. Claudio da Cunha (UFPR)**

---

**Profa. Dra. Maria Ester Pereira (UFSM)**

**Santa Maria, 02 de Março de 2011**

*Sirlei (minha mãe), Italo (meu pai)  
e Alãn (meu irmão)*

## **AGRADECIMENTOS**

Sem vocês eu não teria conseguido:

Agradeço aos meus pais Sirlei e Italo Mariani, pelo apoio, incentivo, paciência, carinho, e o amor, pois sem o amor deles eu nada seria.

À professora Maribel Rubin, por sua orientação, pelos ensinamentos, pela paciência, por não ter desistido de mim e principalmente pela oportunidade de estar concluindo esta etapa tão importante de minha vida.

Agradeço também ao professor Carlos Fernando Mello, sempre prestativo e disposto a ajudar desde a discussão do artigo até a carta do revisor.

A Michelle Melgarejo da Rosa, sempre dedicada e disposta a ajudar nos experimentos, meu braço direito, desde o primeiro dia que entrei no laboratório.

Aos colegas de laboratório que de alguma forma ou de outra me ajudaram nesta conquista.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro, permitindo uma melhor execução deste trabalho.

*“A mente que se abre a uma nova idéia  
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
Universidade Federal de Santa Maria

### ENVOLVIMENTO DO SISTEMA OPIÓIDE NA DEPENDÊNCIA DE ESTADO INDUZIDA PELA ARCAÍNA EM RATOS

Autora: RAQUELE KIPPER MARIANI

Orientadora: MARIBEL ANTONELLO RUBIN

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 02 de Março de 2011

A arcaína é um antagonista do sítio de ligação das poliaminas no receptor NMDA, a qual induz dependência de estado. No entanto, nenhum estudo abordou o envolvimento de outros neurotransmissores/neuromoduladores na dependência de estado induzida pela arcaína. No presente estudo, investigamos se o sistema opióide está envolvido na dependência de estado induzida pela arcaína na tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA (IA) em ratos. A administração sistêmica de arcaína (30 mg/kg, i.p) ou morfina (5 mg/kg, i.p) zero, 3, 6 ou 9 horas pós-treino, reduziu a latência de descida da plataforma no dia do teste. A injeção de arcaína (30 mg/kg, i.p) ou morfina (5 mg/kg, i.p) 30 minutos antes do teste, reverteu o déficit de desempenho induzido pela administração de arcaína ou morfina zero, 3 ou 6, mas não 9 horas pós-treino. A reversão da piora da memória induzida pela arcaína foi totalmente transferida para a morfina, e vice-versa. A associação de baixas doses de arcaína e morfina (10 e 1,5 mg/kg, respectivamente), que individualmente não pioraram a memória, induziram dependência de estado. A naloxona (2 mg/kg, 3 min pós-treino, ou 1 mg/kg uma hora pré-teste, i.p), reverteu a amnésia e a dependência de estado induzida pela arcaína e morfina. Esses resultados sugerem que a dependência de estado induzida pela arcaína envolve o sistema opióide.

**Palavras-chave:** arcaína, poliamina, morfina, dependência de estado, sistema opióide, memória.

## **ABSTRACT**

Dissertation of Master's degree  
Graduation program in Pharmacology  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### **Arcaine-induced state-dependent memory involves opioid mechanisms in rats**

AUTHOR: RAQUELE KIPPER MARIANI

ADVISOR: MARIBEL ANTONELLO RUBIN

Date and defense place: Santa Maria, March, 2<sup>th</sup> 2011

Arcaine is a competitive antagonist of the polyamine binding site at the NMDA receptor which induces state-dependent recall. However, no study has addressed the involvement of other neurotransmitter/neuromodulators in arcaine-induced state dependency. The current study investigates whether the opioid system is involved in arcaine-induced state-dependent memory retrieval of the inhibitory avoidance task (IA) in rats. The systemic administration of arcaine (30 mg/kg, i.p.) or morphine (5 mg/kg, i.p.) zero, 3, 6 or 9 hours post-training, reduced step-down latencies at testing. Arcaine (30 mg/kg, i.p.) or morphine (5 mg/kg, i.p.) injection 30 min before testing reversed the performance deficit induced by administration of arcaine or morphine zero, 3 or 6, but not 9 hours post-training. The reversal of arcaine-induced impairment of IA performance was completely transferred to morphine, and vice-versa. The association of low and ineffective doses of morphine and arcaine (10 and 1.5 mg/kg, respectively) were additive and caused state-dependency. Naloxone (2 mg/kg, 3 min post-training, or 1 mg/kg, 1 hour pre-test, i.p.), reversed the amnesia and the state dependency induced by morphine and arcaine. These results suggest that state dependency induced by arcaine involves the opioid system.

**Keywords:** Arcaine, polyamines, morphine, state dependency, opioid system, memory.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
AMPA	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
AP5	Ácido D-2-amino-5-fosfonopentanóico
ARC	Arcaína
CaMKII	Proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina do tipo II
CREB	Proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc
dcSAM	S-Adenosilmetionina descarboxilase
DFMO	$\alpha$ -Difluorometilornitina
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
KN-62	(1-[N,O-bis(5-isoquinolinasulfonil)-N-metil-L-tirosil]-4-fenilpiperazina
L-NAME	N <sup>G</sup> -Nitro-L-arginina-metil éster
LTP	Potencialização de longa duração
mRGLU	Receptor glutamatérgico metabotrópico
MAPK	Proteína ativada por mitogênio
MAT	Metionina adenosiltransferase
MK-801	(+)-5-Metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,b]-ciclohepteno-5-10-amino
NOS	Oxido nítrico sintase
ODC	L-Ornitina descarboxilase
PAF	Fator de agregação plaquetária
PAO	Poliamina oxidase
PCP	Fenciclidina
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PKG	Proteína quinase dependente de GMPc
PKC	Proteína quinase dependente de cálcio
rNMDA	Receptor <i>N</i> -Metil-D-aspartato
SAM	S-Adenosil-metionina
SAMDC	S-Adenosil-metionina descarboxilase
SNC	Sistema Nervoso Central
SPD	Espermidina
SSAT	Espermidina/espermina N <sup>1</sup> acetil-transferase

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão Bibliográfica

Figura 1- Cascata de eventos que ocorrem na formação da memória.....	26
Figura 2- Representação esquemática do receptor NMDA.....	29
Figura 3- Estrutura química das poliaminas.....	30
Figura 4- Estrutura da Arcaína .....	31
Figura 5- Metabolismo das poliaminas.....	34
Figura 6- Equema de ações modulatórias da espermina sobre o receptor NMDA.....	36
Figura 7- Representação esquemática do mecanismo de ação da morfina sobre o receptor $\mu$ -opióide.....	45

### Artigo

Fig. 1. Effect of arcaine (30 mg/kg) zero (A), 3 (B), 6 (C) and 9 hours (D) after training and 30 min before testing on step-down latencies at testing.....	52
Fig. 2. Effect of the intraperitoneal administration of morphine (5 mg/kg) or vehicle zero (A), 3 hours (B), 6 hours (C), and 9 hours (D) after training and 30 min before testing on step-down latencies at testing.....	52
Fig. 3 Transfer of arcaine induced state dependency to morphine.....	53
Fig. 4 Effect of naloxone (a nonselective opioid antagonist) on morphine-induced state dependency.....	53
Fig. 5 Effect of naloxone on arcaine-induced state Dependency.....	54
Fig. 6 Association of low, non-effective doses of arcaine and morphine causes state dependency.....	54

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	V
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
APRESENTAÇÃO.....	XII
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1 Memória.....	20
3.2 Mecanismos de Memória.....	22
3.3 Receptor <i>N</i> -metil-D-aspartato (NMDA).....	26
3.4 Poliaminas.....	29
3.5 Arcaína.....	31
3.6 Metabolismo das poliaminas.....	32
3.7 Poliaminas e receptor NMDA.....	35
3.8 Poliaminas, receptor NMDA e memória.....	36
3.9 Dependência de Estado.....	38
3.9.1 Sistema opióide e memória.....	42
3.9.2 Esquiva inibitória.....	46
4. RESULTADOS.....	48
4.1. ARTIGO.....	49
5. DISCUSSÃO.....	59
6. CONCLUSÃO.....	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
8. ANEXOS.....	76
8.1 Anexo 1 Material Suplementar do manuscrito.....	76
8.2 Anexo 2 carta do principal editor referente a primeira submissão ao periódico <i>Psychopharmacology</i> .....	82
8.3 Anexo 3 carta do principal editor referente a segunda submissão ao periódico <i>Psychopharmacology</i> .....	93

## APRESENTAÇÃO

Na introdução está descrita uma breve abordagem geral sobre os temas abordados nesta dissertação. A revisão bibliográfica apresenta uma revisão sucinta sobre os temas trabalhados nesta dissertação. As seções discussão e conclusão, encontradas ao fim desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre a mesma. As referências bibliográficas encontradas ao final desta dissertação referem-se somente as citações que aparecem na introdução, revisão bibliográfica e discussão.

Os resultados que fazem parte dessa dissertação estão apresentados sob forma de artigo publicado no periódico *Psychopharmacology*. As seções introdução, materiais e métodos, resultados, discussão e referências bibliográficas encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo. Em anexo encontram-se o material suplementar do manuscrito bem como as cartas dos revisores do manuscrito.

## **1. INTRODUÇÃO**

---

## **1. Introdução**

As poliaminas endógenas (putrescina, espermidina e espermina) estão presentes em altas concentrações no sistema nervoso central e por sua natureza policatiônica podem interagir com diversos alvos intracelulares, incluindo enzimas e ácidos nucleicos, e exercer ações complexas em uma variedade de canais iônicos (Scott et al. 1993). As poliaminas também têm sido implicadas na plasticidade em eventos tais como a modulação do aprendizado e a memória interagindo com receptores glutamatérgicos do tipo AMPA (Pellegrini-Giampietro 2003) e com o receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato (NMDA) (Ransom and Stec 1988; Rock and Macdonald 1995; Williams 1997 a; Williams et al. 1991). Várias evidências indicam que muitos dos efeitos biológicos das poliaminas são devidos á modulação do receptor NMDA (Wallace 2009).

A administração sistêmica, intra-hipocampal e intra-amígdala de espermidina melhora a memória em tarefas distintas (Camera et al. 2007; Guerra et al. 2006; Rubin et al. 2004; 2000; 2001; Shimada et al. 1994) e facilita a extinção da memória (Gomes et al. 2010). Além disso, a administração intraestriatal de espermina reverte o prejuízo de memória induzido pelo ácido quinolínico em uma tarefa de reconhecimento de objeto (Velloso et al. 2009).

O efeito facilitatório das poliaminas sobre a memória parece depender da ativação do receptor NMDA e da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (Camera et al. 2007; Guerra et al. 2006; Rubin et al. 2001). É também notável que os efeitos facilitatórios da espermidina sobre a memória são revertidos por

baixas doses de arcaína, um antagonista competitivo do sítio de ligação das poliaminas na subunidade NR2B do receptor NMDA, sugerindo que o receptor NMDA está envolvido na melhora da memória induzida por espermidina (Rubin et al. 2000). Seguindo a mesma visão, o antagonista não-competitivo do receptor NMDA, o MK-801, reverte o efeito facilitador da espermidina sobre a memória do medo (Camera et al. 2007) e a administração sistêmica e intra-amígdala de arcaína piora a memória dos animais na tarefa de esquivas inibitória (Rubin et al. 2000) e medo condicionado (Rubin et al. 2004), sugerindo que exista um tônus poliaminérgico endógeno que fisiologicamente modula o processamento da memória nesta estrutura. É particularmente interessante que os efeitos facilitadores da espermidina sobre a memória são antagonizados por arcaína, traxoprodil e ifenprodil, antagonistas da subunidade NR2B do receptor NMDA, em doses muito baixas (Gomes et al. 2010; Rubin et al. 2004; 2000; 2001). Tal achado sugere que o receptor NMDA está envolvido na melhora da memória induzida pela espermidina.

Estudo realizado por Ceretta e colaboradores (2008), demonstrou que a administração pós-treino de arcaína causa amnésia, e que este efeito amnésico é revertido pela administração de arcaína pré-teste, caracterizando dependência de estado da arcaína. Além disso, a dependência de estado para a arcaína pode ser transferida para o MK-801 e vice-versa, reforçando o envolvimento do receptor NMDA nos efeitos da arcaína. Tais achados sugerem que, fisiologicamente, o estado de ativação do receptor NMDA pode se constituir em um marcador contextual da memória. Dependência de estado é dito quando uma informação que foi aprendida enquanto o animal está sob a

influência de uma determinada droga, pode ser recordada apenas quando este animal estiver sob o mesmo contexto e estado fisiológico no qual a informação foi adquirida pela primeira vez (Darbandi et al. 2008; Khajehpour et al. 2008; Rezayof et al. 2008).

Há muito se sabe que a aprendizagem e a memória são afetadas por opióides. Assim, a administração pré ou pós-treino de morfina, um agonista opióide, prejudica a memória em diferentes paradigmas, inclusive de esquiva inibitória (Ahmadi et al. 2007; Rezayof et al. 2006). Enquanto a administração pré-teste de morfina reverte o prejuízo da memória induzido pela administração pré ou pós-treino da droga, caracterizando dependência de estado da morfina (Khalilzadeh et al. 2006; Zarrindast et al. 2006a; 2006b). O envolvimento de receptores  $\mu$  opióide na dependência de estado induzida por morfina tem sido sugerido, uma vez que ela é prevenida por naloxona, mas não por naltrindole (Zarrindast et al. 2004).

Uma interação entre os sistemas opióide e glutamatérgico tem sido proposta, uma vez que o antagonista de receptores NMDA, MK-801, potencializa a amnésia induzida por morfina (Cestari and Castellano 1997) e previne a dependência de estado induzida por opióides (Zarrindast et al. 2006c), sugerindo que a dependência de estado à morfina envolve receptores opióides e NMDA.

Considerando que ambos arcaína e morfina induzem dependência de estado a qual envolve o receptor NMDA, neste estudo investigou-se o possível papel dos receptores opióides na dependência de estado induzida pela arcaína na tarefa de esquiva inibitória em ratos.

## **2. OBJETIVOS**

---

## **2. Objetivos**

O objetivo geral do presente estudo foi investigar o envolvimento do sistema opióide na dependência de estado induzida pela arcaína em ratos.

Objetivos específicos

- 1- Determinar a janela de tempo em que a arcaína e a morfina induzem amnésia na tarefa de esquivar inibitória.
- 2- Determinar a janela de tempo em que a arcaína e a morfina induzem dependência de estado.
- 3- Avaliar se a arcaína e morfina apresentam dependência de estado cruzada.
- 4- Avaliar o envolvimento dos receptores opióides na dependência de estado induzida pela arcaína e morfina.
- 5- Avaliar se a arcaína e morfina em dose ineficaz apresentam efeito aditivo e dependência de estado.
- 6- Avaliar se a arcaína e morfina alteram a atividade locomotora e exploratória dos animais.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

### **3. Revisão Bibliográfica**

#### **3.1 Memória**

A memória pode ser definida como a aprendizagem, a formação, a conservação e a evocação de informações. A aquisição é também chamada de aprendizagem: só se grava aquilo que foi aprendido. A evocação é também chamada de recordação, lembrança, recuperação. Só lembramos aquilo que gravamos, aquilo que foi aprendido (Bliss and Collingridge 1993)

Segundo o Dr. Iván Izquierdo “Somos aquilo que lembramos e também somos o que decidimos esquecer”. De acordo com nossos hábitos e personalidade, podemos escolher não esquecer as ofensas e as agressões jamais, e nesse caso estaremos propensos a amargura, a paranóia ou ao ressentimento. Podemos escolher esquecer-las por completo, ou reprimi-las até que desapareçam do nosso acervo de memórias importantes, e nesse caso ficaremos muitas vezes indefesos perante a sua reiteração. Podemos também, entretanto, escolher reprimi-las ou extingui-las até que passem a ficar fora do acervo das memórias de uso diário e facilmente acessíveis, mas a nossa disposição caso se torne necessárias; por exemplo, quando for oportuno esquivar-nos ou defender-nos de novas ofensas ou agressões. Nossa mente possui os mecanismos para escolher entre essas possíveis soluções (Cammarota et al. 2005). O uso repetido de uma ou outra delas nos leva por rumos diferentes em relação a nossa personalidade; e a personalidade não é

algo que se obtém como um diploma em uma certa idade: podemos mudá-la ao longo da vida, como produto das memórias deixadas pelas experiências. O mundo está cheio de pessoas que já foram “boazinhas” e, como consequência de uma guerra, uma humilhação ou um infortúnio, se tornaram ressentidas e perigosas. E também de outras que já foram ressentidas e amarguradas e depois de um sucesso, um golpe de sorte, o amor de alguém, o amor de muitos, a realização pessoal, ou qualquer outro motivo, tornam-se tolerantes, benevolentes e de trato agradável e frutífero. As mudanças de personalidade pelo conjunto de experiências que temos são muitas vezes inconscientes e até involuntárias; outras vezes são conscientes e produto de nosso julgamento sobre o que é que mais nos convém na sociedade em que vivemos, e de nossa análise cuidadosa das características dessa sociedade. Portanto, o conjunto dessas memórias determina a personalidade e a forma de ser, de viver e de agir de cada um, e por isso somos únicos e completamente diferentes. A perda da memória leva a perda de si mesmo, a perda da história de uma vida e das interações duradouras com outros seres humanos (Izquierdo 2002).

As memórias podem ser classificadas quanto à sua natureza em memória declarativa ou explícita e não-declarativa ou implícita. A memória declarativa ou explícita é aquela memória que registra fatos e eventos que tenham ocorrido e que podemos evocar por meio de palavras com plena intervenção da consciência (recordação). É aquela memória para o nome de um amigo, as últimas férias de verão. A memória de trabalho é uma memória declarativa muito breve e fugaz, que não produz arquivo. Ela serve para manter durante alguns segundos, no máximo poucos minutos, a informação que está sendo processada no momento, como por exemplo: usamos a memória de

trabalho quando perguntamos para alguém o número de telefone do dentista: conservamos esse número o tempo suficiente para discá-lo e, uma vez feita a comunicação correspondente, o esquecemos (Ashby and O'Brien 2005; Izquierdo et al. 2006).

As memórias não-declarativas ou implícitas, são memórias que adquirimos sem perceber, são memórias de capacidade ou habilidades motoras ou sensoriais, como por exemplo: andar de bicicleta, nadar, etc (Izquierdo et al. 2006).

As memórias também podem ser classificadas quanto ao tempo de retenção em memória de curta e longa duração e memória remota. As memórias de curta duração duram pouco tempo (minutos ou 3 a 6 horas) enquanto a memória de longa duração está sendo formada, se estas memórias durarem muitos meses ou anos passam a ser denominadas de memórias remotas (Lees et al. 2000).

### **3.2 Mecanismos de Memória**

Há evidências de que formamos memória por mais de um mecanismo bioquímico, dependendo do tipo da memória formada. Há evidências também que os mecanismos bioquímicos pelos quais formamos a memória são diferentes dos mecanismos pelos quais a evocamos e envolvem uma miríade de eventos moleculares que ocorrem em locais, estruturas e em tempos diferentes no sistema nervoso central (Abel and Lattal 2001; Izquierdo et al. 2002).

O mecanismo celular de aprendizado e memória envolve mecanismos de plasticidade sináptica tais como a LTP. Do ponto de vista funcional, a LTP corresponde a um processo de facilitação das sinapses, cujo estabelecimento depende da duração e da frequência do estímulo repetitivo; ou numa analogia, depende do “treinamento”, e, portanto, de um processo de ‘aprendizagem’ (Bliss and Collingridge 1993). Bliss e Lomo (1970) haviam apenas demonstrado que a estimulação elétrica de alta frequência de alguma forma tornava os circuitos neurais mais potentes. Mas quais seriam os mecanismos neurais responsáveis por este fenômeno? Vários estudos têm demonstrado que, em hipocampo o aminoácido glutamato, produz LTP através da ligação com moléculas receptoras existentes na membrana pós-sináptica (Hollmann and Heinemann 1994).

A cascata de reações para a formação da memória (FIGURA 1) inicia quando o glutamato é liberado, se liga a receptores específicos na membrana pós-sináptica: ácido amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol propiônico (AMPA), cainato, NMDA e receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mRGLU), (Bliss and Collingridge 1993; Mcgaugh and Izquierdo 2000).

A ligação de glutamato no receptor AMPA leva ao influxo de  $\text{Na}^+$  e assim promove a retirada do  $\text{Mg}^{2+}$  do receptor NMDA, que passa a responder ao glutamato permitindo a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula (Hollmann et al. 1991; MacDermott et al. 1986). Este aumento na concentração de cálcio intracelular estimula a proteína calmodulina, que se torna ativa quando quatro íons cálcio se ligam a ela. Torna-se então  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina, o segundo mensageiro principal para LTP e para a memória (Lledo et al. 1995).

A  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina, ativa enzimas que desempenham um papel fundamental neste processo, como a adenilato ciclase, que catalisa a conversão de ATP em AMPc o qual ativa a proteína quinase dependente de AMPc (PKA), (Taylor et al. 1990; Whittard and Akiyama 2001). A  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina também ativa a enzima  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina dependente de proteína quinase II (CaMK II- atua fosforilando e ativando o receptor AMPA) (Lisman and Zhabotinsky 2001; Lledo et al. 1995; Strack et al. 1997).

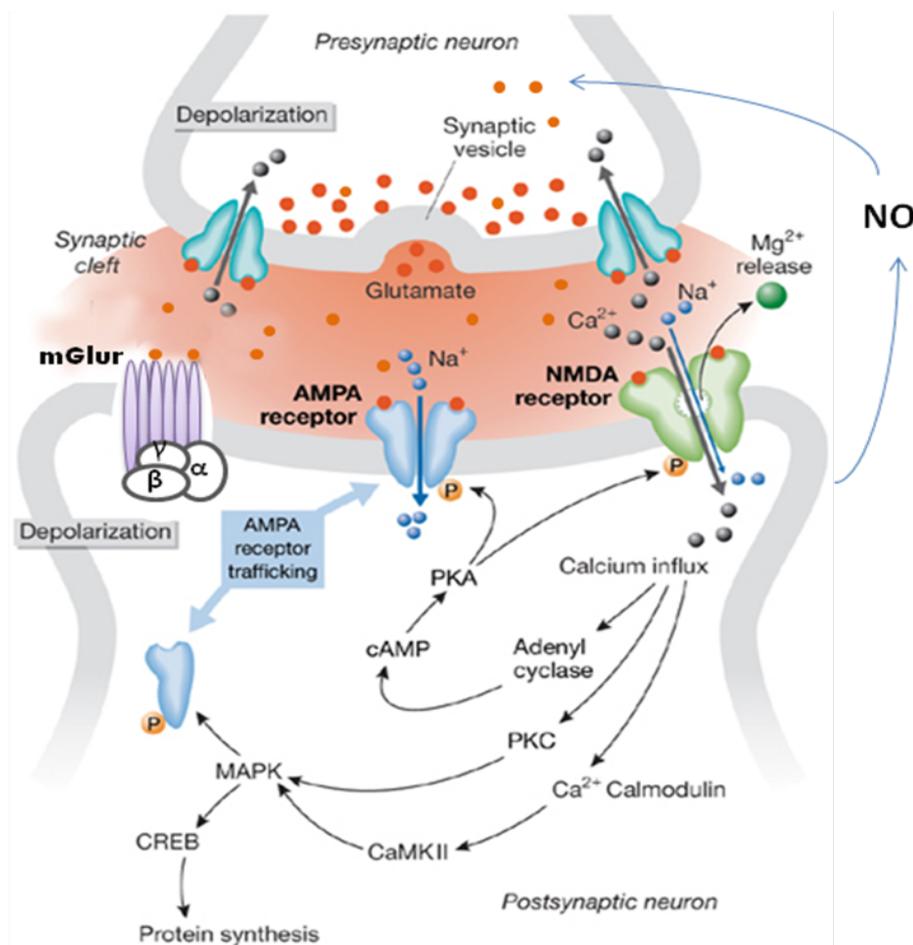
O aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular também ativa a proteína quinase dependente de GMPc (PKG) a qual libera substâncias como óxido nítrico, monóxido de carbono e fator de agregação plaquetária (PAF) as quais aumentam ainda mais a liberação de glutamato (Bliss and Collingridge 1993; Izquierdo and Medina 1995). Estas enzimas, irão modificar a conformação espacial de outras moléculas, geralmente por fosforilação (Bliss and Collingridge 1993).

Em outras palavras, há uma cascata de reações bioquímicas típicas que podem ter muitos efeitos diferentes. Por exemplo, a PKA e a proteína quinase dependente de cálcio (PKC) fosforilam os receptores AMPA e NMDA, permitindo que eles permaneçam ativados por mais tempo após a ligação do glutamato a eles (Chen and Huang 1992; Lan et al. 2001; Raman et al. 1996; Roche et al. 1996; Skeberdis et al. 2006). Como resultado, o neurônio pós-sináptico se torna ainda mais despolarizado, contribuindo assim para a LTP. Além disso, juntas (PKC e PKA) fosforilam fatores de transcrição protéicos no núcleo, dos quais o mais conhecido é a proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc (CREB) que desempenha um papel importante na transcrição de genes e síntese de diversas proteínas, aumentando a

efetividade de transmissão de informação entre os neurônios (Hummler et al. 1994; Jancic et al. 2009; Ramanan et al. 2005).

O aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula pós-sináptica também pode ativar a enzima óxido nítrico sintase (NOS) a qual converte L-arginina em L-citrulina formando o NO (óxido nítrico). Assim, o NO pode agir como um mensageiro retrógrado difundindo-se para o terminal pré-sináptico e alterando a liberação de neurotransmissores (Garthwaite 1991).

A memória pode ser modulada por agonistas, antagonistas de receptores glutamatérgicos (AMPA, NMDA, mRGLU, cainato) e também por inibidores específicos de algumas enzimas (PKA, PKC, PKG, CAMK II) em diferentes estruturas cerebrais (Izquierdo and Medina 1995).



**Figura 1-** Cascata de eventos envolvidos na formação da memória (Voglis and Tavernarakis 2006).

### 3.3 Receptor *N*-metil-D-aspartato (rNMDA)

O receptor NMDA possui múltiplos sítios de ligação, tanto para compostos endógenos quanto exógenos (Figura 2). Dentre estes, existem sítios de ligação para agonistas tais como glutamato e antagonista deste sítio como AP-5 (Ácido D-2-amino-5-fosfopentanóico), sítio para a glicina (co-agonista) que liga serina e D-cicloserina como agonista e ácido 7-

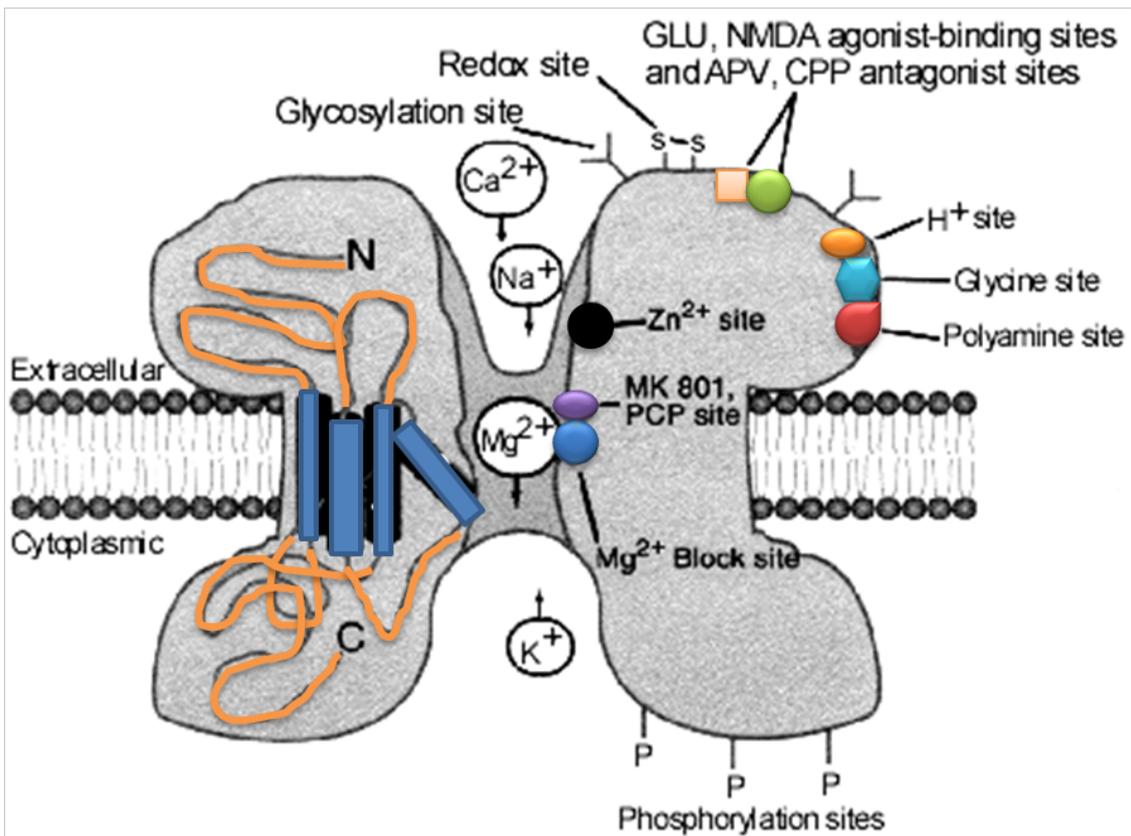
cloroquinurênico como antagonista. Antagonistas como  $Mg^{2+}$ , MK-801 (dizocilpina), quetamina, fenciclidina (PCP) entre outros podem se ligar bloqueando o canal NMDA. Além disso, existem sítios de ligação para agentes redox, prótons, zinco e poliaminas que podem modular a atividade do receptor (Cull-Candy and Leszkiewicz 2004; Ozawa et al. 1998; Paoletti et al. 2009; Riedel et al. 2003; Yamakura and Shimoji 1999).

O receptor glutamatérgico *N*-Metil-D-aspartato (rNMDA) desempenha um importante papel em várias funções fisiológicas, tais como plasticidade sináptica, memória, aprendizagem e na formação de redes neurais durante o desenvolvimento (Schwartz et al. 1996; Whetsell 1996). Além disso, NMDA está envolvido em uma variedade de estados patológicos, incluindo doenças neurológicas causadas por excitotoxicidade neuronal, lesão aguda como isquemia, trauma, epilepsia e estados crônicos degenerativos como a doença de Huntington, esclerose lateral amiotrófica e talvez em várias outras síndromes, como a doença de Alzheimer, transtornos psiquiátricos e síndrome de dor neuropática (Javitt et al. 1994; Krystal et al. 1994; Pud et al. 1998; Thornberg and Saklad 1996; Woolf and Thompson 1991; Yamin 2009)

O NMDAr é formado por diferentes proteínas heteroméricas chamadas subunidades: NR1 (A-G) NR2 (A-D) e NR3 (A-B) que agrupadas formam um canal iônico com condutância seletiva de íons cálcio, sódio e potássio através da membrana neuronal (Monyer et al. 1992).

Quando o receptor está em repouso, íons de  $Mg^{2+}$  ficam ligados a um sítio dentro do canal iônico impedindo assim o influxo de  $Ca^{2+}$ . O canal só é ativado quando 3 fatores ocorrem simultaneamente: 1) ligação do neurotransmissor glutamato na subunidade NR2B; 2) ligação de glicina (co-

agonista obrigatório) na subunidade NR1; e 3) despolarização da membrana pós-sináptica. Estes três fatores provocam uma mudança na conformação alostérica do receptor diminuindo a afinidade pelo  $Mg^{2+}$  que é deslocado, permitindo assim o influxo de íons  $Ca^{2+}$  e  $Na^+$  bem como o efluxo de  $K^+$ . A ativação do receptor NMDA é voltagem dependente e ocorre através de receptores AMPA que estão localizados ao lado de receptores NMDA. Quando ativados, o receptor NMDA age no sentido de aumentar ainda mais a despolarização iniciada pelos receptores AMPA. Esse aumento de íons cálcio no meio intracelular, é extremamente importante para que mensageiros intracelulares possam ativar muitas enzimas, envolvidas na consolidação da memória, como: ativação de proteínas quinases de cálcio (PKC) e a proteína dependente de cálcio-calmodulina II, que são responsáveis por algumas respostas celulares mediadas pelo receptor NMDA, que inclui formas de plasticidade sináptica (Hollmann et al. 1991; Kerchner and Nicoll 2008; Newpher and Ehlers 2009);



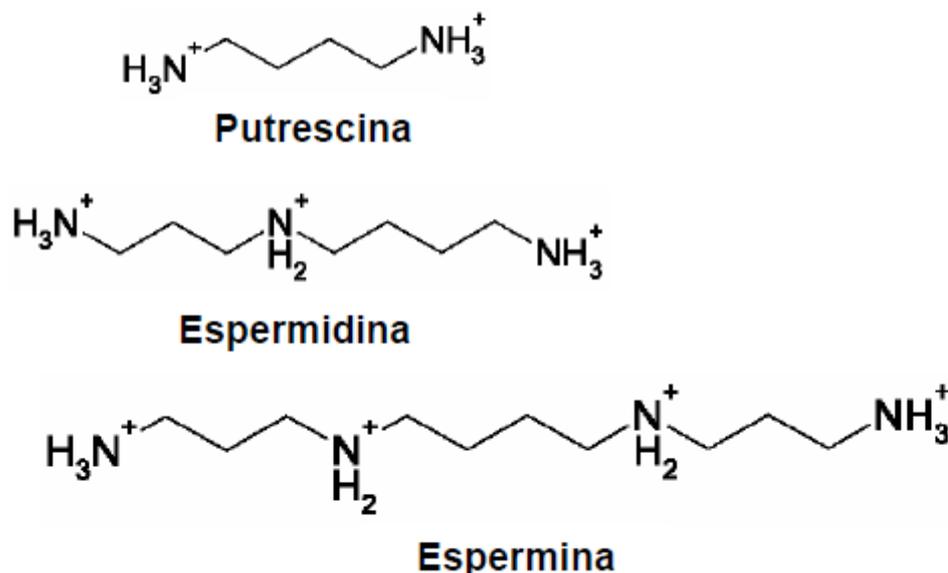
**Figura 2-** Representação esquemática do receptor NMDA adaptado de Zigmond et al 1999).

### 3.4 Poliaminas

As poliaminas (Putrescina, Espermidina e Espermina) são cátions alifáticos de baixo peso molecular presentes em todos os organismos vivos. Sua descoberta foi feita por Antoni Van Leeuwenhoek em 1778, que descreveu a presença de cristais de fosfatos de espermidina em amostras resfriadas do sêmen humano.

As poliaminas são encontradas em plantas, insetos, bactérias e em animais superiores (Leeuwenhoek 1778; Morgan 1998; Wortham et al. 2007). As poliaminas são compostas por uma, duas ou três cadeias carbonadas

flexíveis, as quais são conectadas por átomos de nitrogênio. Elas também apresentam grupamentos amino primário nas extremidades da cadeia carbonada. Como mostra a figura 3, putrescina (1,4-dianobutano) é uma di-amina primária, espermidina (mono-*N*-3-aminopropil-1,4-diaminobutano) é uma tri-amina e espermina (bis-*N*-3-aminopropil-1,4-diaminobutano) é uma tetra-amina, todas contêm grupamentos aminos primários ou secundários (Teti et al. 2002).



**Figura 3-** Estrutura química das três poliaminas endógenas (adaptado de Kalac and Krausová, 2005).

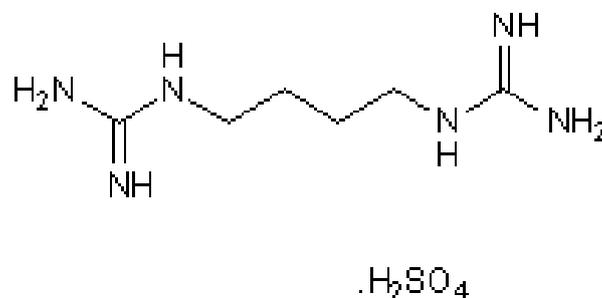
Devido à sua carga positiva, estes compostos podem se ligar a várias macromoléculas, como o DNA e RNA, proteínas e lipídios de membrana (Ouameur and Tajmir-Riahi 2004; Ruiz-Chica et al. 2003; Wallace 2003). As poliaminas também têm sido implicadas em processos celulares, incluindo a regulação de tradução e expressão de gene, a proliferação celular, a modulação da sinalização e estabilização da membrana da célula (Igarashi and

Kashiwagi 2000; Tabor and Tabor 1984; Wallace 2003). As poliaminas também podem regular a morte celular, particularmente a apoptose (Seiler and Raul 2005; Thomas and Thomas 2001).

### 3.5 Arcaína

A arcaína é um análogo das poliaminas, possuindo estrutura semelhante a estas. A arcaína é composta por uma cadeia carbonada, a qual está conectada por átomos de nitrogênio. Ela também apresenta grupamentos amino nas extremidades da cadeia carbonada, além de conter uma molécula de ácido sulfúrico, sendo assim a arcaína é um sulfato 1,4-diguanidinobutano como mostrado na figura 4 (Reynolds 1990).

A arcaína é um antagonista competitivo do sítio de ligação das poliaminas na subunidade NR2B do rNMDA (Lynch et al., 1995). Estudos demonstraram que a arcaína provoca o deslocamento da curva da ligação da dizocilpina produzida pela espermidina para a direita o que sugere que a arcaína é um antagonista competitivo das poliaminas (Sacaan and Johnson, 1990).



**Figura 4:** Estrutura da arcaína, adaptado de Reynolds 1990.

### **3.6 Metabolismo das poliaminas**

As poliaminas e seu metabolismo são de importância médica e farmacológica. Elas estão presentes em concentrações relativamente elevadas no cérebro de mamíferos (hipocampo: putrescina 7,1 nmol g<sup>-1</sup>; espermidina 420 nmol g<sup>-1</sup>; espermina 334 nmol g<sup>-1</sup>) (Seiler and Schmitd-Glenewinkel 1975).

As poliaminas encontradas nos seres humanos são sintetizadas no organismo ou provém da flora gastrintestinal capaz de metabolizar aminoácidos provenientes da dieta (Teti et al. 2002). Uma noção geral do metabolismo das poliaminas pode ser vista na figura 5.

A síntese das poliaminas inicia-se pela formação da putrescina a partir da ornitina por uma reação catalisada pela enzima ornitina descarboxilase (ODC), uma enzima limitante na síntese das poliaminas. Esta enzima pode ser inibida pelo  $\alpha$ -difluorometilornitina (DFMO), o que leva a uma redução drástica de putrescina e espermidina. A ornitina utilizada para a síntese de putrescina é na sua maioria proveniente do ciclo da uréia (Coffino 2000). A arginase é necessária para fornecer ornitina e arginina, em células que não possuem o ciclo da uréia completo, e conseqüentemente levando a síntese de putrescina. Assim, ambas arginase I (citossólica e expressa principalmente no fígado) e arginase II (mitocondrial) podem ser capazes de fornecer ornitina para a síntese de poliaminas (Pegg and McCann 1982).

A partir da putrescina são formadas as outras duas poliaminas: espermidina e espermina.

A metionina fornece os grupos aminopropil necessários para converter a putrescina nas poliaminas superiores (espermidina e espermina). Os grupos aminopropil são convertidos em S-adenosilmetionina (SAM) pela ação da

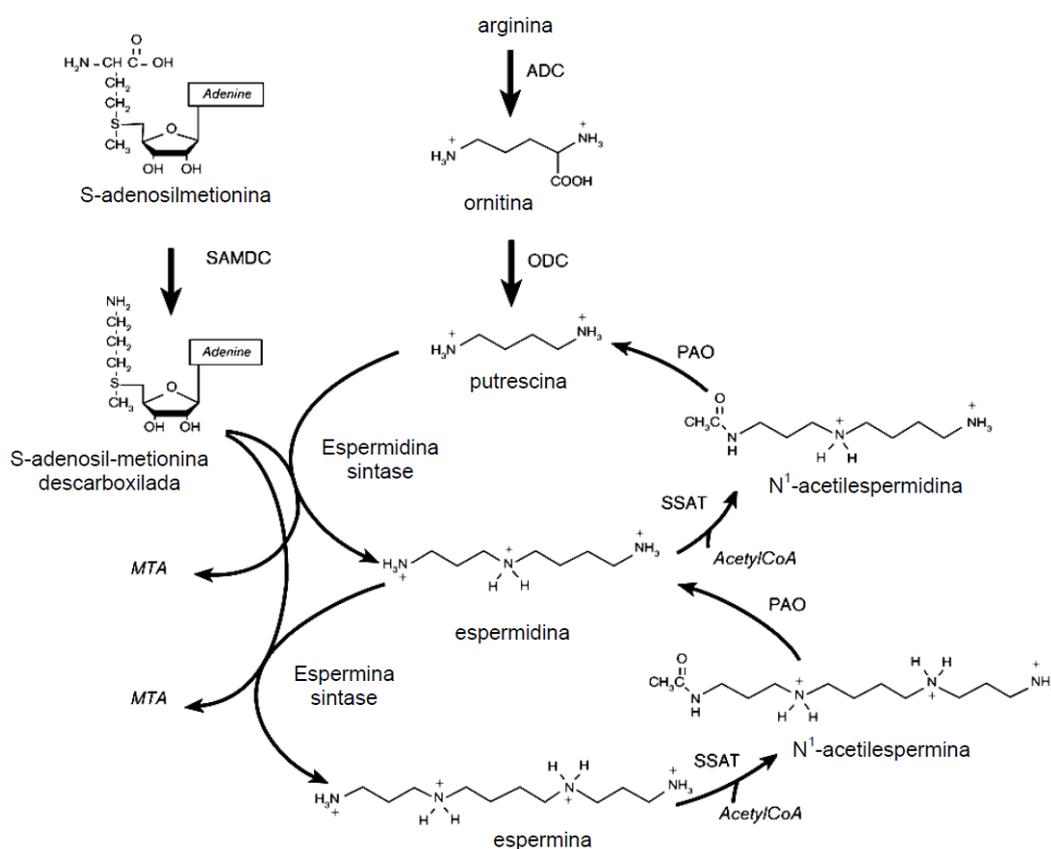
enzima metionina adenosiltransferase (MAT). A SAM é então descarboxilada pela enzima S-adenosilmetionina descarboxilase (SAMDC), para formar o doador aminopropil S-adenosilmetionina descarboxilada (dcSAM) (Casero and Pegg 1993; Moinard et al. 2005) Assim, a espermidina é formada a partir da putrescina pela transferência de um grupamento aminopropil transferido da dcSAM, uma reação catalisada pela espermidina sintase. A enzima espermina sintase, transfere o segundo grupo aminopropil de outra molécula de dcSAM para a espermidina originando a espermina (Moinard et al. 2005; Tabor and Tabor 1984).

As reações catalisadas pelas aminopropil-transferases (espermidina e espermina sintase) são essencialmente irreversíveis, mas a reversão da rota pode ocorrer através da atividade da espermidina/espermina-N1-acetiltransferase (SSAT), a qual forma intermediários N-acetilados, N1-acetilespermidina e N1-acetilespermina. Estes apresentam afinidade pela enzima poliamina oxidase (PAO), que rompe as ligações C-N entre os resíduos aminopropil e os grupos amino secundário para formar espermidina e putrescina (Moinard et al. 2005; Seiler 1990). Assim, esta via de interconversão catalisada pela SSAT e PAO é muitas vezes descrita como parte do sistema de biossíntese de poliaminas, mas não pode gerar poliaminas pela síntese de novo, e sim está mais envolvida na degradação e excreção das poliaminas.

O catabolismo final das poliaminas é feito por amino-oxidases dependentes de cobre. Pela desaminação oxidativa do grupamento amino primário, cada intermediário do ciclo de interconversão pode ser transformado em um aldeído, que é posteriormente oxidado em um aminoácido ou em um grupamento gama-lactâmico. Os produtos finais do catabolismo bem como

poliaminas acetiladas, são excretados por via renal como poliaminas inalteradas, sendo um mecanismo de controle dos níveis intracelulares de poliaminas (Gugliucci 2004; Seiler 2004).

As três enzimas que regulam a biossíntese de poliaminas são ornitina descarboxilase, S-adenosilmetionina descarboxilase e espermidina/espermina N-acetiltransferase. Estas enzimas regulam os mecanismos envolvendo os três passos do metabolismo das poliaminas: síntese de novo, rota de interconversão e catabolismo (Morgan 1999; Seiler 2004).



**Figura 5:** Metabolismo das poliaminas. Arginina descarboxilase (ADC); ornitina descarboxilase (ODC); S-adenosil-metionina descarboxilase (SAMDC); espermidina/espermina N<sup>1</sup> acetil-transferase (SSAT); poliamina oxidase (PAO); metiltioadenosina (MTA) (Urdiales et al. 2001).

### **3.7 Poliaminas e receptor NMDA**

As poliaminas endógenas, especialmente espermina e espermidina, são reguladores de várias atividades na membrana e também de canais iônicos, podendo interagir com subtipos específicos de canais de potássio e receptores glutamatérgicos, principalmente na subunidade NR2B do receptor NMDA (Williams 1997a; 1997 b; Williams et al. 1990).

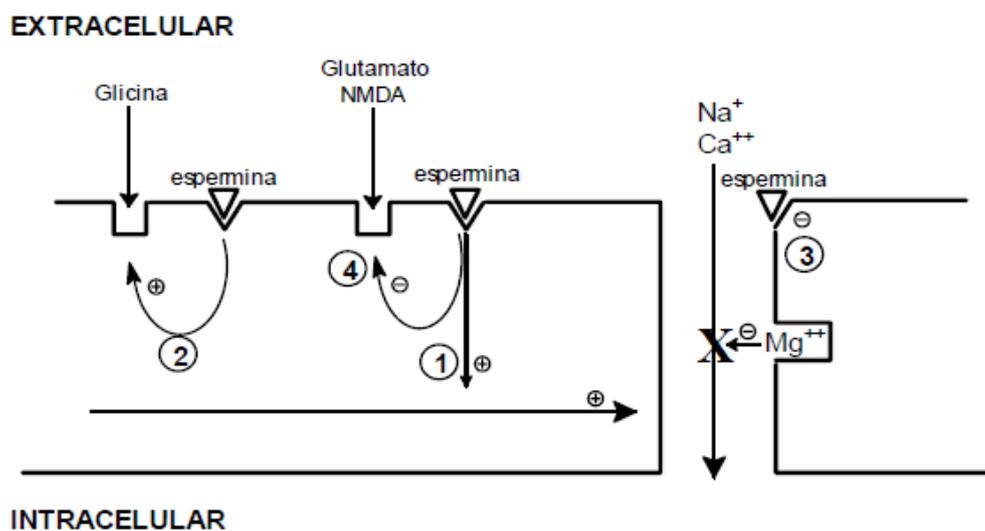
Ranson e Stec (1988) mostraram que a espermidina e espermina, aumentavam a afinidade do receptor NMDA pelo [<sup>3</sup>H]MK-801, na presença e na ausência de concentrações saturantes de glutamato e glicina. Foi então proposto que o efeito estimulatório das poliaminas deve-se a sua ligação no receptor NMDA.

A espermina atua sobre o receptor NMDA de maneira bifásica, ou seja, quando em altas concentrações ela não potencializa a ligação do [<sup>3</sup>H]MK-801, enquanto que em baixas concentrações de espermina aumenta a condutância do receptor NMDA, por aumentar a frequência de abertura do canal (Johnson 1996; Rock and Macdonald 1995). Esta ação complexa das poliaminas sobre o receptor NMDA sugere que possa haver mais de um sítio de ligação das poliaminas associado a este receptor (Worthen et al. 2001; Yoneda and Ogita 1991).

A figura 6 apresenta o esquema com o efeito inibitório e estimulatório das poliaminas sobre o receptor NMDA (Johnson 1996; Williams 1997b).

- 1- Estimulação glicina-independente: a espermina aumenta as correntes de íons pelo receptor NMDA na presença de concentrações saturantes de glicina;

- 2- Estimulação glicina-dependente: a espermina aumenta a afinidade do receptor pela glicina;
- 3- Uma inibição voltagem dependente, por diminuição da condutância do canal, como resultado de seu caráter catiônico na entrada do poro, ou por bloqueio do canal aberto em um sítio dentro do poro como faz o magnésio.
- 4- Inibição da afinidade do receptor pelo glutamato.



**Figura 6-** Esquema de ações modulatórias da espermina sobre o receptor NMDA. + efeito estimulatório das poliaminas; - efeito inibitório das poliaminas. 1- 4: sítios 1 – 4 (adaptado de Johnson, 1996).

### 3.8 Poliaminas, receptor NMDA e memória

As poliaminas estão envolvidas na modulação da memória, e em diferentes tarefas de aprendizagem, apresentando um efeito bifásico: quando em baixas concentrações melhoram a memória e quando em altas concentrações pioram a memória (Anderson et al. 1975; Halonen et al. 1993).

De fato, altas doses de espermidina (125-250 nmol) administradas por via intracerebroventricular, causa déficit no aprendizado no labirinto aquático de Morris (Conway 1998). A administração intraperitoneal de poliaminas potencializa a diminuição do aprendizado induzido por dizocilpina no labirinto em T de 14 braços (Shimada et al. 1994). Por outro lado, a administração sistêmica, intrahipocampal e intra-amígdala de espermidina melhora o desempenho de ratos na tarefa de esquiva inibitória (Guerra et al. 2006; Rubin et al. 2000; 2001), medo condicionado (Camera et al. 2007; Rubin et al. 2004) e extinção do medo condicionado contextual (Gomes et al. 2010). O efeito facilitatório causado pela espermidina no teste de esquiva inibitória parece ocorrer somente nas fases de aquisição e início da consolidação da memória (Berlese et al. 2005). O efeito facilitatório causado pela espermidina, pode ser revertido pela administração de arcaína. Isto apóia as evidências que o efeito facilitatório da espermidina é devido à interação da espermidina no sítio das poliaminas no rNMDA, uma vez que não só a administração de arcaína, mas também de MK-801 (antagonista não-competitivo do rNMDA) traxoprodil e ifenprodil (antagonistas da subunidade NR2B do rNMDA) revertem a melhora da memória induzida por espermidina (Camera et al. 2007; Gomes et al. 2010; Rubin et al. 2004; 2000; 2001).

O efeito facilitatório da espermidina sobre a memória parece depender da atividade da enzima óxido nítrico sintase hipocampal, uma vez que a administração intra-hipocampal de N<sup>G</sup>-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), um inibidor não específico da enzima óxido nítrico sintase, imediatamente após o treino, previne a melhora da memória causada por espermidina na tarefa de

esquiva inibitória. A espermidina aumenta os níveis de nitratos e nitritos, e a co-administração de L-NAME previne este efeito (Guerra et al. 2006).

### **3.9 Dependência de estado**

As memórias são adquiridas sob a influência de um determinado "tônus" cerebral dopaminérgico, noradrenérgico, serotoninérgico ou betaendorfinico (McGaugh et al. 1975). Esses moduladores e hormônios geralmente facilitam a formação de memórias (Perry and Izquierdo 1989).

As memórias são mais bem evocadas quando o "tônus" neurohumoral e hormonal vigente no momento de sua aquisição se repetem na evocação (Izquierdo 1982). Assim, em momentos de ansiedade elevada, em que se libera muita dopamina, noradrenalina cerebral, adrenalina e corticóides na periferia, teremos não só tendência a gravar melhor o que está acontecendo nessa ocasião, como também facilidade para evocar outras experiências igualmente assustadoras ou aversivas. Isto é sem dúvida útil para ter em mente, disponível para a utilização imediata, por meio de estratégias de ação apropriadas para a circunstância: devemos fugir, pular, nos esconder ou lutar? (Izquierdo 2002).

Este fenômeno se denomina dependência de estado: a evocação das memórias de certo conteúdo emocional depende do estado hormonal e neurohumoral em que a mesma esteja ocorrendo (Bruins Slot and Colpaert 1999b). Quanto mais esse estado se pareça com aquele em que memórias de índole similar foram adquiridas, melhor será a evocação (Jackson et al. 1992; Shulz et al. 2000). Assim, muitas memórias ficam num estado que poderíamos chamar

latente, só despertado por determinadas conjunções de fenômenos neuro-humorais e hormonais próprios de cada estado: as que causam medo, as que chamam ao sexo etc. Mas isto não quer dizer que o fato dessas memórias importantes ficarem latentes signifique que foram esquecidas, sequer temporariamente. Quer dizer que essas memórias dependentes de um determinado estado neuro-humoral e hormonal, para serem reativadas, requerem certos estímulos que compreendam pelo menos parte da reprodução do estado em que foram originalmente adquiridas (Izquierdo 2002).

Tarefas como esQUIVA inibitória reproduzem muito bem a dependência de estado em animais. No treino ocorrem dois conjuntos paralelos de eventos que podem interagir. Um deles inclui a aprendizagem, que é seguida pelo armazenamento onde passa de um estado lábil a um estado mais fixo, a fase de consolidação da memória. Na fase de consolidação, as memórias são bastante suscetíveis a interferências como, por exemplo, por drogas, e assim a informação armazenada pode ou não estar disponível para a evocação na sessão de teste; a sessão do teste geralmente envolve além da recuperação, algum grau de reaprendizagem (Abel and Lattal 2001; McGaugh and Izquierdo 2000).

Simultaneamente com a aprendizagem, existem alterações neurohumorais e hormonais que persistem no período pós-treino e pode influenciar o aprendizado, o armazenamento, a consolidação ou a evocação da memória. Algumas destas alterações neurohumorais e hormonais que persistem após o treino são: (1) hipersecreção periférica de epinefrina e noradrenalina (Gold and McCarty 1981; Liang et al. 1986), (2) liberação de dopamina, noradrenalina (Schutz et al. 1979) e de  $\beta$ -endorfina no cérebro

(Izquierdo et al. 1980a), e (3) liberação do hormônio adenocorticotrófico (ACTH) (Dunn 1980). Várias evidências sugerem que estas alterações podem modular a formação da memória após o treino (Cahill and McGaugh 1996; Introini-Collison and McGaugh 1988).

As mudanças que ocorrem na sessão do teste têm sido menos estudadas e acredita-se que são menores que as que ocorrem no período pós-treino. Elas podem ter influência sobre a disponibilidade para a recuperação da memória ou evocação. De fato a liberação de  $\beta$ -endorfina no cérebro é muito menor na sessão do teste (Izquierdo 1982; Izquierdo et al. 1980b). Existem motivos para acreditar que a sessão de teste da tarefa de esquiva inibitória em que não é dado um choque e acompanhada por uma descarga muito menor de ACTH ou catecolaminas periféricas do que na sessão de treino, particularmente uma vez que estas alterações parecem depender do estresse ou aversão associadas a tarefa (Gold and Van Buskirk 1976; Gold and Van Buskirk 1975; Izquierdo and Dias 1983).

A administração pré-teste intraperitoneal de ACTH,  $\beta$ -endorfina ou epinefrina aumenta a recuperação do comportamento aversivo aprendido anteriormente (de Wied et al. 1978; Izquierdo 1980; Rigter 1978). Este aumento pode ser manifestado na melhora da performance dos animais na tarefa de esquiva inibitória no dia do teste (Izquierdo 1980), também retardar a extinção da memória (de Wied et al. 1978), e também em reverter a amnésia induzida pelo tratamento pós-treino (Rigter 1978).

As alterações neurohumorais e hormonais sugerem que a aprendizagem e a memória dependem da relação entre o estado endógeno que se desenvolve durante e após o treino e o que se desenvolve durante a retenção

do teste: ou em outras palavras, que existe uma dependência de estado endógeno. Assim estas alterações endógenas irão servir como pistas contextuais para uma melhor evocação da memória no dia do teste (Izquierdo 1984; Izquierdo 1988).

A dependência de estado além de envolver alterações neurohumorais e hormonais, também envolve vários sistemas de neurotransmissores, como: sistema glutamatérgico, sistema opióide, sistema dopaminérgico, sistema serotoninérgico, entre outros; e também segundos mensageiros (AMPC, GMPc, NO, etc), além da síntese de proteínas (PKA, PKC, etc), (Ardjmand et al. 2011; Houghoghi et al. 2009; Nasehi et al. 2010; Sharifzadeh et al. 2006; Wu et al. 2006; Zarrindast et al. 2008). A dependência de estado na tarefa de esquiva inibitória parece envolver diferentes regiões cerebrais, tais como: amígdala, hipocampo, estriado, córtex, nucleo accumbens entre outras (Izquierdo and Medina 1993; 1997).

Além da tarefa de esquiva inibitória, a tarefa de labirinto aquático de Morris também induz dependência de estado nos animais, o que envolve a memória espacial (Nakagawa et al. 1995).

Ceretta e colaboradores (2008) mostraram que o déficit no desempenho dos animais na tarefa de esquiva inibitória induzida pela administração de arcaína pós-treino, foi revertido pela administração de arcaína pré-teste, caracterizando dependência de estado da arcaína. Também foi demonstrado que a administração pré-teste de MK-801 reverte o prejuízo da memória induzida pela administração pós-treino de MK-801. Além disso, o MK-801 pode substituir a arcaína, indicando uma dependência de estado cruzada entre a

arcaína e MK-801, reforçando o envolvimento do rNMDA neste efeito da arcaína.

### **3.9.1 Sistema opióide e memória**

Os opióides são comumente utilizados como analgésicos, mas sua utilização clínica é limitada pelo desenvolvimento de tolerância e dependência física (Veilleux et al. 2010).

Os receptores opióides pertencem a uma família de receptores acoplados a proteína G. Existem quatro subtipos de receptores opióides: Mu ( $\mu$  ou MOR), Delta ( $\delta$  ou DOR), Kappa ( $\kappa$  ou KOR), e o receptor ORL1, que também tem sido sugerido na ligação de opióides (Bodnar 2009).

O receptor MOR está acoplado a uma proteína G inibitória ( $G_i$ ), quando ativado pela ligação do agonista morfina, diminui a fosforilação induzida pelo AMPc, inibe os canais de cálcio enquanto ativa os canais de potássio (figura 7), com isso induz uma hiperpolarização na célula, causando amnésia (Ueda 1989).

O sistema opióide tem sido implicado na modulação da memória, em condições estressantes. Em animais, a retenção de uma experiência que envolve um estímulo aversivo (um choque por exemplo) é prejudicada por agonistas opiáceos e reforçada por antagonistas opiáceos administrados logo após o treino. Desta maneira, o sistema opióide (ou mais especificamente, a ativação farmacológica do sistema) é geralmente considerado como prejudicial a memória. Assim, a administração de morfina pré ou pós treino na tarefa de

esquiva inibitória (a qual envolve um estímulo aversivo) prejudica a memória (Izquierdo and McGaugh 1985). Porém, a administração de morfina pré-teste reverte o efeito amnésico causado pela morfina no treino, caracterizando dependência de estado, onde a evocação de uma determinada memória, vai exigir que o organismo esteja em um estado semelhante aquele em que a memória foi adquirida pela primeira vez. Naloxona, mas não naltrindole, antagoniza a dependência de estado induzida pela morfina (Bruins Slot and Colpaert 1999a).

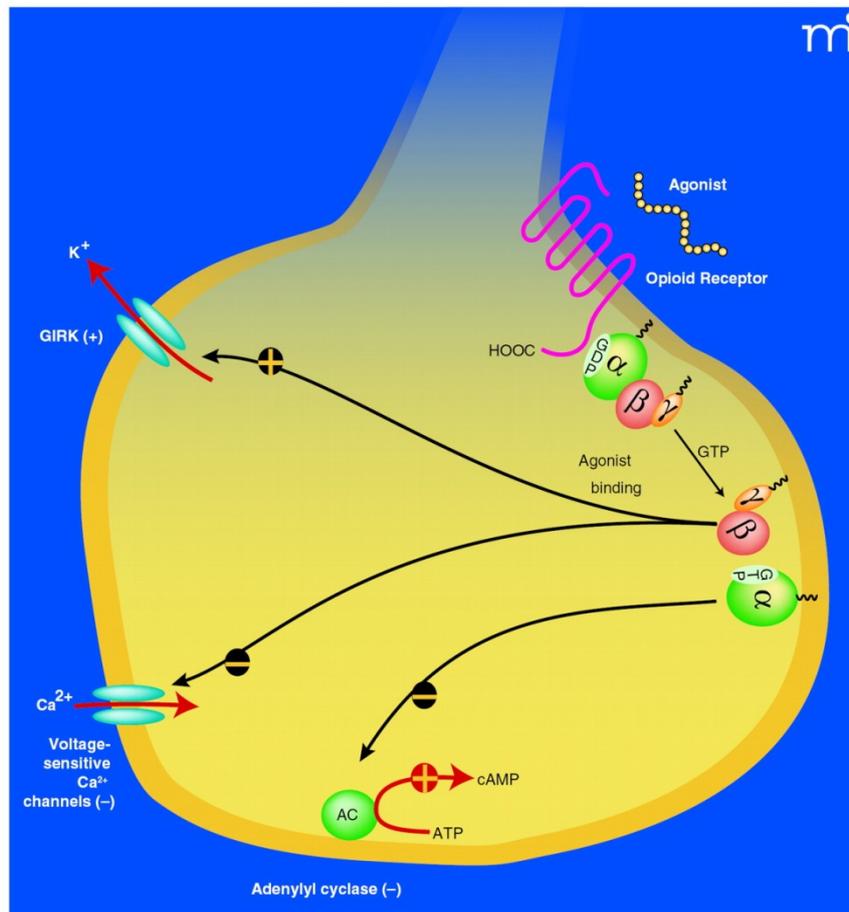
Estudos têm mostrado que a dependência de estado causada pela morfina envolve o sistema glutamatérgico, uma vez que a administração de antagonistas do receptor NMDA, como o MK-801 e o AP-5, bloqueiam a dependência de estado induzida pelo agonista opióide (Zarrindast et al. 2006c). Outros estudos têm mostrado que o MK-801 potencializa a amnésia induzida pela morfina (Cestari and Castellano 1997) sugerindo que a dependência de estado causada pela morfina envolve o receptor NMDA.

Além disso, a administração de morfina regula a expressão da subunidade NR2B do receptor NMDA no sistema límbico e córtex frontal, e tem sido sugerido como uma das adaptações nos circuitos cerebrais durante o desenvolvimento da dependência de opiáceos (Johansson et al. 2010). É importante ressaltar que a dependência de estado causada pela morfina envolve outros sistema na memória além do sistema glutamatérgico, como: sistema colinérgico (Rezayof et al. 2008), sistema dopaminérgico (Zarrindast et al. 2006b), sistema gabaérgico (Rassouli et al. 2010), entre outros. A morfina também induz dependência em outras tarefas como no labirinto aquático de Morris (Miladi Gorji et al. 2008) e na aprendizagem de preferência condicionada

do local (Rezayof et al. 2007). Ainda, a administração de naloxona bloqueia a aquisição mas não a consolidação e a evocação da extinção do medo condicionado, demonstrando o envolvimento de opióides na memória do medo (Kim and Richardson 2009).

A memória também pode ser modulada por opióides endógenos. Estes peptídeos endógenos são produzidos naturalmente no corpo. Eles incluem endorfina, encefalinas, dinorfina e endorfina.  $\beta$ -endorfina é expressa em células no núcleo arqueado do hipotálamo e no tronco cerebral, e atua através dos receptores  $\mu$ -opióides. Encefalina é amplamente distribuída pelo cérebro e age através dos receptores  $\mu$  e  $\delta$ -opióides. Dinorfina age através de receptores  $\kappa$ -opióide e é encontrada na medula espinhal e em muitas partes do cérebro, incluindo o hipotálamo. A endorfina (endorfina-1 e endomorfina-2) se ligam fortemente e preferencialmente aos receptores  $\mu$ -opióides. Estes peptídeos endógenos têm sido implicados na dependência de estado, isto por que, a piora da memória causada pela administração pós-treino deste opióides endógenos, pode ser atenuada pela administração dos mesmos pré-teste, demonstrando uma dependência de estado endógena (Okada et al. 2002; Zadina et al. 1999).

Considerando que a dependência de estado causada pela arcaína e causada pela morfina envolvem o receptor NMDA, no presente estudo estudaremos se a dependência de estado induzida pela arcaína envolve o sistema opióide.



**Figura 7-** Representação esquemática do mecanismo de ação da morfina sobre o receptor  $\mu$ -opióide, adaptado de Kreer and Forge 2007.

### **3.9.2 Esquiva inibitória**

A esquiva inibitória é muito utilizada para avaliar a memória em ratos e camundongos: é um teste muito simples, o treino é realizado uma única vez, permanece por muito tempo (às vezes, toda a vida) e tem um valor biológico importante (Izquierdo, 2002). A tarefa de esquiva inibitória utiliza a região CA1 do hipocampo, sendo importante para os mecanismos da formação da memória de longa duração como: excitação das células hipocâmpais por meio da estimulação de receptores glutamatérgicos AMPA, NMDA e metabotrópicos, e a entrada de cálcio nas células levando a ativação subsequente de várias proteínas-quinase (Izquierdo, 2002).

A tarefa de esquiva inibitória envolve a formação de uma memória declarativa na qual o animal aprende a inibir uma resposta (descer de uma plataforma ou entrar em um outro compartimento) para não receber um estímulo aversivo (um choque elétrico). Esta memória corresponde àquela em que nós, os humanos, evitamos entrar em uma rua perigosa ou aprendemos a olhar à esquerda antes de atravessar a rua (Izquierdo, 2002). A esquiva inibitória é uma memória episódica (lembramos o episódio pelo qual aprendemos: o dia em que colocamos os dedos na tomada) e também semântica (aprendemos a evitar todas ou, pelo menos, a maioria das circunstâncias perigosas: um conhecimento episódico adquire valor semântico). Esta tarefa de aprendizado é a que melhor demonstra separadamente as fases de aquisição, consolidação e evocação da memória, e assim pode ser utilizada para reproduzir a dependência de estado em animais. A aquisição de uma esquiva inibitória é ansiogênica e/ou estressante, porque envolve um

choque elétrico, que produz hipersecreção de neurotransmissores ou neuromoduladores ( $\beta$ -endorfina, noradrenalina) e hormônios do estresse (noradrenalina do sistema simpático, adrenalina, ACTH, etc) o que agem como pistas para uma melhor evocação da memória no dia do teste, facilitando a dependência de estado induzida por drogas (Izquierdo, 2002) .

## **4. RESULTADOS**

---

## Effect of naloxone and morphine on arcaine-induced state-dependent memory in rats

Raquele Kipper Mariani · Carlos Fernando Mello · Michelle Melgarejo Rosa · Ana Paula Chiapinotto Ceretta · Keli Camera · Maribel Antonello Rubin

Received: 2 May 2010 / Accepted: 30 January 2011  
© Springer-Verlag 2011

### Abstract

**Rationale** Arcaine is a competitive antagonist of the polyamine binding site at the *N*-methyl-D-aspartic acid receptor which induces state-dependent recall. However, no study has addressed the involvement of other neurotransmitter/neuro-modulators in arcaine-induced state dependency.

**Objectives** The current study investigates whether the opioid system is involved in arcaine-induced state-dependent memory retrieval of the inhibitory avoidance task (IA) in rats.

**Results** The systemic administration of arcaine (30 mg/kg, intraperitoneally (i.p.)) or morphine (5 mg/kg, i.p.) 0, 3, 6, or 9 h post-training, reduced step-down latencies at testing. Arcaine (30 mg/kg, i.p.) or morphine (5 mg/kg, i.p.) injection 30 min before testing reversed the performance deficit induced by administration of arcaine or morphine 0, 3 or 6, but not 9 h post-training. The reversal of arcaine-induced impairment of IA performance was completely transferred to morphine and vice versa. The association of low and ineffective doses of morphine and arcaine (10 and 1.5 mg/kg, respectively) were additive and caused state dependency. Naloxone (2 mg/kg, 3 min post-training, or

1 mg/kg, 1 h pre-test, i.p.) reversed the amnesia and the state dependency induced by morphine and arcaine.

**Conclusion** These results suggest that state dependency induced by arcaine involves the opioid system.

**Keywords** Arcaine · Polyamines · Morphine · State dependency · Opioid system · Memory

### Introduction

The endogenous polyamines (putrescine, spermine, and spermidine) are aliphatic amines with a polycationic structure. Polyamines can interact with several intracellular targets, including nucleic acids and enzymes, and exert complex actions on a variety of ion channels (Scott et al. 1993). Polyamines also have been implicated in modulation of the glutamatergic *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR; Ransom and Stec 1988; Rock and Macdonald 1995; Williams 1997; Williams et al. 1991) and  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptors (Pellegrini-Giampietro 2003). Considerable evidence suggests that several of the biological effects of polyamines are due to NMDAR modulation. Accordingly, the systemic (Camera et al. 2007; Shimada et al. 1994), intra-hippocampal (Berlese et al. 2005; Guerra et al. 2006; Rubin et al. 2000), and intra-amygdalar (Rubin et al. 2004, 2001) administration of spermidine improves memory in distinct tasks and facilitates memory extinction (Gomes et al. 2010). Moreover, the intrastriatal administration of spermine reverses the deficits induced by quinolinic acid on an object recognition task (Velloso et al. 2009).

The facilitatory effects of spermidine are antagonized by low doses of arcaine, an antagonist of the NMDAR polyamine binding site, suggesting that the NMDAR is involved in the memory improvement induced by spermidine (Rubin et al. 2000). In line with this view, the

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00213-011-2215-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

R. K. Mariani · M. M. Rosa · A. P. C. Ceretta · K. Camera · M. A. Rubin (✉)  
Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia,  
Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas,  
Universidade Federal de Santa Maria,  
Santa Maria 97105-900 Rio Grande do Sul, Brazil  
e-mail: maribel.rubin@gmail.com

C. F. Mello  
Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia,  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências  
da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria,  
Santa Maria 97105-900 Rio Grande do Sul, Brazil

noncompetitive NMDAR antagonist, MK-801, reverses the facilitatory effect of spermidine on the memory of fear (Camera et al. 2007), and the systemic (Ceretta et al. 2008) and intra-amygdalar administration of arcaïne impairs the memory of inhibitory avoidance (Rubin et al. 2000) and fear conditioning tasks (Rubin et al. 2004).

The deficits in the performance at testing, induced by the post-training administration of arcaïne, are abrogated if it is administered again, 30 min before testing (Ceretta et al. 2008), characterizing state dependency for arcaïne. State dependency is said to occur when a given information is learned under the influence of a certain drug, and such an information is more easily recalled when the animal is subjected to the same pharmacological state in which the information was learned (Overton 1964; Riccio et al. 2006). Accordingly, pre-test administration of MK-801 also cancels the memory impairment induced by the post-training administration of MK-801 (Harrod et al. 2001) and can be substituted for arcaïne, indicating a cross-state dependency for arcaïne and MK-801, further supporting a role for NMDAR in this effect of arcaïne (Ceretta et al. 2008).

It has long been known that learning and memory are affected by opioids (Castellano 1975; for a broad review, see “Endogenous opiates and behavior” series; Bodnar 2009). Pre- or post-training administration of the opioid receptor agonist morphine impairs memory in different paradigms, including inhibitory avoidance (Ahmadi et al. 2007; Rezaïof et al. 2006). Furthermore, pre-test administration of morphine reverses the impairment of memory induced by pre- or post-training administration of morphine, characterizing morphine-induced state dependency (Khalilzadeh et al. 2006; Zarrindast et al. 2006a, b). It is likely that  $\mu$ -opioid receptor activation is involved in this morphine state of memory, as naloxone, but not naltrindole, antagonizes the effects of morphine (Zarrindast et al. 2004). Other studies have shown that the NMDAR antagonist MK-801 potentiates morphine-induced amnesia (Cestari and Castellano 1997) and inhibits state dependency caused by opioids (Zarrindast et al. 2006c), suggesting that morphine state dependency involves NMDA and opioid receptors. Considering that both arcaïne and morphine induce state-dependent learning that involves NMDA receptors, in this study we investigated the possible role of opioid receptors on arcaïne-induced state dependency in the inhibitory avoidance task in rats.

## Materials and methods

### Animals

Naive male adult Wistar rats (200–250 g), from the animal house of the Federal University of Santa Maria, were used. The animals were housed five to a cage on a 12-h day/night

cycle (lights on at 07:00 A.M.) at a temperature of 22–23°C with free access to water and standard laboratory chow (Guabi, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil). Behavioral tests were conducted during the light phase of the cycle (between 9:00 A.M. and 6:00 P.M.) using independent experimental groups of rats. All animal experimentation reported in this study was conducted in accordance with Brazilian law N° 11.794/2008, which is in agreement with the Policies on the Use of Animals and Humans in Neuroscience Research, revised and approved by the Society for Neuroscience Research in January 1995 and with the Institutional and National regulations for animal research (Institutional Ethics Committee process number 0206). The number of animals in each group was limited by planned statistical comparisons. The first analysis was carried out at  $n=6$ , and subsequent comparisons performed after a two-animal increase in each group, until a  $p_{\alpha}<0.05$  or a  $p_{\beta}<0.2$  was obtained, determining the interruption of the experiment. Every effort was made to minimize the suffering of the animals.

### Drugs

1,4-Diguanidinobutane sulfate (arcaïne) was obtained from Pfaltz & Bauer (Waterbury, CT, USA); naloxone and morphine sulfate were obtained from Cristália (São Paulo, São Paulo, Brazil). All drug solutions were prepared daily in saline (0.9% NaCl). All injections were administered intraperitoneally (i.p.) in a 1-ml/kg injection volume. Doses were selected based on previous studies (Ahmadi et al. 2007; Ceretta et al. 2008; Zarrindast et al. 2004) and pilot experiments.

### Inhibitory avoidance

The animals were trained in a one-trial step-down inhibitory avoidance paradigm (IA). The IA training apparatus consisted of a 30×25×25-cm box with a 2.5-cm high, 7-cm wide, and 25-cm-long platform covering the left side of the grid floor. During training, animals were gently placed on the platform facing the left rear corner of the training box, and immediately after stepping down with their four paws on the grid, they received a 4-s 0.4-mA scrambled foot shock. Immediately after training, they were returned to their home cage. Memory retention was evaluated in a test session carried out 24 h after training, in which trained animals were placed on the training box platform, and the step-down latency was measured. A cutoff time of 300 s was imposed on step-down latency during testing session. The apparatus was cleaned with 30% ethyl alcohol before and after each rat occupied it.

### Open field

Immediately after the IA testing session, all animals were transferred to an open field in order to assess exploratory

activity. Animals were placed on the center quadrant of a round open field (56 cm diameter) with the floor divided into ten equal areas. An observer, who was not aware of the pharmacological treatments, manually recorded the number of crossing and rearing responses over 5 min. Crossing was defined as the total number of areas crossed with the four paws, and rearing was defined as the total number of stand up responses on two paws. This test was carried out to identify possible motor disabilities that might have influenced inhibitory avoidance performance at testing.

**Experiment 1: determination of the time window for the state dependency induced by arcaine and morphine**

This experiment was designated to determine the time window in which arcaine and morphine state dependency develops and the importance of the contingency of endogenous state and learning. For this purpose, the animals received arcaine (30 mg/kg), morphine (5 mg/kg), or saline 0, 3, 6, or 9 h after training and 30 min before testing.

**Experiment 2: transfer of arcaine-induced state dependency to morphine**

In this experiment, we investigated whether the reversal of the impairment of IA performance induced by the post-training injection of arcaine is transferred to morphine. The animals were randomly assigned to one of seven groups, wherein each animal received two injections: the first 0 h post-training and the second 30 min before testing, respectively: saline and saline (Sal/Sal), arcaine (30 mg/kg) and saline (Arc/Sal), arcaine and arcaine (Arc/Arc), arcaine and morphine (5 mg/kg; Arc/Mor), morphine and saline (Mor/Sal), morphine and morphine (Mor/Mor), and morphine and arcaine (Mor/Arc).

**Experiment 3: effect of naloxone (nonselective opioid antagonist) on morphine-induced state dependency**

In order to confirm the involvement of opioid receptors in morphine-induced state-dependent learning, the animals were injected with morphine (5 mg/kg) or saline immediately after training, the opioid receptor antagonist, naloxone (2 mg/kg, i.p.) or saline 3 min after training or naloxone (1 mg/kg) 1 h pre-test, and morphine (5 mg/kg) or saline 30 min before testing.

**Experiment 4: effect of naloxone on arcaine-induced state dependency**

In this experiment, we investigated whether naloxone reverses arcaine-induced state dependency. The animals

received arcaine (30 mg/kg) or saline immediately after training, naloxone (2 mg/kg) or saline 3 min after training or naloxone (1 mg/kg) 1 h pre-test, and arcaine (30 mg/kg) or saline 30 min before testing.

**Experiment 5: determination whether arcaine- and morphine-induced state dependency is additive**

In this experiment, we determined whether arcaine- and morphine-induced state dependency is additive by administering low (non-effective) doses of these compounds. The animals received saline, arcaine (10 mg/kg), morphine (1.5 mg/kg), or arcaine plus morphine (10 and 1.5 mg/kg, respectively) immediately after training and 30 min before testing.

**Statistics**

Retention latencies are expressed as the median and interquartile range. Statistical analysis of test step-down latencies was carried out by Kruskal–Wallis followed by post hoc analyses (nonparametric Dunn's test). Crossing and rearing responses were analyzed by one-way ANOVA. A  $p_{\alpha} < 0.05$  was used as the criterion for statistical significance.

## Results

### Experiment 1

Figure 1 shows the effect of arcaine (30 mg/kg) 0 (a), 3 (b), 6 (c), and 9 h (d) after training and 30 min before testing on step-down latencies at testing. Statistical analysis revealed a significant difference between groups:  $H(3) = 20.49$ ,  $p < 0.05$  (a);  $H(3) = 20.29$ ,  $p < 0.05$  (b);  $H(3) = 21.26$ ,  $p < 0.05$  (c); and  $H(3) = 11.57$ ,  $p < 0.05$  (d). Post hoc analysis revealed that arcaine injection 0, 3, 6, and 9 h post-training (Arc/Sal group) reduces step-down latencies at testing. Arcaine injection 30 min before testing did not alter step-down latencies but reversed the performance deficit induced by 0, 3, and 6 h post-training administration of arcaine (Arc/Arc group). These results indicate that arcaine induces state dependency up to 6 h, but not at 9 h post-training.

Figure 2 shows the effect of the intraperitoneal administration of morphine (5 mg/kg) or vehicle a, b, c, and d after training and 30 min before testing on step-down latencies at testing. Statistical analysis revealed a significant difference between groups:  $H(3) = 23.44$ ,  $p < 0.05$  (a);  $H(3) = 23.23$ ,  $p < 0.05$  (b);  $H(3) = 24.12$ ,  $p < 0.05$  (c); and  $H(3) = 21.01$ ,  $p < 0.05$  (d). Post hoc analysis revealed that morphine injection 0, 3, 6, and 9 h after training (Mor/Sal groups) or 30 min before

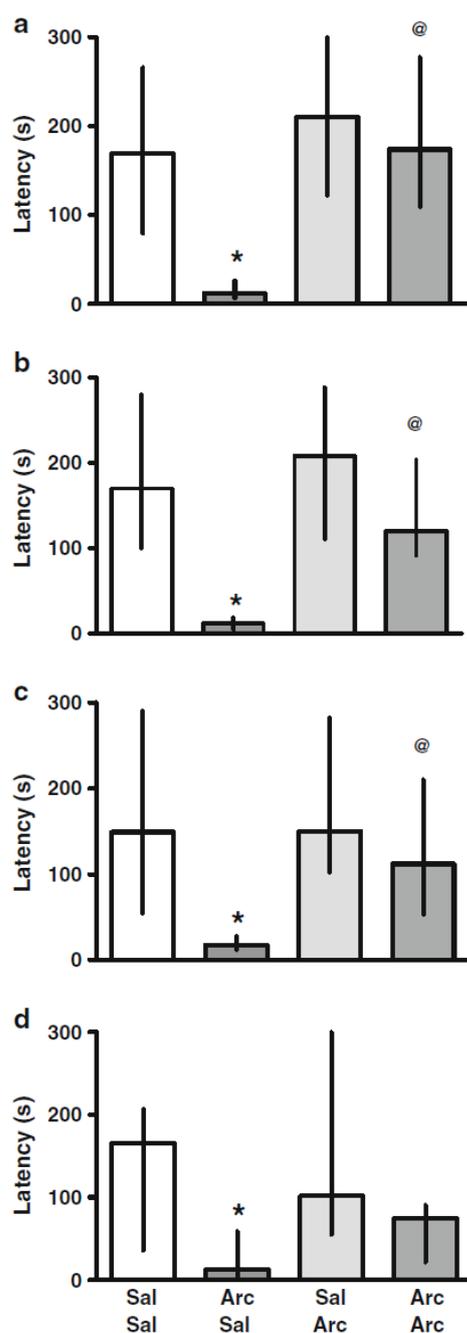


Fig. 1 Effect of vehicle (saline, *Sal*) or arcaine (*Arc*; 30 mg/kg) 0 (a), 3 (b), 6 h (c), and 9 h (d) after training and 30 min before testing on test step-down latency (s). Data are median  $\pm$  interquartile range for 9–11 animals in each group. \* $p < 0.05$  compared to control group (Sal/Sal), @ $p < 0.05$  compared to Arc/Sal group

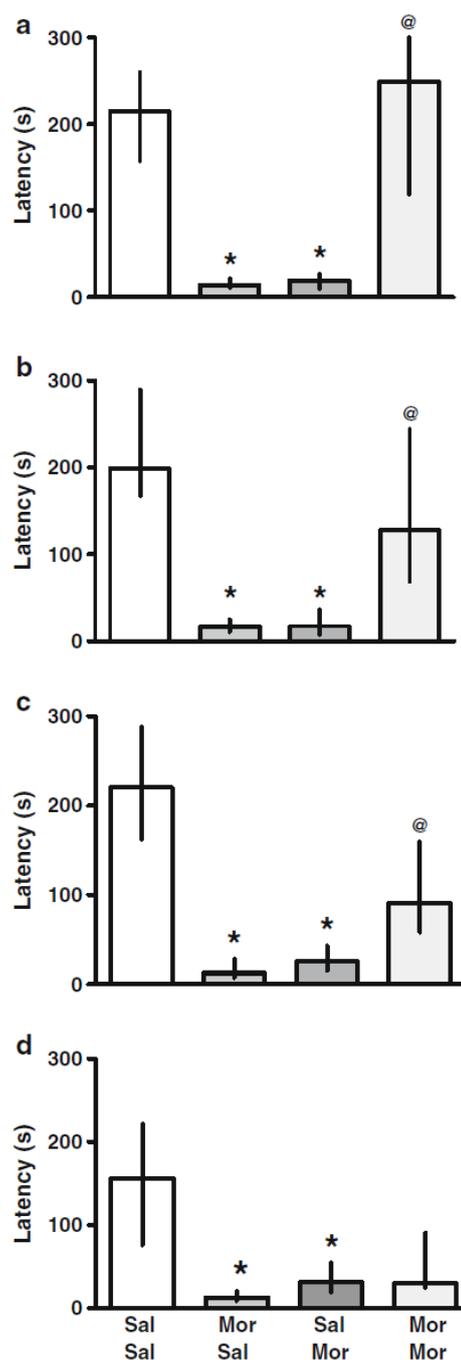


Fig. 2 Effect of vehicle (saline, *Sal*) or morphine (*Mor*; 5 mg/kg) 0 (a), 3 (b), 6 (c), and 9 h (d) after training and 30 min before testing on test step-down latency (s). Data are median  $\pm$  interquartile range for 8–11 animals in each group. \* $p < 0.05$  compared to control group (Sal/Sal), @ $p < 0.05$  compared to Mor/Sal and Sal/Mor groups

testing (Sal/Mor group) reduces step-down latencies at testing. Morphine injection 30 min before testing reversed the performance deficit induced by the administration of

morphine 0, 3, and 6 h but not 9 h post-training (Mor/Mor group). These results show that morphine induces state dependency when injected up to 6 h after training.

Experiment 2

Figure 3 shows the transfer of arcaine-induced state dependency to morphine. Statistical analysis (Kruskal–Wallis  $H$  test) revealed a significant effect of treatment:  $H(6)=28.41, p<0.05$ . Multiple comparison analysis revealed that post-training administration of arcaine (Arc/Sal group) and morphine (Mor/Sal group) reduced step-down latencies at testing and that pre-test administration of arcaine and morphine reversed the deleterious effect of the post-training administration of arcaine and morphine, respectively (Arc/Arc and Mor/Mor groups). These data confirm that arcaine and morphine cause state-dependent learning, as demonstrated in experiment 1. In addition, the administration of morphine 30 min before testing reversed the performance deficit induced by the post-training administration of arcaine. Similarly, the administration of arcaine 30 min before testing reversed the performance impairment induced by the post-training administration of morphine, demonstrating the transfer of the reversal of arcaine-induced impairment of IA to morphine and vice versa.

Experiment 3

Figure 4 shows the effect of naloxone (a nonselective opioid antagonist) on morphine-induced state dependency. Statistical analysis revealed a significant effect of treatment:  $H(7)=46.65, p<0.05$  (a) and  $H(7)=58.26, p<0.05$  (b). Post hoc analysis revealed that post-training and pre-test administration of morphine (Mor/Sal/Sal and Sal/Sal/Mor groups) reduced step-down latencies at testing. The analysis also demonstrated that post-training administration of naloxone (2 mg/kg, 3 min after training; Fig. 4a) reverses the performance deficit induced by the post-training or pre-

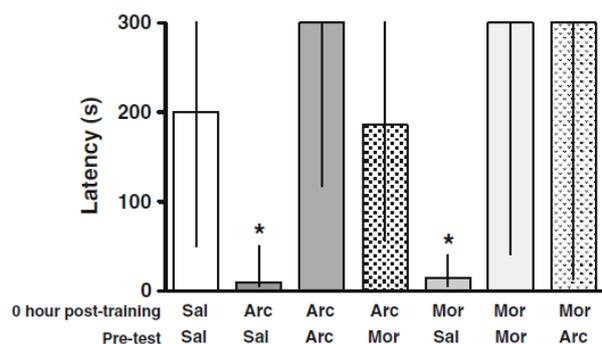


Fig. 3 Effect of vehicle (saline, Sal), arcaine (Arc; 30 mg/kg), or morphine (Mor; 5 mg/kg) 0 h post-training and 30 min before testing on test step-down latency (s). Data are median  $\pm$  interquartile range for 11 animals in each group. \* $p<0.05$  compared to control group (Sal/Sal)

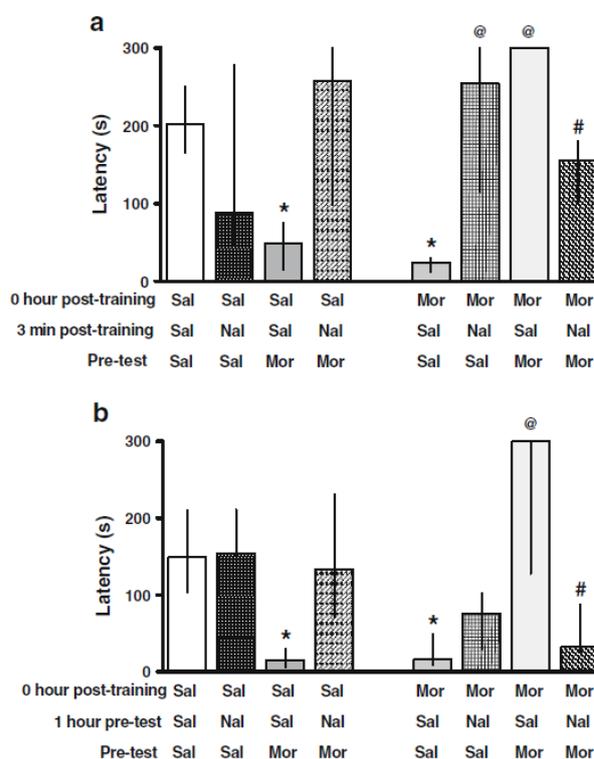


Fig. 4 Effect of naloxone (Nal; 2 mg/kg) 3 min after training (a) and naloxone (1 mg/kg) 1 h before testing (b) on morphine-induced state dependency. Data are the median  $\pm$  interquartile range for 10–11 animals in each group. \* $p<0.05$  compared to control group (Sal/Sal/Sal), @ $p<0.05$  compared to Sal/Sal/Mor and Mor/Sal/Sal groups, and # $p<0.05$  compared to Mor/Sal/Mor group

test injection of morphine (Mor/Nal/Sal and Sal/Nal/Mor groups). Naloxone (1 mg/kg; Fig. 4b) administration 1 h before testing reversed the performance deficit induced by the pre-test injection of morphine (Sal/Nal/Mor group) but did not reverse the performance deficit induced by the post-training injection of morphine (Mor/Nal/Sal group). Interestingly, post-training or pre-test administration of naloxone attenuated morphine-induced state dependency (Mor/Nal/Mor group).

Experiment 4

Figure 5 shows the effect of naloxone on arcaine-induced state dependency. Statistical analysis revealed a significant effect of treatment:  $H(7)=41.62, p<0.05$  (a) and  $H(7)=42.58, p<0.05$  (b). Post hoc analysis revealed that post-training administration of arcaine (Arc/Sal/Sal group) reduced step-down latencies at testing. The analysis also indicated that post-training administration of naloxone (2 mg/kg, 3 min after training; Fig. 5a) reverses the

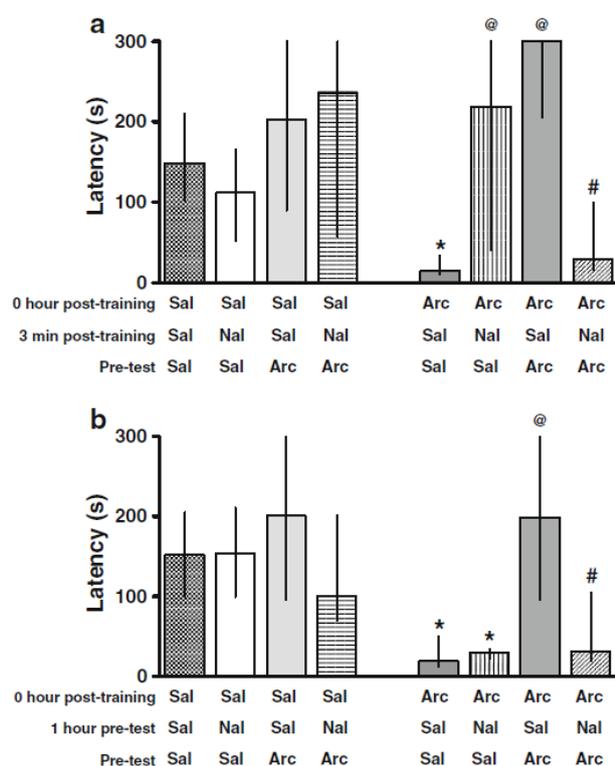


Fig. 5 Effect of naloxone (*Nal*; 2 mg/kg) 3 min after training (a) and naloxone (1 mg/kg) 1 h pre-test (b) on arcaine-induced state dependency. Data are the median  $\pm$  interquartile range for 11–12 animals in each group. \* $p < 0.05$  compared to control group (Sal/Sal/Sal), @ $p < 0.05$  compared to Arc/Sal/Sal group, and # $p < 0.05$  compared to Arc/Sal/Arc group

performance deficit induced by the injection of arcaine immediately after training (Arc/Nal/Sal group). The administration of naloxone (1 mg/kg; Fig. 5b) 1 h before testing did not reverse the performance deficit induced by the post-training injection of arcaine (Arc/Nal/Sal group). In addition, the post-training administration of naloxone reversed the state dependency induced by arcaine (Arc/Nal/Arc group). These results suggest that the impairment of memory and the state dependency induced by arcaine involves opioid receptors.

### Experiment 5

Figure 6 shows that association of low, non-effective doses of arcaine and morphine causes state dependency  $H(6) = 19.41$ ,  $p < 0.05$ , indicating that the effects of arcaine and morphine on state-dependent learning are additive.

### Open-field evaluation

Immediately after IA testing sessions, the animals were subjected to an open-field session, which revealed that

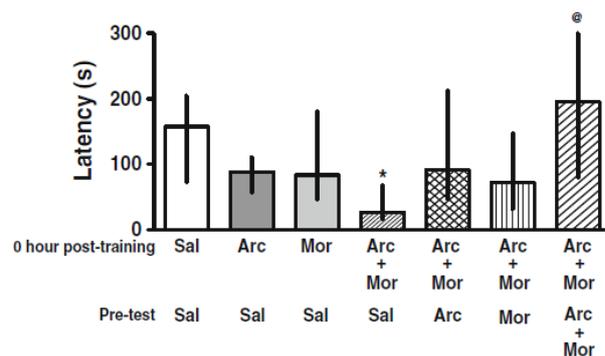


Fig. 6 Effect of vehicle (saline, *Sal*), arcaine (*Arc*; 10 mg/kg), morphine (*Mor*; 1.5 mg/kg) or arcaine plus morphine (Arc + Mor) 0 h post-training and 30 min before testing on test step-down latency (s). Data are median  $\pm$  interquartile range for ten animals in each group. \* $p < 0.05$  compared to control group (Sal/Sal) and @ $p < 0.05$  compared to Arc + Mor/Sal group

pharmacological treatment did not alter spontaneous locomotor activity (Supplemental Tables S1, S2, S3, S4, and S5).

### Discussion

The main findings of the current study were as follows: (a) The administration of arcaine or morphine 0, 3, 6, or 9 h post-training impaired the performance of the animals in a subsequent testing session performed 24 h later; (b) the respective administration of morphine or arcaine before testing reverted the deleterious effect of the administration of morphine or arcaine 0, 3, and 6 but not 9 h after training on the performance of the animals at testing, configuring opioid, and polyamine antagonist state dependencies; (c) state dependency to arcaine was fully transferred to morphine and vice versa; (d) the association of low, non-effective doses of arcaine and morphine causes state dependency; and (e) the post-training or pre-test administration of naloxone reverted the deleterious effect of the opioid and of the polyamine antagonist on the performance of the animals in the testing session because it prevented the establishment of state dependency both to the opioid and the polyamine antagonist.

It has been widely accepted that the contingency between endogenous state and learning is required for state-dependent memory. Nevertheless, accumulating evidence supports that state dependency also ensues if pharmacological treatment is given after training, namely during the consolidation of the memory of the task (Netto and Maltchik 1991; Zarrindast et al. 2007). In this context, it is reasonable to suppose that (1) delaying drug injections would impair state dependency by disrupting contingency and (2) if arcaine and morphine impaired performance at

testing by interfering in the same (state dependency-related) mechanisms, they should share the same time-dependency profile. The experiments shown in Figs. 1 and 2 determine the time window in which arcaine- and morphine-induced state dependency occurs and provide experimental evidence for the importance of the contingency between drug and learning (or early consolidation) for state-dependent memory. As expected from previous studies, the shorter was the period between training and morphine or arcaine treatment, the more efficient were the drugs to cause state dependency. On the other hand, the IA performance impairment caused by the delayed (9-h) administration of morphine or arcaine is not related to state dependency, since it was not reverted by the respective administration of pre-test morphine or arcaine. One might argue that delayed (9-h) morphine may have impaired the retrieval of the task. This possibility sounds unlikely because the  $T_{1/2}$  for morphine is approximately 45 min in naïve rats (Miyamoto et al. 1988). Consequently, negligible concentrations of morphine in the serum and in the brain would be expected after 15 h, at testing.

Interestingly, similar delayed pharmacological interference on memory (12–24 h post-training) has been recently reported in the ventral tegmental area (Rossato et al. 2009) and in the hippocampus (Bethus et al. 2010; Katche et al. 2010) and has been implicated in memory persistence (Wang et al. 2010). Therefore, it is possible that delayed systemic morphine or arcaine injection have altered or modulated memory persistence of the task.

These experiments, particularly those in which there was a contingency between drug and learning, confirmed the fairly known phenomenon of morphine-induced state-dependent memory retrieval (Izquierdo and Dias 1983, 1985) and the recently reported similar effect for arcaine (Ceretta et al. 2008). Interestingly, in these experiments, an amnesic effect for pre-testing injection of morphine, but not of arcaine, was observed. The lack of effect of negative modulators of NMDARs on memory retrieval (Rezayof et al. 2008; Roesler et al. 2006) in the absence of pharmacological intervention around training is in agreement with our results that pre-test systemic injection of a putative antagonist of the polyamine binding site at the NMDAR does not alter memory retrieval (Ceretta et al. 2008). However, if animals are treated with arcaine immediately after training, asymmetric state dependency for arcaine ensues (Figs. 1, 3, and 5; Ceretta et al. 2008). Asymmetrical state dependency, first described and commented by Berger, was reported for other drugs, such as scopolamine and lorazepam (Berger and Stein 1969).

Additional evidence for an interaction between the NMDAR antagonist and the opioid system comes from the experiments depicted in Fig. 3, which shows that state dependency to arcaine is fully transferred to morphine and

vice versa. The transfer of response between different agents has been argued as experimental evidence supporting common mechanisms of action (Jackson et al. 1992). Although no study has addressed whether arcaine interacts with opioid receptors and vice versa, [ $^3$ H]ifenprodil binding is displaced by arcaine, but not by morphine (Hashimoto et al. 1994), suggesting different pharmacological targets for these compounds, at the receptor level.

Notwithstanding, one should also look for common mechanisms beyond receptor level that could be elicited by both morphine and arcaine and result in similar cellular and behavioral responses. In this context, the NMDAR is known to activate nitric oxide synthase and cGMP production, effects that are attenuated by NMDAR antagonists (Girouard et al. 2009; Lourenco et al. 2010), such as arcaine. It is also noteworthy that arcaine competitively inhibits NOS activity (Yokoi et al. 1994), a pharmacological property that could decrease NO/cGMP-mediated actions, though experimental evidence for such an effect of arcaine *in vivo* is still missing. Interestingly, naloxone increases cGMP production, an effect that is abolished by morphine (Pu et al. 1997). Pu et al. (1997) have also shown axo-somatic and axo-dendritic synaptic connections between beta-endorphin and NOS-immunopositive networks in the hypothalamus and medial septum and have suggested that naloxone-induced cGMP production was due to blockade of endogenous opioid mechanisms. Curiously, the septum is fundamental for electroconvulsive shock-induced amnesia, which is naloxone reversible (Netto and Izquierdo 1985).

If a decrease in NO/cGMP signaling was the common mechanism shared by arcaine and morphine that allowed the transfer of the avoidance response, one should expect that other agents capable of reducing NO/cGMP production, such as NOS inhibitors, would cause the same effect. Accordingly, morphine-induced state dependency transfers to L-NAME, an effect that is counteracted by the co-administration of L-arginine (Khavandgar et al. 2003).

A role for opioid receptors in the currently described state dependency to arcaine is further supported by the findings shown in Figs. 4 and 5 that show that post-training (a) and pre-test (b) naloxone reverted not only the deleterious effect of the post-training administration of morphine and arcaine on the performance at testing but also the state dependency induced by the post-training injection of these compounds. The reversal of morphine-induced state dependency by naloxone is in agreement with the studies by Bruins Slot and Colpaert (1999) and Khavandgar et al. (2001), who have described that early pre-test administration of naloxone prevents morphine-induced state dependency (Bruins Slot and Colpaert 1999; Khavandgar et al. 2001). Moreover, low and ineffective doses of arcaine and morphine had additive effect, causing state dependency to the same degree of that caused by full doses of arcaine and morphine (Fig. 6).

One intriguing result obtained in this study was that post-training injection of naloxone prevented the impairment of performance induced by pre-test injection of morphine (Fig. 4a). One might argue that a residual amount of naloxone at testing could have prevented the effect of pre-test morphine, particularly if considered the dose used in the current study (2 mg/kg), which is higher than the doses used in other studies (0.15–1 mg/kg, pre-test before morphine to prevent morphine-induced state dependency; Bruins Slot and Colpaert 1999; Khavandgar et al. 2001; Nishimura et al. 1990; Zarrindast and Rezayof 2004). However, this possibility sounds unlikely, since the  $T_{1/2}$  for naloxone in rats is approximately 30 min (Ngai et al. 1976), and morphine injection was carried out approximately 23 h later, when naloxone concentrations would be negligible. Other possibilities, such as lack of effect of pre-test morphine (Khavandgar et al. 2003) and a facilitatory effect of post-training naloxone (Izquierdo 1979), are also improbable, given that the Sal/Sal/Mor group presented shorter latencies than Sal/Sal/Sal group and Sal/Nal/Sal did not differ from Sal/Sal/Sal group. It is clear, however, that 3-min post-training naloxone administration antagonizes the amnesic effect of immediately post-training morphine (an expected response for an opioid antagonist) and disrupts the effects (facilitatory and inhibitory) of pre-test morphine, making retrieval insensitive to opioid agonist manipulation. Interestingly, the same applies for arcaine, since post-training naloxone also antagonized the amnesic effect of immediately post-training arcaine (an expected response for an opioid antagonist if this was an opioid-mediated response) and disrupted the facilitatory effect of pre-test arcaine, making retrieval insensitive to arcaine. Considering the overall results of these experiments, one might conclude that consolidating the task in the absence of opioid tonus (presence of naloxone) makes recall also opioid-independent, what could be considered a form of state dependency.

In summary, in this study we present experimental evidence suggesting that opioid mechanisms play a role in the state-dependent memory induced by arcaine and that morphine- and arcaine-induced state dependency may occur if drugs are given up to 6 h after training.

**Acknowledgments** This study was supported by CNPq and CAPES. All the experiments comply with the current laws of Brazil.

## References

- Ahmadi S, Zarrindast MR, Nouri M, Haeri-Rohani A, Rezayof A (2007) N-Methyl-D-aspartate receptors in the ventral tegmental area are involved in retrieval of inhibitory avoidance memory by nicotine. *Neurobiol Learn Mem* 88:352–358
- Berger BD, Stein L (1969) Asymmetrical dissociation of learning between scopolamine and Wy 4036, a new benzodiazepine tranquilizer. *Psychopharmacologia* 14:351–358
- Berlese DB, Sauzem PD, Carati MC, Guerra GP, Stiegemeier JA, Mello CF, Rubin MA (2005) Time-dependent modulation of inhibitory avoidance memory by spermidine in rats. *Neurobiol Learn Mem* 83:48–53
- Bethus I, Tse D, Morris RG (2010) Dopamine and memory: modulation of the persistence of memory for novel hippocampal NMDA receptor-dependent paired associates. *J Neurosci* 30:1610–1618
- Bodnar RJ (2009) Endogenous opiates and behavior: 2008. *Peptides* 30:2432–2479
- Bruins Slot LA, Colpaert FC (1999) Opiate states of memory: receptor mechanisms. *J Neurosci* 19:10520–10529
- Camera K, Mello CF, Ceretta AP, Rubin MA (2007) Systemic administration of polyaminergic agents modulate fear conditioning in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 192:457–464
- Castellano C (1975) Effects of morphine and heroin on discrimination learning and consolidation in mice. *Psychopharmacologia* 42:235–242
- Ceretta AP, Camera K, Mello CF, Rubin MA (2008) Arcaine and MK-801 make recall state-dependent in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 201:405–411
- Cestari V, Castellano C (1997) MK-801 potentiates morphine-induced impairment of memory consolidation in mice: involvement of dopaminergic mechanisms. *Psychopharmacology (Berl)* 133:1–6
- Girouard H, Wang G, Gallo EF, Anrather J, Zhou P, Pickel VM, Iadecola C (2009) NMDA receptor activation increases free radical production through nitric oxide and NOX2. *J Neurosci* 29:2545–2552
- Gomes GM, Mello CF, Rosa MM, Bochi GV, Ferreira J, Barron S, Rubin MA (2010) Polyaminergic agents modulate contextual fear extinction in rats. *Neurobiol Learn Mem* 93:589–595
- Guerra GP, Mello CF, Sauzem PD, Berlese DB, Furian AF, Tabarelli Z, Rubin MA (2006) Nitric oxide is involved in the memory facilitation induced by spermidine in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 186:150–158
- Harrod SB, Flint RW, Riccio DC (2001) MK-801 induced retrieval, but not acquisition, deficits for passive avoidance conditioning. *Pharmacol Biochem Behav* 69:585–593
- Hashimoto K, Mantione CR, Spada MR, Neumeyer JL, London ED (1994) Further characterization of [3H]ifenprodil binding in rat brain. *Eur J Pharmacol* 266:67–77
- Izquierdo I (1979) Effect of naloxone and morphine on various forms of memory in the rat: possible role of endogenous opiate mechanisms in memory consolidation. *Psychopharmacology (Berl)* 66:199–203
- Izquierdo I, Dias RD (1983) Effect of ACTH, epinephrine, beta-endorphin, naloxone, and of the combination of naloxone or beta-endorphin with ACTH or epinephrine on memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology* 8:81–87
- Izquierdo I, Dias RD (1985) Influence on memory of posttraining or pre-test injections of ACTH, vasopressin, epinephrine, and beta-endorphin, and their interaction with naloxone. *Psychoneuroendocrinology* 10:165–172
- Jackson A, Koek W, Colpaert FC (1992) NMDA antagonists make learning and recall state-dependent. *Behav Pharmacol* 3:415–421
- Katche C, Bekinschtein P, Slipczuk L, Goldin A, Izquierdo IA, Cammarota M, Medina JH (2010) Delayed wave of c-Fos expression in the dorsal hippocampus involved specifically in persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:349–354
- Khalilzadeh A, Zarrindast MR, Djahanguiri B (2006) Effects of intracerebroventricular administration of ultra low doses of histaminergic drugs on morphine state-dependent memory of passive avoidance in mice. *Behav Brain Res* 166:184–187
- Khavandgar S, Homayoun H, Torkaman-Boutorabi A, Zarrindast MR (2001) The effects of adenosine receptor agonists and antagonists

- on morphine state-dependent memory of passive avoidance. *Neurobiol Learn Mem* 78:390–405
- Khavandgar S, Homayoun H, Zarrindast MR (2003) The effect of L-NAME and L-arginine on impairment of memory formation and state-dependent learning induced by morphine in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 167:291–296
- Lourenco CF, Santos R, Barbosa RM, Gerhardt G, Cadenas E, Laranjinha J (2010) In vivo modulation of nitric oxide concentration dynamics upon glutamatergic neuronal activation in the hippocampus. *Hippocampus* (in press)
- Miyamoto Y, Ozaki M, Yamamoto H (1988) Effects of adrenalectomy on pharmacokinetics and antinociceptive activity of morphine in rats. *Jpn J Pharmacol* 46:379–386
- Netto CA, Izquierdo I (1985) Posterior hypothalamic deafferentation abolishes the amnesic effect of electroconvulsive shock in rats. *Psychoneuroendocrinology* 10:159–163
- Netto CA, Maltchik M (1991) Retrieval effects of beta-endorphin and naloxone, and the novelty-induced antinociception in the developing rat. *Behav Neural Biol* 55:366–379
- Ngai SH, Berkowitz BA, Yang JC, Hempstead J, Spector S (1976) Pharmacokinetics of naloxone in rats and in man: basis for its potency and short duration of action. *Anesthesiology* 44:398–401
- Nishimura M, Shiigi Y, Kaneto H (1990) State dependent and/or direct memory retrieval by morphine in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 100:27–30
- Overton DA (1964) State-dependent or “dissociated” learning produced with pentobarbital. *J Comp Physiol Psychol* 57:3–12
- Pellegrini-Giampietro DE (2003) An activity-dependent spermine-mediated mechanism that modulates glutamate transmission. *Trends Neurosci* 26:9–11
- Pu S, Horvath TL, Diano S, Naftolin F, Kalra PS, Kalra SP (1997) Evidence showing that beta-endorphin regulates cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate (cGMP) efflux: anatomical and functional support for an interaction between opiates and nitric oxide. *Endocrinology* 138:1537–1543
- Ransom RW, Stec NL (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
- Rezayof A, Amini R, Rassouli Y, Zarrindast MR (2006) Influence of nitric oxide on morphine-induced amnesia and interactions with dopaminergic receptor agents. *Physiol Behav* 88:124–131
- Rezayof A, Sharifi K, Zarrindast MR, Rassouli Y (2008) Modulation of ethanol state-dependent learning by dorsal hippocampal NMDA receptors in mice. *Alcohol* 42:667–674
- Riccio DC, Millin PM, Bogart AR (2006) Reconsolidation: a brief history, a retrieval view, and some recent issues. *Learn Mem* 13:536–544
- Rock DM, Macdonald RL (1995) Polyamine regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35:463–482
- Roesler R, Vianna MR, Schroder N, Ferreira MB, Quevedo J (2006) Aversive learning under different training conditions: effects of NMDA receptor blockade in area CA1 of the hippocampus. *Neurochem Res* 31:679–683
- Rossato JI, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH, Cammarota M (2009) Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science* 325:1017–1020
- Rubin MA, Boemo RL, Jurach A, Rojas DB, Zanolla GR, Obregon AD, Souza DO, Mello CF (2000) Intrahippocampal spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. *Behav Pharmacol* 11:57–61
- Rubin MA, Stiegemeier JA, Volkweis MA, Oliveira DM, Fenili AC, Boemo RL, Jurach A, Mello CF (2001) Intra-amygdala spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. *Eur J Pharmacol* 423:35–39
- Rubin MA, Berlese DB, Stiegemeier JA, Volkweis MA, Oliveira DM, dos Santos TL, Fenili AC, Mello CF (2004) Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats. *J Neurosci* 24:2328–2334
- Scott RH, Sutton KG, Dolphin AC (1993) Interactions of polyamines with neuronal ion channels. *Trends Neurosci* 16:153–160
- Shimada A, Spangler EL, London ED, Ingram DK (1994) Spermidine potentiates dizocilpine-induced impairment of learning performance by rats in a 14-unit T-maze. *Eur J Pharmacol* 263:293–300
- Velloso NA, Dalmolin GD, Gomes GM, Rubin MA, Canas PM, Cunha RA, Mello CF (2009) Spermine improves recognition memory deficit in a rodent model of Huntington's disease. *Neurobiol Learn Mem* 92:574–580
- Wang SH, Redondo RL, Morris RG (2010) Relevance of synaptic tagging and capture to the persistence of long-term potentiation and everyday spatial memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:19537–19542
- Williams K (1997) Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem J* 325(Pt 2):289–297
- Williams K, Romano C, Dichter MA, Molinoff PB (1991) Modulation of the NMDA receptor by polyamines. *Life Sci* 48:469–498
- Yokoi I, Kabuto H, Habu H, Inada K, Toma J, Mori A (1994) Structure–activity relationships of arginine analogues on nitric oxide synthase activity in the rat brain. *Neuropharmacology* 33:1261–1265
- Zarrindast MR, Rezayof A (2004) Morphine state-dependent learning: sensitization and interactions with dopamine receptors. *Eur J Pharmacol* 497:197–204
- Zarrindast MR, Jafari MR, Ahmadi S, Djahanguiri B (2004) Influence of central administration ATP-dependent K<sup>+</sup> channel on morphine state-dependent memory of passive avoidance. *Eur J Pharmacol* 487:143–148
- Zarrindast MR, Askari E, Khalilzadeh A, Nouraei N (2006a) Morphine state-dependent learning sensitization and interaction with nitric oxide. *Pharmacology* 78:66–71
- Zarrindast MR, Bananej M, Khalilzadeh A, Fazli-Tabaei S, Haeri-Rohani A, Rezayof A (2006b) Influence of intracerebroventricular administration of dopaminergic drugs on morphine state-dependent memory in the step-down passive avoidance test. *Neurobiol Learn Mem* 86:286–292
- Zarrindast MR, Jafari-Sabet M, Rezayat M, Djahanguiri B, Rezayof A (2006c) Involvement of NMDA receptors in morphine state-dependent learning in mice. *Int J Neurosci* 116:731–743
- Zarrindast MR, Shendy MM, Ahmadi S (2007) Nitric oxide modulates state dependency induced by lithium in an inhibitory avoidance task in mice. *Behav Pharmacol* 18:289–295

## **5. DISCUSSÃO**

---

## **5. Discussão**

O presente estudo teve como propósito pesquisar se a dependência de estado induzida pela arcaína envolve o sistema opióide.

Os resultados encontrados demonstram que a administração sistêmica de arcaína ou morfina 0, 3, 6, 9 horas pós-treino prejudicou o desempenho dos animais na tarefa de esquia inibitória no dia do teste. A administração de arcaína ou morfina pré-teste reverteu o efeito amnésico induzida pela administração de arcaína e morfina 0, 3 e 6, mas não 9 horas pós-treino, o que caracteriza a dependência de estado causada pela morfina, agonista opióide e pela arcaína, antagonista das poliaminas. Também foi demonstrado que a dependência de estado causada pela arcaína foi transferida para a morfina, e vice-versa. A associação de baixa e ineficaz dose de arcaína e morfina causaram dependência de estado. Além disso, a administração de naloxona (2 mg/kg, 3 min pós-treino ou 1 mg/kg, uma hora pré-teste), reverteu o efeito deletério e a dependência de estado induzida pela morfina e arcaína na sessão do teste.

Nos experimentos 1 e 2, os quais determinam a janela de tempo em que a arcaína e morfina induzem dependência de estado, demonstram que tanto a dependência de estado induzida pela arcaína como de morfina, ocorrem na mesma janela temporal. Isto sugere que ambos devem partilhar seu mecanismo de dependência de estado ao mesmo tempo. Além disso, é visto que a administração 9 horas pós-treino de arcaína ou morfina prejudicou o desempenho dos animais na sessão do teste por um mecanismo que não está relacionado com a dependência de estado, uma vez que não é revertida pela

respectiva administração pré-teste de arcaína ou morfina. Esses dados confirmam o fenômeno de dependência de estado a recuperação da informação obtida em um aprendizado vai exigir que o organismo esteja em um estado semelhante aquele em que a informação foi inicialmente adquirida; isto pode ser observado tanto para morfina (Izquierdo and Dias 1983; 1985) e recentemente para arcaína (Ceretta et al. 2008). Curiosamente, nesses experimentos, um efeito amnésico causado pela injeção pré-teste de morfina, mas não de arcaína, foi observado. A ausência de efeito de moduladores negativos do receptor NMDA na recuperação da memória está de acordo com nossos resultados que a administração sistêmica pré-teste de arcaína não altera a recuperação da memória (Ceretta et al. 2008). Porém, se os animais são tratados com arcaína e morfina pós-treino (figuras 1, 3 e 5, e Ceretta et al. 2008) estes pioram a memória. A dependência de estado assimétrica foi descrita pela primeira vez por Berger, sendo relatada para outras drogas, como a escopolamina e lorazepam (Berger and Stein 1969).

Ceretta e colaboradores 2008 demonstraram que a dependência de estado induzida pela arcaína foi transferida para o MK-801 e vice-versa. Esta evidência apóia os achados do trabalho, uma vez que, a dependência de estado induzida pela arcaína foi transferida para a morfina e vice-versa. Além disso, outros trabalhos demonstraram que a dependência de estado causada pela morfina pode ser inibida pela administração de antagonista do receptor NMDA, como o AP-5, por exemplo (Ardjmand et al. 2011), o que sugere que a dependência de estado causada pela morfina e arcaína envolvem o sistema glutamatérgico. Outro ponto comum entre a arcaína e morfina, para explicar melhor estes resultados, é o fato de que a arcaína inibe a atividade da NOS no

cérebro de ratos, com isso contribuindo para a diminuição de NO/GMPc (Kabuto et al. 1995; Yokoi et al. 1994). Curiosamente, a infusão de naloxona no hipotálamo de ratos, aumenta a produção de GMPc, um efeito que é abolido pela morfina (Pu et al. 1997). Além disso, a administração pós-treino de L-arginina, a qual serve como substrato para a NOS, reverte a piora da memória causada pela administração pré-teste de morfina (Khavandgar et al. 2003).

Se um decréscimo na sinalização de NO/GMPc for o mecanismo comum partilhado pela arcaína e morfina, o qual poderia ter permitido a transferência da resposta, deve-se esperar que outros agentes que são capazes de reduzir a produção de NO/GMPc, como os inibidores da NOS, causem o mesmo efeito. Assim, a morfina transfere a resposta de dependência de estado para o L-NAME, um efeito que é neutralizado pela co-administração de L-arginina (Khavandgar et al. 2003).

Os resultados mostrados nas figuras 4 e 5 reforçam o envolvimento do sistema opióide na dependência de estado induzida pela arcaína, que mostram que administração de naloxona pós-treino (A) e pré-teste (B), não só reverteu a piora da memória causada pela administração pós-treino de morfina e arcaína, mas também a dependência de estado induzida pela injeção pós-treino destes compostos. Tem sido descrito que a administração de naloxona pré-teste inibe a dependência de estado causada pela morfina (Bruins Slot and Colpaert 1999 b).

Um resultado inesperado obtido no presente estudo foi que a injeção pós-treino de naloxona impediu o prejuízo do desempenho causado pela injeção pré-teste de morfina. O que é intrigante, uma vez que o T1/2 de naloxona em ratos é cerca de 30 min (Ngai et al. 1976), e a injeção de morfina

foi realizada aproximadamente 23 horas depois, quando as concentrações de naloxona seriam insignificantes. É claro, porém, que a administração de naloxona 3 min pós-treino antagonizou o efeito amnésico da morfina imediatamente pós-treino e impediu o da morfina de pré-teste, fazendo uma recuperação insensível a manipulação do agonista opióide. O mesmo se aplica para arcaína, uma vez que a naloxona pós-treino também antagonizou o efeito amnésico da arcaína imediatamente pós-treino, e impediu o efeito facilitador da arcaína pré-teste, tornando a recuperação insensível a arcaína.

Os experimentos em que a injeção pré-teste de naloxona bloqueou a dependência de estado causada pela arcaína e morfina (figuras 4B e 5B), apóiam a ideia de que a dependência de estado induzida pela arcaína envolve o sistema opióide. Além disso, a administração de dose baixa e ineficaz de arcaína e morfina, apresentaram efeito aditivo, induzindo dependência de estado com a mesma intensidade daquela causada por doses plenas de arcaína e morfina (fig 6).

Em resumo, neste estudo apresentamos evidências convincentes de que o mecanismo opióide desempenha um importante papel na memória de dependência de estado induzida pela arcaína e que a morfina e arcaína induzem dependência de estado quando são dadas até seis horas após o treino. No entanto devem ser realizados mais estudos, a fim de definir os mecanismos envolvidos na transferência de resposta entre arcaína e morfina.

## **6. CONCLUSÕES**

---

## **6. Conclusões**

Através da análise dos resultados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que:

1- A arcaína e a morfina induzem amnésia quando administradas zero, 3, 6 ou 9 horas pós-treino.

2- A arcaína e a morfina induzem dependência de estado zero, 3, ou 6 mas não 9 horas pós-treino.

3- A arcaína e a morfina induzem dependência de estado cruzada.

4- A dependência de estado induzida pela arcaína envolve o sistema opióide uma vez que a administração de naloxona (2 mg/kg, 3 min pós-treino, ou 1 mg/kg uma hora pré-teste, i.p), reverteu a amnésia e a dependência de estado induzidas pela arcaína e morfina.

5- A arcaína e morfina apresentam efeito aditivo e causam dependência de estado em baixas doses.

6- Nenhum dos tratamentos farmacológicos alterou a atividade locomotora e exploratória dos animais.

**7. Referências Bibliográficas**

---

## **7. Referências Bibliográficas**

- Leeuwenhoek AV (1978) Classic pages in obstetrics and gynecology. *Observationes...de natis e semine genitali animalculis*. Antoni Van Leeuwenhoek. *Philosophical Transactions of the Royal Society (London)*, vol. 12, pp. 1040-1043, 1678-1679. *Am J Obstet Gynecol* 131: 469-70
- Abel T, Lattal KM (2001) Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Opin Neurobiol* 11: 180-7
- Ahmadi S, Zarrindast MR, Nouri M, Haeri-Rohani A, Rezayof A (2007) N-Methyl-D-aspartate receptors in the ventral tegmental area are involved in retrieval of inhibitory avoidance memory by nicotine. *Neurobiol Learn Mem* 88: 352-8
- Anderson DJ, Crossland J, Shaw GG (1975) The actions of spermidine and spermine on the central nervous system. *Neuropharmacology* 14: 571-7
- Ardjmand A, Rezayof A, Zarrindast MR (2011) Involvement of central amygdala NMDA receptor mechanism in morphine state-dependent memory retrieval. *Neurosci Res*
- Ashby FG, O'Brien JB (2005) Category learning and multiple memory systems. *Trends Cogn Sci* 9: 83-9
- Berger BD, Stein L (1969) Asymmetrical dissociation of learning between scopolamine and Wy 4036, a new benzodiazepine tranquilizer. *Psychopharmacologia* 14: 351-8
- Berlese DB, Sauzem PD, Carati MC, Guerra GP, Stiegemeier JA, Mello CF, Rubin MA (2005) Time-dependent modulation of inhibitory avoidance memory by spermidine in rats. *Neurobiology of Learning and Memory* 83: 48-53
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31-9
- Bliss TV, Lomo T (1970) Plasticity in a monosynaptic cortical pathway. *J Physiol* 207: 61P
- Bodnar RJ (2009) Endogenous opiates and behavior. *Peptides* 31: 2325-59
- Bruins Slot LA, Colpaert FC (1999a) Opiate states of memory: receptor mechanisms. *J Neurosci* 19: 10520-9
- Bruins Slot LA, Colpaert FC (1999b) Recall rendered dependent on an opiate state. *Behav Neurosci* 113: 337-44
- Cahill L, McGaugh JL (1996) Modulation of memory storage. *Curr Opin Neurobiol* 6: 237-42
- Camera K, Mello CF, Ceretta AP, Rubin MA (2007) Systemic administration of polyaminergic agents modulate fear conditioning in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 192: 457-64
- Cammarota M, Bevilaqua LR, Barros DM, Vianna MR, Izquierdo LA, Medina JH, Izquierdo I (2005) Retrieval and the extinction of memory. *Cell Mol Neurobiol* 25: 465-74
- Casero RA, Jr., Pegg AE (1993) Spermidine/spermine N1-acetyltransferase--the turning point in polyamine metabolism. *Faseb J* 7: 653-61
- Ceretta AP, Camera K, Mello CF, Rubin MA (2008) Arcaine and MK-801 make recall state-dependent in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 201: 405-11

- Cestari V, Castellano C (1997) MK-801 potentiates morphine-induced impairment of memory consolidation in mice: involvement of dopaminergic mechanisms. *Psychopharmacology (Berl)* 133: 1-6
- Chen L, Huang LY (1992) Protein kinase C reduces Mg<sup>2+</sup> block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature* 356: 521-3
- Coffino P (2000) Polyamines in spermiogenesis: not now, darling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4421-3
- Conway EL (1998) Brain lesions and delayed water maze learning deficits after intracerebroventricular spermine. *Brain Res* 800: 10-20
- Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN (2004) Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE* 2004: re16
- Darbandi N, Rezayof A, Zarrindast MR (2008) Modulation of morphine state-dependent learning by muscarinic cholinergic receptors of the ventral tegmental area. *Physiol Behav* 94: 604-10
- de Wied D, Bohus B, van Ree JM, Urban I (1978) Behavioral and electrophysiological effects of peptides related to lipotropin (beta-LPH). *J Pharmacol Exp Ther* 204: 570-80
- Dunn AJ (1980) Neurochemistry of learning and memory: an evaluation of recent data. *Annu Rev Psychol* 31: 343-90
- Garthwaite J (1991) Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci* 14: 60-7
- Girouard H, Wang G, Gallo EF, Anrather J, Zhou P, Pickel VM, Iadecola C (2009) NMDA receptor activation increases free radical production through nitric oxide and NOX2. *J Neurosci* 29: 2545-52
- Gold PE, McCarty R (1981) Plasma catecholamines: changes after footshock and seizure-producing frontal cortex stimulation. *Behav Neural Biol* 31: 247-60
- Gold PE, Van Buskirk R (1976) Enhancement and impairment of memory processes with post-trial injections of adrenocorticotrophic hormone. *Behav Biol* 16: 387-400
- Gold PE, van Buskirk R (1978) Posttraining brain norepinephrine concentrations: correlation with retention performance of avoidance training and with peripheral epinephrine modulation of memory processing. *Behav Biol* 23: 509-20
- Gold PE, Van Buskirk RB (1975) Facilitation of time-dependent memory processes with posttrial epinephrine injections. *Behav Biol* 13: 145-53
- Gomes GM, Mello CF, Rosa MM, Bochi GV, Ferreira J, Barron S, Rubin MA (2010) Polyaminergic agents modulate contextual fear extinction in rats. *Neurobiol Learn Mem*
- Guerra GP, Mello CF, Sauzem PD, Berlese DB, Furian AF, Tabarelli Z, Rubin MA (2006) Nitric oxide is involved in the memory facilitation induced by spermidine in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 186: 150-8
- Gugliucci A (2004) Polyamines as clinical laboratory tools. *Clin Chim Acta* 344: 23-35
- Halonen T, Sivenius J, Miettinen R, Halmekyto M, Kauppinen R, Sinervirta R, Alakuijala L, Alhonen L, MacDonald E, Janne J, et al. (1993) Elevated seizure threshold and impaired spatial learning in transgenic mice with putrescine overproduction in the brain. *Eur J Neurosci* 5: 1233-9

- Hollmann M, Boulter J, Maron C, Heinemann S (1994) Molecular biology of glutamate receptors. Potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor splice variants by zinc. *Ren Physiol Biochem* 17: 182-3
- Hollmann M, Hartley M, Heinemann S (1991) Ca<sup>2+</sup> permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* 252: 851-3
- Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17: 31-108
- Houghoghi V, Rezayof A, Zyaian S, Zarrindast MR (2009) Intradorsal hippocampal microinjection of lithium reverses morphine-induced impairment of memory in mice: interactions with dopamine receptor mechanism(s). *Behav Pharmacol* 20: 680-7
- Hummeler E, Cole TJ, Blendy JA, Ganss R, Aguzzi A, Schmid W, Beermann F, Schutz G (1994) Targeted mutation of the CREB gene: compensation within the CREB/ATF family of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 5647-51
- Igarashi K, Kashiwagi K (2000) Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun* 271: 559-64
- Introuini-Collison IB, McGaugh JL (1988) Modulation of memory by post-training epinephrine: involvement of cholinergic mechanisms. *Psychopharmacology (Berl)* 94: 379-85
- Izquierdo I (1980) Effect of beta-endorphin and naloxone on acquisition, memory, and retrieval of shuttle avoidance and habituation learning in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 69: 111-5
- Izquierdo I (1984) Endogenous State dependency: memory depends on the relation between the neurohumoral and hormonal states present after training and the time of testing. In: Lynch G, Mcgaugh JL, Weinberger NM (eds) *Neurobiology of learning and memory*. Guilford, New York, p 333-350.
- Izquierdo, I., 2002. *Memória*, Porto Alegre.
- Izquierdo I (1982) The role of an endogenous amnesic mechanism mediated by brain beta-endorphin in memory modulation. *Braz J Med Biol Res* 15: 119-34
- Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M (2006) Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci* 29: 496-505
- Izquierdo I, Dias RD (1983) Effect of ACTH, epinephrine, beta-endorphin, naloxone, and of the combination of naloxone or beta-endorphin with ACTH or epinephrine on memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology* 8: 81-7
- Izquierdo I, Dias RD (1985) Influence on memory of posttraining or pre-test injections of ACTH, vasopressin, epinephrine, and beta-endorphin, and their interaction with naloxone. *Psychoneuroendocrinology* 10: 165-72
- Izquierdo I, Dias RD, Souza DO, Carrasco MA, Elisabetsky E, Perry ML (1980a) The role of opioid peptides in memory and learning. *Behav Brain Res* 1: 451-68
- Izquierdo I, McGaugh JL (1985) Effect of a novel experience prior to training or testing on retention of an inhibitory avoidance response in mice: involvement of an opioid system. *Behav Neural Biol* 44: 228-38

- Izquierdo I, Medina JH (1993) Role of the amygdala, hippocampus and entorhinal cortex in memory consolidation and expression. *Braz J Med Biol Res* 26: 573-89
- Izquierdo I, Medina JH (1995) Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiol Learn Mem* 63: 19-32
- Izquierdo I, Medina JH (1997) Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 68: 285-316
- Izquierdo I, Netto CA, Dalmaz C, Chaves ML, Pereira ME, Siegfried B (1988) construction and reconstruction of memories. *Braz J Med Biol Res* 21:9-25.
- Izquierdo I, Souza DO, Carrasco MA, Dias RD, Perry ML, Eisinger S, Elisabetsky E, Vendite DA (1980b) Beta-endorphin causes retrograde amnesia and is released from the rat brain by various forms of training and stimulation. *Psychopharmacology (Berl)* 70: 173-7
- Izquierdo I, Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM, Szapiro G, Coitinho AS, Muller L, Cammarota M, Bevilaqua LR, Medina JH (2002) Memory retrieval and its lasting consequences. *Neurotox Res* 4: 573-593
- Jackson A, Koek W, Colpaert FC (1992) NMDA antagonists make learning and recall state-dependent. *Behav Pharmacol* 3: 415-421
- Jancic D, Lopez de Armentia M, Valor LM, Olivares R, Barco A (2009) Inhibition of cAMP response element-binding protein reduces neuronal excitability and plasticity, and triggers neurodegeneration. *Cereb Cortex* 19: 2535-47
- Javitt DC, Zylberman I, Zukin SR, Heresco-Levy U, Lindenmayer JP (1994) Amelioration of negative symptoms in schizophrenia by glycine. *Am J Psychiatry* 151: 1234-6
- Johansson T, Elfverson M, Zhou Q, Nyberg F (2010) Allosteric modulation of the NMDA receptor by neurosteroids in rat brain and the impact of long term morphine administration. *Biochem Biophys Res Commun* 401: 504-8
- Johnson TD (1996) Modulation of channel function by polyamines. *Trends Pharmacol Sci* 17: 22-7
- Kabuto H, Yokoi I, Habu H, Asahara H, Mori A (1995) Inhibitory effect of arcaïne on nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroreport* 6: 554-6
- Kalac P, Krausová P (2005) A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chem* 90: 219-30
- Kerchner GA, Nicoll RA (2008) Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP. *Nat Rev Neurosci* 9: 813-25
- Khajehpour L, Rezayof A, Zarrindast MR (2008) Involvement of dorsal hippocampal nicotinic receptors in the effect of morphine on memory retrieval in passive avoidance task. *Eur J Pharmacol* 584: 343-51
- Khalilzadeh A, Zarrindast MR, Djahanguiri B (2006) Effects of intracerebroventricular administration of ultra low doses of histaminergic drugs on morphine state-dependent memory of passive avoidance in mice. *Behav Brain Res* 166: 184-7

- Khavandgar S, Homayoun H, Zarrindast MR (2003) The effect of L-NAME and L-arginine on impairment of memory formation and state-dependent learning induced by morphine in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 167: 291-6
- Kim JH, Richardson R (2009) The effect of the mu-opioid receptor antagonist naloxone on extinction of conditioned fear in the developing rat. *Learn Mem* 16: 161-6
- Kreek MJ, Laforge KS (2007) Stress responsivity addiction and a functional variant of the human Mu-opioid receptor gene. *7*: 74-8
- Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB, Jr., Charney DS (1994) Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry* 51: 199-214
- Lan JY, Skeberdis VA, Jover T, Grooms SY, Lin Y, Araneda RC, Zheng X, Bennett MV, Zukin RS (2001) Protein kinase C modulates NMDA receptor trafficking and gating. *Nat Neurosci* 4: 382-90
- Lees GV, Jones EG, Kandel E (2000) Expressive genes record memories. *Neurobiol Dis* 7: 533-6
- Liang KC, Juler RG, McGaugh JL (1986) Modulating effects of posttraining epinephrine on memory: involvement of the amygdala noradrenergic system. *Brain Res* 368: 125-33
- Lisman JE, Zhabotinsky AM (2001) A model of synaptic memory: a CaMKII/PP1 switch that potentiates transmission by organizing an AMPA receptor anchoring assembly. *Neuron* 31: 191-201
- Lledo PM, Hjelmstad GO, Mukherji S, Soderling TR, Malenka RC, Nicoll RA (1995) Calcium/calmodulin-dependent kinase II and long-term potentiation enhance synaptic transmission by the same mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 11175-9
- Lynch DR, Lawrence JJ, Lenz S, Anegawa NJ, Dichter M, Pritchett DB (1995) Pharmacological characterisation of heterodimeric NMDA receptors composed of NR1A and 2B subunits: differences with receptors formed from NR1A and 2A. *Neurochem* 1462:68-64
- MacDermott AB, Mayer ML, Westbrook GL, Smith SJ, Barker JL (1986) NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature* 321: 519-22
- McGaugh JL, Gold PE, Van Buskirk R, Haycock J (1975) Modulating influences of hormones and catecholamines on memory storage processes. *Prog Brain Res* 42: 151-62
- McGaugh JL, Izquierdo I (2000) The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. *Trends Pharmacol Sci* 21: 208-10
- Medina JH, Izquierdo I (1995) Retrograde messengers, long-term potentiation and memory. *Brain Res Brain Res Rev* 21: 185-94

- Miladi Gorji H, Rashidy-Pour A, Fathollahi Y (2008) Effects of morphine dependence on the performance of rats in reference and working versions of the water maze. *Physiol Behav* 93: 622-7
- Moinard C, Cynober L, de Bandt JP (2005) Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin Nutr* 24: 184-97
- Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH (1992) Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256: 1217-21
- Morgan DM (1998) Polyamines. An introduction. *Methods Mol Biol* 79: 3-30
- Morgan DM (1999) Polyamines. An overview. *Mol Biotechnol* 11: 229-50
- Nakagawa Y, Ishibashi Y, Yoshii T, Tagashira E (1995) Muscimol induces state-dependent learning in Morris water maze task in rats. *Brain Res* 681: 126-30
- Nasehi M, Piri M, Jamali-Raeufy N, Zarrindast MR (2010) Influence of intracerebral administration of NO agents in dorsal hippocampus (CA1) on cannabinoid state-dependent memory in the step-down passive avoidance test. *Physiol Behav* 100: 297-304
- Newpher TM, Ehlers MD (2009) Spine microdomains for postsynaptic signaling and plasticity. *Trends Cell Biol* 19: 218-27
- Ngai SH, Berkowitz BA, Yang JC, Hempstead J, Spector S (1976) Pharmacokinetics of naloxone in rats and in man: basis for its potency and short duration of action. *Anesthesiology* 44: 398-401
- Okada Y, Tsuda Y, Bryant SD, Lazarus LH (2002) Endomorphins and related opioid peptides. *Vitam Horm* 65: 257-79
- Ouameur AA, Tajmir-Riahi HA (2004) Structural analysis of DNA interactions with biogenic polyamines and cobalt(III)hexamine studied by Fourier transform infrared and capillary electrophoresis. *J Biol Chem* 279: 42041-54
- Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 54: 581-618
- Paoletti P, Vergnano AM, Barbour B, Casado M (2009) Zinc at glutamatergic synapses. *Neuroscience* 158: 126-36
- Pegg AE, McCann PP (1982) Polyamine metabolism and function. *Am J Physiol* 243: C212-21
- Pellegrini-Giampietro DE (2003) An activity-dependent spermine-mediated mechanism that modulates glutamate transmission. *Trends Neurosci* 26: 9-11
- Perry ML, Izquierdo I (1989) Effect of posttraining and pretest beta-endorphin and ACTH administration in normal and protein malnourished rats. *Peptides* 10: 1117-20
- Pu S, Horvath TL, Diano S, Naftolin F, Kalra PS, Kalra SP (1997) Evidence showing that beta-endorphin regulates cyclic guanosine 3',5'-monophosphate (cGMP) efflux: anatomical and functional support for an interaction between opiates and nitric oxide. *Endocrinology* 138: 1537-43
- Pud D, Eisenberg E, Spitzer A, Adler R, Fried G, Yarnitsky D (1998) The NMDA receptor antagonist amantadine reduces surgical neuropathic pain in cancer patients: a double blind, randomized, placebo controlled trial. *Pain* 75: 349-54

- Raman IM, Tong G, Jahr CE (1996) Beta-adrenergic regulation of synaptic NMDA receptors by cAMP-dependent protein kinase. *Neuron* 16: 415-21
- Ramanan N, Shen Y, Sarsfield S, Lemberger T, Schutz G, Linden DJ, Ginty DD (2005) SRF mediates activity-induced gene expression and synaptic plasticity but not neuronal viability. *Nat Neurosci* 8: 759-67
- Ransom RW, Stec NL (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: 830-6
- Rassouli Y, Rezayof A, Zarrindast MR (2010) Role of the central amygdala GABA-A receptors in morphine state-dependent memory. *Life Sci* 86: 887-93
- Reynolds JI (1990) Arcaine uncovers dual interactions of polyamines with the N-Methyl-D-Aspartate receptor. *Jorn of Pharm and Exper* 1001:07-255
- Rezayof A, Amini R, Rassouli Y, Zarrindast MR (2006) Influence of nitric oxide on morphine-induced amnesia and interactions with dopaminergic receptor agents. *Physiol Behav* 88: 124-31
- Rezayof A, Darbandi N, Zarrindast MR (2008) Nicotinic acetylcholine receptors of the ventral tegmental area are involved in mediating morphine-state-dependent learning. *Neurobiol Learn Mem* 90: 255-60
- Rezayof A, Nazari-Serenjeh F, Zarrindast MR, Sepehri H, Delphi L (2007) Morphine-induced place preference: involvement of cholinergic receptors of the ventral tegmental area. *Eur J Pharmacol* 562: 92-102
- Riedel G, Platt B, Micheau J (2003) Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res* 140: 1-47
- Rigter H (1978) Attenuation of amnesia in rats by systemically administered enkephalins. *Science* 200: 83-5
- Roche KW, O'Brien RJ, Mammen AL, Bernhardt J, Huganir RL (1996) Characterization of multiple phosphorylation sites on the AMPA receptor GluR1 subunit. *Neuron* 16: 1179-88
- Rock DM, Macdonald RL (1995) Polyamine regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35: 463-82
- Rubin MA, Berlese DB, Stiegemeier JA, Volkweis MA, Oliveira DM, dos Santos TL, Fenili AC, Mello CF (2004) Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats. *J Neurosci* 24: 2328-34
- Rubin MA, Boemo RL, Jurach A, Rojas DB, Zanolla GR, Obregon AD, Souza DO, Mello CF (2000) Intrahippocampal spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. *Behavioral Pharmacology* 11: 57-61
- Rubin MA, Stiegemeier JA, Volkweis MA, Oliveira DM, Fenili AC, Boemo RL, Jurach A, Mello CF (2001) Intra-amygdala spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. *European Journal of Pharmacology* 423: 35-9
- Ruiz-Chica J, Medina MA, Sanchez-Jimenez F, Ramirez FJ (2003) Raman spectroscopy study of the interaction between biogenic polyamines and an alternating AT oligodeoxyribonucleotide. *Biochim Biophys Acta* 1628: 11-21

- Sacaan AI and Johnson KM (1990) Characterization of the stimulatory and inhibitory effects of polyamines on [<sup>3</sup>H] TCP binding to the NMDA receptor ionophore complex. *Mol Pharmacol* 57:77-37
- Schutz RA, Barros Schutz MT, Orsingher OA, Izquierdo I (1979) Brain dopamine and noradrenaline levels in rats submitted to four different aversive behavioral tests. *Psychopharmacology (Berl)* 63: 289-92
- Schwartz BL, Hashtroudi S, Herting RL, Schwartz P, Deutsch SI (1996) d-Cycloserine enhances implicit memory in Alzheimer patients. *Neurology* 46: 420-4
- Scott RH, Sutton KG, Dolphin AC (1993) Interactions of polyamines with neuronal ion channels. *Trends Neurosci* 16: 153-60
- Seiler N (1990) Polyamine metabolism. *Digestion* 46 Suppl 2: 319-30
- Seiler N (2004) Catabolism of polyamines. *Amino Acids* 26: 217-33
- Seiler and Schmitd-Glenewinkel (1975) Regional distribution of putrescine, spermidine and spermine in relation to the distribution of RNA and DNA in the rat nervous system. *J Neurochem* 4:791-5.
- Seiler N, Raul F (2005) Polyamines and apoptosis. *J Cell Mol Med* 9: 623-42
- Sharifzadeh M, Haghigat A, Tahsili-Fahadan P, Khalaj S, Zarrindast MR, Zamanian AR (2006) Intra-hippocampal inhibition of protein kinase A attenuates morphine-induced conditioned place preference. *Pharmacol Biochem Behav* 85: 705-12
- Shimada A, Spangler EL, London ED, Ingram DK (1994) Spermidine potentiates dizocilpine-induced impairment of learning performance by rats in a 14-unit T-maze. *Eur J Pharmacol* 263: 293-300
- Shulz DE, Sosnik R, Ego V, Haidarliu S, Ahissar E (2000) A neuronal analogue of state-dependent learning. *Nature* 403: 549-53
- Skeberdis VA, Chevaleyre V, Lau CG, Goldberg JH, Pettit DL, Suadcani SO, Lin Y, Bennett MV, Yuste R, Castillo PE, Zukin RS (2006) Protein kinase A regulates calcium permeability of NMDA receptors. *Nat Neurosci* 9: 501-10
- Strack S, Choi S, Lovinger DM, Colbran RJ (1997) Translocation of autophosphorylated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II to the postsynaptic density. *J Biol Chem* 272: 13467-70
- Tabor CW, Tabor H (1984) Polyamines. *Annu Rev Biochem* 53: 749-90
- Taylor SS, Buechler JA, Yonemoto W (1990) cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem* 59: 971-1005
- Teti D, Visalli M, McNair H (2002) Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 781: 107-49
- Thomas T, Thomas TJ (2001) Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci* 58: 244-58
- Thornberg SA, Saklad SR (1996) A review of NMDA receptors and the phencyclidine model of schizophrenia. *Pharmacotherapy* 16: 82-93
- Ueda H (1989) [Molecular pharmacology of opioid receptor mechanisms]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 94: 339-49

- Urdiales JL, Medina MA, Sanchez-Jimenez F (2001) Polyamine metabolism revisited. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13: 1015-9
- Veilleux JC, Colvin PJ, Anderson J, York C, Heinz AJ (2010) A review of opioid dependence treatment: pharmacological and psychosocial interventions to treat opioid addiction. *Clin Psychol Rev* 30: 155-66
- Velloso NA, Dalmolin GD, Gomes GM, Rubin MA, Canas PM, Cunha RA, Mello CF (2009) Spermine improves recognition memory deficit in a rodent model of Huntington's disease. *Neurobiol Learn Mem* 92: 574-80
- Voglis G, Tavernarakis N (2006) The role of synaptic ion channels in synaptic plasticity. *EMBO Rep* 7: 1104-10
- Wallace HM (2003) Polyamines and their role in human disease--an introduction. *Biochem Soc Trans* 31: 354-5
- Wallace HM (2009) The polyamines: past, present and future. *Essays Biochem* 46: 1-9
- Whetsell WO, Jr. (1996) Current concepts of excitotoxicity. *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 1-13
- Whittard JD, Akiyama SK (2001) Positive regulation of cell-cell and cell-substrate adhesion by protein kinase A. *J Cell Sci* 114: 3265-72
- Williams K (1997a) Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem J* 325 ( Pt 2): 289-97
- Williams K (1997b) Modulation and block of ion channels: a new biology of polyamines. *Cell Signal* 9: 1-13
- Williams K, Dawson VL, Romano C, Dichter MA, Molinoff PB (1990) Characterization of polyamines having agonist, antagonist, and inverse agonist effects at the polyamine recognition site of the NMDA receptor. *Neuron* 5: 199-208
- Williams K, Romano C, Dichter MA, Molinoff PB (1991) Modulation of the NMDA receptor by polyamines. *Life Sci* 48: 469-98
- Wolf CJ, Thompson SW (1991) The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain* 44: 293-9
- Wortham BW, Patel CN, Oliveira MA (2007) Polyamines in bacteria: pleiotropic effects yet specific mechanisms. *Adv Exp Med Biol* 603: 106-15
- Worthen DR, Gibson DA, Rogers DT, Bence AK, Fu M, Littleton JM, Crooks PA (2001) Endogenous indoles as novel polyamine site ligands at the N-methyl-D-aspartate receptor complex. *Brain Res* 890: 343-6
- Wu ZQ, Li M, Chen J, Chi ZQ, Liu JG (2006) Involvement of cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathway in regulation of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase upon activation of opioid receptors by morphine. *Mol Pharmacol* 69: 866-76
- Yamakura T, Shimoji K (1999) Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Prog Neurobiol* 59: 279-98
- Yamin G (2009) NMDA receptor-dependent signaling pathways that underlie amyloid beta-protein disruption of LTP in the hippocampus. *J Neurosci Res* 87: 1729-36

- Yokoi I, Kabuto H, Habu H, Inada K, Toma J, Mori A (1994) Structure-activity relationships of arginine analogues on nitric oxide synthase activity in the rat brain. *Neuropharmacology* 33: 1261-5
- Yoneda Y, Ogita K (1991) Novel fourth binding sites of [3H]spermidine within the NMDA receptor complex. *Adv Exp Med Biol* 287: 455-75
- Zadina JE, Martin-Schild S, Gerall AA, Kastin AJ, Hackler L, Ge LJ, Zhang X (1999) Endomorphins: novel endogenous mu-opiate receptor agonists in regions of high mu-opiate receptor density. *Ann N Y Acad Sci* 897: 136-44
- Zarrindast MR, Askari E, Khalilzadeh A, Nouraei N (2006a) Morphine state-dependent learning sensitization and interaction with nitric oxide. *Pharmacology* 78: 66-71
- Zarrindast MR, Bananej M, Khalilzadeh A, Fazli-Tabaei S, Haeri-Rohani A, Rezayof A (2006b) Influence of intracerebroventricular administration of dopaminergic drugs on morphine state-dependent memory in the step-down passive avoidance test. *Neurobiol Learn Mem* 86: 286-92
- Zarrindast MR, Jafari-Sabet M, Rezayat M, Djahanguiri B, Rezayof A (2006c) Involvement of NMDA receptors in morphine state-dependent learning in mice. *Int J Neurosci* 116: 731-43
- Zarrindast MR, Jafari MR, Ahmadi S, Djahanguiri B (2004) Influence of central administration ATP-dependent K<sup>+</sup> channel on morphine state-dependent memory of passive avoidance. *Eur J Pharmacol* 487: 143-8
- Zarrindast MR, Lahmi A, Ahamadi S (2008) Possible involvement of mu-opioid receptors in effect of lithium on inhibitory avoidance response in mice. *J Psychopharmacol* 22: 865-71
- Zarrindast MR, Rezayof A (2004) Morphine state-dependent learning: sensitization and interactions with dopamine receptors. *Eur J Pharmacol* 497: 197-204
- Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR (1999) *Fundamental Neuroscience*, London: Academic Press.

## 8. anexos

### 8.1 Anexo 1

#### Material suplementar do manuscrito.

Supplemental Table S1 Effect of treatments of experiment 1 on the training step-down latency (s) and on the behavior of rats in the open-field immediately after the inhibitory avoidance testing session.

Group	Training latency	Crossing	Rearing	<i>N</i>
Experiment 1, Fig 1.A				
Sal/Sal	6.88 ± 0.93	18.44 ± 2.80	18.44 ± 1.94	9
Arc/Sal	8.22 ± 1.91	15.22 ± 2.07	16.33 ± 2.59	9
Sal/Arc	7.22 ± 1.03	20.78 ± 1.99	15.33 ± 2.31	9
Arc/Arc	4.77 ± 1.22	19.67 ± 1.78	13.11 ± 2.57	9
Experiment 1, Fig 1.B				
Sa/Sal	7.44 ± 1.59	15.44 ± 1.71	14.56 ± 1.90	9
Arc/Sal	6.11 ± 1.04	20.22 ± 1.29	19.56 ± 2.70	9
Sal/Arc	6.11 ± 1.19	15.11 ± 2.30	17.00 ± 3.18	9
Arc/Arc	7.00 ± 1.04	15.11 ± 1.32	18.00 ± 2.43	9
Experiment 1, Fig 1.C				
Sal/Sal	5.18 ± 0.91	17.73 ± 2.19	17.64 ± 2.87	11
Arc/Sal	5.81 ± 0.76	13.45 ± 1.72	18.36 ± 2.47	11
Sal/Arc	7.09 ± 1.63	13.09 ± 1.71	16.00 ± 1.61	11
Arc/Arc	6.45 ± 1.48	16.64 ± 2.35	18.55 ± 2.23	11
Experiment 1, Fig 1.D				
Sal/Sal	8.00 ± 1.74	32.27 ± 4.70	19.55 ± 2.79	11
Arc/Sal	12.6 ± 3.31	28.82 ± 3.34	14.36 ± 2.64	11
Sal/Arc	10.6 ± 2.39	20.82 ± 1.98	16.00 ± 2.09	11
Arc/Arc	6.27 ± 1.16	29.27 ± 3.34	16.36 ± 1.81	11

Data are means ± SEM. *N*, number of animals in each group

**Supplemental Table S2** Effect of treatments of experiment 1 on the training step-down latency (s) and on the behavior of rats in the open-field immediately after the inhibitory avoidance testing session.

Group	Training latency	Crossing	Rearing	<i>N</i>
Experiment 1, Fig 2.A				
Sal/Sal	5.00 ± 1.11	17.50 ± 2.04	18.50 ± 2.44	8
Mor/Sal	6.00 ± 0.70	20.25 ± 1.81	16.75 ± 1.79	8
Sal/Mor	17.6 ± 9.53	18.00 ± 2.26	14.38 ± 1.60	8
Mor/Mor	6.12 ± 1.27	19.88 ± 1.79	18.75 ± 1.70	8
Experiment 1, Fig 2.B				
Sal/Sal	4.25 ± 1.20	22.13 ± 1.54	14.50 ± 1.89	8
Mor/Sal	6.25 ± 0.95	19.50 ± 1.60	15.63 ± 1.88	8
Sal/Mor	7.12 ± 2.53	16.00 ± 1.43	14.13 ± 1.46	8
Mor/Mor	4.00 ± 1.62	17.25 ± 1.50	15.25 ± 1.34	8
Experiment 1, Fig 2.C				
Sal/Sal	4.87 ± 1.64	17.63 ± 1.96	14.63 ± 2.38	8
Mor/Sal	4.87 ± 1.40	17.25 ± 1.75	13.88 ± 1.79	8
Sal/Mor	7.50 ± 2.82	15.88 ± 1.34	15.63 ± 1.06	8
Mor/Mor	3.62 ± 0.32	16.50 ± 1.00	12.63 ± 1.42	8
Experiment 1, Fig 2.D				
Sal/Sal	7.09 ± 2.08	32.73 ± 2.47	24.45 ± 2.70	11
Mor/Sal	6.09 ± 1.26	25.00 ± 3.81	20.91 ± 3.25	11
Sal/Mor	7.54 ± 2.01	24.18 ± 2.64	24.00 ± 3.01	11
Mor/Mor	6.72 ± 1.95	25.00 ± 2.58	30.00 ± 3.87	11

Data are means ± SEM. *N*, number of animals in each group

**Supplemental Table S3** Effect of treatments of experiment 2 on the training step-down latency (s) and on the behavior of rats in the open-field immediately after the inhibitory avoidance testing session.

Group	Training latency	Crossing	Rearing	<i>N</i>
Experiment 2, Fig 3				
Sal/Sal	6.45 ± 0.86	15.45 ± 2.14	7.81 ± 1.50	11
Arc/Sal	7.54 ± 0.83	23.36 ± 3.13	12.18 ± 1.82	11
Arc/ Arc	8.72 ± 1.05	24.55 ± 3.21	11.64 ± 2.40	11
Arc/Mor	7.72 ± 0.68	26.00 ± 3.28	13.73 ± 1.73	11
Mor/Sal	9.00 ± 1.04	23.82 ± 4.18	10.73 ± 2.63	11
Mor/Mor	7.90 ± 0.70	28.27 ± 3.92	15.45 ± 2.92	11
Mor/Arc	7.54 ± 0.74	26.82 ± 4.41	13.64 ± 2.43	11

Data are means ± SEM. *N*, number of animals in each group

**Supplemental Table S4** Effect of treatments of experiment 3 on the training step-down latency (s) and on the behavior of rats in the open-field immediately after the inhibitory avoidance testing session.

Group	Training latency	Crossing	Rearing	N
Experiment 3, Fig 4.A				
Sal/Sal/Sal	7.09 ± 1.62	17.18 ± 2.55	9.00 ± 1.27	11
Sal/Nal/Sal	5.40 ± 1.13	10.60 ± 0.94	6.10 ± 1.36	10
Sal/Sal/Mor	8.72 ± 1.62	13.09 ± 2.15	5.45 ± 0.95	11
Sal/Nal/Mor	4.72 ± 0.79	8.63 ± 1.54	5.27 ± 0.79	11
Mor/Sal/Sal	7.00 ± 0.98	11.91 ± 1.57	6.00 ± 0.71	11
Mor/Nal/Sal	5.54 ± 1.17	14.82 ± 2.23	8.00 ± 1.25	11
Mor/Sal/Mor	7.72 ± 1.37	10.58 ± 2.58	5.66 ± 1.09	11
Mor/Nal/Mor	4.63 ± 0.82	10.82 ± 2.06	6.36 ± 0.96	11
Experiment 3, Fig 4.B				
Sal/Sal/Sal	6.27 ± 1.16	30.45 ± 3.41	15.64 ± 1.90	11
Sal/Nal/Sal	4.63 ± 0.81	26.64 ± 3.12	15.55 ± 2.29	11
Sal/Sal/Mor	5.00 ± 1.40	25.18 ± 2.61	19.73 ± 2.78	11
Sal/Nal/Mor	4.09 ± 1.08	27.55 ± 2.86	20.36 ± 2.53	11
Mor/Sal/Sal	5.63 ± 0.97	16.55 ± 2.91	17.36 ± 2.30	11
Mor/Nal/Sal	4.45 ± 1.12	26.09 ± 3.53	21.55 ± 2.56	11
Mor/Sal/Mor	6.45 ± 1.52	24.45 ± 2.51	17.45 ± 2.73	11
Mor/Nal/Mor	5.09 ± 1.23	23.55 ± 2.76	18.82 ± 2.14	11

Data are means ± SEM. N, number of animals in each group

**Supplemental Table S5** Effect of treatments of experiment 4 on the training step-down latency (s) and on the behavior of rats in the open-field immediately after the inhibitory avoidance testing session.

Group	Training latency	Crossing	Rearing	<i>N</i>
Experiment 4, Fig 5.A				
Sal/Sal/Sal	5.18 ± 1.48	15.55 ± 2.44	11.00 ± 2.43	11
Sal/Nal/Sal	5.90 ± 1.69	15.45 ± 2.36	10.36 ± 1.71	11
Sal/Sal/Arc	6.33 ± 0.80	18.27 ± 2.80	11.73 ± 1.52	11
Sal/Nal/Arc	4.16 ± 1.02	16.75 ± 1.98	13.08 ± 1.73	12
Arc/Sal/Sal	6.00 ± 1.16	15.42 ± 1.87	9.83 ± 2.29	12
Arc/Nal/Sal	4.90 ± 1.06	15.42 ± 2.27	12.25 ± 1.37	12
Arc/Sal/Arc	5.72 ± 1.36	14.64 ± 1.49	13.45 ± 1.97	11
Arc/Nal/Arc	5.72 ± 1.77	17.09 ± 1.83	16.91 ± 1.93	11
Experiment 4, Fig 5.B				
Sal/Sal/Sal	4.72 ± 1.07	27.0 ± 3.20	30.82 ± 3.16	11
Sal/Nal/Sal	5.27 ± 1.18	31.55 ± 3.72	25.27 ± 3.67	11
Sal/Sal/Arc	5.81 ± 1.74	25.91 ± 3.38	27.09 ± 3.83	11
Sal/Nal/Arc	5.63 ± 1.49	28.73 ± 2.88	24.36 ± 3.42	11
Arc/Sal/Sal	7.09 ± 1.04	18.45 ± 1.91	25.55 ± 3.62	11
Arc/Nal/Sal	5.81 ± 1.32	27.09 ± 3.23	18.91 ± 3.01	11
Arc/Sal/Arc	5.81 ± 2.14	26.82 ± 3.31	20.82 ± 1.83	11
Arc/Nal/Arc	3.90 ± 0.88	25.73 ± 2.87	20.18 ± 1.80	11

Data are means ± SEM. *N*, number of animals in each group

**Supplemental Table S6-** Effect of arcaine (30 mg/kg) or vehicle (Sal) administration immediately post-training on the test step-down latency (s) of rats pseudo trained (without shock).

Group	Training latency	<i>N</i>
Sal	14.00 ± 1.842	8
Arc	10.00 ± 2.765	8

Data are means ± SEM. *N*, number of animals in each group

**Supplemental Table S7** Effect of vehicle (Sal) administration immediately post-training and 30 min pre-test on the training and test step-down latency (s).

Group	Training latency	Test latency
Sal/Sal	5.250 ± 1.236	173.1 ± 34.50
Statistical Analysis	t=4.86, df=14, p<0.001	

Data are means ± SEM. *N*, number of animals in each group

## 8.2 Anexo 2

Neste anexo está a carta dos revisores referente a primeira submissão ao periódico *Psychopharmacology*, com parecer sobre o manuscrito.

Manuscript No. Psych-2010-00264

Title : Arcaine-induced state-dependent memory involves opioid mechanisms

Corresponding author : Dr. Maribel Rubin

Dear Dr. Rubin,

The manuscript, authored by R. K. Mariani, C. F. Mello, M.M. da Rosa, A. P. C. Ceretta, K. Camera, and yourself, entitled “Arcaine-induced state-dependent memory involves opioid mechanisms” (MS No. 2010-00264) has been evaluated by three editorial consultants promptly, rigorously and carefully.

Please find the reviewers’ detailed comments attached below. The topic of arcaine-opioid interactions is of potential interest. Nonetheless, a number of issues distract from this experimental effort that involves a very large number of animals and includes many confirmatory data.

Let me highlight the key concerns with the current report.

First, the initial studies with morphine and arcaine constitute largely replications of previously published findings. It would have been useful to learn about the

effects of other doses of these compounds, particularly in view of the subsequently conducted decisive studies on the interactions between morphine and arcaïne.

Second, any information on the kinetics of the compounds involving the administration of three drugs at different time points will be important in order to learn about potential mechanism(s) of interaction. At present, the results are difficult to interpret in terms of potential mechanisms. Reviewer 1 points to the surprising lack of effect in varying the time interval between training and drug injection. Again, kinetic questions arise that need to be resolved.

Third, the Reviewers mention three potential confounds for the current data on latencies to step-down – anxiety, impulsivity and altered motor activity. The open-field data address these potential confounds incompletely. Also, the open-field data are confounded by being always sequenced immediately after the foot-shock avoidance task. In future work, I recommend to automate these motor activity measurements.

In terms of statistical analyses, the Kruskal-Wallis tests is appropriate for latency data that are limited by an upper cut-off and are not normally distributed. It is less clear how the Dunn test was applied.

Reviewers 2 and 3 point to the current data as being more relevant to retrieval, but neither to formation nor consolidation of memory. Your data require a more precise and qualified interpretation.

In addition to the comments and queries by the reviewing colleagues, may I ask

you to attend to several further issues with the presentation and style.

(1) Please avoid a sentence as title, and rather render the title as a label.

Also, mention the animal species in the title

(2) In general, your paper is well written. Only a few expressions and words require improvement (for example, please avoid the interchangeable use of “dependence” and “dependency.” Also, P3L14/15: start a new sentence and correct the verb: “Considerable evidence suggests that...” P5: “0.9% NaCl.”

(3) Please use supporting references more selectively and avoid multiple references in support of the same point. Also, I recommend to credit the original contributions in preference of recent replications.

(4) I recommend to perform behavioral experiments in the active phase of this nocturnal species.

(5) Please avoid repeating material in the results section and in the figure legends.

I kindly ask that you submit your revised manuscript that contains further novel data, as follows:

- The text, including tables figures and figure legends, in one file, compatible with Word.
- If high resolution Figures are necessary please submit each figure in a separate file without the figure legend.

Please clearly mark all your revisions in the electronic version of the revised

manuscript. Please respond in a detailed and itemized fashion to each of the comments of the Reviewers and Editor.

---

I request that you revise your manuscript as quickly as possible, but within three months of receipt of this letter.

To submit your revision please log in your author center at <https://mc.manuscriptcentral.com/psychopharmacology> , click on 'Manuscripts with decision'. Please follow the instructions when the 'Submit a revision' window opens.

I look forward to the receipt of your extensively revised manuscript.

Sincerely,

Klaus A. Miczek

Principal Editor

Psychopharmacology

Reviewer: 1

Comments of Reviewer for the attention of authors.

I believe the study by Mariani et al. makes a potentially interesting contribution.

By showing the interchangeability of arcaïne and morphine in a state dependent retention paradigm, the authors provide evidence for common opioid

mechanisms, although it is not yet clear at what level the “state” similarities exist.

I do have a couple of major concerns that I believe need to be addressed in some manner:

1. The open field measure of activity is not an adequate way to assess any effects of the treatments on step-down latency test performance. This is a particularly important issue with respect to the arcaine groups because the good performance (i.e., failure to disrupt “memory”) in the conditions where the drug is administered for the first time at testing (Fig 1, Sal – Arc conditions) could be due to a direct effect of the drug on step down latency. If that were the case, then the recovery of performance in the same state groups (Arc-Arc) would not be interpretable. A minimal control would be to give the drug (without training) prior to a “test” to evaluate step down latencies. Even better would be to use pseudo training (non contingent footshock) and the drug exposure to control for all the events that the experimental rats have received. (I should note that this criticism would not apply to the morphine condition where the drug given only at testing does, in fact, disrupt performance i.e., produces symmetrical state dependent memory.)

2. The “time window” phrase is not very meaningful, since even after six hours the window does not seem to close, although the data hint at a change in performance as the drug administration is delayed. This lack of temporal effect is a bit worrisome, as other studies have found a window to exist, and the amnesia literature seldom reports retrograde amnesia when there are many

hours between training and the amnesic treatment. Do the authors have other data showing that the state dependent memory with these drugs is a time-dependent phenomenon?

More minor matters:

- a. Assuming the failure of arcaïne to disrupt memory when given only prior to testing is not an artifact, then the authors might want to note that asymmetrical state dependency has been found with other drugs. I believe Barry Berger was one of the first to point this out and comment on it.
- b. The authors cite Ceretta et al with respect to MK -801 producing state dependent retention, but they probably should also cite Harrod et al , as I believe that they were the first to demonstrate the state effect of MK-801 in the inhibitory avoidance task.
- c. The General Discussion seems rambling and not always directly related to the findings presented.
- d. I think the term “noteworthy” might capture the authors’ intent better than “remarkable” (important shades of difference).

Reviewer: 2

Comments of Reviewer for the attention of authors.

Mariani and collaborators present an interesting and well written manuscript that describes the effect of post-training and pre-test administration of arcaïne and

morphine on the performance of adult rats in the one-trial inhibitory avoidance task. They provide evidence that the memory impairment induced by arcaine involves opioid receptors. In addition they find that arcaine-induced state-dependent retrieval of inhibitory avoidance memory can be transferred to morphine and vice-versa, suggesting the involvement of the opioid system in arcaine-induced state-dependency. However, several issues should be clarified.

### Major

1. The major concern with this study is the description and interpretation of the results of experiments 3 and 4. These experiments describe the effect of post-training naloxone administration on morphine- and arcaine-induced performance impairment and state-dependent retrieval in the inhibitory avoidance task. The experiments were well designed and included all the appropriate control groups. However the results from control experiments should be discussed more in detail by the authors.

1.1. In experiment 3, surprisingly, post-training naloxone administration prevents not only the impairment induced by post-training, but also by pre-test morphine administration (Mor/Nal/Sal and Sal/Nal/Mor), suggesting a long-lasting effect of naloxone administration. As the authors stressed in the discussion, the dose of naloxone (2 mg/kg) used in the present study is higher than the doses used in other studies (0.5-1 mg/kg) to prevent morphine-induced state-dependent retrieval. What was the rationale for the choice of the naloxone dose? This issue should be clarified, especially because a potentially novel result of the present study is the effect of pharmacological manipulation of the consolidation phase on morphine state-dependency, as opposed to

manipulations of the memory retrieval phase largely studied in the literature. The authors should consider to repeat the experiment with a lower dose of naloxone.

1.2. The authors stated in the Discussion that post-training administration of naloxone prevented state-dependency to morphine (Mor/Nal/Mor) in experiment 3. However, as they correctly noted in the Results, naloxone only attenuated morphine-induced state-dependency compared to the Mor/Sal/Mor group, without causing a real performance impairment. Indeed is the test latency of the Mor/Nal/Mor group different from the Sal/Sal/Sal control group? Moreover, in this experiment the performance of the Mor/Sal/Mor group is exceptionally good (all animals reached the cut-off of 300 s), compared with all other groups in the same experiment, but also with the Mor/Mor groups in experiments 1 and 2. This weakens, in my opinion, the significance of the difference observed between the Mor/Sal/Mor and the Mor/Nal/Mor group, especially if the Mor/Nal/Mor group is not different from the saline-treated group. This issue should be discussed appropriately and the interpretation of the effect of naloxone on state-dependency should be more cautious.

1.3. I was puzzled by the effects of naloxone reported in experiment 4. Post-training administration of naloxone impaired the performance of rats administered both post-training and pre-test with arcaine (Arc/Nal/Arc), suggesting an effect on state-dependent memory retrieval. Nonetheless, this result is surprising in light of a) the ability of post-training administration of naloxone to revert the deficit induced by post-training arcaine; b) the lack of effect of pre-test arcaine administration, with or without post-training naloxone, on inhibitory avoidance performance. Based on these results, one would not

expect a deficit in the Arc/Nal/Arc group. This issue should be discussed by the authors and the interpretation of the effect of naloxone on state-dependency to arcaine should be more cautious. Pre-test naloxone administration might be helpful to clarify the role of the opioid system in arcaine-induced state-dependency.

Taken together, these observations reduce the implications of the present study on the mechanisms of morphine and arcaine-induced state-dependent retrieval. The authors should revise the manuscript accordingly.

2. This study investigates the effect of various pharmacological treatments on learning and memory. However, no compelling evidence was provided that the training procedure used in the present study effectively induces learning. Even though the same procedure has been largely used in the literature, it is fundamental to demonstrate that learning occurs in the present experimental conditions. A convincing way to demonstrate that control animals develop an inhibitory avoidance memory as a consequence of training, would be to show increased step-down latencies in the testing session compared to the training in saline-treated rats.

3. Differences in anxiety or impulsivity could severely affect the performance of rats in the one-trial inhibitory avoidance task, compromising the results of the study. In addition to the locomotor activity data, step-down latencies during training should be provided and analyzed in order to demonstrate there were no significant pre-existing differences among groups.

4. In the Results, the description of the post-hoc analysis should be revised

in order to make clear and explicit which differences are statistically significant and which are not. Moreover, for each comparison, it should be clearly stated which groups are being compared. For example, in experiment 1, Figure 2C, is the Mor/Mor group significantly different from the Sal/Sal group? At present this information can not be inferred unequivocally from the manuscript.

Minor

1. The effect of pre-test arcaine administration in experiment 1 should be described in the Results for completeness.
2. In the Methods, Page 7, Line 24 “morphine (5 mg/kg)” should be changed to “arcaine (30 mg/kg)”.
3. The number of experimental animals in each group should be reported in the Results.

Reviewer: 3

Comments of Reviewer for the attention of authors.

In the manuscript by Mariani et al. authors investigate the interaction between the NMDA and the opioid systems in rat state-dependent memory.

Post-training administration of arcaine or morphine induced a deficit in the inhibitory avoidance, tested 24h later. The deficit is reversed if arcaine or

morphine are injected 30 minutes before the test.

Authors conclude that a response transfer occurs between arcaine and morphine, as morphine causes a state dependency when administered before the test in substitution of arcaine, and the same effect is reported when arcaine is injected in substitution of morphine. In addition, the opioid antagonist naloxone seems to interfere with arcaine state-dependent memory.

In general these data confirm previous findings regarding the ability of arcaine (Ceretta et al. 2008) and morphine (Izquierdo, 1979; Izquierdo and Dias, 1983; Nishimura et al. 1990; Ukai et al. 1993; Bruins Slot and Colpaert, 1999a,b, khavandgar et al. 2002; Jafari-Sabet, 2005 ) to independently induce state dependency. The main finding is the interaction between the two systems.

This result is interesting, however I have the following concerns:

-This set of experiments suggests that arcaine and morphine at the doses used did not disrupt memory formation and consolidation, but induced a state which affected retrieval. In experiment 3 and 4 the authors use post-training injection of naloxone, manipulating the consolidation phase. The pre-test injection, however, seems to be the best control to study the effect of morphine in memory retrieval.

The interpretation of the effect of post-training injections can't be conclusive without other control experiments. The effect of naloxone on the pre-test morphine, or on the state dependency induced by morphine, suggests a proactive effects of naloxone, or a facilitatory effect on consolidation (Messing et al. 1979; Izquierdo 1979, 1983) that should be clarified. Also, supplementary

post hoc comparisons (mor/nal/sal vs Mor/Nal/Mor) would help the interpretation of the results.

- It is not clear why authors explored in experiment 1 later post-training time points, far from the learning phase if the contingency between the endogenous state and learning is required for state-dependent memory. The relevance of this approach should be better emphasized, as the temporal coincidence mentioned in the discussion is not convincing.

-In the discussion the summary of the results is overextended. Most of the results presented confirm already published findings. In addition, despite the speculation about the possible interaction of arcaine and morphine effect at signal transduction level, which is not supported by experimental evidence, authors are not providing a mechanistic view of this interaction, as they propose in the rationale. The discussion would benefit if it was more focused on the finding about the interaction between two systems.

### **8.3 Anexo 3**

Neste anexo está a carta do principal editor referente a segunda submissão ao periódico *Psychopharmacology*, com parecer sobre o manuscrito.

---

Title : Arcaine-induced state-dependent memory involves opioid mechanisms in rats

Corresponding author : Dr. Maribel Rubin

Dear Dr. Rubin,

The revised version of the manuscript, authored by R. K. Mariani, C. F. Mello, M.M. da Rosa, A. P. C. Ceretta, K. Camera, and yourself, entitled “Arcaine-induced state-dependent memory involves opioid mechanisms” (MS No. 2010-00264.R1) has incorporated some of the requested and recommended changes. Nonetheless, there is considerable room for improvement.

It is unfortunate that I could not persuade you to go beyond single doses of morphine, arcaine and naloxone. As you know, single dose pharmacology is treacherous and often misleading. Once more, please strengthen your report by adding at least one further dose.

Your delineation of the time course is valuable. However, such a 9-hour time course in behavioral effects needs to be complemented by pharmacokinetic or other mechanistic data. Once more, I am asking you to supply such information.

In terms of style and format of presentation, let me reiterate

(1) Please avoid a sentence as title, and rather render the title as a label. As Robert A. Day in his book on “How to write and publish a scientific paper” so

appropriately stated regarding the format of a title, an assertive sentence is improper and imprudent. Do not worry about the downloads –

Psychopharmacology has the second highest downloads in all of the Journals of the Springer Verlag. It is a scientific journal, not a newspaper. Your data show single-dose morphine and naloxone effects, but do not give insight into “opioid mechanisms.”

(2) Once more, please use supporting references more selectively and avoid multiple references in support of the same point, particularly from your own laboratory. Also, I recommend to credit the original contributions in preference of recent replications. For example, cite the original demonstration of state dependency on top of P4. Also, cite the original demonstration that opioids alter learning and memory (P4 center).

(3) The number of subjects in the tables and the total number of rats on top of P5 should match. I recommend that you present the number of rats for each experiment in the text and explain why some experiments contain 8 and others 12 rats. Clearly, not all experiments were conducted at the same time. Also, specify the sequence of experiments.

(4) Please observe the 15-page limit for the text portion of the manuscript, using 12 point font and double spacing.

(5) Please improve the quality of the graphs. For example, enlarge the numerals and letters along the axes so that the overall size of the figure can be reduced. Avoid repeating identical labels in multi-plot figures. Also, I recommend shading the bars depicting the effects of experimental treatments in shades of grey.

(6) In the supplemental tables and also in the text of the results it is not

necessary to present the statistical details of non-significant changes.

Again, I kindly ask that you submit your further revised manuscript, as follows:

- The text, including tables figures and figure legends, in one file, compatible with Word.
- If high resolution Figures are necessary please submit each figure in a separate file without the figure legend.

As before, I request that you revise your manuscript as quickly as possible, but within three months of receipt of this letter.

To submit your revision please log in your author center at <https://mc.manuscriptcentral.com/psychopharmacology>, click on 'Manuscripts with decision'. Please follow the instructions when the 'Submit a revision' window opens.

I look forward to the receipt of your extensively revised manuscript.

Sincerely,

Klaus A. Miczek

Principal Editor

Psychopharmacology

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.  
This page will not be added after purchasing Win2PDF.