

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

ESPERMINA REVERTE O DANO DE MEMÓRIA INDUZIDO
POR LIPOPOLISSACARÍDEO EM CAMUNDONGOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
Pâmella Karina Santana Frühauf

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**ESPERMINA REVERTE O DANO DE MEMÓRIA INDUZIDO
POR LIPOPOLISSACARÍDEO EM CAMUNDONGOS**

Por

Pâmella Karina Santana Frühauf

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Neuropsicofarmacologia e Imunofarmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), com requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**.

Orientador: Maribel Antonello Rubin

Santa Maria, RS, Brasil

2014

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

**ESPERMINA REVERTE O DANO DE MEMÓRIA INDUZIDO POR
LIPOPOLISSACARÍDEO EM CAMUNDONGOS**

elaborada por

Pâmella Karina Santana Frühauf

Como requisito parcial para obtenção do grau de

Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Maribel Antonello Rubin (UFSM)

Presidente/Orientadora

Nadja Schröder, Dra. (PUCRS)

Denis Broock Rosemberg, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 21 de Agosto de 2014

AGRADECIMENTOS

Gratidão a Deus, meu Pai Soberano, e minha Divina Mãe pela oportunidade de viver, buscar a evolução e a sabedoria;

Gratidão a minha Mãe Norma por me ensinar através de exemplos o valor da determinação, da força, da firmeza e do amor para se conseguir tocar nos sonhos;

Gratidão ao meu pai Luiz Paulo por me ensinar desde cedo a amar os livros e a ciência;

Gratidão às minhas irmãs e sobrinhos pelo afeto, carinho e confiança que foram vitais para vencer os desafios até aqui;

Gratidão aos meus irmãos de caminhada que são faróis iluminando o meu caminho, que me trazem força, fé e alegria;

Gratidão à professora Maribel e ao professor Carlos pelo incentivo, por acreditar no meu potencial e me auxiliar no desenvolvimento deste trabalho;

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

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

*“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais retorna ao seu tamanho Original”*

[Albert Einstein]

RESUMO

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

ESPERMINA REVERTE O DANO DE MEMÓRIA INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO EM CAMUNDONGOS

Autora: Pâmella Karina Santana Frühauf

Orientadora: Maribel Antonello Rubin

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 21 de Agosto de 2014

A inflamação periférica desencadeia a produção central de citocinas inflamatórias, gerando um quadro de neuroinflamação. Essa condição altera as transmissões no receptor *N*-Metil-D-Aspartato (NMDA) o que prejudica a memória e a plasticidade sináptica. A injeção de Lipopolissacarídeo (LPS) induz a neuroinflamação e prejudica a memória. A espermina e a espermidina são poliaminas endógenas que modulam fisiologicamente o receptor NMDA em mamíferos. Uma vez que as poliaminas melhoram a memória em tarefas cognitivas, investigamos se a administração pós-treino de espermina reverte o prejuízo de memória induzido por LPS sistêmico na tarefa de reconhecimento de objetos em camundongos. Enquanto a espermina (1 mg/kg, ip) aumentou, o ifenprodil (10 mg/kg, ip), antagonista não competitivo do receptor NMDA contendo GluN2B, diminuiu a discriminação na tarefa de reconhecimento de objetos. A espermina, em doses que não alteram a memória (0,3 mg/kg, ip), reverteu o dano cognitivo induzido por LPS (250 µg/kg, ip). O ifenprodil (0,3 mg/kg, ip) impediu o efeito protetor da espermina contra o prejuízo de memória induzido por LPS na tarefa de reconhecimento de objetos. No entanto, a espermina não reverteu o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias induzido por LPS no hipocampo e córtex cerebral. Os resultados do presente estudo indicam que a espermina protege a piora da memória induzida por LPS em camundongos. O mecanismo desta proteção envolve o sítio de ligação das poliaminas no receptor NMDA, e não envolve mecanismos anti-inflamatórios.

Palavras-chave: Memória. Neuroinflamação. Receptor NMDA. Espermina. Ifenprodil. Reconhecimento de objetos. Lipopolissacarídeo.

ABSTRACT

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

SPERMINE REVERSES LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED MEMORY DEFICIT IN MICE

Author: Pâmella Karina Santana Frühauf

Advisor: Maribel Antonello Rubin

Place and date of defense: Santa Maria, August 21, 2014

Neuroinflammation is a neuropathological finding in a number of neurodegenerative diseases. Intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS) induces neuroinflammation and memory deficit. Spermine and spermidine are endogenous polyamines that physiologically modulate the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor in mammals by binding to the polyamine-binding site at the NMDA receptor. Since polyamines improve memory in cognitive tasks, we tested whether the post-training administration of spermine reverses the deficits of memory induced by LPS in the object recognition task in mice. While spermine (1 mg/kg, i.p.) increased, ifenprodil (10 mg/kg, i.p.), a noncompetitive GluN2B-containing NMDA receptor antagonist, decreased the discrimination score on novel object recognition task. Spermine, at dose that did not alter memory (0.3 mg/kg, i.p.), reversed the cognitive impairment induced by LPS (250 µg/kg, i.p.). Ifenprodil (0.3 mg/kg, i.p.) reversed the protective effect of spermine against LPS-induced memory deficits in the novel object recognition task. However, spermine failed to reverse the LPS-induced increased of cortical and hippocampal cytokines levels. The results indicate that spermine protects from LPS-induced memory deficits in mice by mechanisms other than decreasing LPS-induced cytokine production.

Keywords: Polyamines; spermine; ifenprodil; NMDA receptor; memory; object recognition, lipopolisacaride.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Comunicação entre SI periférico e SNC.....	13
Figura 2- Mecanismos envolvidos na patologia neurodegenerativa.	15
Figura 3- Complexo Lipopolissacarídeo/ Receptor <i>Toll Like-4</i>	18
Figura 4- Estrutura química das poliaminas	20
Figura 5- Metabolismo das poliaminas.....	23
Figura 6- Sítios de modulação alostérica no receptor NMDA.	25

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
BDNF	Fator neurotrófico derivado do Encéfalo
BHE	Barreira Hematoencefálica
COX-2	Ciclooxigenase -2
CREB	Proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc
EROs	Espécies reativas de Oxigênio
GFAP	Proteína Glial Fibrilar Ácida
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
INOs	Óxido Nítrico-sintase
LBP	Proteína Ligadora de Lipopolissacáride
LPS	Lipopolissacarídeo
MD-2	Proteína Mieloide Diferenciadora 2
MK-801	(+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,b]-ciclohepteno-5-10-amino
NMDA	<i>N</i> -Metil-D-Aspartato
MTA	Metiltioadenosina
MyD88	Fator de Diferenciação Mielóide 88
NTD	Domínio N-terminal
NF κ B	Fator de Transcrição Nuclear κ B
OCV	Órgãos Circunventrivulares
ODC	Ornitina descarboxilase
NO	Óxido Nítrico
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PAO	Poliamina oxidase
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PKC	Proteína quinase dependente de cálcio
SI	Sistema Imune
SNC	Sistema Nervoso Central
SSAT	Espermidina/espermina acetiltransferase
SAMDC	S-adenosil-metionina Descarboxilase
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral – α
TLR	Receptor Toll Like

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Comunicação entre Sistema Nervoso Central e Sistema Imune.....	11
1.2 LPS e Neuroinflamação.....	13
1.3 LPS e Memória.....	19
1.4 Poliaminas.....	20
1.4.1 Metabolismo das Poliaminas.....	21
1.5 Receptor NMDA, Poliaminas e Memória.....	23
1.6 Relação entre receptor NMDA, Neuroinflamação e Memória.....	26
1.7 Reconhecimento de Objetos.....	29
1.8 Justificativa.....	30
2. OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3. MANUSCRITO.....	32
4. CONCLUSÕES.....	51
5. PERSPECTIVAS.....	51
6. REFERÊNCIAS.....	52

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Comunicação entre sistema nervoso central e sistema imune

A comunicação entre o sistema nervoso central (SNC) e o sistema imune (SI) é, atualmente, alvo de diversos estudos científicos, os quais investigam as interações mútuas entre esses dois importantes sistemas. Todos nós, possivelmente, já experienciamos mudanças de humor, emoção e cognição associados a uma infecção sistêmica. Isso mostra que existe comunicação entre a periferia e o encéfalo durante uma infecção. Esses dois grandes sistemas possuem uma relação bidirecional em que um exerce um papel regulador sobre o outro (NGUYEN ET AL,2002; PERRY,2010). Ambos desempenham uma importante função na fisiologia e nas respostas à invasão de patógenos, possuindo, portanto, uma interação adaptativa entre si (NGUYEN ET AL,2002; PERRY,2010). Na década de 1970 descreveu-se que a imunização de animais com diferentes antígenos produzia mudanças neuroendócrinas no SNC (BESEDOVSKY & SORKIN,1977). Nesse momento, iniciava-se uma segunda etapa no estudo da neuroimmunomodulação, a qual buscava investigar os efeitos originários do SI sobre a atividade do SNC. Segundo (BESEDOVSKY & SORKIN,1977), o SNC percebe e responde a sinais oriundos da ativação imune em resposta a estímulos imunogênicos, sugerindo que o SI atuaria como um “órgão sensorial”. Um exemplo da comunicação entre esses dois sistemas é o chamado “comportamento doentio”, descrito por (HART,1988), que em modelos animais, é o conjunto de alterações metabólicas e comportamentais induzidas por estímulos imunogênicos, auxiliando no combate à infecção. Alguns desses sintomas englobam alterações adaptativas que preservam a energia do organismo. Essas condições auxiliam na recuperação e no combate à infecção: diminuição da atividade locomotora, redução do comportamento sexual, perda do apetite, alterações de humor, redução da regulação do sono e febre. Entretanto, concomitante a isso, surgem as reações aparentemente não adaptativas, relacionadas com a resposta imune, destacando nesse contexto os déficits de aprendizagem e memória (BARRIENTOS ET AL,2009; BARRIENTOS ET AL,2002; BILBO ET AL,2008; PUGH ET AL,1998). Sabendo que a

homeostasia do SNC é de fundamental importância para o funcionamento das células neuronais, o SNC possui uma reação imune inata bem organizada em resposta a uma infecção bacteriana sistêmica ou lesão cerebral. Para isso conta com a barreira hematoencefálica (BHE), que é uma barreira protetora formada por células endoteliais altamente especializadas, as quais inibem o tráfego transcelular de moléculas, pela baixa atividade de pinocitose e difusão restrita paracelular de moléculas hidrofílicas por causa da rede elaborada de junções de oclusão inter-endotelial complexa (FOX ET AL,2000). Logo, alteração na integridade da BHE e migração de leucócitos para dentro do SNC (consequência da neuroinflamação) são eventos iniciais na patogenia de doenças inflamatórias, neurodegenerativas, infecciosas e neoplásicas do SNC (WEISS ET AL,2009).

Entretanto não é apenas através do rompimento da BHE que há comunicação entre o SNC e o SI. As vias de comunicação entre locais de inflamação periférica para o encéfalo têm sido investigadas em diversos trabalhos (CUNNINGHAM ET AL,2007; CUNNINGHAM ET AL,2005; DUNN,2006; KONSMAN ET AL,2002; QUAN & HERKENHAM,2002). Esses estudos mostram as vias pelas quais as citocinas atingem o SNC e fornecem evidências que mediadores inflamatórios, produzidos sistemicamente, sinalizam informações ao encéfalo por rotas humorais e neurais. Uma importante via de acesso é o nervo vago (Figura 1) que é a principal via aferente da cavidade torácico-abdominal para o encéfalo. Quando as citocinas entram em contato com receptores específicos nas terminações vagais, é emitido um impulso nervoso até o núcleo vagal do encéfalo, que terminam no núcleo do trato solitário, que por sua vez, sinaliza a regiões do encéfalo envolvidas com humor e motivação (QUAN & HERKENHAM,2002). Sinais humorais, em particular citocinas como interleucina 1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) são tipicamente pequenas, mas grande demais para atravessar a BHE (CUNNINGHAM ET AL,2007; CUNNINGHAM ET AL,2005; DUNN,2006; KONSMAN ET AL,2002; QUAN & HERKENHAM,2002). Estas citocinas chegam ao SNC via órgãos circumventriculares (OCV) que são regiões encefálicas com ausência de BHE. Outra forma de sinalizar inflamação ao SNC é sintetizar moléculas que possam atravessar a BHE. As células endoteliais possuem receptores para citocinas, que uma vez ativados secretam eicosanoides, moléculas que são mediadores inflamatórios lipídicos, como as prostaglandinas. Esses eicosanoides têm propriedades físico-químicas que os possibilitam, via corrente sanguínea, acessar o encéfalo através da BHE, induzindo

processos fisiopatológicos. A sinalização da inflamação para o encéfalo através dessas vias evoca uma resposta dos macrófagos perivasculares e da micróglia, que uma vez ativados sintetizam mediadores inflamatórios dentro do SNC, incluindo citocinas, prostaglandinas e óxido nítrico (DUNN,2006; PERRY,2010; QUAN & HERKENHAM,2002). A presença de diversas vias redundantes do SI periférico para o encéfalo denota a importância deste processo de sinalização.

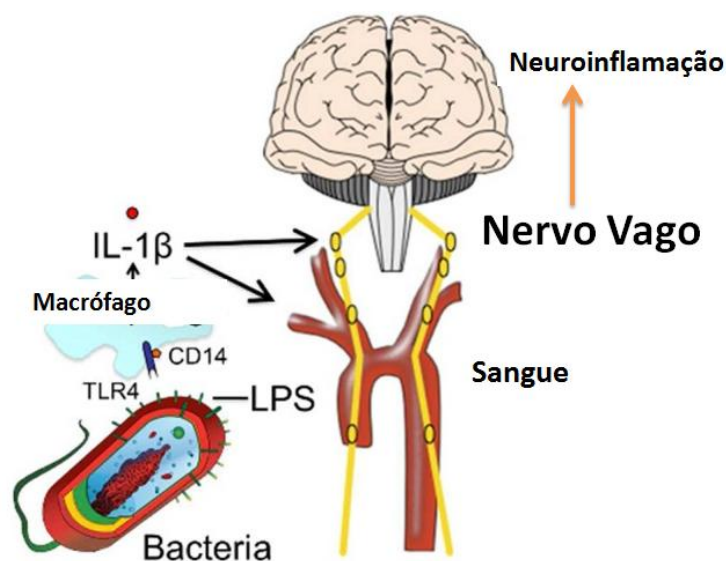


Figura 1 Comunicação do SI periférico e SNC. O lipopolissacarídeo (LPS) liga-se ao receptor Toll Like - 4 (TLR4) em macrófagos periféricos e estimula a liberação de interleucina 1 β (IL-1 β). A IL-1 β no sangue pode entrar no encéfalo através de órgãos circunventriculares, mecanismos de transporte ativo ou ainda através do nervo vago. Fonte: Adaptado de (BAGANZ & BLAKELY,2013)

1.2 LPS e Neuroinflamação

Existem fortes evidências da ocorrência de um complexo processo inflamatório no tecido neuronal associado a várias patologias no SNC. Assim, a doença de Alzheimer (LEE ET AL,2008), lesão cerebral traumática (YAKA ET AL,2007),

autismo (VARGAS ET AL,2005), doença de Parkinson (HERNANDEZ-ROMERO ET AL,2012), esclerose múltipla (WEISS ET AL,2009) são doenças associadas à neuroinflamação a qual contribui para a progressão e o agravamento dos quadros patológicos. As reações inflamatórias do SNC diferem substancialmente daquelas ocorridas em outros tecidos do organismo. Em primeiro lugar o parênquima do SNC é desprovido de células dendríticas residentes, os macrófagos perivasculares assumem função de células dendríticas maduras no SNC (BALABANOV ET AL,1999; HICKEY & KIMURA,1988). Segundo, os astrócitos e a micróglia são as células parenquimais imunes do SNC, sua ativação é diminuída em condições não patológicas. Estas células fagocíticas constituem cerca de 10% de todas as células do sistema nervoso e representam a primeira linha de defesa contra patógenos invasores, servindo também de sensores especiais para ocorrência de dano tecidual no encéfalo (HENEKA & O'BANION,2007).

A resposta inflamatória no SNC é caracterizada pela infiltração de granulócitos, macrófagos/monócitos no parênquima cerebral, ativação da micróglia, expansão dos astrócitos, expressão de citocinas, moléculas de adesão, e outros mediadores inflamatórios (DIRNAGL ET AL,1999; FEUERSTEIN ET AL,1998). As células da glia podem ser ativadas diretamente por substâncias que são liberadas a partir das fibras nervosas aferentes após estimulação, o que inclui substância P, adenosina trifosfato e glutamato. Uma vez ativada, a micróglia libera uma série de mediadores pró-inflamatórios, incluindo citocinas, fatores do sistema complemento, várias espécies radiculares, produtos secretórios tóxicos e óxido nítrico (NO), todos capazes de contribuir para disfunção e morte neuronal (Figura 2) (NGUYEN ET AL,2002), bem como a sua ativação aciona as vias de sinalização pró-inflamatórias do fator de transcrição nuclear kB (NFkB) (XANTHOS & SANDKUHLER,2014). As células da micróglia quando ativadas, também têm a capacidade de fagocitar células mortas ou danificadas, promovendo a eliminação destes fragmentos celulares da área afetada, de modo semelhante ao que ocorre nos macrófagos fagocíticos no sistema imune periférico (SMITH ET AL,2012).

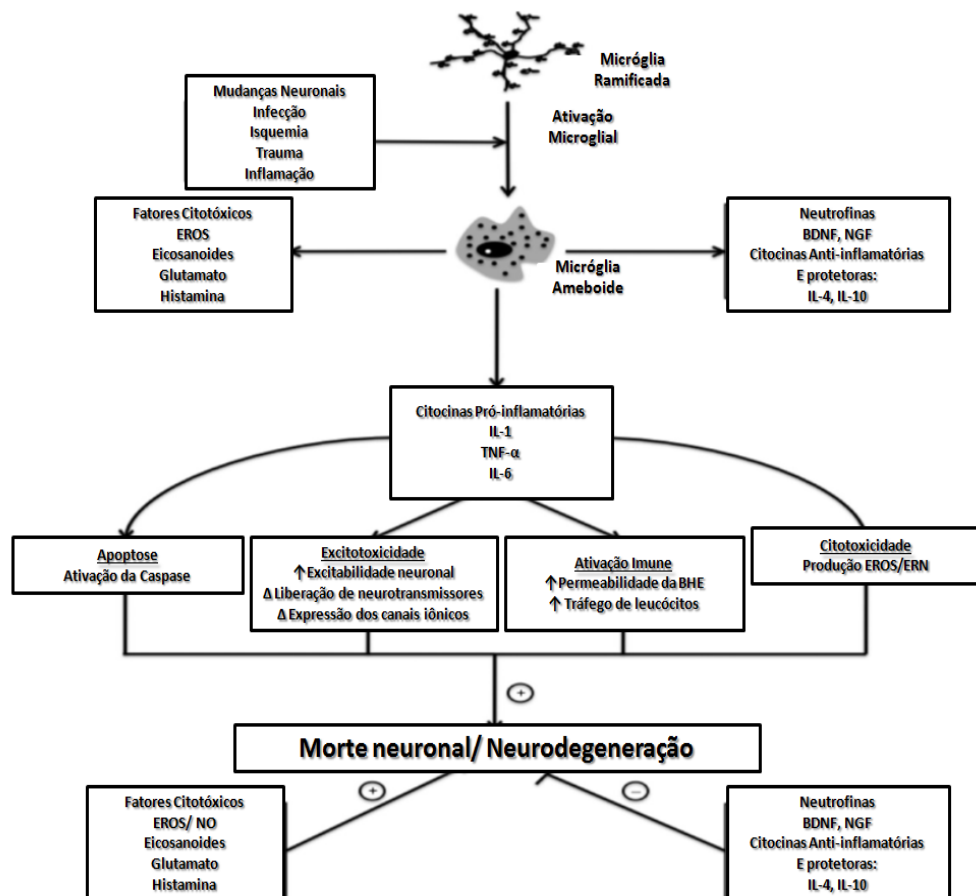


Figura 2 Mecanismos envolvidos na patologia neurodegenerativa, em processos de neuroinflamação.
 Fonte: Adaptado de (SMITH ET AL,2012)

Os eventos imunes que sucedem a invasão de um patógeno causador de inflamação podem ser reproduzidos com a administração de um constituinte isolado da parede bacteriana, o lipopolissacarídeo (LPS). Por isso, a administração de LPS tem sido adotada em diversos modelos experimentais para induzir processos inflamatórios e ativar o SI através da liberação de citocinas pró-inflamatórias no SNC (KOENIG ET AL,2014; LEE ET AL,2008; MIWA ET AL,2011).

O LPS é um dos mais potentes indutores de resposta do SI. O sistema imune inato é capaz de detectar concentrações picomolares desta molécula e desencadear resposta celular (GIOANNINI ET AL,2004), em macrófagos o LPS afeta a transcrição de mais de 1000 genes diferentes (BJORKBACKA ET AL,2004). O LPS é um componente biologicamente ativo da membrana de bactérias gram-negativas e é responsável por sua estrutura e estabilidade; constitui três quartos da superfície bacteriana, e é liberado continuamente, não apenas quando a bactéria morre, mas durante seu

crescimento e divisão. A *Escherichia coli* possui cerca de dois milhões de moléculas de LPS (GORBET & SEFTON,2005; PETSCH & ANSPACH,2000).

O LPS é composto por três partes, sendo uma parte polissacarídica hidrofílica, que é covalentemente ligada a uma parte lipídica hidrofóbica (Lipídeo A), a qual está inserida na membrana, e a região do antígeno-O. A região lipídica, lipídeo-A, é a fração mais conservada da endotoxina e é responsável por suas atividades biológicas, como por exemplo, a sua virulência, toxicidade e a estimulação do SI (LU ET AL,2008; PETSCH & ANSPACH,2000). O lipídeo-A age na ativação do SI, podendo atuar em diferentes células, como macrófagos, monócitos, neutrófilos, plaquetas sanguíneas, células endoteliais.

O reconhecimento dos patógenos é uma das propriedades mais básicas e importantes dos SI. Os organismos pluricelulares possuem um sistema de reconhecimento e defesa contra patógenos invasores, para isso possuem receptores específicos, como os “Toll Like Receptors” (TLR). Esses receptores são um bom exemplo de receptores de reconhecimento padrão, estimulados por estruturas características expressas por bactérias, vírus, e fungos chamadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (NGUYEN ET AL,2002; O'NEILL ET AL,2013). Um desses PAMPs é o LPS (O'NEILL ET AL,2013). A interação dos TLR com os PAMPs desencadeia a expressão de citocinas inflamatórias. Os TLR reconhecem um amplo espectro de ligantes incluindo LPS, proteínas (flagelina) e ácidos nucleicos (DNA e RNA dupla fita), e ativam uma via de sinalização comum que culmina na ativação de fatores de transcrição como o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B)(AKIRA & TAKEDA,2004; BJORKBACKA ET AL,2004; LU ET AL,2008). A ativação do NF- κ B leva a alterações na expressão gênica, tais como regulação positiva da expressão de moléculas co-estimulatórias de superfície, e a secreção de citocinas, como a IL-1, IL-6,IL-8,IL-12 e TNF- α (LU ET AL,2008).

Muitos PAMPs foram descritos como ativadores de determinados TLR. Assim, TLR2/TLR6 podem ser estimulados por uma série de componentes bacterianos como o peptidoglicano e o ácido lipóico. O DNA viral interage com o TLR9, enquanto que o RNA viral pode ativar o TLR7 e TLR8 (LU ET AL,2008; PICHLMAIR & REIS E SOUSA,2007). Os TLR4 podem ser ativados por diversos PAMPs. Poltorak (1998)(POLTORAK ET AL,1998) demonstrou que o TLR4 é um importante sensor para o LPS (POLTORAK ET AL,1998). De fato, pequenas quantidades de LPS, ou mais propriamente do lipídeo A, são detectadas pelo TLR4 e são capazes de

induzir os macrófagos a sintetizar mediadores inflamatórios como o TNF- α , e a IL-1 β (LU ET AL,2008). O reconhecimento do LPS é mediado ainda por outras moléculas como a proteína ligadora de lipopolissacáride (LBP), a proteína CD14 e ainda a proteína mielóide diferenciadora 2 (MD-2). As proteínas LBP, MD-2 e CD14 atuam como proteínas auxiliares, responsáveis por transferir LPS para o receptor TLR4 ou para o complexo formado entre o receptor TLR4 e a proteína MD-2 (Figura 3) (AKIRA & TAKEDA,2004; SHIMAZU ET AL,1999). Esse complexo é considerado como a principal forma de reconhecimento do LPS. A ativação dos receptores TLR4 pode desencadear diversas vias de sinalização, sendo uma das principais vias ativadas pelo LPS a do fator de transcrição NF-KB que ao se translocar ao núcleo, promove a transcrição de diversos genes que participam de processos fisiológicos e fisiopatológicos (ARROYO ET AL,2011; RAETZ & WHITFIELD,2002).

A sinalização intracelular induzida pela interação do LPS com seus receptores desencadeia o recrutamento de diversas proteínas citoplasmáticas, através de interações domínio-domínio específicas através de vias dependente ou independente do fator de diferenciação mielóide 88 (Myd88), chamada de proteína adaptadora. Ambas as vias que podem ser ativadas convergem para ativação do complexo de cinases IKKs, que por sua vez ativam a fosforilação, ubiquitinação e degradação proteossômica da proteína inibitória I κ B- α . Essa proteína é responsável por manter o NF-KB retido no citoplasma e sua degradação permite a liberação do fator de transcrição e sua translocação ao núcleo da célula (ARROYO ET AL,2011; LU ET AL,2008; O'NEILL ET AL,2013). Portanto, estímulos inflamatórios como o LPS culminam na transcrição de vários genes, responsáveis pela síntese de proteínas pró-inflamatórias como TNF, IL-6, IL-1, enzimas como óxido nítrico sintase (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2) (NGUYEN ET AL,2002; O'NEILL ET AL,2013). Devido à produção dessas proteínas inflamatórias a administração sistêmica de LPS é um método amplamente utilizado para induzir resposta imune.

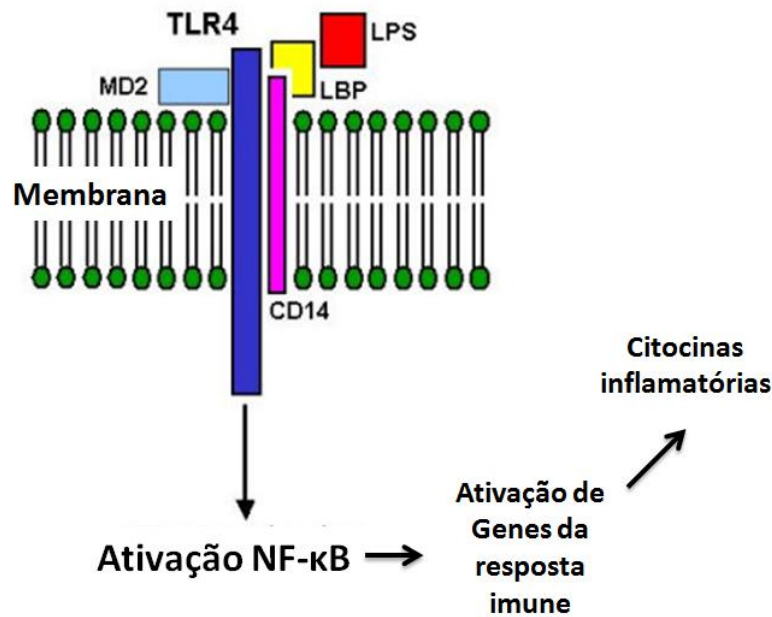


Figura 3 Visão geral do complexo Lipopolissacarídeo/ Receptor *Toll Like-4* (LPS/TLR-4) que é facilitado pelas proteínas ligadoras de LPS (LBP) e CD14 que medeiam a ativação de citocinas pró-inflamatórias. FONTE: Adaptado de (OUBURG ET AL,2005).

Diversos estudos têm demonstrado as ações centrais do LPS quando administrado sistemicamente. Lee e colaboradores (2008) demonstraram que a administração sistêmica de LPS resulta no acúmulo do peptídeo β amilóide 1-42 (encontrado nos depósitos das placas senis no encéfalo de pacientes com Doença de Alzheimer) no hipocampo e córtex cerebral de camundongos (LEE ET AL,2008). Estes resultados sugerem que um estímulo neuroinflamatório contribui para quadros clínicos semelhantes às condições patológicas da doença de Alzheimer. Ainda, a administração sistêmica de LPS induz a ativação da micróglia (QIN ET AL,2007), bem como aumento da expressão de diversos mediadores pró-inflamatórias como NF- κ B (CHOI ET AL,2012), citocinas (KONSMAN ET AL,1999; KRANJAC ET AL,2012; QIN ET AL,2007), iNOS (CHOI ET AL,2012; KONSMAN ET AL,1999; LEE ET AL,2012), COX-2, (CHOI ET AL,2012; LEE ET AL,2013; LEE ET AL,2012), EROs (LEE ET AL,2013) GFAP (CHOI ET AL,2012; LEE ET AL,2012), Caspase-3 (ZARIFKAR ET AL,2010), e ainda induz a diminuição da expressão dos fatores neurotróficos, como o derivado do encéfalo (BDNF) (GUAN & FANG,2006; KRANJAC ET AL,2012; SCHNYDRIG ET AL,2007).

1.3 LPS e Memória

Como relatado anteriormente, a administração sistêmica de LPS produz neuroinflamação. Há mais de uma década, diversos estudos (CHOI ET AL,2012; KRANJAC ET AL,2012; SHAW ET AL,2001) têm intensificado a investigação sobre os efeitos da neuroinflamação na memória e o possível mecanismo pelo qual a resposta inflamatória central pode levar a prejuízos cognitivos, para então tentar reverter esses danos por meio de intervenções farmacológicas.

Em conformidade com isso, tem-se demonstrado que a administração de LPS prejudica a memória na tarefa de medo condicionado ao contexto (BILBO ET AL,2005; KRANJAC ET AL,2012; PUGH ET AL,1998; THOMSON & SUTHERLAND,2005), labirinto aquático de Morris (CHOI ET AL,2012; SHAW ET AL,2001; SPARKMAN ET AL,2005b; ZARIFKAR ET AL,2010), bem como na tarefa de esquiva inibitória (KOHMAN ET AL,2007; LIN ET AL,2012; SPARKMAN ET AL,2005a; TARR ET AL,2011) em ratos e camundongos. Além disso, o LPS diminui a preferência por objeto novo no teste de reconhecimento de objetos, em camundongos (MIWA ET AL,2011; YAKA ET AL,2007).

Em vista disso, várias substâncias vêm sendo testadas para reverter os danos cognitivos causados pela neuroinflamação. Grande parte das drogas que revertem os prejuízos cognitivos possui ação anti-inflamatória, suprimindo a ativação de NF- κ B (CHOI ET AL,2012; MIWA ET AL,2011), reduzindo a ativação das células da glia (CUI ET AL,2008; PARK ET AL,2012), inibindo a síntese de TNF- α , ou por efeitos anti-amiloidogênicos (LEE ET AL,2012; LIN ET AL,2012). No entanto existem mais mecanismos a serem estudados que envolvem memória e neuroinflamação, como por exemplo, efeitos de moduladores do receptor NMDA (YAKA ET AL,2007; ZARIFKAR ET AL,2010), o qual possui papel chave na plasticidade sináptica. Neste sentido, indaga-se sobre as poliaminas que se ligam no receptor NMDA e melhoram a memória em diversos modelos animais (BERLESE ET AL,2005; CAMERA ET AL,2007; RIBEIRO ET AL,2013; RUBIN ET AL,2001; SIGNOR ET AL,2014; VELLOSO ET AL,2009).

1.4 Poliaminas

As poliaminas putrescina, espermidina (SPD) e espermina, são aminas alifáticas presentes em quase todas as células incluindo células procarióticas, eucarióticas, plantas e animais (THOMAS & THOMAS,2001). Essas aminas alifáticas estão amplamente distribuídas no sistema nervoso central, sendo encontradas principalmente em regiões do encéfalo como: hipotálamo, bulbo, hipocampo e cerebelo.

Quanto a caracterização estrutural das poliaminas sabe-se que a putrescina é uma di-amina primária (1,4 – diaminobutano), espermidina é uma tri-amina (mono-N-3-aminopropil-1,4-diaminobutano) e a espermina é uma tetra-amina (bis-N-3-aminopropil-1,4-diaminobutano) (Figura 4) (TETI ET AL,2002). Estas aminas alifáticas simples são conectadas por átomos de nitrogênio e possuem respectivamente uma, duas ou três cadeias carbonadas flexíveis (CARTER,1994a; WILLIAMS,1997).

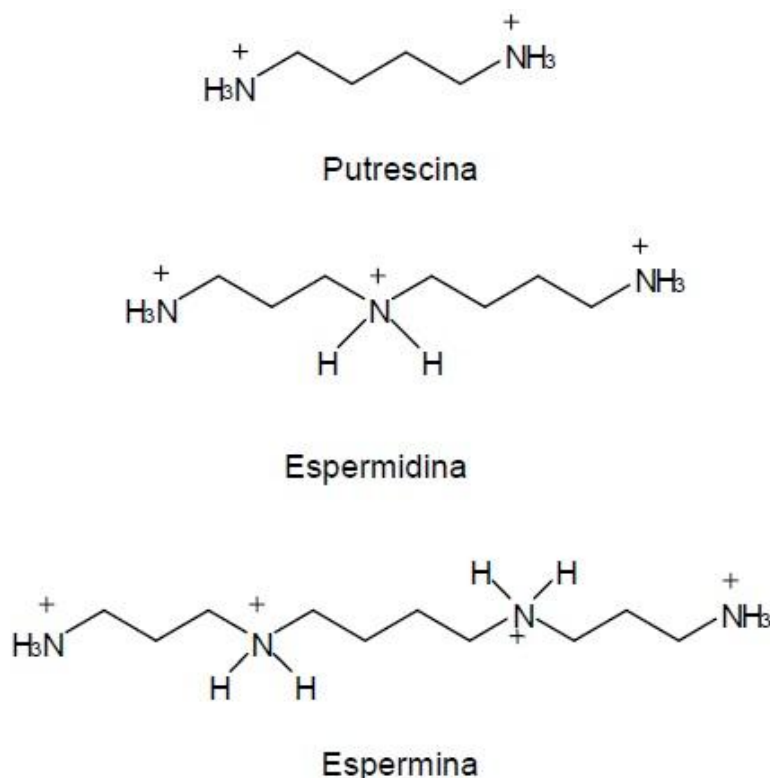


Figura 4- Estrutura química das poliaminas (TETI ET AL,2002).

As poliaminas podem se ligar a várias macromoléculas, como o DNA e RNA, proteínas e lipídios de membrana, devido à sua carga positiva, sendo estas

interações eletrostáticas responsáveis pela maioria de suas funções (HM,2003; OUAMEUR ET AL,2004; RUIZ-CHICA ET AL,2003). Estudos também mostram que elas podem agir como neurotransmissores e neuromoduladores, devido ao fato delas serem armazenadas em vesículas sinápticas e liberadas de maneira cálcio-dependente, através de um estímulo químico ou elétrico (CARTER,1994b; WILLIAMS ET AL,1991).

As poliaminas estão relacionadas com inúmeros processos celulares, incluindo a regulação de tradução e expressão de gene, a proliferação celular, morte celular por apoptose, a modulação da sinalização e estabilização da membrana da célula. Ainda, elas interagem com diversos canais iônicos, tais como canais de K^+ retificadores de entrada, receptores AMPA permeáveis ao Ca^{2+} , receptores cainato e o receptor NMDA (HM,2003; IGARASHI & KASHIWAGI,2000; SEILER & RAUL,2005; TABOR & TABOR,1984; THOMAS & THOMAS,2001). O enfoque dos estudos envolvendo as poliaminas se dá em sua interação com o sitio de ligação das poliaminas do receptor NMDA (COUGHENOUR & BARR,2001).

1.4.1 Metabolismo das Poliaminas

As poliaminas encontradas nos seres humanos são sintetizadas no organismo ou provém da flora gastrintestinal capaz de metabolizar os aminoácidos provenientes da dieta (TETI ET AL,2002). Distinguem-se duas maiores rotas de metabolismo das poliaminas: a via da produção (*sínteses de novo*) ou da interconversão e a via do catabolismo final das poliaminas. O aminoácido ornitina é o principal precursor das poliaminas endógenas (figura 5).

No encéfalo, a ornitina é formada a partir da clivagem hidrolítica do aminoácido arginina, através da enzima arginase formando putrescina (SEILER,1981). Uma vez sintetizada, a putrescina serve como precursor para a espermina e espermidina, para isso deve haver a doação de um grupamento aminopropil para a putrescina, o qual é derivado da descarboxilação da S-adenosilmetionina através da ação da enzima S-adenosilmetionina descarboxilase. A enzima espermidina sintase, uma enzima aminopropil transferase, catalisa a transferência do grupamento aminopropil para a putrescina, formando a espermidina. A espermina é formada pela doação de um segundo grupamento

aminopropil para a espermidina, catalisada pela espermina sintase, formando então a espermina (MOINARD ET AL,2005; TABOR & TABOR,1984).

A rota de interconversão permite que essa reação seja reversível, isto é, a espermina e a espermidina podem ser convertidas em espermidina e putrescina, respectivamente. A enzima espermidina/espermina acetiltransferase (SSAT), presente no encéfalo, acetila a espermina ou espermidina na posição N1, transformando as poliaminas em derivados monoacetil. Através da ação da SSAT, a espermina é transformada em N1-acetilespermina e a espermidina em N1-acetilespermidina. As poliaminas acetiladas sofrem, por fim, uma clivagem oxidativa, catalisada pela enzima poliamina oxidase (PAO), liberando os grupamentos aminopropil, e formando a espermidina e putrescina, respectivamente (PEGG,2009; SEILER,1987; URDIALES ET AL,2001).

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

As três enzimas que regulam a biossíntese das poliaminas são a ornitina descarboxilase, a S-adenosilmetionina descarboxilase e a espermidina/espermina N-acetiltransferase. Essas enzimas regulam os mecanismos envolvendo os três passos do metabolismo das poliaminas, que são a síntese, a rota de interconversão e o catabolismo, os quais regulam os níveis de poliaminas no organismo (MORGAN,1999; SEILER,2004).

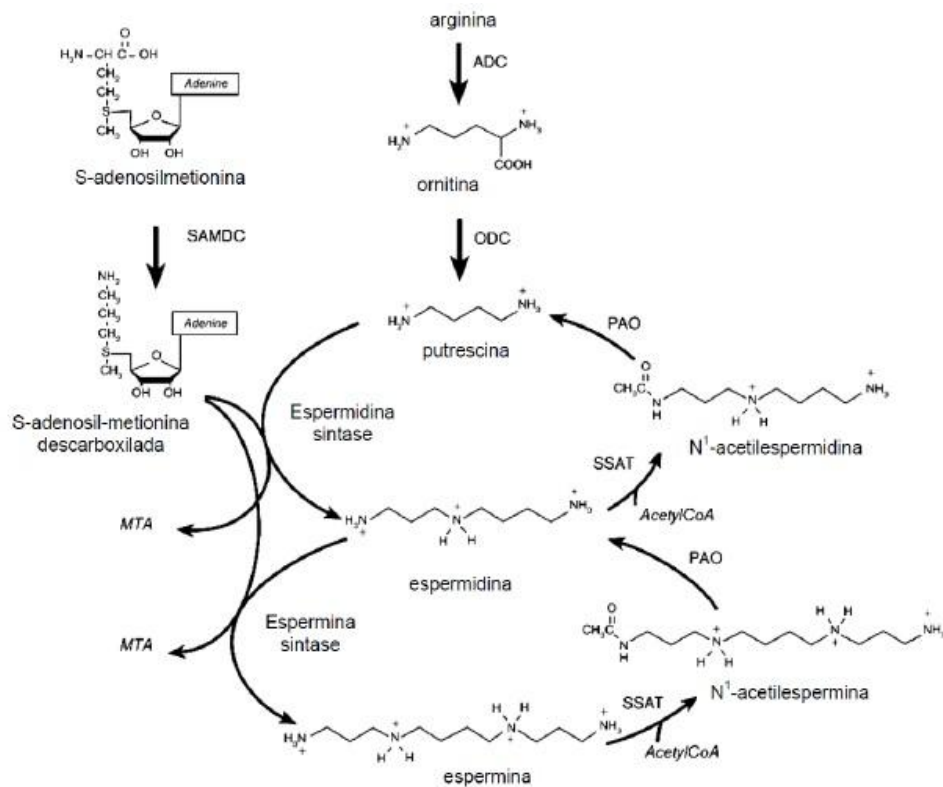


Figura 5 Metabolismo das poliaminas. Arginina descarboxilase (ADC); ornitina descarboxilase (ODC); S-adenosil-metionina descarboxilase (SAMDC); espermidina/espermina N¹ acetil-transferase (SSAT); poliamina oxidase (PAO); metiltioadenosina (MTA) adaptado de (URDIALES ET AL,2001).

1.5 Receptor NMDA, Poliaminas e Memória

Desde a sua descoberta, o receptor NMDA tem fascinado os neurocientistas devido as suas intrigantes funções no SNC. Esses canais iônicos nos quais o glutamato se liga, são mediadores essenciais da plasticidade do encéfalo e são capazes de converter padrões específicos da atividade neuronal em mudanças a longo prazo na estrutura e função das sinapses o que parece ser a base da cognição (PAOLETTI ET AL,2013).

As disfunções do receptor NMDA estão envolvidas em diversas doenças neurológicas e psiquiátricas, incluindo acidente vascular cerebral, dor neurogênica, doenças neurodegenerativas e esquizofrenia (LAU & ZUKIN,2007; MONY ET AL,2011; TRAYNELIS ET AL,2010). Por isso há o interesse em novas drogas que tenham como alvo esses receptores.

Existem vários subtipos de receptor NMDA, distinguindo-se entre si de acordo com as subunidades que possuem. Foram identificadas sete diferentes subunidades deste receptor, pertencentes a três diferentes subfamílias de acordo com a sequência de homologia: a subunidade GluN1, quatro subunidades distintas GluN2 (GluN2A, GluN2B, GluN2C e GluN2D), que são codificadas por quatro genes diferentes, e um par de subunidades GluN3 (GluN3A e GluN3B), decorrentes de dois genes separados. O número total de aminoácidos por subunidade varia entre 900 a mais de 1480 (PAOLETTI ET AL,2013).

Os receptores NMDA apresentam propriedades notáveis que os distinguem de outros tipos de receptores ionotrópicos ativados por ligantes (CULL-CANDY & LESZKIEWICZ,2004; PAOLETTI ET AL,2013). Em primeiro lugar, o seu canal iônico está sujeito a um bloqueio voltagem dependente por Mg^{2+} ; segundo, seus canais são altamente permeáveis ao Ca^{2+} ; em terceiro lugar, eles exibem cinética lenta devido ao lento desligamento do glutamato; quarto, sua ativação requer a presença não só de glutamato, mas também de um co-agonista (glicina-serina); e em quinto lugar, eles são equipados com uma grande variedade de sítios modulatórios o que confere uma sensibilidade apurada para o microambiente extracelular (PAOLETTI ET AL,2013). Um desses sítios é aquele das poliaminas.

Conforme pode ser visto na figura 6, as poliaminas funcionam como moduladores alostéricos positivos do receptor NMDA, ligando-se na interface formada pelos lóbulos inferiores do domínio N-terminal (NTD) das subunidades GluN1 e GluN2B do receptor (MONY ET AL,2011). O dímero formado pelo NTD das subunidades GluN1/GluN2B, que possuem formato de concha, pode alternar entre dois estados conformacionais, um estado ativo e outro estado “tipo-dessensibilizado”. No estado ativado, as regiões NTD das duas subunidades estão abertas, o que mantém os lóbulos inferiores próximos e aumenta a probabilidade de ligação do agonista. Já no estado tipo-dessensibilizado, cargas eletrostáticas mantêm os lóbulos inferiores de GluN1 e GluN2B separados, o que provoca o fechamento da região NTD. A espermina e a spermidina agem estabilizando o receptor em um estado ativado, aliviando a repulsão eletrostática que separa os lóbulos inferiores das subunidades GluN1 e GluN2B (MONY ET AL,2011).

O ifenprodil é um modulador alostérico negativo do receptor NMDA, seletivo para os receptores contendo GluN2B. O mecanismo pelo qual o ifenprodil inibe as respostas do receptor NMDA ainda não está bem elucidado, sendo a inibição não

competitiva (AMICO-RUVIO ET AL,2012), já que o ifenprodil se liga a fenda do domínio N - terminal da subunidade GluN2B, promovendo o afastamento dos lobos inferiores do receptor (Figura 6) (MONY ET AL,2011).

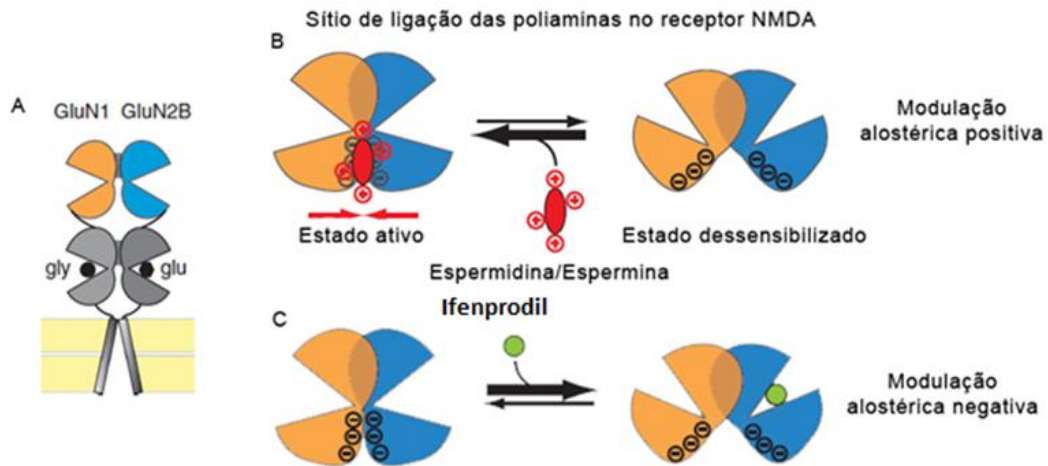


Figura 6- Sítios de modulação alostérica no receptor NMDA. A) Visão esquemática do heterodímero formado pelas subunidades GluN1 e GluN2B. B) Sítio de ligação das poliaminas no receptor NMDA. C) Sítio de ligação de antagonistas da subunidade GluN2B do receptor NMDA. gly: Glicina; glu: glutamato. Adaptado de (MONY ET AL,2011).

Alguns estudos têm mostrado que a superexpressão de gene da subunidade GluN2B do receptor NMDA melhora a memória utilizando as tarefas de reconhecimento de objetos, medo condicionada ao contexto e ao som, a extinção do medo, e transmissão social de preferência alimentar mas não a memória de reconhecimento de odor (CAO ET AL,2007; TANG ET AL,1999; WHITE & YOUNGENTOB,2004). Também tem sido descrito que as poliaminas melhoram a memória de roedores em diferentes tarefas, bem como atenuam o déficit de memória induzido por diferentes agentes amnésicos (BERLESE ET AL,2005; CAMERA ET AL,2007; KISHI ET AL,1998; MEYER ET AL,1998; MIKOLAJCZAK ET AL,2002; RIBEIRO ET AL,2013; RUBIN ET AL,2004; RUBIN ET AL,2001; SHIMADA ET AL,1994; SIGNOR ET AL,2014; TADANO ET AL,2004; VELLOSO ET AL,2009).

Tem sido descrito que o efeito facilitatório das poliaminas sobre a memória envolve o receptor NMDA uma vez que o MK 801, antagonista NMDA, reverte a melhora da memória induzida por espermidina (CAMERA ET AL,2007). Além disso, outros trabalhos mostram que a administração intra-amígdala (RUBIN ET AL,2004) e

sistêmica (CAMERA ET AL,2007) de arcaína, atagonista do sítio das poliaminas do receptor NMDA, em uma dose que não apresenta efeito *per se*, reverte o efeito facilitatório da espermidina sobre a memória na tarefa de medo condicionado, mostrando o envolvimento do sítio de ligação das poliaminas no receptor NMDA no efeito das poliaminas. Velloso e colaboradores (2009) descrevem que a administração intraestriatal de espermina pós-treino reverte o prejuízo de memória induzido por ácido quinolínico, um modelo da doença de Huntington, na tarefa de reconhecimento do objetos. Evidências recentes também sugerem que a facilitação da memória induzida pela espermidina na tarefa de esquivas inibitória envolve ativação sequencial das vias da PKC e PKA/CREB no hipocampo (GUERRA ET AL,2011; GUERRA ET AL,2012).

1.6 Relação entre receptor NMDA, Neuroinflamação e Memória

O declínio de memória que ocorre com o envelhecimento é geralmente ligada à plasticidade sináptica deficiente, que poderia ser causada por uma alteração na função e/ou expressão do receptor NMDA. Esses receptores parecem ser mais vulneráveis ao processo de envelhecimento do que outros receptores de glutamato e mostram declínios em suas densidades de ligação, funções eletrofisiológicas, e influência em outros sistemas transmissores (MAGNUSSON ET AL,2002; MAGNUSSON ET AL,2007). O funcionamento alterado do receptor NMDA envolve a expressão reduzida de determinadas subunidades deste receptor (MAGNUSSON ET AL,2002; MAGNUSSON ET AL,2007). Assim, macacos e ratos idosos apresentam déficits na expressão da subunidade GluN2B (BAI ET AL,2004; CLAYTON & BROWNING,2001), as quais se relacionam com a redução da aprendizagem e memória. Sendo assim, os tratamentos destinados a prevenir ou reverter os efeitos do envelhecimento nos receptores NMDA podem ajudar na reversão do declínio da memória que está associado com o envelhecimento e doenças relacionadas à idade (MAGNUSSON ET AL,2010).

A neuroinflamação desempenha um papel importante na progressão das patologias associadas ao envelhecimento, como por exemplo da doença de Alzheimer (AKIYAMA ET AL,2000; MCGEER & MCGEER,1998). Regiões do encéfalo especialmente envolvidas na aprendizagem e na memória demonstram grau mais

elevado de ativação das células da micróglia e mostram maior taxa de atrofia (CAGNIN ET AL,2001). Os neurônios do córtex entorrinal e hipocampo são particularmente mais vulneráveis às consequências de neuroinflamação crônica e envelhecimento (HAUSS,1981; WENK,2003).

O receptor NMDA é altamente concentrado na região cortical e hipocampal do encéfalo e sua ativação tem um duplo papel, já que está envolvido tanto na neuroplasticidade quanto na neurodegeneração. Portanto, danos nas funções deste receptor podem contribuir para os declínios cognitivos observados na Doença de Alzheimer (BI,2010). A neuroinflamação induzida por LPS causa redução no número de receptores NMDA, principalmente das subunidades GluN2A e GluN2B (MA ET AL,2014), no hipocampo e no córtex cerebral, que são regiões do encéfalo particularmente envolvidas com a memória (BIEGON ET AL,2002; ROSI ET AL,2004). A perda da função dos receptores NMDA em regiões corticais e hipocampais pode contribuir para os déficits cognitivos subsequentes às doenças neuroinflamatórias (BIEGON ET AL,2002; MA ET AL,2014). Desse modo, tem sido mostrada, em diversos estudos, a seguinte sequência de eventos que levam a neurodegeneração, e consequente perda dos receptores NMDA no processo de neuroinflamação (WENK,2003):

- 1- A administração de LPS leva à liberação de citocinas inflamatórias por astrócitos e micróglia ativadas (QUAN ET AL,1994);
- 2- Essas citocinas estimulam a produção de outros mediadores inflamatórios, tais como prostaglandinas (KATSUURA ET AL,1989);
- 3- As prostaglandinas podem induzir a liberação de glutamato de astrócitos (BEZZI ET AL,1998; BEZZI ET AL,2001);
- 4- O aumento dos níveis de glutamato extracelular e da estimulação dos receptores de glutamato, leva ao desbloqueio dependente de despolarização e de Mg^{2+} , e a entrada de quantidades tóxicas de Ca^{2+} em neurônios, por meio desses receptores.(BAL-PRICE & BROWN,2001) ;
- 5- A glia ativada pode potencializar a toxicidade mediada pelo NMDA via produção e liberação de óxido nítrico (MORIMOTO ET AL,2002) e interleucinas (VIVIANI ET AL,2003), sugerindo que a neuroinflamação pode exacerbar a excitotoxicidade neuronal;

6- As prostaglandinas e as citocinas podem também elevar indiretamente a concentração extracelular do glutamato, inibindo a sua recaptação pelos astrócitos (ROBINSON ET AL,1993; ROTHSTEIN ET AL,1993);

7- O bloqueio da captação de glutamato por astrócitos resulta em significativa neurodegeneração (ROBINSON ET AL,1993; ROTHSTEIN ET AL,1993).

8- O aumento de glutamato extracelular e a superestimulação dos receptores glutamatérgicos pode regular negativamente a expressão gênica dos receptores de glutamato, levando a internalização (PARK ET AL,2009) e perda (MA ET AL,2014; ROSI ET AL,2004) dos receptores NMDA. Isto sugere que os neurônios que expressam esses receptores de glutamato no hipocampo e córtex cerebral podem estar em maior risco de degeneração na presença de neuroinflamação (BAL-PRICE & BROWN,2001).

Biegon e colaboradores (2004), tem relatado uma diminuição progressiva na densidade dos receptores NMDA entre 1 e 24 horas após o trauma cerebral em camundongos. Esta diminuição dura pelo menos uma semana, e a administração de um agente anti-oxidante 1 e 2 dias após a lesão, melhora significativamente a função neurológica e cognitiva. Já, Yaka e coelgas (2007) mostraram que a injeção i.p. de D-cicloserina, um agonista do sítio da glicina no receptor NMDA, reverte os déficits cognitivos induzidos por trauma cerebral, na tarefa de reconhecimento de objetos, bem como, reverte a diminuição da LTP, e ainda recupera os níveis de BDNF hipocampais. Estes resultados sugerem que a estimulação do receptor NMDA, em vez da inibição do receptor NMDA, poderia ser benéfica para a reversão dos danos cognitivos que ocorrem com a neuroinflamação.

Sendo assim, questiona-se se as poliaminas, além de serem agonistas do receptor NMDA, como relatado anteriormente, poderiam ainda ter efeito antiinflamatório e com isso proteger o encéfalo dos danos induzidos por LPS. Porém, na literatura existem dados conflitantes relacionando os efeitos das poliaminas na resposta inflamatória. Diversos estudos têm demonstrado que a espermina inibe a resposta inflamatória inata(ZHANG ET AL,1999; ZHANG ET AL,1997; ZHU ET AL,2009) e restringe a atividade dos macrófagos, diminuindo com isso a liberação de citocinas inflamatórias (ZHANG ET AL,1999). Já é conhecido que as concentrações de espermina estão significativamente elevadas nos tecidos durante

uma doença inflamatória ou processos neoplásicos, o que sugere um papel direto da espermina para limitar o crescimento ou a disseminação de um agente infeccioso ou tumoral. (BJELAKOVIC ET AL,2010; ZHANG ET AL,1997; ZHANG ET AL,2000). No entanto, (SOULET & RIVEST,2003) mostraram atividade pró-inflamatória das poliaminas, após constatar exacerbação da resposta imune inata pela administração intra-cerebro-ventricular de espermina. Também (PUNTAMBEKAR ET AL,2011), utilizando modelo *in vivo*, mostrou que as poliaminas promovem o influxo de macrófagos para o SNC de murinos após insulto patogênico, demonstrando ação pró-inflamatória das poliaminas. Portanto, há necessidade de maior investigação sobre os efeitos das poliaminas nas respostas inflamatórias no SNC e seu envolvimento na cognição durante um quadro de neuroinflamação.

1.7 Tarefa de Reconhecimento de Objetos

A tarefa de reconhecimento de objetos é um teste comportamental utilizado para acessar memória declarativa em roedores, que se baseia na tendência natural do animal em explorar mais o objeto novo em detrimento ao familiar, num contexto conhecido. Essa preferência incondicionada por objetos novos é considerada um indicativo de que o objeto familiar existe na memória (ENNACEUR,2010). Nesse paradigma de aprendizagem, a diferença na exploração entre um objeto previamente conhecido e um objeto novo é dada como um índice de desempenho de memória (MAZARATI ET AL,2011). Em contraste com a maioria dos paradigmas de memória e aprendizado classicamente usados que requerem longos períodos de treinamento do animal, a tarefa de reconhecimento de objetos oferece a possibilidade de se obter a informação rápida, além de não requerer a exposição a um estímulo aversivo e nem restrição hídrica ou alimentar. Esta tarefa tem sido utilizada para avaliar o efeito das poliaminas sobre a memória em modelo da doença de Huntington (VELLOSO ET AL,2009), ainda foi utilizado para avaliar a memória em modelo de trauma cerebral (YAKA ET AL,2007), e também em modelos de neuroinflamação induzido por LPS (MIWA ET AL,2011).

1.8 Justificativa

Apesar da existência de várias evidências sugerindo um papel facilitador para poliaminas no aprendizado e na memória, nenhum estudo abordou se as poliaminas melhoram o prejuízo de memória induzida por LPS. Portanto, no presente estudo, investigou-se o efeito de espermina na piora de memória induzida por LPS no teste de reconhecimento de objetos. Além disso, foi investigado se a espermina altera o aumento dos níveis de citocinas corticais e hipocámpais induzido por LPS em camundongos, uma vez que tanto a atividade anti- como pró-inflamatória também têm sido relatados para estas aminos alifáticas

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar o efeito da administração sistêmica de espermina sobre a memória e sobre o conteúdo de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias de camundongos administrados sistemicamente com LPS.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 – Avaliar o efeito da administração de espermina e ifenprodil sobre a memória da tarefa de reconhecimento de objetos.

2.2.2 - Avaliar o efeito da espermina sobre a piora da memória causada por LPS.

2.2.3 - Avaliar o efeito do ifenprodil sobre a piora da memória causada por LPS.

2.2.4 – Avaliar o envolvimento do sítio de ligação das poliaminas no receptor NMDA no efeito da espermina sobre a piora da memória induzida por LPS.

2.2.5 – Avaliar o efeito da espermina sobre os níveis de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias no córtex cerebral e hipocampo de animais tratados com LPS.

3. MANUSCRITO

Spermine reverses LPS-induced memory deficit in mice

Pâmella Karina Santana Frühauf, Rafael Porto Ineu, Lediane Tomazi, Thiago Duarte, Carlos Fernando Mello, Maribel Antonello Rubin*

Graduation Program in Pharmacology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

*Correspondence: Maribel Antonello Rubin, PhD, Biochemistry and Molecular Biology Department, Natural and Exact Sciences Center, Federal University of Santa Maria, Camobi. CEP: 97105900, Santa Maria, RS, Brazil. Fax: + 55 55 3220 8978. maribel.rubin@gmail.com

Email addresses: PKSF: pam_fruhauf@yahoo.com.br

RPI: rafaelineu@gmail.com

LT: ledianetomazi@gmail.com

TD: duartethiago89@yahoo.com.br

CFM: mello.cf@gmail.com

MAR: maribel.rubin@gmail.com

Abstract

Background

Lipopolysaccharide (LPS) induces neuroinflammation and memory deficit. Since polyamines improve memory in various cognitive tasks, we hypothesized that spermine administration reverses LPS-induced memory deficits in the object recognition task in mice. The involvement of the polyamine binding site at the NMDA receptor and cytokine production in the promnestic effect of spermine were investigated.

Methods

Adult male mice were injected with LPS (250 µg/kg, i.p.) and spermine (0.3 - 1 mg/kg, i.p.) and/or ifenprodil (0.3- 10 mg/kg, i.p.) and their memory function was evaluated using the novel object recognition task. In addition, cortical and hippocampal cytokines levels were measured by ELISA four hours after LPS injection.

Results

While spermine increased, ifenprodil decreased the discrimination score in the novel object recognition task. Spermine at dose that did not alter memory (0.3 mg/kg, i.p.), reversing the cognitive impairment induced by LPS. Ifenprodil (0.3 mg/kg, i.p.), a GluN2B-containing NMDA receptor antagonist, reversed the protective effect of spermine against LPS-induced memory deficits. However, spermine failed to reverse the LPS-induced increase of cortical and hippocampal cytokines levels.

Conclusions

The results indicate that spermine protects from LPS-induced memory deficits in mice by a mechanism that involves GluN2B receptors.

Keywords

Neuroinflammation, polyamines, spermine, ifenprodil, NMDA receptor, memory, object recognition

Background

Neuroinflammation is implicated in several neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease [1], autism [2], head injury [3], Parkinson disease [4] and multiple sclerosis [5]. It has been shown that intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS), a cell wall component of gram-negative bacteria induces neuroinflammation, hippocampal cell loss, cognitive impairment, learning deficits and even beta amyloid plaque generation in the hippocampus [1, 6]. A number of studies have shown that upon exposure to LPS, microglia become activated and produce proinflammatory mediators such as cytokines, chemokines, prostanooids, and reactive oxygen species [1, 7-9]. Current evidence indicates that these products are key mediators of the neuroinflammatory process and contribute to LPS-induced neuronal damage and subsequent cognitive impairment [1, 7-12]. In line with this view, it has been shown that LPS administration impairs contextual fear conditioning [12-14], spatial memory [6, 15-18] and avoidance learning [19-23], in rats and mice. In addition, LPS decreases the preference for a novel object in the novel object recognition test, in mice [24].

The N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors seem to be particularly susceptible to the neuroinflammatory challenge, since inflammation decreases the expression of GluN1 [25], GluN2A and GluN2B [26] subunits and NMDA-dependent long-term potentiation [27] in the hippocampus. This finding is in agreement with previous reports that showed that neuroinflammation decreases total NMDA receptors (NR1 immunoreactivity) in the hippocampus and entorhinal cortex [28] and that LPS-treated animals present decreased MK801 binding [29]. Accordingly, the partial NMDA receptor agonist d-cycloserine prevents the deleterious effects of LPS [30] and closed head injury [3] on memory consolidation. Therefore, it sounds possible that other positive allosteric modulators of the NMDA receptor attenuate LPS-induced cognitive deficits.

Polyamines, such as putrescine, spermidine and spermine (SPM), allosterically activate NMDA receptors by binding at the lower lobe of the N-terminal domain of GluN1 and GluN2B dimer interface [31]. Functionally, polyamines are involved in growth and differentiation, but they also regulate a broad array of cellular functions in both neurons and

inflammatory cells [32-34]. Numerous reports have indicated that polyamines improve memory in several tasks and attenuate memory deficits induced by different amnesic agents [35-44]. In fact, agonists and antagonists of the polyamine binding site at the NMDA receptor facilitate and impair memory in various tasks respectively [36, 37, 39, 42, 43, 45, 46], and the sequential activation of PKC and PKA/CREB pathways in the hippocampus has been implicated in the promnesic effect of polyamines [47, 48].

Despite the growing evidence suggesting a facilitatory role for polyamines in learning and memory, no study has addressed whether polyamines improve LPS-induced memory deficits. Therefore, in the current study we investigated the effect of spermine on LPS-induced impairment of memory in the novel object recognition test. In addition, we investigated whether spermine alters LPS-induced increase of cortical and hippocampal cytokine levels in mice, since both anti- and proinflammatory activity have also been reported for these aliphatic amines [32, 49-52].

Methods

Animals

Male Swiss mice (30-35 g) from the animal house of the Federal University of Santa Maria were used. The animals had free access to water and food (Guabi, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil), and were maintained in a humidity and temperature-controlled room (22 ± 2 °C) under a 12-h light-dark cycle. Behavioral experiments were conducted in a sound-attenuated and air-regulated room, where the animals were habituated 1 hour prior to experiments. Behavioral tests were conducted during the light phase of the cycle (between 9:00 A.M. and 5:00 P.M.). All animal procedures were carried out in accordance with Brazilian law no. 11.794/2008, which is in agreement with the Policies on the Use of Animals and Humans in Neuroscience research, revised and approved by the Society for Neuroscience Research in January 1995 and with the Institutional and National regulations for animal research (process 068/2011). All experimental protocols were designed aiming to keep the number of animals used to a minimum, as well as their suffering.

Drug administration

Lipopolysaccharide (LPS - *Escherichia coli*, serotype 055:B5), spermine (N, N'-bis [3-aminopropyl] 1,4-butanediamine) and ifenprodil (alpha-[4-Hydroxyphenyl]-beta-methyl- 4-benzyl-1-piperidineethanol tartrate salt) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). All drugs solutions were prepared daily in saline (0.9% NaCl) and injections were performed intraperitoneally (i.p.) in a 10 ml/kg injection volume. Doses were selected based on previous studies [12], and pilot experiments.

Behavioral testing

Novel Object Recognition Task

Novel object recognition task was carried out as described previously [53]. The task was performed in a 30 x 30 x 30 cm wooden chamber, with walls painted black and the front wall made of Plexiglas and the floor covered with ethyl vinyl acetate sheet. A light bulb, hanging 60 cm above the behavioral apparatus, provided constant illumination of about 40 lux, and an

air-conditioner provided constant background sound isolation. The objects used were plastic mounting bricks, each of them with different shapes and colors, but same size. Throughout the experiments objects were used in a counterbalanced manner and animals did not display previously preference for any of the objects. Chambers and objects were cleaned with 30% ethanol immediately before and at the end of each behavioral evaluation. The task consisted of habituation, training and testing sessions, each of them with the duration of 8 minutes. In the first session, mice were individually habituated to the behavioral apparatus and then returned to their home cages. Twenty-four hours later the animals were subjected to a training session in which the animals were exposed to two of the same objects (object A), and the exploration time was recorded with two stopwatches. Exploration was recorded when the animal touched or reached the object with the nose at a distance of less than 2 cm. Climbing or sitting on the object was not consider exploration. The test session was carried out 24 hours after training. Mice was placed back in the behavioral chamber and one of the familiar objects (i.e. object A) was replaced by a novel object (i.e. object B). The time spent exploring the familiar and the novel object was recorded. The discrimination score was then calculated, taking into account the difference of time spent exploring the novel (B) and the familiar (A) objects ($T_{\text{novel}} - T_{\text{familiar}}$), and used as a memory parameter.

Open field

Immediately after the object recognition-test session, the animals were transferred to a 30 x 30-cm open field, with the floor divided into four squares. During the 5-min open field session, the number of crossing responses was recorded. The open field was used to identify motor disabilities, which might influence the object recognition performance.

Quantification of cytokines

Cytokine quantification was assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using commercial kits for mouse IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 (eBIO-SCIENCE, San Diego, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. The presence and concentration of the cytokines were determined by the intensity of the color measured by spectrometry in a microplate reader.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Student's *t*-test, one, two or three -way ANOVA followed by post hoc analyses (Student–Newman–Keuls test). A $P < 0.05$ was considered significant. *F* and *P* values are shown only if $P < 0.05$.

Experimental design

Experiment 1

This experiment was designated to investigate the effect of LPS on the object recognition task performance. Animals were habituated and trained, as described above. Immediately after training, the animals were injected with saline or LPS (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Twenty-four hours after training, the animals were subjected to the novel object recognition test session and open field, as described above.

Experiment 2

This experiment was designated to investigate the effect of spermine or ifenprodil on the object recognition task performance. Animals were habituated and trained, as described above. Immediately after training, the animals were injected with saline, spermine (0.1- 10 mg/kg) or ifenprodil (0.3- 10 mg/kg). Twenty-four hours after training, the animals were subjected to the novel object recognition test session and open field, as described above.

Experiment 3

This experiment was designed to investigate the involvement of polyamine-binding sites in the impairment of memory induced by LPS. Animals were habituated and trained, as described above. Immediately after training, the animals were injected with saline or LPS (250 µg/kg) and 5 minutes later with saline or the polyaminergic agonist, spermine (at doses that have no effect *per se* on memory, 0.3 mg/kg, as determined by the dose-effect curve shown in Fig. 2A) in different flanks. Twenty-four hours after training, the animals were subjected to the novel object recognition test session and open field, as described above.

Experiment 4

This experiment was designed to investigate the involvement of polyamine-binding sites on the NMDA receptor in the reversion of the LPS-induced impairment of memory by spermine on the object recognition task performance. Animals were habituated and trained, as described above. Immediately after training, the animals were injected with saline or LPS (250 µg/kg), 5 min later they were injected with saline or the polyaminergic agonist, spermine (0.3 mg/kg, the dose that reverses the LPS-induced impairment of memory shown in Fig. 3) and 5 minutes later they were injected with saline or ifenprodil (at doses that have no effect *per se* on memory, 0.3 mg/kg, as determined by the dose-effect curve shown in Fig. 2B) in different flanks. Twenty-four hours after training, the animals were submitted to the novel object recognition test and open field, as described above.

Experiment 5

This experiment was designated to investigate whether spermine prevents LPS-induced increases in levels of proinflammatory cytokines, IL-1 β , IL-6, TNF- α , ITF- γ , and anti-inflammatory cytokine, IL-10. Immediately after the training session of the object recognition task, animals received saline, LPS (250 µg/kg), spermine (0.3 mg/kg) or a combination of LPS (250 µg/kg) and spermine (0.3 mg/kg). Four hours after drug administration the animals were anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), transcardially perfused with cold saline and the cerebral cortex and the hippocampi were dissected and homogenized in appropriated buffer (PBS containing 1 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 0.5% bovine serum albumin, pH 7.4). Samples were centrifuged at 25,000 g for 10 min and the supernatant was used to measure IL-1 β , IL-6, TNF- α , ITF- γ and IL-10 levels, which were corrected for total protein content. Protein concentration was determined for each brain region by the Bradford method (Bradford, 1976) enabling cytokine levels to be expressed as pg/mg protein. The cytokines quantification was assessed as described above.

Results

LPS decreased the discrimination score in novel object recognition task.

Figure 1 shows the effect of the post-training intraperitoneal administration of LPS or saline on discrimination score in the object recognition task. Statistical analysis (Student's *t*-test) revealed that LPS (250 µg/kg) decreased the discrimination score ($t_{14}=4.3$; $P<0.01$), compared with control group, indicating a memory impairment in LPS-treated animals.

Spermine increased and ifenprodil decreased the discrimination score on novel object recognition task.

Figure 2A shows the effect of post-training administration of spermine (0.1-10 mg/kg) on the discrimination score in the object recognition task. Statistical analysis (one-way ANOVA) revealed a significant effect of spermine ($F_{5,44}= 2.51$; $P<0.05$). Post hoc analysis revealed that spermine (1 mg/kg) increased discrimination score, indicating that spermine improved memory.

Figure 2B shows the effect of post-training administration of ifenprodil (0.3-10 mg/kg) on the discrimination score in the object recognition task. Statistical analysis (one-way ANOVA) revealed a significant effect of ifenprodil ($F_{3,16}= 6.60$; $P<0.05$). Post hoc analysis revealed that ifenprodil (10 mg/kg) decreased discrimination score, indicating that ifenprodil impaired memory.

Spermine attenuates LPS-induced discrimination impairments on novel object recognition task.

Figure 3 shows the effect of post-training administration of spermine on LPS-induced impairment of memory on novel object recognition task. Statistical analysis (two-way ANOVA) revealed a significant treatment (saline or LPS) versus polyamine agonist (saline or spermine) interaction ($F_{1,56}= 9.03$; $P<0.05$), revealing that spermine reversed the impairment of memory induced by LPS.

Ifenprodil reverses the effect of spermine in LPS-treated animals.

Figure 4 shows the effect of ifenprodil (0.3 mg/kg) on the spermine-induced reversion of the impairment of memory induced by LPS in the object recognition task. Statistical analysis (three-way ANOVA) revealed a significant treatment (saline or LPS) versus polyamine agonist (saline or spermine) versus NMDA receptor antagonist (saline or ifenprodil) interaction ($F_{1,11}= 3.97$; $P<0.05$). *Post hoc* analysis (SNK) revealed that ifenprodil reversed the effect of spermine in attenuating the impairment of memory induced by LPS on the novel object recognition task.

Treatments did not alter crossing responses.

Since the discrimination score may be affected by locomotor alterations unrelated to the mnemonic component of the task, we monitored the number of crossing responses in the open field task. Treatments did not alter locomotor activity measured by crossing responses (data not shown). Therefore, the reported effects in this study are unlikely to be associated with changes in locomotion and coordination.

Spermine did not revert LPS-induced increase of cytokines levels

Figures 5 and 6 show the effect of post-training administration of spermine and LPS on the levels of proinflammatory and antiinflammatory cytokines in the hippocampi and cerebral cortex, respectively. Statistical analysis (two-way ANOVA) revealed only a significant effect of treatment (saline or LPS) on IL-1 β ($F_{1,15}= 21.35$; $P<0.001$), IL-6 ($F_{1,15}= 21.49$; $P<0.001$) and TNF- α ($F_{1,15}= 14.65$; $P<0.01$) levels in the hippocampi (figure 5); and on IL-1 β ($F_{1,15}= 21.86$; $P<0.001$), IL-6 ($F_{1,15}= 22.47$; $P<0.001$), TNF- α ($F_{1,15}= 12.20$; $P<0.01$) and IL-10 ($F_{1,15}= 21.28$; $P<0.001$) levels in the cerebral cortex (Figure 6). Spermine (0.3 mg/kg) did not alter cytokine levels. LPS and SPM did not alter the levels of IFN- γ in the hippocampi (Figure 5) and in cerebral cortex (Figure 6).

Discussion

The current study showed that a polyaminergic agonist, spermine, reverses post-training bacterial endotoxin-induced memory impairment in the novel object recognition task. In addition, it showed that spermine, at doses higher than those capable of reversing the deleterious effect of LPS, increases the discrimination score in the novel object recognition task. It also revealed that ifenprodil decreases the discrimination score in the novel object recognition task, and a non-effective dose of ifenprodil reverses the memory improving effect of spermine in LPS-treated animals, providing pharmacological evidence that the promnesic effect of spermine involves the polyamine binding site at the NMDA receptor. However, spermine failed to reverse the LPS-induced increase of cytokine levels in the cerebral cortex and hippocampi.

The currently described ability of spermine to reverse LPS-induced memory deficits is in agreement with a number of studies that have isolatedly shown that while LPS disrupts [1, 12, 17, 19, 54], polyamines improve memory [35-42, 55].

Several mechanisms have been implicated in LPS-induced alterations of neural functions. It has been suggested that memory impairment is triggered by direct stimulation of Toll-like receptor (TLR)₄ by LPS. TLR₄ activation recruits myeloid differentiation adaptor protein (MyD88) and ultimately activates the nuclear factor κ B signalling pathway, increasing the production of proinflammatory cytokines by macrophages [56], microglia [57-59] and astrocytes [57, 60]. LPS-induced activation of glial cells results in neurotoxic substances release, including nitric oxide, glutamate, cytotoxic cytokines, and superoxide radicals [12, 57, 61, 62] and suppression of neurotrophic factors secretion, impairing neuroplasticity and, consequently, learning and memory [12, 13, 15, 21, 63, 64]. In addition, TLR₄ activates Src family kinases, which phosphorylate GluN2B subunit or NMDA receptor and enhance GluN2B-dependent Ca²⁺ influx [65, 66], promoting excitotoxicity. Indeed, LPS induces progressive and cumulative neuronal loss over time [67-69].

On the other hand, there is a large body of evidence indicating that the promnesic effects of polyamines involve the activation of NMDA receptors, which have been critically implicated in learning and memory processes [39, 43, 47, 48, 70-72]. In the current study ifenprodil, a noncompetitive GluN2B-containing NMDA receptor antagonist, not only impaired the consolidation of the memory of novel object recognition task, but also reversed

(at a dose that did not alter memory *per se* in our study) the improving effect of spermine on the memory of LPS-treated animals, supporting a role for NMDA receptors in this effect of spermine [73-75]. Interestingly, these results are in agreement with the study by Kranjac and colleagues (2013) [30], who have shown that partial NMDA receptor agonist d-cycloserine rescues memory consolidation following systemic bacterial endotoxin exposure. Furthermore, Velloso and colleagues (2009) [44] have found that post-training intrastriatal administration of spermine reverses the recognition memory deficits in the novel object recognition task induced by quinolinic acid (QA), a model of Huntington's disease. It is worth noting that spermine improved memory *per se* in the novel object recognition task. To our knowledge, this is the first study showing that spermine improves memory. The finding that ifenprodil prevents the promnestic effect of spermine tempt us to propose that it may involve the same molecular targets proposed for spermidine [36, 37, 39, 41]. However, further studies are necessary to clarify this point.

In vivo and *in vitro* studies have suggested that polyamines may have a dual role in inflammation, eliciting both anti- and proinflammatory responses. For instance, spermine decreases monocyte proinflammatory cytokine response *in vitro* [49, 50, 76-78]. On the other hand, Puntambekar and colleagues (2011) [52] have shown that polyamines promote macrophage influx into the murine central nervous system following pathogenic insult, in an *in vivo* model of secondary central nervous system (CNS) inflammation. Soulet and Rivest (2003) [79] have shown that systemic LPS increases ornithine decarboxylase expression throughout the CNS and that this finding precedes an increase in the expression of proinflammatory molecules TLR₂ and TNF- α , in mice. Moreover, treatment with a difluoromethylornithine, an irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, decreases LPS-induced TNF- α and TLR2 expression, proving evidence that the LPS-induced increase of proinflammatory molecules is polyamine-dependent. The intracerebral injection of spermine prior to LPS also increases the number of cells expressing both TNF- α and TLR2 in the CNS [79]. Interestingly, LPS exposure stimulates IL-1 β release from astrocytes (*in vitro*) through a mechanism that requires NMDA receptor stimulation [80]. However, we have found that spermine does not alter IL1- β , IL-6, TNF- α and IFN- γ levels in the cerebral cortex and hippocampus, a finding that does not support an anti-inflammatory role for this polyamine in our experimental conditions.

Conclusion

Spermine improves memory *per se* and attenuates LPS-induced memory impairment. Our results also suggest that spermine protects against LPS-induced memory impairment by mechanisms that involve the polyamine binding site at the NMDA receptor, since it is reverted by ifenprodil. Spermine, however, does not prevent LPS-induced increase of proinflammatory molecules, suggesting that the effect of spermine on memory does not involve anti-inflammatory mechanisms.

List of abbreviations

LPS: lipopolysaccharide; NMDA: N-methyl-D-aspartate; SPM: spermine; PKC: Protein kinase C; PKA: Protein kinase A; CREB: cAMP response element-binding protein; TLR₄:

Toll-like receptor 4; MyD88: Myeloid differentiation adaptor protein; CNS: Central nervous system; IL-1 β : Interleukin-1 β ; IL-6: Interleukin-6; TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α ; ITF- γ : Interferon- γ ; IL-10: Interleukin-10.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests

Authors' contributions

Conceived and designed the experiments: PKSf, RPI, LT and TD. Performed the behavioral experiments: PKSf and LT. Performed the quantification of cytokines: TD. Analyzed the data: RPI, CFM and MAR. Wrote the paper: CFM, MAR and PKSf. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (306164/2010-8, 481664/2010-6, 476551/2009-9). CFM and MAR are recipients of CNPq fellowships. PKSf, LT and TD are recipients of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CPES fellowships.

References

1. Lee JW, Lee YK, Yuk DY, Choi DY, Ban SB, Oh KW, Hong JT: **Neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation.** *J Neuroinflammation* 2008, **5**:37.
2. Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA: **Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism.** *Ann Neurol* 2005, **57**:67-81.
3. Yaka R, Biegon A, Grigoriadis N, Simeonidou C, Grigoriadis S, Alexandrovich AG, Matzner H, Schumann J, Trembovler V, Tsenter J, Shohami E: **D-cycloserine improves functional recovery and reinstates long-term potentiation (LTP) in a mouse model of closed head injury.** *FASEB J* 2007, **21**:2033-2041.
4. Hernandez-Romero MC, Delgado-Cortes MJ, Sarmiento M, de Pablos RM, Espinosa-Oliva AM, Arguelles S, Bandez MJ, Villaran RF, Maurino R, Santiago M, et al: **Peripheral inflammation increases the deleterious effect of CNS inflammation on the nigrostriatal dopaminergic system.** *Neurotoxicology* 2012, **33**:347-360.
5. Weiss N, Miller F, Cazaubon S, Couraud PO: **The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases.** *Biochim Biophys Acta* 2009, **1788**:842-857.
6. Shaw KN, Commins S, O'Mara SM: **Lipopolysaccharide causes deficits in spatial learning in the watermaze but not in BDNF expression in the rat dentate gyrus.** *Behav Brain Res* 2001, **124**:47-54.

7. Cazareth J, Guyon A, Heurteaux C, Chabry J, Petit-Paitel A: **Molecular and cellular neuroinflammatory status of mouse brain after systemic lipopolysaccharide challenge: importance of CCR2/CCL2 signaling.** *J Neuroinflammation* 2014, **11**:132.
8. Block ML, Zecca L, Hong JS: **Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms.** *Nat Rev Neurosci* 2007, **8**:57-69.
9. Turrin NP, Gayle D, Ilyin SE, Flynn MC, Langhans W, Schwartz GJ, Plata-Salaman CR: **Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine mRNA induction in the periphery and brain following intraperitoneal administration of bacterial lipopolysaccharide.** *Brain Res Bull* 2001, **54**:443-453.
10. Beishuizen A, Thijs LG: **Endotoxin and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis.** *J Endotoxin Res* 2003, **9**:3-24.
11. Gabellec MM, Griffais R, Fillion G, Haour F: **Expression of interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta and interleukin 1 receptor antagonist mRNA in mouse brain: regulation by bacterial lipopolysaccharide (LPS) treatment.** *Brain Res Mol Brain Res* 1995, **31**:122-130.
12. Kranjac D, McLinden KA, Deodati LE, Papini MR, Chumley MJ, Boehm GW: **Peripheral bacterial endotoxin administration triggers both memory consolidation and reconsolidation deficits in mice.** *Brain Behav Immun* 2012, **26**:109-121.
13. Pugh CR, Kumagawa K, Fleshner M, Watkins LR, Maier SF, Rudy JW: **Selective effects of peripheral lipopolysaccharide administration on contextual and auditory-cue fear conditioning.** *Brain Behav Immun* 1998, **12**:212-229.
14. Bilbo SD, Biedenkapp JC, Der-Avakian A, Watkins LR, Rudy JW, Maier SF: **Neonatal infection-induced memory impairment after lipopolysaccharide in adulthood is prevented via caspase-1 inhibition.** *J Neurosci* 2005, **25**:8000-8009.
15. Sparkman NL, Martin LA, Calvert WS, Boehm GW: **Effects of intraperitoneal lipopolysaccharide on Morris maze performance in year-old and 2-month-old female C57BL/6J mice.** *Behav Brain Res* 2005, **159**:145-151.
16. Terrando N, Rei Fidalgo A, Vizcaychipi M, Cibelli M, Ma D, Monaco C, Feldmann M, Maze M: **The impact of IL-1 modulation on the development of lipopolysaccharide-induced cognitive dysfunction.** *Crit Care* 2010, **14**:R88.
17. Zarifkar A, Choopani S, Ghasemi R, Naghdi N, Maghsoudi AH, Maghsoudi N, Rastegar K, Moosavi M: **Agmatine prevents LPS-induced spatial memory impairment and hippocampal apoptosis.** *Eur J Pharmacol* 2010, **634**:84-88.
18. Lee YJ, Choi DY, Choi IS, Kim KH, Kim YH, Kim HM, Lee K, Cho WG, Jung JK, Han SB, et al: **Inhibitory effect of 4-O-methylhonokiol on lipopolysaccharide-induced neuroinflammation, amyloidogenesis and memory impairment via inhibition of nuclear factor-kappaB in vitro and in vivo models.** *J Neuroinflammation* 2012, **9**:35.
19. Sparkman NL, Kohman RA, Garcia AK, Boehm GW: **Peripheral lipopolysaccharide administration impairs two-way active avoidance conditioning in C57BL/6J mice.** *Physiol Behav* 2005, **85**:278-288.
20. Kohman RA, Tarr AJ, Sparkman NL, Day CE, Paquet A, Akkaraju GR, Boehm GW: **Alleviation of the effects of endotoxin exposure on behavior and hippocampal IL-1beta by a selective non-peptide antagonist of corticotropin-releasing factor receptors.** *Brain Behav Immun* 2007, **21**:824-835.
21. Tarr AJ, McLinden KA, Kranjac D, Kohman RA, Amaral W, Boehm GW: **The effects of age on lipopolysaccharide-induced cognitive deficits and interleukin-1beta expression.** *Behav Brain Res* 2011, **217**:481-485.
22. Lin GH, Lee YJ, Choi DY, Han SB, Jung JK, Hwang BY, Moon DC, Kim Y, Lee MK, Oh KW, et al: **Anti-amyloidogenic effect of thiacecremonone through anti-inflammation in vitro and in vivo models.** *J Alzheimers Dis* 2012, **29**:659-676.
23. Choi DY, Lee JW, Lin G, Lee YK, Lee YH, Choi IS, Han SB, Jung JK, Kim YH, Kim KH, et al: **Obovatol attenuates LPS-induced memory impairments in mice via inhibition of NF-kappaB signaling pathway.** *Neurochem Int* 2012, **60**:68-77.

24. Miwa M, Tsuboi M, Noguchi Y, Enokishima A, Nabeshima T, Hiramatsu M: **Effects of betaine on lipopolysaccharide-induced memory impairment in mice and the involvement of GABA transporter 2.** *J Neuroinflammation* 2011, **8**:153.
25. Harre EM, Galic MA, Mouihate A, Noorbakhsh F, Pittman QJ: **Neonatal inflammation produces selective behavioural deficits and alters N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNA in the adult rat brain.** *Eur J Neurosci* 2008, **27**:644-653.
26. Ma J, Choi BR, Chung C, Min SS, Jeon WK, Han JS: **Chronic brain inflammation causes a reduction in GluN2A and GluN2B subunits of NMDA receptors and an increase in the phosphorylation of mitogen-activated protein kinases in the hippocampus.** *Mol Brain* 2014, **7**:33.
27. Min SS, Quan HY, Ma J, Han JS, Jeon BH, Seol GH: **Chronic brain inflammation impairs two forms of long-term potentiation in the rat hippocampal CA1 area.** *Neurosci Lett* 2009, **456**:20-24.
28. Rosi S, Ramirez-Amaya V, Hauss-Wegrzyniak B, Wenk GL: **Chronic brain inflammation leads to a decline in hippocampal NMDA-R1 receptors.** *J Neuroinflammation* 2004, **1**:12.
29. Biegon A, Alvarado M, Budinger TF, Grossman R, Hensley K, West MS, Kotake Y, Ono M, Floyd RA: **Region-selective effects of neuroinflammation and antioxidant treatment on peripheral benzodiazepine receptors and NMDA receptors in the rat brain.** *J Neurochem* 2002, **82**:924-934.
30. Kranjac D, Koster KM, Kahn MS, Eimerbrink MJ, Womble BM, Cooper BG, Chumley MJ, Boehm GW: **Peripheral administration of D-cycloserine rescues memory consolidation following bacterial endotoxin exposure.** *Behav Brain Res* 2013, **243**:38-43.
31. Mony L, Zhu S, Carvalho S, Paoletti P: **Molecular basis of positive allosteric modulation of GluN2B NMDA receptors by polyamines.** *EMBO J* 2011, **30**:3134-3146.
32. Zhang M, Wang H, Tracey KJ: **Regulation of macrophage activation and inflammation by spermine: a new chapter in an old story.** *Crit Care Med* 2000, **28**:N60-66.
33. Gilad GM, Gilad VH: **Astroglia growth retardation and increased microglia proliferation by lithium and ornithine decarboxylase inhibitor in rat cerebellar cultures: Cytotoxicity by combined lithium and polyamine inhibition.** *J Neurosci Res* 2007, **85**:594-601.
34. Tabor CW, Tabor H: **Polyamines.** *Annu Rev Biochem* 1984, **53**:749-790.
35. Kishi A, Ohno M, Watanabe S: **Spermidine, a polyamine site agonist, attenuates working memory deficits caused by blockade of hippocampal muscarinic receptors and mGluRs in rats.** *Brain Res* 1998, **793**:311-314.
36. Rubin MA, Boemo RL, Jurach A, Rojas DB, Zanolla GR, Obregon AD, Souza DO, Mello CF: **Intrahippocampal spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats.** *Behav Pharmacol* 2000, **11**:57-61.
37. Rubin MA, Stiegemeier JA, Volkweis MA, Oliveira DM, Fenili AC, Boemo RL, Jurach A, Mello CF: **Intra-amygdala spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats.** *Eur J Pharmacol* 2001, **423**:35-39.
38. Mikolajczak P, Okulicz-Kozaryn I, Kaminska E, Niedopad L, Polanska A, Gebka J: **Effects of acamprosate and some polyamine site ligands of NMDA receptor on short-term memory in rats.** *Eur J Pharmacol* 2002, **444**:83-96.
39. Rubin MA, Berlese DB, Stiegemeier JA, Volkweis MA, Oliveira DM, dos Santos TL, Fenili AC, Mello CF: **Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats.** *J Neurosci* 2004, **24**:2328-2334.
40. Tadano T, Hozumi S, Yamadera F, Murata A, Nijima F, Tan-No K, Nakagawasai O, Kisara K: **Effects of NMDA receptor-related agonists on learning and memory impairment in olfactory bulbectomized mice.** *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2004, **26**:93-97.
41. Berlese DB, Sauzem PD, Carati MC, Guerra GP, Stiegemeier JA, Mello CF, Rubin MA: **Time-dependent modulation of inhibitory avoidance memory by spermidine in rats.** *Neurobiol Learn Mem* 2005, **83**:48-53.
42. Camera K, Mello CF, Ceretta AP, Rubin MA: **Systemic administration of polyaminergic agents modulate fear conditioning in rats.** *Psychopharmacology (Berl)* 2007, **192**:457-464.

43. Ribeiro DA, Mello CF, Signor C, Rubin MA: **Polyaminergic agents modulate the reconsolidation of conditioned fear.** *Neurobiol Learn Mem* 2013, **104**:9-15.
44. Velloso NA, Dalmolin GD, Gomes GM, Rubin MA, Canas PM, Cunha RA, Mello CF: **Spermine improves recognition memory deficit in a rodent model of Huntington's disease.** *Neurobiol Learn Mem* 2009, **92**:574-580.
45. Ceretta AP, Camera K, Mello CF, Rubin MA: **Arcaine and MK-801 make recall state-dependent in rats.** *Psychopharmacology (Berl)* 2008, **201**:405-411.
46. da Rosa MM, Mello CF, Camera K, Ceretta AP, Ribeiro DA, Signor C, Rubin MA: **Opioid mechanisms are involved in the disruption of arcaine-induced amnesia by context pre-exposure.** *Neurobiol Learn Mem* 2012, **97**:294-300.
47. Guerra GP, Mello CF, Bochi GV, Pazini AM, Fachinetto R, Dutra RC, Calixto JB, Ferreira J, Rubin MA: **Hippocampal PKA/CREB pathway is involved in the improvement of memory induced by spermidine in rats.** *Neurobiol Learn Mem* 2011, **96**:324-332.
48. Guerra GP, Mello CF, Bochi GV, Pazini AM, Rosa MM, Ferreira J, Rubin MA: **Spermidine-induced improvement of memory involves a cross-talk between protein kinases C and A.** *J Neurochem* 2012, **122**:363-373.
49. Zhang M, Borovikova LV, Wang H, Metz C, Tracey KJ: **Spermine inhibition of monocyte activation and inflammation.** *Mol Med* 1999, **5**:595-605.
50. Zhang M, Caragine T, Wang H, Cohen PS, Botchkina G, Soda K, Bianchi M, Ulrich P, Cerami A, Sherry B, Tracey KJ: **Spermine inhibits proinflammatory cytokine synthesis in human mononuclear cells: a counterregulatory mechanism that restrains the immune response.** *J Exp Med* 1997, **185**:1759-1768.
51. Bussiere FI, Chaturvedi R, Cheng Y, Gobert AP, Asim M, Blumberg DR, Xu H, Kim PY, Hacker A, Casero RA, Jr., Wilson KT: **Spermine causes loss of innate immune response to *Helicobacter pylori* by inhibition of inducible nitric-oxide synthase translation.** *J Biol Chem* 2005, **280**:2409-2412.
52. Puntambekar SS, Davis DS, Hawel L, 3rd, Crane J, Byus CV, Carson MJ: **LPS-induced CCL2 expression and macrophage influx into the murine central nervous system is polyamine-dependent.** *Brain Behav Immun* 2011, **25**:629-639.
53. Gomes GM, Dalmolin GD, Bar J, Karpova A, Mello CF, Kreutz MR, Rubin MA: **Inhibition of the Polyamine System Counteracts beta-Amyloid Peptide-Induced Memory Impairment in Mice: Involvement of Extrasynaptic NMDA Receptors.** *PLoS One* 2014, **9**:e99184.
54. Lee B, Sur B, Park J, Kim SH, Kwon S, Yeom M, Shim I, Lee H, Hahm DH: **Ginsenoside rg3 alleviates lipopolysaccharide-induced learning and memory impairments by anti-inflammatory activity in rats.** *Biomol Ther (Seoul)* 2013, **21**:381-390.
55. Meyer RC, Knox J, Purwin DA, Spangler EL, Ingram DK: **Combined stimulation of the glycine and polyamine sites of the NMDA receptor attenuates NMDA blockade-induced learning deficits of rats in a 14-unit T-maze.** *Psychopharmacology (Berl)* 1998, **135**:290-295.
56. Borowski T, Kokkinidis L, Merali Z, Anisman H: **Lipopolysaccharide, central in vivo biogenic amine variations, and anhedonia.** *Neuroreport* 1998, **9**:3797-3802.
57. Smith JA, Das A, Ray SK, Banik NL: **Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases.** *Brain Res Bull* 2012, **87**:10-20.
58. Nakajima K, Kohsaka S: **Microglia: activation and their significance in the central nervous system.** *J Biochem* 2001, **130**:169-175.
59. Van Dam AM, Bauer J, Tilders FJ, Berkenbosch F: **Endotoxin-induced appearance of immunoreactive interleukin-1 beta in ramified microglia in rat brain: a light and electron microscopic study.** *Neuroscience* 1995, **65**:815-826.
60. Li C, Zhao R, Gao K, Wei Z, Yin MY, Lau LT, Chui D, Hoi Yu AC: **Astrocytes: implications for neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease.** *Curr Alzheimer Res* 2011, **8**:67-80.

61. Fine SM, Angel RA, Perry SW, Epstein LG, Rothstein JD, Dewhurst S, Gelbard HA: **Tumor necrosis factor alpha inhibits glutamate uptake by primary human astrocytes. Implications for pathogenesis of HIV-1 dementia.** *J Biol Chem* 1996, **271**:15303-15306.
62. Espey MG, Kustova Y, Sei Y, Basile AS: **Extracellular glutamate levels are chronically elevated in the brains of LP-BM5-infected mice: a mechanism of retrovirus-induced encephalopathy.** *J Neurochem* 1998, **71**:2079-2087.
63. Yirmiya R, Goshen I: **Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis.** *Brain Behav Immun* 2011, **25**:181-213.
64. Thomson LM, Sutherland RJ: **Systemic administration of lipopolysaccharide and interleukin-1beta have different effects on memory consolidation.** *Brain Res Bull* 2005, **67**:24-29.
65. Yu XM, Askalan R, Keil GJ, 2nd, Salter MW: **NMDA channel regulation by channel-associated protein tyrosine kinase Src.** *Science* 1997, **275**:674-678.
66. Viviani B, Bartesaghi S, Gardoni F, Vezzani A, Behrens MM, Bartfai T, Binaglia M, Corsini E, Di Luca M, Galli CL, Marinovich M: **Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases.** *J Neurosci* 2003, **23**:8692-8700.
67. Cunningham C: **Microglia and neurodegeneration: the role of systemic inflammation.** *Glia* 2013, **61**:71-90.
68. Gyoneva S, Davalos D, Biswas D, Swanger SA, Garnier-Amblard E, Loth F, Akassoglou K, Traynelis SF: **Systemic inflammation regulates microglial responses to tissue damage in vivo.** *Glia* 2014, **62**:1345-1360.
69. Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, Knapp DJ, Crews FT: **Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration.** *Glia* 2007, **55**:453-462.
70. Castellano C, Cestari V, Ciamei A: **NMDA receptors and learning and memory processes.** *Curr Drug Targets* 2001, **2**:273-283.
71. Morris RG: **NMDA receptors and memory encoding.** *Neuropharmacology* 2013, **74**:32-40.
72. Newcomer JW, Krystal JH: **NMDA receptor regulation of memory and behavior in humans.** *Hippocampus* 2001, **11**:529-542.
73. Paoletti P, Bellone C, Zhou Q: **NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease.** *Nat Rev Neurosci* 2013, **14**:383-400.
74. Rock DM, Macdonald RL: **Polyamine regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channels.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995, **35**:463-482.
75. Williams K, Romano C, Dichter MA, Molinoff PB: **Modulation of the NMDA receptor by polyamines.** *Life Sci* 1991, **48**:469-498.
76. Zhu S, Ashok M, Li J, Li W, Yang H, Wang P, Tracey KJ, Sama AE, Wang H: **Spermine protects mice against lethal sepsis partly by attenuating surrogate inflammatory markers.** *Mol Med* 2009, **15**:275-282.
77. Hasko G, Kuhel DG, Marton A, Nemeth ZH, Deitch EA, Szabo C: **Spermine differentially regulates the production of interleukin-12 p40 and interleukin-10 and suppresses the release of the T helper 1 cytokine interferon-gamma.** *Shock* 2000, **14**:144-149.
78. Bjelakovic G, Stojanovic I, Jevtovic Stoimenov T, Pavlovic D, Kocic G, Rossi S, Tabolacci C, Nikolic J, Sokolovic D, Bjelakovic L: **Metabolic correlations of glucocorticoids and polyamines in inflammation and apoptosis.** *Amino Acids* 2010, **39**:29-43.
79. Soulet D, Rivest S: **Polyamines play a critical role in the control of the innate immune response in the mouse central nervous system.** *J Cell Biol* 2003, **162**:257-268.
80. Gerard F, Hansson E: **Inflammatory activation enhances NMDA-triggered Ca²⁺ signalling and IL-1beta secretion in primary cultures of rat astrocytes.** *Brain Res* 2012, **1473**:1-8.

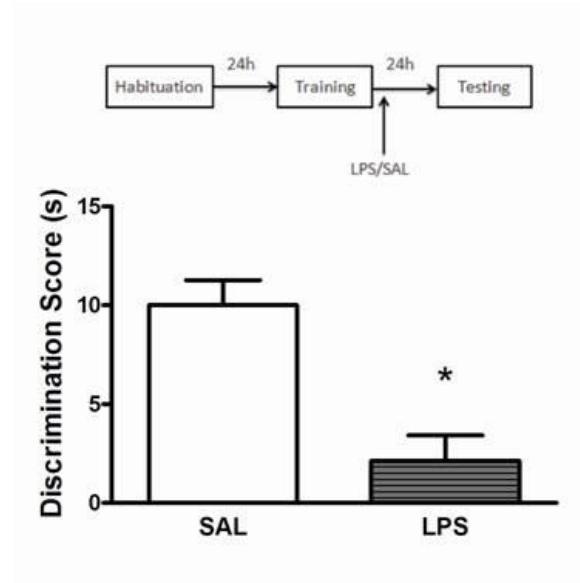


Figure 1 Effects of LPS on the discrimination score in novel object recognition task. Post-training administration of LPS (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.) decreased the discrimination score in the object recognition task. Data are expressed as mean \pm SEM for 8 animals in each group. * $P < 0.001$ compared with saline group (Student's t -test).

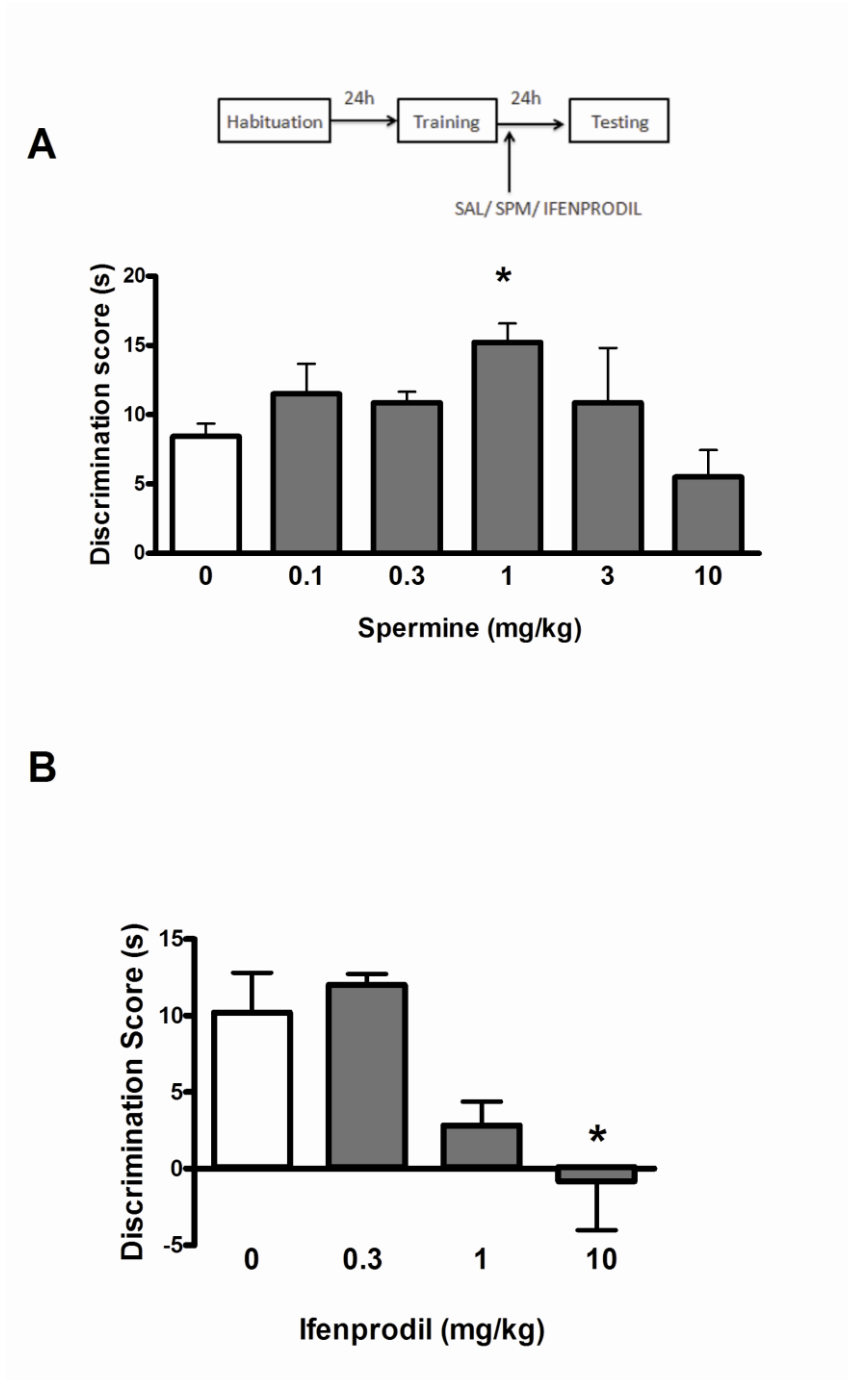


Figure 2 Effect of administration of spermine or ifenprodil on memory. Immediately after training, the animals were injected with saline, spermine (0.1- 10 mg/kg, i.p) or ifenprodil (0.3- 10 mg/kg, i.p). Twenty-four hours after training, the animals were subjected to the novel object recognition test session. (A) Spermine increased and (B) ifenprodil decreased the discrimination score on novel object recognition task. Data are expressed as mean \pm SEM for 6-9 animals in each group. * $P < 0.05$ compared with saline group (one-way ANOVA followed by the Student–Newman-Keuls post hoc test).

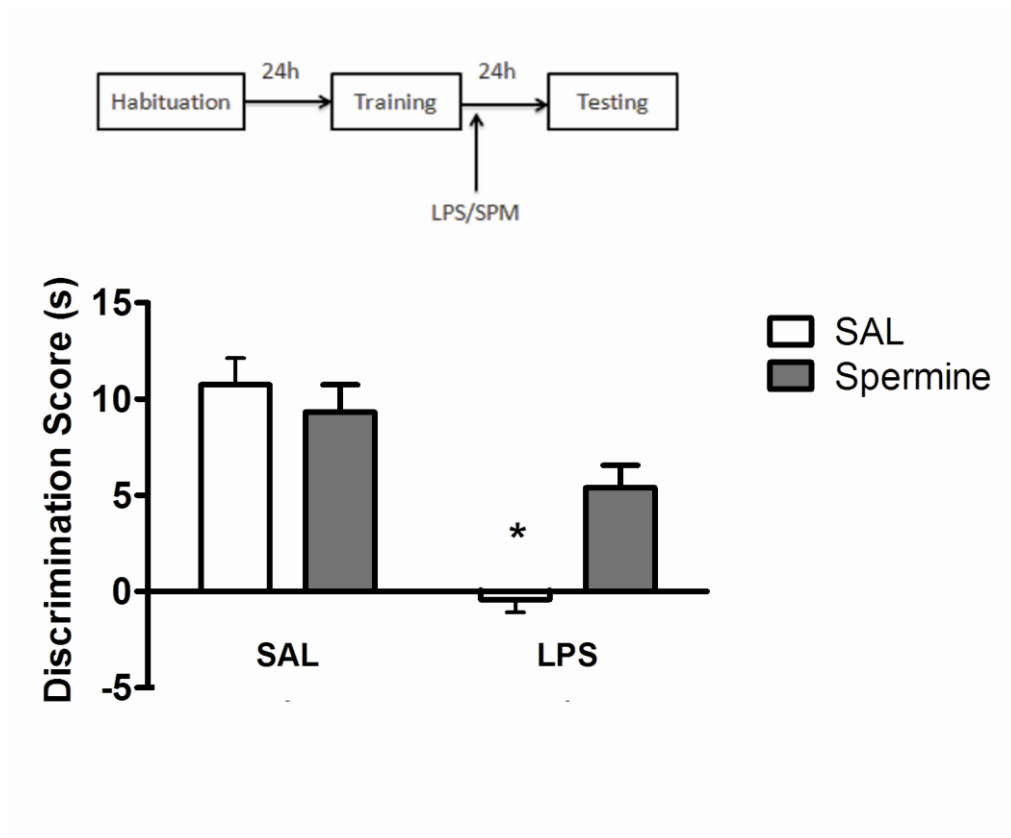


Figure 3 Effect of spermine in LPS-induced memory impairment. Post-training administration of spermine (0.3 mg/kg, i.p.) attenuates LPS-induced (250 μ g/kg, i.p.) discrimination impairments on novel object recognition task. Data are expressed as mean \pm SEM for 15 animals in each group. * $P < 0.001$ compared with saline group (two-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls post hoc test).

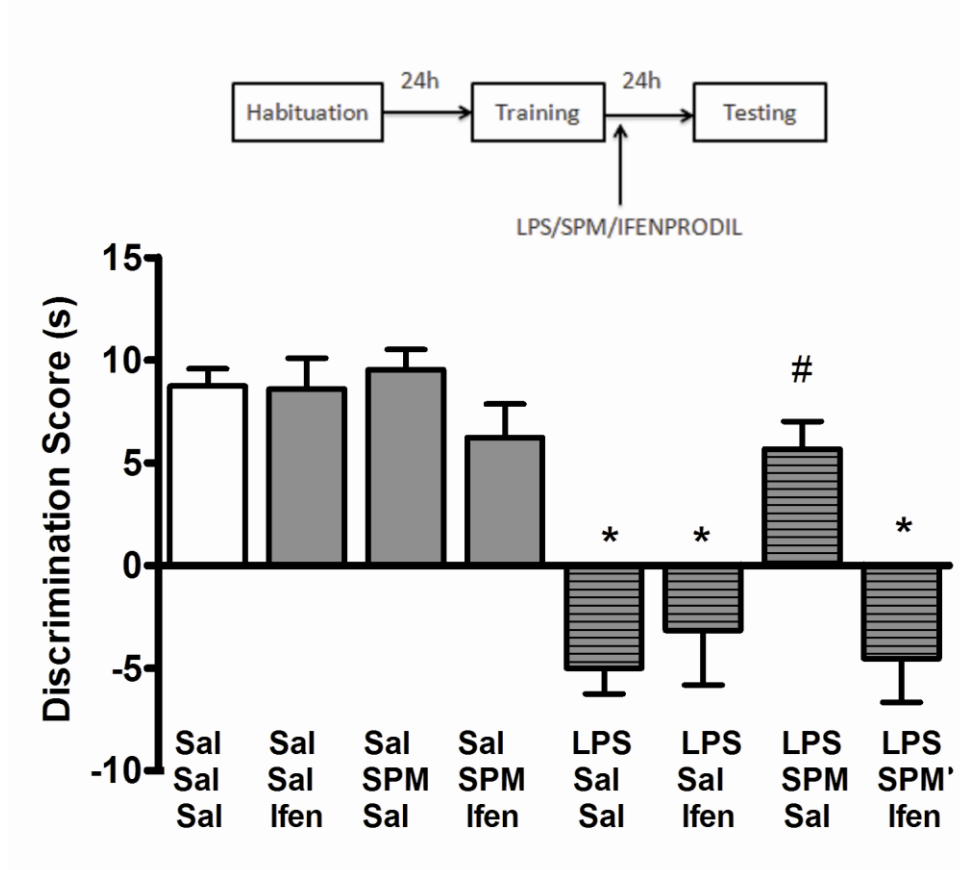


Figure 4 Effect of agonist and/or antagonist of the NMDA receptor on LPS-treated animal memory. Immediately after training, the animals were injected with saline or LPS (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.), 5 min later they were injected with saline or spermine (0.3 mg/kg, i.p.) and 5 minutes later they were injected with saline or ifenprodil (0.3 mg/kg, i.p.) in different flanks. Ifenprodil reversed the effect of spermine in LPS-treated animals. Data are the mean \pm SEM of 13-15 animals per group. * $P < 0.05$ compared to control group Sal/Sal/Sal, # $P < 0.05$ compared to LPS/Sal/Sal group (three-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls post hoc test).

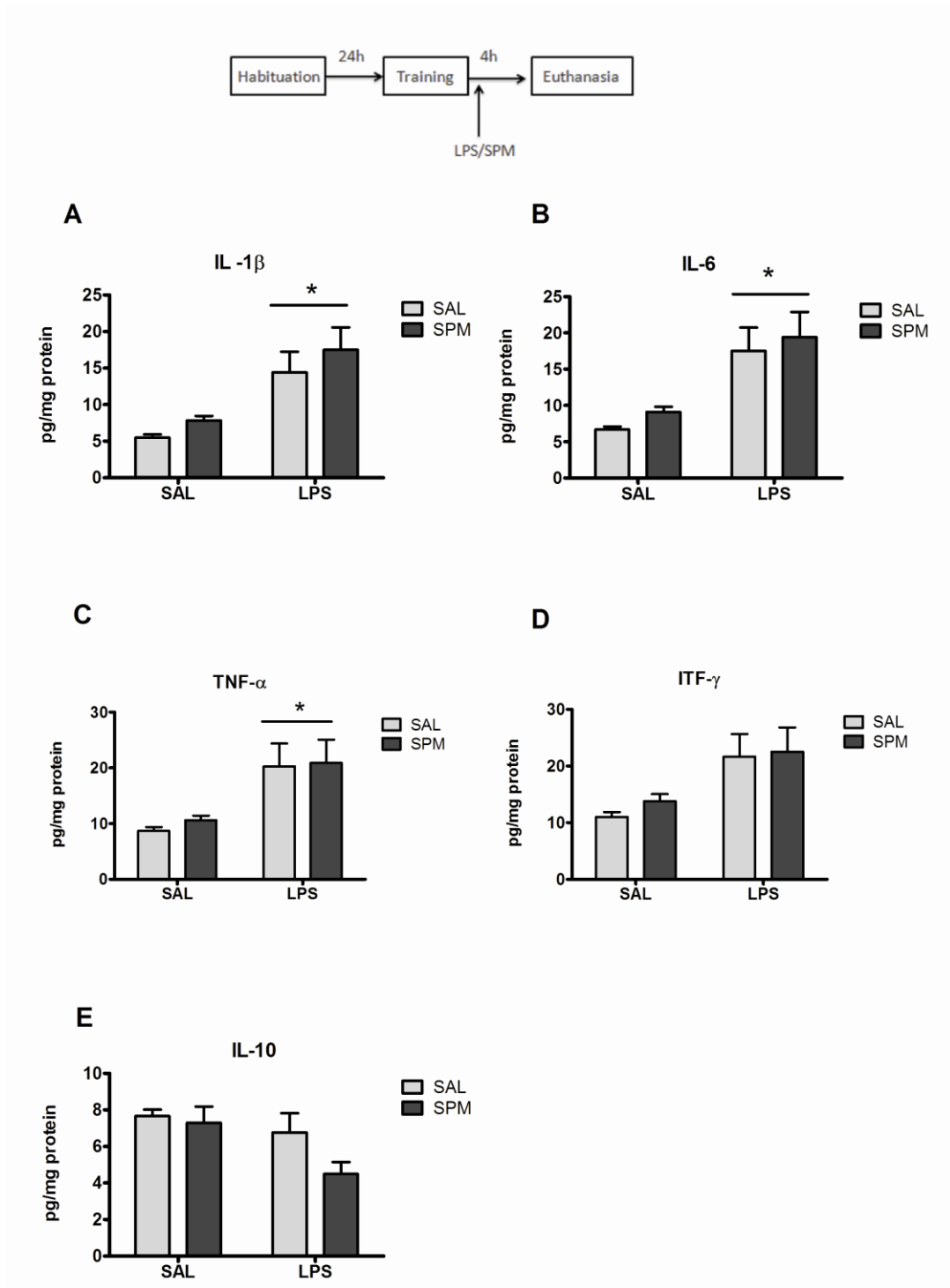


Figure 5: Effects of post-training administration of spermine and LPS in the levels of proinflammatory and anti inflammatory cytokines in hippocampi. Immediately after the training session of the object recognition task, animals received saline, LPS (250 μ g/kg, i.p), spermine (0.3 mg/kg, i.p) or a combination of LPS (250 μ g/kg, i.p) and spermine (0.3 mg/kg, i.p), and were euthanized 4 hours after injections to measure the levels of IL-1 β (A), IL-6 (B), TNF- α (C), ITF- γ (D) and IL-10 (E) in hippocampi. Spermine did not reverting the increase of cytokines levels LPS-induced. Data are the mean \pm SEM of 4-5 animals per group. * P <0.05, compared with vehicle (two-way ANOVA followed by the Student–Newman-Keuls post hoc test).

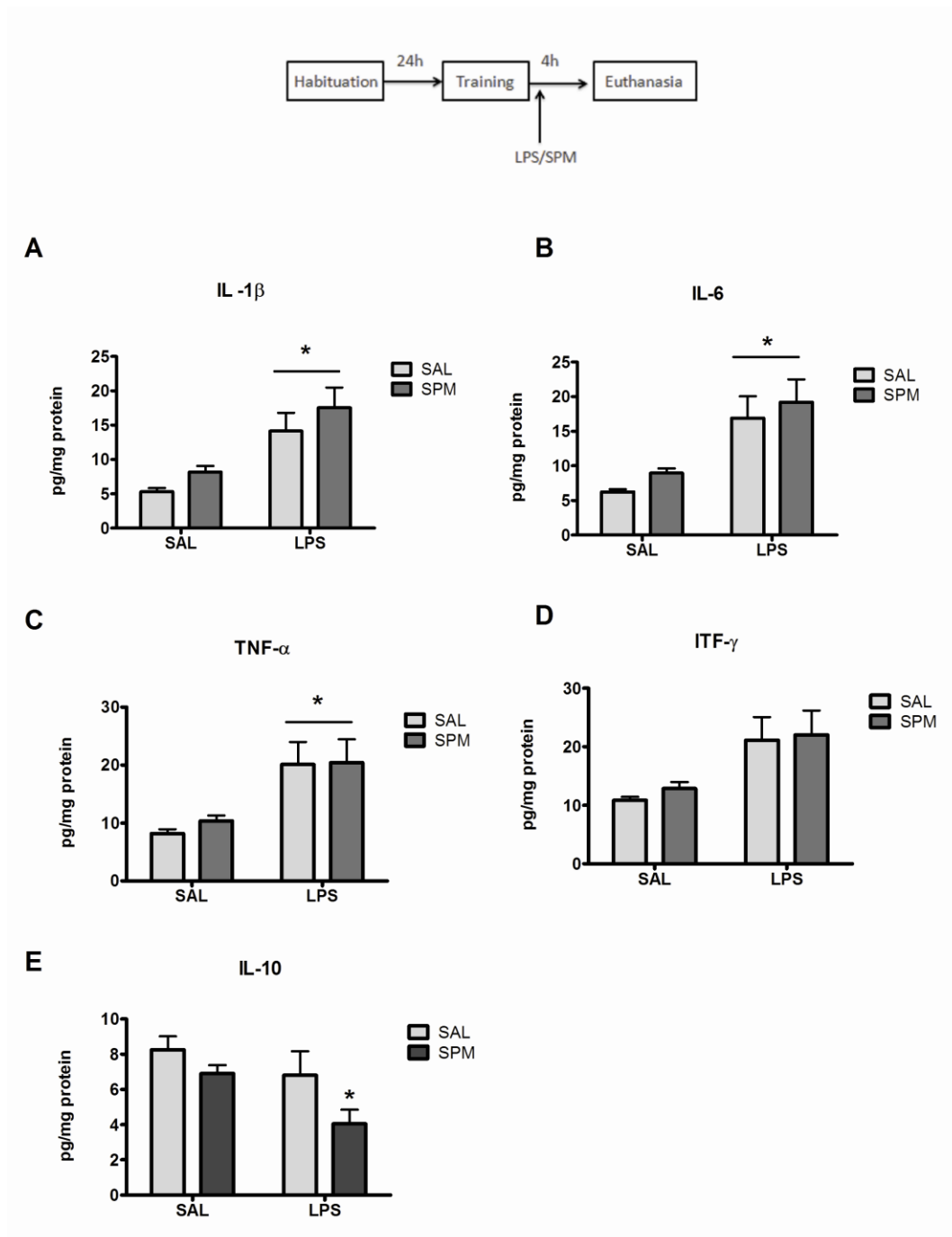


Figure 6 Effects of post-training administration of spermine and LPS on the levels of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in cerebral cortex. Immediately after the training session of the object recognition task, animals received saline, LPS (250 μ g/kg, i.p), spermine (0.3 mg/kg, i.p) or a combination of LPS (250 μ g/kg, i.p) and spermine (0.3 mg/kg, i.p), and were euthanized 4 hours after injections to measure the levels of IL-1 β (A), IL-6 (B), TNF- α (C), ITF- γ (D) and IL-10 (E) in cerebral cortex. Spermine did not reverting the increase of cytokines levels LPS-induced. Data are the mean \pm SEM of 4-5 animals per group. * $P < 0.05$ compared with vehicle (two-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls post hoc test).

4. CONCLUSÕES

4. CONCLUSÕES

Com os resultados do presente estudo podemos concluir que:

- 1 A espermina melhorou e o ifenprodil causou um déficit de memória na tarefa de reconhecimento de objetos.
- 2 A espermina reverteu o déficit de memória induzida por LPS.
- 3 O ifenprodil não alterou o efeito amnésico do LPS.
- 4 O ifenprodil impediu a espermina de reverter o dano na memória induzido por LPS.
- 5 A espermina não reverteu o aumento dos níveis de citocinas inflamatórias induzidos por LPS.

4.1 Conclusão geral

A espermina possui papel protetor sobre os danos de memória induzidos por LPS, por mecanismos que envolvem o sítio de ligação das poliaminas no receptor NMDA, não abrangendo mecanismos anti-inflamatórios.

5. PERSPECTIVAS DE CONTINUIDADE DE ESTUDO

Os autores deste trabalho pretendem investigar o mecanismo pelo qual as poliaminas estão revertendo a piora da memória induzida por LPS. Para isso serão realizados ensaios de Western Blot da cascata PKA e CREB, proteínas cuja fosforilação, é comprovadamente necessária para a formação da memória, bem como a expressão de BDNF, já mencionado neste trabalho. Ainda pretende-se estudar o envolvimento da administração crônica de LPS e poliaminas.

6. REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

AKIRA S, TAKEDA K (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4: 499-511

AKIYAMA H ET AL (2000) Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 14 Suppl 1: S47-53

AMICO-RUVIO SA ET AL (2012) Ifenprodil effects on GluN2B-containing glutamate receptors. *Mol Pharmacol* 82: 1074-1081

ARROYO DS ET AL (2011) Toll-like receptors are key players in neurodegeneration. *Int Immunopharmacol* 11: 1415-1421

BAGANZ NL, BLAKELY RD (2013) A dialogue between the immune system and brain, spoken in the language of serotonin. *ACS Chem Neurosci* 4: 48-63

BAI L ET AL (2004) Changes in the expression of the NR2B subunit during aging in macaque monkeys. *Neurobiol Aging* 25: 201-208

BAL-PRICE A, BROWN GC (2001) Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. *J Neurosci* 21: 6480-6491

BALABANOV R ET AL (1999) Role of central nervous system microvascular pericytes in activation of antigen-primed splenic T-lymphocytes. *J Neurosci Res* 55: 578-587

BARRIENTOS RM ET AL (2009) Time course of hippocampal IL-1 beta and memory consolidation impairments in aging rats following peripheral infection. *Brain Behav Immun* 23: 46-54

BARRIENTOS RM ET AL (2002) Memory for context is impaired by a post context exposure injection of interleukin-1 beta into dorsal hippocampus. *Behav Brain Res* 134: 291-298

BERLESE DB ET AL (2005) Time-dependent modulation of inhibitory avoidance memory by spermidine in rats. *Neurobiol Learn Mem* 83: 48-53

BESEDOVSKY H, SORKIN E (1977) Network of immune-neuroendocrine interactions. *Clin Exp Immunol* 27: 1-12

BEZZI P ET AL (1998) Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. **Nature** 391: 281-285

BEZZI P ET AL (2001) CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNFalpha: amplification by microglia triggers neurotoxicity. **Nat Neurosci** 4: 702-710

BI X (2010) Alzheimer disease: update on basic mechanisms. **J Am Osteopath Assoc** 110: S3-9

BIEGON A ET AL (2002) Region-selective effects of neuroinflammation and antioxidant treatment on peripheral benzodiazepine receptors and NMDA receptors in the rat brain. **J Neurochem** 82: 924-934

BILBO SD ET AL (2008) Early-life infection leads to altered BDNF and IL-1beta mRNA expression in rat hippocampus following learning in adulthood. **Brain Behav Immun** 22: 451-455

BILBO SD ET AL (2005) Neonatal infection-induced memory impairment after lipopolysaccharide in adulthood is prevented via caspase-1 inhibition. **J Neurosci** 25: 8000-8009

BJELAKOVIC G ET AL (2010) Metabolic correlations of glucocorticoids and polyamines in inflammation and apoptosis. **Amino Acids** 39: 29-43

BJORKBACKA H ET AL (2004) The induction of macrophage gene expression by LPS predominantly utilizes Myd88-independent signaling cascades. **Physiol Genomics** 19: 319-330

CAGNIN A ET AL (2001) In-vivo measurement of activated microglia in dementia. **Lancet** 358: 461-467

CAMERA K ET AL (2007) Systemic administration of polyaminergic agents modulate fear conditioning in rats. **Psychopharmacology (Berl)** 192: 457-464

CAO X ET AL (2007) Maintenance of superior learning and memory function in NR2B transgenic mice during ageing. **Eur J Neurosci** 25: 1815-1822

CARTER C (1994a) The Neuropharmacology of Polyamines. **American Press**

CARTER C (1994b) *Neuropharmacology of polyamines*: Academic Press.

CHOI DY ET AL (2012) Obovatol attenuates LPS-induced memory impairments in mice via inhibition of NF-kappaB signaling pathway. **Neurochem Int** 60: 68-77

CLAYTON DA, BROWNING MD (2001) Deficits in the expression of the NR2B subunit in the hippocampus of aged Fisher 344 rats. **Neurobiol Aging** 22: 165-168

COUGHENOUR LL, BARR BM (2001) Use of trifluoroperazine isolates a [(3)H]ifenprodil binding site in rat brain membranes with the pharmacology of the voltage-independent ifenprodil site on N-methyl-D-aspartate receptors containing NR2B subunits. *J Pharmacol Exp Ther* 296: 150-159

CUI CA ET AL (2008) Macelignan attenuates LPS-induced inflammation and reduces LPS-induced spatial learning impairments in rats. *Neurosci Lett* 448: 110-114

CULL-CANDY SG, LESZKIEWICZ DN (2004) Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE* 2004: re16

CUNNINGHAM C ET AL (2007) The sickness behaviour and CNS inflammatory mediator profile induced by systemic challenge of mice with synthetic double-stranded RNA (poly I:C). *Brain Behav Immun* 21: 490-502

CUNNINGHAM C ET AL (2005) Comparison of inflammatory and acute-phase responses in the brain and peripheral organs of the ME7 model of prion disease. *J Virol* 79: 5174-5184

DIRNAGL U ET AL (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22: 391-397

DUNN AJ (2006) Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. *Clin Neurosci Res* 6: 52-68

ENNACEUR A (2010) One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behav Brain Res* 215: 244-254

FEUERSTEIN GZ ET AL (1998) The role of cytokines in the neuropathology of stroke and neurotrauma. *Neuroimmunomodulation* 5: 143-159

FOX NC ET AL (2000) Progressive cerebral atrophy in MS: a serial study using registered, volumetric MRI. *Neurology* 54: 807-812

GIOANNINI TL ET AL (2004) Isolation of an endotoxin-MD-2 complex that produces Toll-like receptor 4-dependent cell activation at picomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4186-4191

GORBET MB, SEFTON MV (2005) Endotoxin: the uninvited guest. *Biomaterials* 26: 6811-6817

GUAN Z, FANG J (2006) Peripheral immune activation by lipopolysaccharide decreases neurotrophins in the cortex and hippocampus in rats. *Brain Behav Immun* 20: 64-71

GUERRA GP ET AL (2011) Hippocampal PKA/CREB pathway is involved in the improvement of memory induced by spermidine in rats. **Neurobiol Learn Mem** 96: 324-332

GUERRA GP ET AL (2012) Spermidine-induced improvement of memory involves a cross-talk between protein kinases C and A. **J Neurochem**

HART BL (1988) Biological basis of the behavior of sick animals. **Neurosci Biobehav Rev** 12: 123-137

HAUSS WH (1981) [Physiology and physiopathology of aging]. **Z Gerontol** 14: 93-106

HENEKA MT, O'BANION MK (2007) Inflammatory processes in Alzheimer's disease. **J Neuroimmunol** 184: 69-91

HERNANDEZ-ROMERO MC ET AL (2012) Peripheral inflammation increases the deleterious effect of CNS inflammation on the nigrostriatal dopaminergic system. **Neurotoxicology** 33: 347-360

HICKEY WF, KIMURA H (1988) Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. **Science** 239: 290-292

HM W (2003) Polyamines and their role in human disease: and introduction. **Biochem Soc Trans** 31: 354-355

IGARASHI K, KASHIWAGI K (2000) Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. **Biochem Biophys Res Commun** 271: 559-564

KATSUURA G ET AL (1989) Interleukin-1 beta increases prostaglandin E2 in rat astrocyte cultures: modulatory effect of neuropeptides. **Endocrinology** 124: 3125-3127

KISHI A ET AL (1998) Spermidine, a polyamine site agonist, attenuates working memory deficits caused by blockade of hippocampal muscarinic receptors and mGluRs in rats. **Brain Res** 793: 311-314

KOENIG S ET AL (2014) Leptin is involved in age-dependent changes in response to systemic inflammation in the rat. **Brain Behav Immun** 36: 128-138

KOHMAN RA ET AL (2007) Alleviation of the effects of endotoxin exposure on behavior and hippocampal IL-1beta by a selective non-peptide antagonist of corticotropin-releasing factor receptors. **Brain Behav Immun** 21: 824-835

KONSMAN JP ET AL (1999) Temporal and spatial relationships between lipopolysaccharide-induced expression of Fos, interleukin-1beta and inducible nitric oxide synthase in rat brain. **Neuroscience** 89: 535-548

KONSMAN JP ET AL (2002) Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. *Trends Neurosci* 25: 154-159

KRANJAC D ET AL (2012) Peripheral bacterial endotoxin administration triggers both memory consolidation and reconsolidation deficits in mice. *Brain Behav Immun* 26: 109-121

LAU CG, ZUKIN RS (2007) NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 8: 413-426

LEE B ET AL (2013) Ginsenoside rg3 alleviates lipopolysaccharide-induced learning and memory impairments by anti-inflammatory activity in rats. *Biomol Ther (Seoul)* 21: 381-390

LEE JW ET AL (2008) Neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation. *J Neuroinflammation* 5: 37

LEE YJ ET AL (2012) Inhibitory effect of 4-O-methylhonokiol on lipopolysaccharide-induced neuroinflammation, amyloidogenesis and memory impairment via inhibition of nuclear factor-kappaB in vitro and in vivo models. *J Neuroinflammation* 9: 35

LIN GH ET AL (2012) Anti-amyloidogenic effect of thiacremonone through anti-inflammation in vitro and in vivo models. *J Alzheimers Dis* 29: 659-676

LU YC ET AL (2008) LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42: 145-151

MA J ET AL (2014) Chronic brain inflammation causes a reduction in GluN2A and GluN2B subunits of NMDA receptors and an increase in the phosphorylation of mitogen-activated protein kinases in the hippocampus. *Mol Brain* 7: 33

MAGNUSSON KR ET AL (2010) Selective Vulnerabilities of N-methyl-D-aspartate (NMDA) Receptors During Brain Aging. *Front Aging Neurosci* 2: 11

MAGNUSSON KR ET AL (2002) Age-related changes in the protein expression of subunits of the NMDA receptor. *Brain Res Mol Brain Res* 99: 40-45

MAGNUSSON KR ET AL (2007) Age-related declines in a two-day reference memory task are associated with changes in NMDA receptor subunits in mice. *BMC Neurosci* 8: 43

MAZARATI A ET AL (2011) High-mobility group box-1 impairs memory in mice through both toll-like receptor 4 and Receptor for Advanced Glycation End Products. *Exp Neurol* 232: 143-148

MCGEER EG, MCGEER PL (1998) The importance of inflammatory mechanisms in Alzheimer disease. *Exp Gerontol* 33: 371-378

MEYER RC ET AL (1998) Combined stimulation of the glycine and polyamine sites of the NMDA receptor attenuates NMDA blockade-induced learning deficits of rats in a 14-unit T-maze. *Psychopharmacology (Berl)* 135: 290-295

MIKOLAJCZAK P ET AL (2002) Effect of multiple ifenprodil or spermidine treatment on social recognition in rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 13: 61-67

MIWA M ET AL (2011) Effects of betaine on lipopolysaccharide-induced memory impairment in mice and the involvement of GABA transporter 2. *J Neuroinflammation* 8: 153

MOINARD C ET AL (2005) Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin Nutr* 24: 184-197

MONY L ET AL (2011) Molecular basis of positive allosteric modulation of GluN2B NMDA receptors by polyamines. *EMBO J* 30: 3134-3146

MORGAN DM (1999) Polyamines. An overview. *Mol Biotechnol* 11: 229-250

MORIMOTO K ET AL (2002) Acute neuroinflammation exacerbates excitotoxicity in rat hippocampus in vivo. *Exp Neurol* 177: 95-104

NGUYEN MD ET AL (2002) Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci* 3: 216-227

O'NEILL LA ET AL (2013) The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol* 13: 453-460

OUAMEUR AA ET AL (2004) Effects of organic and inorganic polyamine cations on the structure of human serum albumin. *Biopolymers* 73: 503-509

OUBURG S ET AL (2005) The CD14 functional gene polymorphism -260 C>T is not involved in either the susceptibility to Chlamydia trachomatis infection or the development of tubal pathology. *BMC Infect Dis* 5: 114

PAOLETTI P ET AL (2013) NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 14: 383-400

PARK JS ET AL (2009) Persistent inflammation induces GluR2 internalization via NMDA receptor-triggered PKC activation in dorsal horn neurons. *J Neurosci* 29: 3206-3219

- PARK SJ ET AL (2012) Neuroprotective effects of INM-176 against lipopolysaccharide-induced neuronal injury. *Pharmacol Biochem Behav* 101: 427-433
- PEGG AE (2009) Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life* 61: 880-894
- PERRY VH (2010) Contribution of systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Acta Neuropathol* 120: 277-286
- PETSCH D, ANSPACH FB (2000) Endotoxin removal from protein solutions. *J Biotechnol* 76: 97-119
- PICHLMAIR A, REIS E SOUSA C (2007) Innate recognition of viruses. *Immunity* 27: 370-383
- POLTORAK A ET AL (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282: 2085-2088
- PUGH CR ET AL (1998) Selective effects of peripheral lipopolysaccharide administration on contextual and auditory-cue fear conditioning. *Brain Behav Immun* 12: 212-229
- PUNTAMBEKAR SS ET AL (2011) LPS-induced CCL2 expression and macrophage influx into the murine central nervous system is polyamine-dependent. *Brain Behav Immun* 25: 629-639
- QIN L ET AL (2007) Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* 55: 453-462
- QUAN N, HERKENHAM M (2002) Connecting cytokines and brain: a review of current issues. *Histol Histopathol* 17: 273-288
- QUAN N ET AL (1994) Induction of interleukin-1 in various brain regions after peripheral and central injections of lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol* 49: 125-134
- RAETZ CR, WHITFIELD C (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 71: 635-700
- RIBEIRO DA ET AL (2013) Polyaminergic agents modulate the reconsolidation of conditioned fear. *Neurobiol Learn Mem* 104: 9-15
- ROBINSON MB ET AL (1993) Inhibition of glutamate uptake with L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate potentiates glutamate toxicity in primary hippocampal cultures. *J Neurochem* 61: 2099-2103
- ROSI S ET AL (2004) Chronic brain inflammation leads to a decline in hippocampal NMDA-R1 receptors. *J Neuroinflammation* 1: 12

ROTHSTEIN JD ET AL (1993) Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 6591-6595

RUBIN MA ET AL (2004) Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats. *J Neurosci* 24: 2328-2334

RUBIN MA ET AL (2001) Intra-amygdala spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. *Eur J Pharmacol* 423: 35-39

RUIZ-CHICA J ET AL (2003) Raman spectroscopy study of the interaction between biogenic polyamines and an alternating AT oligodeoxyribonucleotide. *Biochim Biophys Acta* 1628: 11-21

SCHNYDRIG S ET AL (2007) Peripheral lipopolysaccharide administration transiently affects expression of brain-derived neurotrophic factor, corticotropin and proopiomelanocortin in mouse brain. *Neurosci Lett* 429: 69-73

SEILER N (1981) Polyamine metabolism and function in brain. *Neurochem Int* 3: 95-110

SEILER N (1987) Functions of polyamine acetylation. *Can J Physiol Pharmacol* 65: 2024-2035

SEILER N (2004) Catabolism of polyamines. *Amino Acids* 26: 217-233

SEILER N ET AL (1996) Polyamine transport in mammalian cells. An update. *Int J Biochem Cell Biol* 28: 843-861

SEILER N, KNODGEN B (1983) N-(3-aminopropyl)pyrrolidin-2-one: a physiological excretory product deriving from spermidine. *Int J Biochem* 15: 907-915

SEILER N, RAUL F (2005) Polyamines and apoptosis. *J Cell Mol Med* 9: 623-642

SHAW KN ET AL (2001) Lipopolysaccharide causes deficits in spatial learning in the watermaze but not in BDNF expression in the rat dentate gyrus. *Behav Brain Res* 124: 47-54

SHIMADA A ET AL (1994) Spermidine potentiates dizocilpine-induced impairment of learning performance by rats in a 14-unit T-maze. *Eur J Pharmacol* 263: 293-300

SHIMAZU R ET AL (1999) MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189: 1777-1782

SIGNOR C ET AL (2014) Spermidine improves fear memory persistence. *Eur J Pharmacol* 730: 72-76

SMITH JA ET AL (2012) Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull* 87: 10-20

SOULET D, RIVEST S (2003) Polyamines play a critical role in the control of the innate immune response in the mouse central nervous system. *J Cell Biol* 162: 257-268

SPARKMAN NL ET AL (2005a) Peripheral lipopolysaccharide administration impairs two-way active avoidance conditioning in C57BL/6J mice. *Physiol Behav* 85: 278-288

SPARKMAN NL ET AL (2005b) Effects of intraperitoneal lipopolysaccharide on Morris maze performance in year-old and 2-month-old female C57BL/6J mice. *Behav Brain Res* 159: 145-151

TABOR CW, TABOR H (1984) Polyamines. *Annu Rev Biochem* 53: 749-790

TADANO T ET AL (2004) Effects of NMDA receptor-related agonists on learning and memory impairment in olfactory bulbectomized mice. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 26: 93-97

TANG YP ET AL (1999) Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 401: 63-69

TARR AJ ET AL (2011) The effects of age on lipopolysaccharide-induced cognitive deficits and interleukin-1beta expression. *Behav Brain Res* 217: 481-485

TETI D ET AL (2002) Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 781: 107-149

THOMAS T, THOMAS TJ (2001) Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci* 58: 244-258

THOMSON LM, SUTHERLAND RJ (2005) Systemic administration of lipopolysaccharide and interleukin-1beta have different effects on memory consolidation. *Brain Res Bull* 67: 24-29

TRAYNELIS SF ET AL (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* 62: 405-496

URDIALES JL ET AL (2001) Polyamine metabolism revisited. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13: 1015-1019

VARGAS DL ET AL (2005) Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol* 57: 67-81

VELLOSO NA ET AL (2009) Spermine improves recognition memory deficit in a rodent model of Huntington's disease. **Neurobiol Learn Mem** 92: 574-580

VIVIANI B ET AL (2003) Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. **J Neurosci** 23: 8692-8700

WEISS N ET AL (2009) The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. **Biochim Biophys Acta** 1788: 842-857

WENK GL (2003) Neuropathologic changes in Alzheimer's disease. **J Clin Psychiatry** 64 Suppl 9: 7-10

WHITE TL, YOUNGENTOB SL (2004) The effect of NMDA-NR2B receptor subunit over-expression on olfactory memory task performance in the mouse. **Brain Res** 1021: 1-7

WILLIAMS K (1997) Modulation and block of ion channels: a new biology of polyamines. **Cell Signal** 9: 1-13

WILLIAMS K ET AL (1991) Modulation of the NMDA receptor by polyamines. **Life Sci** 48: 469-498

XANTHOS DN, SANDKUHLER J (2014) Neurogenic neuroinflammation: inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity. **Nat Rev Neurosci** 15: 43-53

YAKA R ET AL (2007) D-cycloserine improves functional recovery and reinstates long-term potentiation (LTP) in a mouse model of closed head injury. **FASEB J** 21: 2033-2041

ZARIFKAR A ET AL (2010) Agmatine prevents LPS-induced spatial memory impairment and hippocampal apoptosis. **Eur J Pharmacol** 634: 84-88

ZHANG M ET AL (1999) Spermine inhibition of monocyte activation and inflammation. **Mol Med** 5: 595-605

ZHANG M ET AL (1997) Spermine inhibits proinflammatory cytokine synthesis in human mononuclear cells: a counterregulatory mechanism that restrains the immune response. **J Exp Med** 185: 1759-1768

ZHANG M ET AL (2000) Regulation of macrophage activation and inflammation by spermine: a new chapter in an old story. **Crit Care Med** 28: N60-66

ZHU S ET AL (2009) Spermine protects mice against lethal sepsis partly by attenuating surrogate inflammatory markers. **Mol Med** 15: 275-282

