

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**PAPEL DO RECEPTOR DO PEPTÍDEO LIBERADOR DE GASTRINA NA
FORMAÇÃO DA MEMÓRIA EMOCIONAL NA AMÍGDALA BASOLATERAL E
NO HIPOCAMPO**

Daniela Lessa da Silva

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Gilberto Schwartzmann
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Rafael Roesler**

**Tese de Doutorado
Porto Alegre, novembro de 2006**

S586p **Silva, Daniela Lessa da**

Papel do receptor do peptídeo liberador de gastrina na formação da memória emocional na amígdala basolateral e no hipocampo / Daniela Lessa da Silva ; orient. Gilberto Schwartzmann ; co-orient. Rafael Roesler. – 2006.

124 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2006.

1. Peptídeo liberador de gastrina 2. Amígdala 3. Hipocampo 4.

Memória I. Schwartzmann, Gilberto II. Roesler, Rafael III. Título.

NLM: WL 102

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	06
DEDICATÓRIA	07
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	09
LISTA DE FIGURAS	10
RESUMO DA TESE	11
ABSTRACT	12
PRIMEIRA PARTE	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1. Bombesina / Peptídeo Liberador da Gastrina e Receptores.....	18
2.2. RC-3095: Antagonista GRPR.....	20
2.3. GRPR e memória.....	20
2.4. Avaliação experimental do medo aprendido e inato.....	23
2.5. A amígdala e o hipocampo na memória relacionada ao medo.....	27
2.6. O envolvimento dos sistemas neuroendócrinos relacionados ao estresse na amígdala basolateral e hipocampo.....	28
2.7. Os sistemas colinérgico, dopaminérgico e serotoninérgico na ABL e hipocampo.....	30
2.8. Cascatas bioquímicas envolvidas na formação da memória da esquia inibitória.....	31
3. JUSTIFICATIVA	33
4. OBJETIVOS	34
4.1. Objetivo geral.....	35
4.2. Objetivos específicos.....	34
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

SEGUNDA PARTE – Artigo 1	47
1. ABSTRACT.....	49
2. INTRODUCTION.....	48
3. MATERIALS AND METHODS.....	50
4. RESULTS.....	53
5. DISCUSSION.....	54
6. ABBREVIATIONS.....	58
7. REFERENCES.....	59
8. FIGURES.....	65
TERCEIRA PARTE – Artigo 2	69
1. ABSTRACT.....	71
2. INTRODUCTION.....	72
3. MATERIALS AND METHODS.....	72
4. RESULTS.....	73
5. DISCUSSION.....	74
6. REFERENCES.....	78
7. FIGURES.....	83
QUARTA PARTE – Artigo 1 - Tradução para a língua portuguesa	86
1. RESUMO.....	87
2. INTRODUÇÃO.....	88
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	89
4. RESULTADOS.....	92
5. DISCUSSÃO.....	93
6. ABREVIATURAS.....	97
7. REFERÊNCIAS.....	98
8. FIGURAS.....	104
QUINTA PARTE – Artigo 2 – Tradução para a língua portuguesa	108
1. RESUMO.....	109
2. INTRODUÇÃO.....	110
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	112
4. RESULTADOS.....	111

5. DISCUSSÃO.....	113
6. REFERÊNCIAS.....	116
7. FIGURAS.....	121
CONCLUSÕES	124
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	125

Agradecimentos

O caminho é longo, e naturalmente muitas pessoas contribuíram, direta ou indiretamente, para a concretização deste trabalho. Agradeço a todos.

Em especial, aos Profs. Gilberto Schwartzmann e Rafael Roesler, que admiro intensamente. Sinto-me extremamente orgulhosa de trabalhar sob a orientação de pesquisadores de tamanha repercussão no meio científico, que nos inspiram de maneira cativante e envolvente e são, acima de tudo, seres humanos maravilhosos.

Agradeço à equipe do Departamento de Bioquímica que, pacientemente, me auxiliou no aprendizado do trabalho experimental, e em especial ao Prof. Ivan Izquierdo.

À equipe da Oncosinos, pelo apoio e colaboração. Em especial ao meu colega Fabiano, pelo incentivo diário e compreensão.

Aos amigos, por serem tão especiais.

À minha família, que é a base de tudo com seu apoio.

Ao meu amor, Marco, pela compreensão, amor, carinho e apoio. Por dividir os momentos difíceis do caminho, e por festejar junto a cada conquista.

DEDICATÓRIA

À minha família,
Início de tudo.

Ao meu amado Marco,
Companheiro de sonhos e realidade.

Aos pacientes,
O sentido de todo o trabalho realizado.

“ Você ouve muito a respeito de sua educação, mas algumas belas, sagradas memórias, preservadas desde a infância, são talvez a melhor educação de todas.

Se um homem carrega tais memórias consigo durante a vida, ele estará salvo pelo resto de seus dias. E mesmo se somente uma boa memória permanece em nossos corações, ela também pode ser o instrumento de nossa salvação algum dia.”

Fiódor Mikhaïlovitch Dostoievski

1821 - 1881

ABREVIATURAS

GRP – Peptídeo Liberador de Gastrina

RC-3095 - (D-Tpi6, Leu13 psi[CH₂NH]-Leu14) *bombesin* (6-14)

ABL – Amígdala Basolateral

GABA – ácido gama-amino butírico

BN – Bombesina

SNC – Sistema Nervoso Central

GRPR – Receptor do Peptídeo Liberador de Gastrina

LTP – Potenciação de Longo Prazo

mA - miliamperes

NMB – Neuromedina B

c-erbB-2/HER-2 – receptor do fator crescimento epidérmico 2

PLC – Fosfolipase C

PKC – Proteína-quinase C

MAPK – Proteína-quinase mitogénio ativada

PKA – Proteína-quinase A

cAMP – Monofosfato Adenilcíclico

D1 - Receptor dopaminérgico tipo 1

D5 – Receptor dopaminérgico tipo 5

AC - Adenilciclase

5-HT_{1A} – receptor 5-hidroxitriptofânio 1_A

NMDA – N-metil-D-aspartato

AMPA – α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate

KREB – Proteína ligante ao elemento responsivo Monofosfato Adenilcíclico

KREB-P – Proteína ligante ao elemento responsivo Monofosfato Adenilcíclico fosforilada

PKG – proteína-quinase G

CaMKII – Proteína-quinase II cálcio-calmodulina

Receptor GABA_A – receptor tipo A do ácido gama-amino butírico

SAL – Salina

RC – RC-3095

Mus - Muscimol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Seqüência de aminoácidos do receptor murino do peptídeo liberador de gastrina (mGRPR).

Figura 2. Diagrama esquemático para modelo dos mecanismos de sinalização celular mediando as ações regulatórias do GRPR na consolidação da memória no hipocampo.

Figura 3. Aparato de esquiva inibitória (caixa de Albarsch).

Figura 4. Labirinto em cruz elevado.

RESUMO DA TESE

O sistema bombesina / peptídeo liberador de gastrina (*gastrin-releasing peptide* - GRP) está implicado na regulação de vários aspectos neurofisiológicos e comportamentais. Em ambos estudos aqui reportados utilizamos o antagonista dos receptores GRP, (D-Tpi6, Leu13 psi[CH₂NH]-Leu14) bombesin (6-14), RC-3095, como ferramenta farmacológica para ampliar o conhecimento sobre a ação do sistema bombesina / GRP na memória na amígdala basolateral (ABL) e hipocampo.

No primeiro estudo demonstramos que os receptores GRP na ABL estão envolvidos na memória aversiva. Ratos Wistar machos adultos foram treinados em tarefa de esquiva inibitória de teste único e avaliados 24 horas após para a retenção da memória. No primeiro experimento, a administração sistêmica do RC-3095 após o treino causou redução da retenção da memória. No segundo experimento, a microinfusão pós-treino bilateral de RC-3095 intra-amigdaliana reduziu de maneira dose-dependente a retenção da tarefa. Consistentemente, quando a ABL foi inativada funcionalmente com o agonista GABAérgico muscimol, no terceiro experimento, o efeito da administração sistêmica do RC-3095 foi bloqueado. Estes resultados sugerem que a ABL medeia o efeito de inibição da memória aversiva causado pelo bloqueio de receptores GRP.

No segundo estudo avaliamos o papel dos receptores GRP no hipocampo dorsal de ratos no medo inato e na formação da memória aversiva. Os ratos receberam microinfusões bilaterais de salina ou RC-3095 no hipocampo dorsal cinco minutos antes do treino em tarefa de esquiva inibitória, sendo testados 24 horas após para a retenção. Foi utilizada esquiva inibitória de múltiplos testes, e o RC-3095 não afetou a aquisição da tarefa; a retenção foi prejudicada na dose de 0,4 µg. Entretanto, em avaliação no aparato do labirinto em cruz elevado, o RC-3095 não demonstrou ter afetado o medo inato ou ansiedade.

Em resumo, nossos experimentos indicam que os receptores GRP na amígdala basolateral e hipocampo estão envolvidos na consolidação da memória aversiva em ratos, e que a ABL é uma região crucial na mediação dos efeitos inibidores de memória do antagonista GRP RC-3095.

ABSTRACT

The bombesin / gastrin-releasing peptide (GRP) receptor system has been implicated in regulating several neurophysiologic and behavioral aspects. In both studies here reported we used the GRP receptor antagonist D-Tpi6, Leu13 psi[CH₂NH]-Leu14 bombesin (6-14), RC-3095, as a pharmacological tool in order to extend the knowledge about the actions of bombesin / GRP system in the basolateral amygdala (BLA) and hippocampus in memory.

In the first paper we show that GRP receptors in the BLA are involved in the consolidation of aversively motivated memory. Adult Wistar male rats were trained in a single-trial step-down inhibitory avoidance task and tested for retention 24 hours later. In the first experiment, post-training systemic injection of RC-3095 impaired memory retention. In the second experiment, post-training bilateral microinfusion of RC-3095 into the BLA dose-dependently impaired retention. Consistently, when BLA was functionally inactivated by the GABAergic agonist muscimol, in the third experiment, the memory-impairing effect of RC-3095 was blocked. These results suggest that BLA mediates the memory-impairing effect of GRP receptors.

Next, reported in the second paper, we evaluated the role of GRP receptors in the rat dorsal hippocampus in formation of fear-motivated memory and innate fear. Adult male Wistar rats were given a bilateral microinfusion of saline or RC-3095 into the dorsal hippocampus 5 minutes before they were trained in a continuous multiple trial inhibitory avoidance task, and tested 24 hours later. RC-3095 did not affect acquisition, but at the dose of 0,4 µg impaired retention test performance. RC-3095 did not affect innate fear and anxiety assessed in an elevated plus maze.

In summary, our experiments indicate that GRP receptors in BLA and hippocampus are involved in regulating aversive memory consolidation in rats, and that the BLA is a crucial area mediating the memory-impairing effects of the GRP antagonist RC-3095.

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

A bombesina (BN) é um peptídeo de 14 aminoácidos originalmente isolado da pele de anfíbios ¹, tendo sido posteriormente identificada em várias espécies de vertebrados. Estudos utilizando anticorpos contra a BN revelaram sua presença no trato gastrointestinal, pulmões e Sistema Nervoso Central (SNC) de mamíferos. Nesta classe, entre os peptídeos similares à BN, o primeiro identificado foi o peptídeo liberador de gastrina (*gastrin-releasing peptide* – GRP). Estudos subseqüentes identificaram seu receptor, o GRPR, e o gene codificador do GRP ².

O GRP apresenta ações estimuladoras na proliferação tumoral, demonstradas em modelos experimentais de diferentes tipos de câncer *in vivo* e em ratos com xenoinxertos de células de câncer humano ^{3,4}. A transdução de sinais do GRP está associada a cascatas de sinalização envolvendo proteína-quinases ⁵⁻⁷, com mecanismos comuns à patogênese de neoplasias e aos eventos observados na cascata bioquímica da formação da memória ⁸⁻¹⁰.

O antagonista do GRPR, o peptídeo RC-3095, (D-Tpi6, Leu13 psi[CH₂NH]-Leu14) *bombesin* (6-14) foi desenvolvido para avaliação de sua atividade anti-neoplásica ¹¹. Demonstrou inibição do crescimento de diversas linhagens celulares tumorais em modelos experimentais animais e humanos ¹²⁻¹⁴. Recentemente foi publicado o primeiro estudo de Fase I avaliando o RC-3095 em pacientes portadores de neoplasias malignas avançadas ¹⁵.

As ações dos peptídeos similares à BN também estão relacionadas a diversos aspectos neurofisiológicos, como saciedade, aversão, recompensa, ansiedade, termorregulação e respostas ao estresse, aprendizado e memória ¹⁶⁻¹⁸. O GRP é encontrado em altas concentrações no SNC, em especial no hipocampo e núcleos da amígdala basolateral (ABL), estruturas intimamente relacionadas à memória e memória relacionada a emoções ^{19,20}.

O processo de formação da memória requer que uma nova informação, inicialmente uma memória lábil, torne-se estável através de um processo de consolidação, envolvendo modificações bioquímicas e estruturais que permitem a plasticidade sináptica. O fenômeno denominado de LTP (*long term potentiation* – potenciação de longo prazo), está associado à plasticidade sináptica e é proposto como uma das bases moleculares da consolidação da memória ⁸⁻¹⁰.

Os processos de formação e expressão da memória são organizados em diferentes sistemas do cérebro dos mamíferos. Através de experimentos em animais, com a indução de lesões cerebrais focais, manipulações genéticas ou inativação farmacológica de diferentes regiões cerebrais, é possível avaliar as diversas estruturas e sistemas neuroendócrinos que estão envolvidos na formação da memória ²¹. O hipocampo é uma área criticamente relacionada à plasticidade sináptica e memória. A amígdala, em especial o complexo de núcleos da ABL, apresenta envolvimento na regulação da memória relacionada à emoção, mediando os efeitos modulatórios de drogas e hormônios ²²⁻²⁴.

No estudo da consolidação da memória, o teste de esQUIVA inibitória em ratos é amplamente utilizado ^{8,25}. Neste teste, o roedor aprende a não descer de uma plataforma para evitar o recebimento de um choque de 0,4 mA, correspondente a uma baixa intensidade. Esse é um modelo animal correspondente ao aprendizado em humanos da evitação a eventos ameaçadores ou potencialmente perigosos. Este tipo de evento, associado à sensação de medo, costuma ser registrado instantaneamente e produz memórias vívidas e de longa duração. A memória resultante deste teste, ou situação de perigo, chama-se de memória aversiva, e é altamente conservada entre as espécies, estando implicada nos processos de reação e adaptação a situações de risco para a sobrevivência do indivíduo ^{2,26-27}. Grande parte das evidências de que dispomos sobre os processos envolvidos na formação da memória é oriunda deste método ou de variantes do mesmo, proporcionando inferências para outras formas de memória.

No procedimento de esQUIVA inibitória, existem evidências sugerindo que a consolidação da memória depende da seqüência de alterações moleculares relacionadas à formação de LTP na região CA1 do hipocampo ^{28,29}. Entretanto, alterações similares ao LTP ocorrem também na amígdala basolateral, no córtex entorrinal e córtex parietal

durante as primeiras horas após o treino, sugerindo que a formação de LTP na região CA1 hipocampal não seja o único mecanismo necessário para a consolidação da memória. É provável que, além da formação de LTP no hipocampo, o momento de ocorrência e a seqüência das vias de sinalização que ocorrem nestas e em outras regiões cerebrais e suas interações sejam os fatores determinantes do processo de consolidação da memória aversiva ³⁰.

Durante o período de consolidação, são envolvidos diversos sistemas neuroendócrinos que modulam a memória nas estruturas cerebrais ³⁰. No hipocampo, a modulação da memória aversiva ocorre precocemente (0 a 3 horas) através de sinapses GABAérgicas, colinérgicas e noradrenérgicas, e mais tardiamente (3 a 6 horas) através de vias dopaminérgicas, beta-noradrenérgicas e serotoninérgicas ⁸. Os sistemas de hormônios e neuromoduladores interagem e são capazes de alterar a memória de uma maneira não linear: glicocorticóides, vasopressina, adrenalina e noradrenalina agem na amígdala basolateral e facilitam a consolidação da memória em baixas doses, porém em altas doses causam o efeito inverso ³¹.

Recentemente o sistema da bombesina / peptídeo liberador de gastrina tem sido proposto como um novo sistema regulador da formação da memória. Estudos experimentais demonstram que a administração sistêmica de BN ou agonistas GRPR afetam a memória aversiva em roedores ^{16,32,33}.

Quando aplicado no hipocampo dorsal, doses intermediárias de BN aumentam, e doses altas provocam a diminuição da memória aversiva ³¹. Inversamente, a infusão de antagonista do GRPR, no hipocampo dorsal, prejudica a consolidação da memória aversiva em ratos, de maneira dose dependente ³². Além disso, a inativação funcional da amígdala provoca a atenuação dos efeitos de facilitação cognitiva induzidos pela administração sistêmica de BN ³³. Desta maneira, é provável que o hipocampo e a ABL estejam envolvidos na mediação dos efeitos regulatórios da BN e de antagonistas do GRPR na memória motivada pelo medo.

Devido ao potencial uso do RC-3095 como agente anti-neoplásico, torna-se necessária uma avaliação criteriosa, inclusive com o uso de modelos animais, de seus efeitos sobre o SNC. Além disso, os antagonistas dos GRPR podem ser utilizados como

ferramentas farmacológicas importantes na investigação do papel desses receptores na função cerebral, em especial a memória.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Bombesina / Peptídeo Liberador de Gastrina e receptores

A bombesina é um peptídeo isolado da pele do sapo *Bombina bombina*, descrita pela primeira vez em 1973 por *Anastasi et al*¹. Estudos subseqüentes identificaram várias substâncias estruturalmente similares que consistem de uma família de neuropeptídeos presentes em várias espécies de vertebrados, divididos em três grupos: família bombesina que inclui a bombesina e alitesina, a família ranatensina, litorina e derivados e a família filolitorina. O GRP foi o primeiro peptídeo similar à BN reconhecido em mamíferos, isolado do tecido gástrico de porcos, com potente ação liberadora de gastrina³⁴. De uma maneira similar, foi identificado um decapeptídeo que age na musculatura lisa de ratos, classificado na família ranatensina e chamado de Neuromedina B (NMB). Em mamíferos, somente homólogos do GRP e NMB foram identificados, tendo sido isolados através de técnicas moleculares e de imuno-histoquímica no cérebro, medula espinhal, estômago e células neuroendócrinas pulmonares. A decodificação genética indica que provavelmente derivam de um mesmo gene ancestral, porém divergiram precocemente durante a evolução, encontrando-se em cromossomos distintos. Entre as espécies, apresentam homologia de 90% entre mamíferos e 80% entre mamíferos e pássaros, denotando alto conservadorismo filogenético. A sua distribuição no sistema nervoso central demonstra um padrão distinto e complementar, sendo encontrada alta expressão do RNAm do GRP no hipocampo e em vários núcleos da amígdala basolateral. Os núcleos olfatório anterior, geniculado medial e supraquiasmático, núcleo pré-óptico medial e parabraquial expressam o GRP moderadamente. Em contraste, a NMB é expressa de maneira mais proeminente no bulbo olfatório, núcleos centrais da amígdala, substância nigra, e em outras regiões que não competem com a expressão do GRP²⁰.

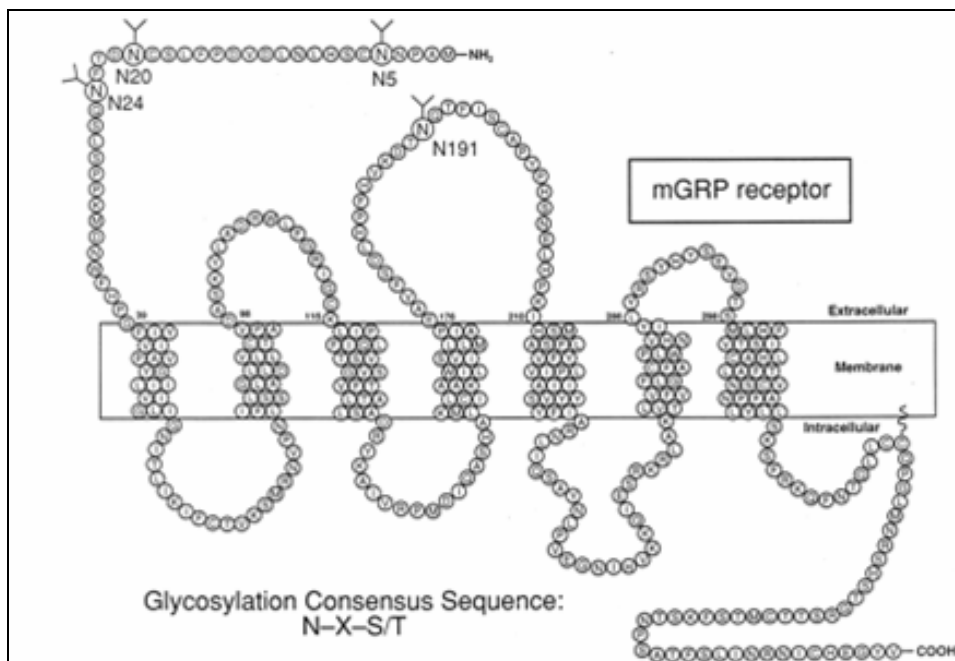


Figura 1. Seqüência de aminoácidos do receptor murino do peptídeo liberador de gastrina (mGRPR).

Outros subtipos de receptores similares à bombesina recentemente descobertos foram chamados de BRS-3, BB4 e BRS-3.5, com afinidades variadas com as diferentes famílias de receptores de bombesina. Entretanto, suas ações permanecem obscuras devido à ausência de ligantes conhecidos para possibilitar o estudo de suas ações³⁴⁻³⁶.

As ações dos peptídeos similares à bombesina, GRP e NMB, apresentam correspondência às regiões anatómicas nas quais foram identificados, e estão relacionadas a vários aspectos neurofisiológicos, como saciedade, termorregulação, aversão, recompensa, ansiedade, aprendizado e memória, e respostas ao estresse²⁰.

Os peptídeos similares à BN apresentam ação também na carcinogênese. Os receptores do GRP e NMB são expressos em linhagens de células de carcinomas humanos³. Em tecidos normais, os peptídeos similares à bombesina estimulam o crescimento de células epiteliais brônquicas e células estromais endometriais, atuando na regulação da proliferação e diferenciação celular do desenvolvimento pulmonar fetal^{37,38}. No carcinoma de pulmão, foi documentada a ação autócrina do GRP como fator de crescimento tumoral³⁹. Linhagens celulares humanas de carcinomas de próstata, mama e

estômago têm seu desenvolvimento acelerado na presença de peptídeos similares à BN
40-43 .

Associado a estes dados, a observação de que a cascata bioquímica envolvida na ativação do receptor GRP apresenta eventos comuns à patogênese de neoplasias ^{3,44} levou ao estudo deste sistema como possível alvo terapêutico no desenvolvimento de drogas anti-neoplásicas.

2.2. RC-3095: Antagonista GRPR

Os antagonistas dos receptores GRP desenvolvidos como drogas anti-neoplásicas demonstraram inibição do crescimento celular tumoral em várias linhagens de câncer de mama estrógeno-independente ⁷, câncer de próstata, pâncreas e ovário. Foi observada também diminuição da expressão da oncoproteína c-erbB-2/HER-2 em linhagens celulares humanas de câncer de mama e diminuição de fatores pró-angiogênicos ⁴²⁻⁴⁴.

O antagonista do GRPR, o RC-3095 (D-Tpi6, Leu13 psi[CH2NH]-Leu14) *bombesin* (6-14), foi desenvolvido para avaliação de atividade anti-neoplásica ^{41,44}. Em modelos experimentais de diferentes tipos de câncer in vivo e em ratos com xenoinxertos de células de câncer humano, foi demonstrada sua ação na inibição do crescimento de células de tumores de próstata, ovário, pulmão, pâncreas, estômago e melanoma ^{3,7}. Recentemente foi publicado o primeiro estudo de fase I do RC-3095 em pacientes com câncer avançado ¹⁵.

2.3. GRPR e memória

O GRPR é um receptor de membrana pós-sináptico, proteína-G acoplado. O modelo proposto de sua atividade na consolidação da memória no hipocampo envolve, após sua ativação, em aumento no cálcio intracelular, ativação da via da fosfolipase C (PLC) e proteína-quinase C (PKC), fosforilação e ativação da MAPK (*mitogen activated protein kinase*) ³¹. Vários mecanismos parecem estar envolvidos em uma sinalização cruzada entre as vias da PKC, MAPK e PKA, pois não parece haver estimulação direta da via da PKA pelo GRPR; entretanto, é necessária a ativação desta via para se dar o efeito da BN na consolidação da memória. Uma possibilidade é que a ativação da PKA seja

decorrente da estimulação da adenilciclase pelo aumento do cálcio intracelular, com ativação da via cAMP/PKA ³⁰.

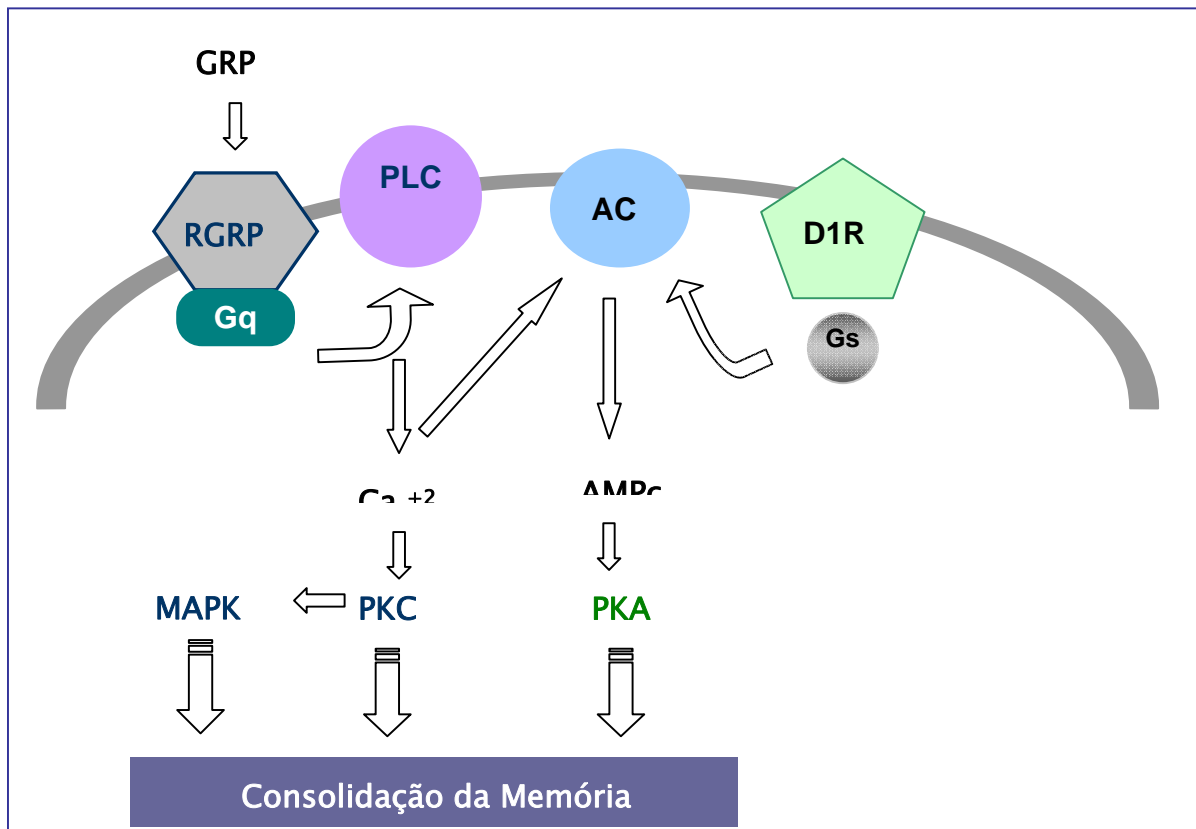


Figura 1. Diagrama esquemático para modelo dos mecanismos de sinalização celular mediando as ações regulatórias do GRPR na consolidação da memória no hipocampo. O GRP liberado no terminal sináptico liga-se ao receptor acoplado à proteína Gq nos sítios pós-sinápticos. A ativação do GRPR induz um aumento no cálcio intracelular e provoca a ativação da via da PLC/PKC, a qual, por sua vez, pode ativar a via da MAPK. O receptor dopaminérgico D1/D5 (D1R) é acoplado à proteína Gs e ativação da adenilciclase (AC). O sinal AMPc induzido por D1R pode ser sinergisticamente potencializado pelo aumento do cálcio induzido pela AC, levando a um aumento da ativação da PKA ³¹.

As vias de sinalização descritas levam a um conseqüente aumento da expressão de oncogenes nucleares como *c-fos* e *c-jun*, os quais formam heterodímeros e aumentam a expressão de genes de fatores de crescimento ⁴⁶. Estes processos, além de comuns aos eventos intracelulares envolvidos nas neoplasias, são reconhecidos também no processo de formação da memória e plasticidade sináptica ^{8,47}.

Estudos demonstram que a administração sistêmica de bombesina ou GRP melhora a memória aversiva em roedores ¹⁶. É provável que a ABL medie os efeitos regulatórios da BN e de antagonistas de GRPR sobre a memória emocional, uma vez que a inativação funcional da amígdala atenua os efeitos de facilitação cognitiva induzidos pela administração sistêmica de BN ³³.

Os estudos com o antagonista GRPR, o RC-3095, na avaliação da memória aversiva em ratos são consistentes com esta hipótese. A administração aguda sistêmica de RC-3095 inibe de forma específica a memória aversiva, sem afetar a memória de reconhecimento ⁴⁸. Além disso, micro-infusões de RC-3095 no hipocampo dorsal prejudicam a consolidação da memória aversiva em ratos ³², efeito que é revertido pela administração pós-treino do glicocorticóide dexametasona ⁴⁹.

Os antagonistas de receptores GRP, como o RC-3095, parecem ser ferramentas farmacológicas importantes na investigação do papel desses receptores na função cerebral, em especial a consolidação da memória aversiva na ABL e hipocampo, motivos que justificam o seguimento das investigações.

2.4. Avaliação experimental do medo aprendido e inato

A capacidade de recordar situações ameaçadoras é de extrema importância para a sobrevivência das espécies. Por outro lado, o desencadeamento da sensação de medo de forma indiscriminada ou exacerbada pode ser patológico. Desta maneira, a compreensão dos mecanismos neurais envolvidos na formação da memória motivada pelo medo permite um melhor entendimento do funcionamento normal do sistema nervoso e a busca de tratamento para desordens eventualmente associadas a situações que envolvem contextos emocionais.

Estudos em seres humanos, devido às questões éticas, usualmente são limitados à avaliação de pacientes que apresentam lesões neurológicas ⁵⁰ ou a experimentos comportamentais com a identificação de alterações metabólicas visualizáveis através de neuroimagens ⁵¹. Com o uso de modelos animais é possível avaliar a influência de diversos sistemas neuroendócrinos através de manipulações farmacológicas, genéticas ou ablativas, possibilitando a identificação e interação das estruturas cerebrais envolvidas na memória relacionada ao medo.

A memória relacionada ao medo aprendido pode ser acessada através do uso de estímulo condicionado, baseado no paradigma Pavloviano ². Em ratos, um dos modelos mais utilizados para a avaliação da memória aversiva é o procedimento de esquiva inibitória. Em nosso meio, o modelo desenvolvido utiliza a caixa de Albarsch. O aparato de Albarsch consiste de uma caixa de acrílico de 50 x 25 x 25 cm, com uma grade de barras de aço paralelas de 1 mm de diâmetro na base e uma plataforma de 7 cm de comprimento e 2,5 cm de altura junto à parede esquerda. Ao ser posicionado na caixa sobre a plataforma, o animal tende a descer para explorar o ambiente, e o estímulo inicialmente neutro (a descida da plataforma para a grade) adquire significado biológico por ser associado a um estímulo aversivo, no caso um choque elétrico de leve intensidade (estímulo não condicionado) ^{31,32,52}. Na realização desta tarefa, a região CA1 do hipocampo e a amígdala basolateral estão criticamente envolvidos ²⁵.



Figura 2. Aparato de esquiva inibitória (caixa de Albarsch).

A ansiedade e o medo inato também podem ser avaliados em laboratório através da resposta não condicionada a um ambiente potencialmente perigoso ⁵³. O modelo animal de ansiedade mais utilizado no mundo é o labirinto em cruz elevado ⁵⁴. Este modelo é baseado no comportamento exploratório espontâneo de roedores em um ambiente com dois níveis de maior (braços abertos) ou menor (braços fechados) característica aversiva. Esse fato gera inicialmente um conflito aproximação-esquiva aos braços abertos, resultado da tendência exploratória do roedor e do medo/novidade. Durante o experimento, por cinco minutos são registrados o número total de entradas nos braços e o número de entradas nos braços fechados e abertos. O comportamento associado à ansiedade é medido pelo grau de evitação do animal aos braços abertos. Durante os testes neste modelo foi demonstrada a ocorrência de aumento na atividade neuronal da amígdala e hipocampo ⁵⁴⁻⁵⁸.

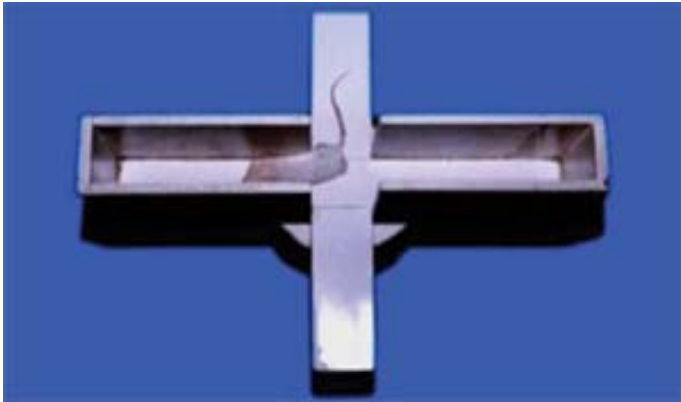


Figura 4. Labirinto em cruz elevado

2.5. A Amígdala e o hipocampo na memória relacionada ao medo

A amígdala, estrutura subcortical situada no lobo temporal medial, é componente chave no circuito neural do medo e das emoções ^{2,59}. A amígdala está envolvida nos processos de ansiedade, alerta e aversão, e é responsável pelo conteúdo emocional que determinadas memórias carregam ⁸. Eventos em contexto emocional tipicamente são mais facilmente lembrados do que eventos neutros, e este parece ser um papel da amígdala. Anatomicamente, consiste de um complexo de mais de dez núcleos, sendo o complexo basolateral, ou a amígdala basolateral, sua maior região. Apresenta extensas conexões intra e internucleares, além de projeções aferentes e eferentes comunicando-a com diversas outras regiões cerebrais, incluindo o hipocampo ⁶⁰.

Lesões ablativas da amígdala causam diminuição da resposta a estímulos ameaçadores em pássaros, gatos, coelhos, cães, macacos e ratos, e inclusive em humanos ²². A estimulação química e elétrica da amígdala em animais desencadeia diversas respostas comportamentais e autonômicas, como congelamento (*freezing*), defesa, alterações na pressão arterial e frequência cardíaca, manifestações usualmente associadas ao medo ⁶¹. Em humanos, a estimulação elétrica da amígdala direita provoca emoções negativas, especialmente medo e tristeza, e a estimulação da amígdala esquerda induz tanto sensações prazerosas, como felicidade, quanto desagradáveis, como medo, ansiedade e tristeza ⁶².

A relação da amígdala com a memória começou a ser demonstrada com observações de que a estimulação elétrica desta região pode causar amnésia retrógrada ⁷⁸. Lesões ou inativações funcionais específicas da amígdala basolateral (BLA), e não de outros núcleos da amígdala, possuem o efeito de alterar a ação facilitadora de diversos hormônios relacionados ao estresse e de uma variedade de drogas na consolidação da memória ^{9,63-64}. A ABL é a estrutura responsável pela modulação da memória relacionada às emoções ^{65, 66}. Em casos de inativação da ABL é demonstrada a perda da capacidade de identificar as diferenças entre os estímulos neutros e os estímulos com significado emocional, porém sem alterações na sensibilidade aos estímulos sensoriais ⁶⁷.

Entretanto, mesmo lesões amigdalianas completas não eliminam o aprendizado de condicionamento ao medo ^{68,69}. É provável que a ação fundamental da ABL nos

processos de memória seja a de modular a consolidação da memória motivada pelo medo (inato e adquirido) em outras regiões cerebrais ⁵⁹, em especial o hipocampo ⁷⁰.

O hipocampo apresenta uma organização celular laminar, possibilitando a identificação de três regiões distintas denominadas de CA1, CA2 e CA3, discriminações baseadas no tamanho e conexões das células piramidais ⁷¹. Lesões específicas da região CA1 do hipocampo dorsal em humanos causam déficits de memória qualitativamente similares a ressecções amplas do hipocampo ⁷², e estímulos elétricos induzem a formação de LTP nesta região ⁷³. Existem evidências de que o aprendizado em tarefa de esQUIVA inibitória é também capaz de induzir a formação de LTP nas células CA1 do hipocampo, podendo estar associado à consolidação da memória ^{28,29}.

Estudos eletrofisiológicos demonstram que a ABL é capaz de modular a plasticidade sináptica no hipocampo ⁷⁴: a inibição farmacológica ou lesões ablativas na ABL previnem a indução de LTP no hipocampo ⁷⁵, e a estimulação causa indução ⁷⁶. O conjunto de informações atuais sugere que, em tarefas de esQUIVA inibitória, o hipocampo esteja envolvido nos aspectos contextuais e espaciais da memória, enquanto que a amígdala esteja envolvida nos aspectos aversivos (emocionais) ^{65,77}.

2.6. O envolvimento dos sistemas neuroendócrinos relacionados ao estresse na amígdala basolateral e hipocampo

A ABL recebe estímulos de diversos neuromoduladores ⁷⁹, em especial hormônios e neurotransmissores envolvidos na resposta metabólica ao estresse. Os sistemas adrenérgico, noradrenérgico e glicocorticóide interagem de forma complexa e ainda não completamente elucidada.

A administração sistêmica de adrenalina, causando aumento da retenção da memória aversiva, foi a primeira demonstração de que os hormônios endógenos estão envolvidos na regulação da consolidação da memória ⁸⁰. As evidências atuais sugerem que os efeitos da adrenalina na memória se dão através da ativação noradrenérgica, pois como uma macromolécula a adrenalina não ultrapassa a barreira hemato-encefálica. A adrenalina parece exercer seu efeito modulatório na memória via ativação periférica beta-adrenérgica de aferentes viscerais, provavelmente via aferentes vagais no núcleo do trato

solitário (NTS). O NTS apresenta projeções noradrenérgicas na amígdala, e via núcleo *paragigantocellularis* se comunica com o *locus coeruleus*, que por sua vez também se projeta e libera noradrenalina na amígdala e hipocampo^{80,81}.

A noradrenalina exerce sua ação na consolidação da memória emocional na ABL através da ativação de receptores beta-adrenérgicos locais. Infusões de noradrenalina ou agonistas beta-adrenérgicos diretamente na amígdala induzem aumento da consolidação da memória aversiva e condicionamento contextual ao medo em ratos⁸², enquanto que o antagonismo dos receptores beta-adrenérgicos na ABL bloqueia os efeitos da adrenalina na consolidação da memória⁸³. Além disso, parece existir uma interação entre os receptores beta e alfa-1-adrenérgicos na ABL modulando a memória aversiva, pois a administração intra-amigdaliana de antagonista alfa-1-adrenérgico concomitante com agonista beta-adrenérgico atenua os efeitos facilitadores deste último^{84,85}.

Os glicocorticóides, hormônios relacionados ao estresse, também atuam através de receptores específicos na ABL. Foi demonstrado que a ativação dos receptores glicocorticóides na ABL ou hipocampo dorsal causa uma facilitação dose-dependente na retenção da memória em tarefa de esquiva inibitória^{86,87}. Entretanto, na presença de lesões na ABL, este efeito estimulador é bloqueado⁸⁸. Além disso, o antagonismo beta-adrenérgico na ABL é capaz de inibir a facilitação induzida por glicocorticóides no hipocampo dorsal, demonstrando que a atividade beta-adrenérgica na ABL é essencial na modulação da memória aversiva induzida pelos glicocorticóides no hipocampo, e que a ação dos sistemas noradrenérgico e glicocorticóide nestas estruturas é interligada⁸⁶. Por sua vez, os glicocorticóides também influenciam a eficácia da estimulação noradrenérgica na consolidação da memória na ABL. Infusões intra-amigdalínicas bilaterais de antagonista glicocorticóide pré-treino em tarefa de esquiva inibitória bloqueiam completamente a facilitação da retenção induzida pela ativação do receptor alfa-1-adrenérgico. Este efeito parece se dar através da ativação da cascata do AMP cíclico (AMPC) pelos receptores beta-adrenérgicos⁸⁹. As vias neurais envolvidas na mediação destas influências parecem ser as projeções da ABL para o *nucleus accumbens*⁹⁰.

Em humanos, os efeitos dos hormônios relacionados ao estresse agem de forma consistente com os achados em animais. O bloqueio de receptores beta-adrenérgicos impede o efeito facilitador da memória relacionada a eventos com significado emocional

⁹¹. Ainda, os efeitos dos glicocorticóides na consolidação da memória dependem do conteúdo emocional do material avaliado, e há indicações que também em humanos a ativação noradrenérgica da amígdala esteja envolvida nos efeitos moduladores dos glicocorticóides na consolidação da memória ⁸¹.

2.7. Os sistemas colinérgico, dopaminérgico e serotoninérgico na ABL e hipocampo

Os sistemas serotoninérgico, dopaminérgico e colinérgico interagem e modulam a consolidação da memória na ABL. Os efeitos de modulação da memória decorrentes da administração sistêmica de drogas que agem nos receptores destes sistemas são bloqueados na presença de lesões ou inibições farmacológicas da ABL ²⁴.

A ABL e o hipocampo apresentam receptores serotoninérgicos 5HT_{1A}. Evidências indicam que a ativação destes receptores possui ação inibitória nos processos de formação de memória nestas estruturas ^{92,93}. Inversamente, a ativação dos receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ na ABL, assim como a ativação do sistema colinérgico ⁹⁴, atuam facilitando a retenção da memória aversiva em ratos ⁷⁹. Tanto os receptores 5HT_{1A} quanto os receptores dopaminérgicos e colinérgicos agem mediados por proteínas G, causando inibição (5HT_{1A}) e estimulação (dopaminérgicos e colinérgicos) da adenilciclase, enzima que medeia a síntese de AMPc. O sistema dopaminérgico está envolvido na modulação da memória induzida pelos sistemas noradrenérgico e colinérgico na ABL. A infusão concomitante de antagonistas beta-adrenérgicos ou muscarínicos bloqueia os efeitos facilitadores da dopamina ^{94,95}.

2.8. Cascatas bioquímicas envolvidas na formação da memória da esquiva inibitória

No treino em tarefa de esquiva inibitória, ocorre uma seqüência de alterações bioquímicas envolvendo o hipocampo, amígdala, córtex entorrinal e córtex parietal posterior. O hipocampo e a amígdala entram em operação imediatamente após o treino e até 30 minutos após, sendo seguidos pelas outras estruturas ⁸. A administração intra-amigdaliana e intra-hipocampal de muscimol, agonista GABAérgico, provoca diminuição na retenção da memória de esquiva inibitória quando aplicado imediatamente após o treino, mas não quando infundido 30 minutos após ⁹⁶.

A seqüência bioquímica, no hipocampo, envolvida no processo de formação da memória aversiva em ratos envolve inicialmente a ativação de receptores glutamatérgicos (NMDA, AMPA e receptores metabotrópicos), seguido de alterações em segundo mensageiros e cascatas bioquímicas, com aumento da atividade das proteína-quinases A (PKA) ⁹⁷, C (PKC) e G (PKG), e proteína-quinase II cálcio-calmodulina (CaMKII). Após, seguem alterações nas subunidades dos receptores de glutamato e suas propriedades de ligação, com aumento da expressão de fatores de transcrição, como c-fos ⁸. Consistentemente, micro-infusões na ABL e hipocampo dorsal de antagonista do receptor glutamatérgico NMDA imediatamente após o treino de esquiva inibitória afetam negativamente a retenção da tarefa ⁷⁶ e, da mesma forma, a inibição da PKC até trinta minutos após o treino na ABL inibe a consolidação da memória aversiva ⁹⁸.

Precocemente, coincidindo com o momento de ativação da ABL e hipocampo, as sinapses GABAérgicas, colinérgicas e noradrenérgicas modulam localmente os eventos bioquímicos envolvidos no processo da memória aversiva. O muscimol, agonista dos receptores GABA_A, quando aplicado na região CA1 do hipocampo imediatamente após o treino é amnésico ⁹⁶, assim como o anticolinérgico escopolamina. A noradrenalina causa facilitação da memória, e o beta-bloqueador timolol altera a sensibilidade à modulação GABAérgica. Outros moduladores envolvidos nestas fases precoces, no hipocampo, incluem mensageiros retrógrados que regulam a liberação de glutamato, como o óxido nítrico, o monóxido de carbono e o fator ativador de plaquetas ⁹⁹.

Três a 6 horas após o treino ocorre o envolvimento da via de sinalização do monofosfato adenilcíclico (cAMP): a cascata cAMP/PKA/CREB. CREB trata-se de uma família de fatores de transcrição que, quando fosforilada (CREB-P), regula a síntese de determinadas proteínas ¹⁰⁰. A ativação da CREB mediada pela PKA modula a ativação e síntese de proteínas críticas para a persistência da plasticidade sináptica ¹⁰¹. Ao contrário dos eventos iniciais, a amígdala não apresenta esta segunda etapa do processo em comum com o hipocampo, corroborando a hipótese de que a amígdala não é um sítio de armazenamento da memória, e que sua ação moduladora no hipocampo se dá precocemente no processo de formação da memória.

Justificativa

O acúmulo de evidências indica que o sistema bombesina / GRP seja importante na modulação dos processos de formação da memória emocional, em especial nos núcleos amigdalianos e hipocampo. Resultados de estudos prévios demonstram que o bloqueio dos receptores GRP, através do antagonista GRPR RC-3095, administrado sistemicamente ou diretamente no hipocampo, induz a inibição da memória relacionada ao medo em modelos animais. O seguimento de experimentos com o bloqueio GRPR no hipocampo e a avaliação dos efeitos do antagonismo GRPR diretamente na ABL torna-se, assim, de fundamental importância para ampliar o conhecimento das ações do sistema GRP no SNC e memória emocional.

Ainda, o RC-3095, molécula desenvolvida para uso como agente anti-neoplásico, deve ser investigada com relação aos seus efeitos no SNC em modelos animais.

4. OBJETIVOS DO ESTUDO

4.1. Objetivo Geral

Avaliar o papel do RC-3095, antagonista de receptores GRP, no hipocampo e amígdala basolateral, em modelo animal da memória relacionada ao medo e ansiedade.

4.2. Objetivos Específicos

- a. Verificar os efeitos de administrações intra-amigdalíanas pós-treino de RC-3095 sobre a memória em tarefa de esQUIVA inibitória.

- b. Verificar os efeitos de administrações sistêmicas de RC-3095 sobre a memória de esQUIVA inibitória em ratos submetidos à inativação funcional farmacológica da amígdala basolateral.

- c. Verificar os efeitos de administrações no hipocampo dorsal de RC-3095 sobre a memória relacionada ao medo, ansiedade e medo inato.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Anastasi A, Erspamer V, Bucci M. Isolation and amino acid sequences of alytesin and bombesin: two analogous active tetradecapeptides from the skin of european discoglossid frogs. *Arch Biochem Biophys*. 1973;148:443-6.
2. Shumyatsky GP, Tsvetkov E, Malleret G, Vronskaya S, Hatton M, Hampton L, et al. Identification of a signaling network in lateral nucleus of amygdala important for inhibiting memory appecifically related to learned fear. *Cell*. 2002;111:905-18.
3. Corjay MH, Dobranski DJ, Way JM, Viallet J, Shapira H, Worland P, et al. Two distinct bombesin receptor subtypes are expressed and functional in human lung carcinoma cells. *J Biol Chem*. 1991;266(28):18771-9.
4. Schwartzmann G. Dexamethasone and gastrin-releasing peptide receptors in human lung cells. *Lung Cancer*. 2004;46(1):129.
5. Hellmich MR, Ives KL, Udipi V, Soloff MS, Greeley GH Jr, Christensen BN, et al. Multiple protein kinase pathways are involved in gastrin-releasing peptide receptor regulated secretion. *J Biol Chem*. 1999; 274:23901-9.
6. Weber HC, Walters J, Leyton J, Casibang M, Purdom S, Jensen RT, et al. A bombesin receptor subtype-3 peptide increases nuclear oncogene expression in a MEK-1 dependent manner in human lung cancer cells. *Eur J Pharmacol*. 2001;412(1):13-20.
7. Bajo AM, Schally AV, Krupa M, Hebert F, Groot K, Szepeshazi K. Bombesin antagonists inhibit growth of MDA-MB-435 estrogen-independent breast

- cancers and decrease the expression of the ErbB-2/HER-2 oncoprotein and c-jun and c-fos oncogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(6):3836-41.
8. Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: The sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brains structures. *Neurobiol Learning and Memory*. 1997;68:285-316.
 9. McGaugh JL. Memory – a century of consolidation. *Science*. 2000;287:248-51.
 10. Miyamoto E. Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. *J Pharmacol Sci*. 2006;100(5):433-42.
 11. Cai R-Z, Radulovic S, Pinski J, Nagy A, Redding TW, Olsen DB, et al. Pseudonanopeptide bombesin antagonists containing C-terminal Trp or Tpi. *Peptides*. 1992;13:267-71.
 12. Yano T, Pinski J, Groot K, Schally AV. Stimulation by bombesin and inhibition by bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 of growth of human breast cancer cell lines. *Cancer Res*. 1992;52:4545-7.
 13. Schwartzmann G, Di Leone LP, Dal Pizzol F, Roesler R. MAPK pathway activation in colorectal cancer: a therapeutic opportunity for GRP receptor antagonists. *The Lancet*. 2005;444-5.
 14. Kahan Z, Sun B, Schally AV, Arencibia JM, Cai RZ, Groot K, et al. Inhibition of growth of MDA-MB-468 estrogen-independent human breast carcinoma by bombesin/gastrin-releasing peptide antagonists RC-3095 and RC-3940-II. *Cancer*. 2000; 88(6):1384-92.
 15. Schwartzmann G, Di Leone LP, Horowitz M, Schunemann D, Cancelli A, Pereira AS, et al. A phase I trial of the bombesin/gastrin-releasing peptide (BN/GRP) antagonist RC3095 in patients with advanced solid malignancies. *Invest New Drugs*. 2006; 24(5):403-12.

16. Flood JF, Morley JE. Effects of bombesin and gastrin-releasing peptide on memory processing. *Brain Res.* 1988; 460(2):314-22.
17. McCoy JG, Avery DD. Bombesin: Potential integrative peptide for feeding and satiety. *Peptides.* 1990;11(3):595-607.
18. Morley JE, Flood J, Silver AJ. Effects of peripheral hormones on memory and ingestive behaviors. *Psychoneuroendocrinology.* 1992;17(4):391-9.
19. Williams CL, McGaugh JL. Enhancement of memory processing in an inhibitory avoidance and radial maze task by post-training infusion of bombesin into the nucleus tractus solitarius. *Brain Res.* 1994;654(2):251-6.
20. Ohki-Hamazaki H, Iwabuchi M, Maekawa F. Development and function of bombesin-like peptides and their receptors. *Int J Dev Biol.* 2005;49:293-300.
21. Moody TW, Pert CB, Rivier J, Brown MR. Bombesin: Specific binding to rat brain membranes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1978;75:5372-6.
22. Ono T, Nishijo H, Uwano T. Amygdala role in conditioned associative learning. *Progr neurobiol.* 1995;46:401-22.
23. Krettek JE, Price JL. Amygdaloid projections to subcortical structures within the basal forebrain and brainstem in the rat and cat. *J Comp Neurol.* 1978;178: 225-54.
24. McGaugh JL. Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. *Trends in Neurosc.* 2002;25:456-61.
25. McGaugh JL, Cahill L, Roozendaal B. Involvement of the amygdala in memory storage: Interaction with other brains systems. *Proceedings Natl Acad Sci USA.* 1996;93:13508-14.

26. Wilesky A, Schafe GE, LeDoux JE. The amygdala modulates memory consolidation of fear-motivated inhibitory avoidance learning but not classical fear conditioning. *J Neurosci*. 2000;20(18):7059-66.
27. McNally GP, Westbrook RF. Predicting danger: the nature, consequences and neural mechanisms of predictive fear learning. *Learn Mem*. 2006;13(3):245-53.
28. Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 1993;361:31-9.
29. Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*. 2006;313(5790):1093-7.
30. Izquierdo I, Bevilaqua LRM, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci*. 2006;29(9):496-505.
31. Roesler R, Luft T, Oliveira SHS, Farias CB, Almeida VR, Quevedo J, et al. Molecular mechanisms mediating gastrin-releasing peptide receptor modulation of memory consolidation in the hippocampus. *Neuropharmacology*. 2006;51:350-7.
32. Roesler R, Meller CA, Kopschina MI, Souza DO, Henriques JA, Schwartzmann G. Intrahippocampal infusion of the bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 impairs inhibitory avoidance retention. *Peptides*. 2003;24(7):1069-74.
33. Rashidy-Pour A, Razvani ME. Unilateral reversible inactivations of the nucleus tractus solitarius and amygdala attenuate the effects of bombesin on memory storage. *Brain Res*. 1998; 814:127-132.

34. McDonald TJ, Jornvall H, Nilsson G, Vagne M, Ghatei M, Bloom SR, et al. Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 1983;90:227-33.
35. Gorbulev V, Akhundova A, Buchner H, Fahrenholz F. Molecular cloning of a new bombesin receptor subtype expressed in uterus during pregnancy. *Eur J Biochem.* 1992;208:405-10.
36. Nagalla SR, Barry BJ, Creswick KC, Eden P, Taylor JT, Spindel ER. Cloning of a receptor for amphibian [Phe¹³]bombesin distinct from the receptor of gastrin-releasing peptide: identification of a fourth bombesin receptor subtype (BB4). *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:6205-9.
37. Spindel ER. Roles of bombesin-like peptides in lung development and lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1996;14:407-8.
38. Shriver SP, Bourdeau HA, Gubish CT, Tirpak DL, Davis ALG, Luketich JD, et al. Sex-specific expression of gastrin-releasing peptide receptor: relationship to smoking history and risk of lung cancer. *J Natl C Inst.* 2000;92:24-33.
39. Cuttitta F, Carney DN, Mulshine J, Moody TW, Fedorko J, Fischler A, et al. Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. *Nature.* 1985;316:823-6.
40. Bologna M, Festuccia C, Muzi P, Biordi L, Ciomei M. Bombesin stimulates growth of human prostatic cancer cells in vitro. *Câncer.* 1989;63:1714-20.
41. Bold RJ, Kim HJ, Ishizuka J, Townsend CM Jr, Thompson JC. A human gastric cancer cell line possesses a functional receptor for gastrin-releasing peptide. *Cancer Invest.* 1998;16:12-7.
42. Chatzistamou I, Schally AV, Szepeshazi K. Inhibition of growth of ES-2 human ovarian cancers by bombesin antagonist RC-3095, and luteinizing hormone-releasing hormone antagonist Cetrorelix. *Cancer Lett.* 2001;171(1):37-45.

43. Bajo AM, Schally AV, Groot K, Szepeshazi K. Bombesin antagonists inhibit proangiogenic factors in human experimental breast cancers. *Br J Cancer*. 2004;90(1):245-52.
44. Chatzistamou I, Schally AV, Sun B, Armatis P, Szepeshazi K. Inhibition of growth of OV-1063 human epithelial ovarian cancers and *c-jun* and *c-fos* oncogene expression by bombesin antagonists. *Br J Cancer*. 2000;83(7):906-13.
45. Qin Y, Ertl T, Cai RZ, Halmos G, Schally AV. Inhibitory effect of bombesin receptor antagonist RC-3095 on the growth of human pancreatic cancer cells in vivo and in vitro. *Cancer Res*. 1994; 54:1035-1041.
46. Draoui M, Chung P, Park M, Birrer M, Jakowlew S, Moody TW. Bombesin stimulates *c-fos* and *c-jun* mRNAs in small cell lung cancer cells. *Peptides*. 1995;16:289-92.
47. Izquierdo I, Quevedo J, Izquierdo LA, Vianna MRM, Szapiro G, Barros DM, et al. What can go wrong when memory fails: The main biochemical events underlying consolidation and retrieval in rats. In Palomo T, Beninger RJ, Archer T, editors. *Neurodegenerative Brain Disorders*. Madrid: Fundacion cerebro y mente, 2000.
48. Roesler R, Kopschina MI, Rosa RM, Henriques JAP, Souza DO, Schwartsmann G. RC-3095, a bombesin/gastrin-releasing peptide receptor antagonist, impairs aversive but not recognition memory in rats. *Eur J Pharmacol*. 2004;486:35-41.
49. Venturella R, Lessa D, Luft T, Roozendaal B, Schwartsmann G, Roesler R. Dexamethasone reverses the memory impairment induced by antagonism of hippocampal gastrin-releasing peptide receptors. *Peptides*. 2005;26:821-5.

50. Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1957;20:11-21.
51. Drobyshevsky A, Baumann SB, Schneider W. A rapid fMRI task battery for mapping of visual, motor, cognitive, and emotional function. *Neuroimage*. 2006;31(2):732-44.
52. Bianchin MM, Mello e Souza T, Medina JH, Izquierdo I. The amygdala is involved in the modulation of long-term memory, but not working, short- and long-term memory. *Neurobiol Learn Mem*. 1999;71:127-31.
53. Viana MB, Tomaz C, Graeff FG. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. *Pharmacol Biochem Behav*. 1994;49(3):549-54.
54. Rodgers RJ, Cole JC. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper SJ, Hendrie CA, editors. *Ethology and psychopharmacology*. Chichester: Wiley; 1994. p. 9-44.
55. Graeff FG, Zangrossi JRH. Animal models of anxiety disorders. In: D'haenen H, den Boer JA, Willner P, eds. *Biological Psychiatry*. New York: Wiley; 2002. p. 879-93.
56. Graeff FG, Netto CF, Zangrossi H Jr. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*. 1998;23(2):237-46
57. Carobrez AP, Bertoglio LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005;29(8):1193-205.
58. Carvalho-Netto EF, Nunes-de-Souza RL. Use of the elevated T-maze to study anxiety in mice. *Behav Brain Res*. 2004. Jan 5;148(1-2):119-32.

59. Packard MG, Wingard JC. Amygdala and “emotional” modulation of the relative use of multiple memory systems. *Neurobiol Learn Mem.* 2004;82:243-52.
60. Sah P, Faber SL, De Armentia ML, Power J. The amygdaloid complex: Anatomy and Physiology. *J. Physiol Rev* 2003;83:803-34.
61. Ursin H, Kaada BR. Functional localization within the amygdaloid complex in the cat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1960;12:1-20.
62. Lanteaume L, Khalifa S, Regis J, Marquis P, Chauvel P, Bartolomei F. Emotion induction after direct intracerebral stimulations of human amygdala. *Cereb Cortex.* 2006; jul 31 [acesso em 2006 Oct 3]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=pubmed>
63. Roozendaal B, Sapolsky RM, McGaugh JL. Basolateral amygdala lesions block the disruptive effects of long-term adrenalectomy on spatial memory. *Neuroscience.* 1998; 84:453-65.
64. Roesler R, Roozendaal B, McGaugh JL. Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of 8-Br-cAMP infused into the entorhinal cortex of rats after training. *Eur J Neurosci.* 2002;15:905-10.
65. Roesler R, Schröder N, Vianna MR, Quevedo J, Bromberg E, Kapczinski F, et al. Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. *Brain Res.* 2003;13;975(1-2):207-13.
66. Vazdarjanova A, McGaugh JL. Basolateral amygdala is involved in modulating consolidation of memory for classical fear conditioning. *J Neurosci.* 1999;19(15):6615-22.
67. Dwyer DM, Killcross. Lesions of the basolateral amygdala disrupt conditioning based on the retrieved representations of motivationally significant events. *J Neurosci.* 2006;26(32):8305-9.

68. Cahill L, Vazdarjanova A, Setlow B. The basolateral amygdala complex is involved with, but is not necessary for, rapid acquisition of Pavlovian fear conditioning. *Eur J Neurosci.* 2000;12(8):3044-50.
69. Killcross S, Robbins TW, Everitt BJ. Different types of fear-conditioned behaviour mediated by separate nuclei within amygdala. *Nature.* 1997;24;388(6640):377-80.
70. Nakao K, Matsuyama K, Matsuki N, Ikegaya Y. Amygdala stimulation modulates hippocampal synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 28;101(39):14270-5.
71. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. A citologia dos neurônios. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, eds. *Princípios da neurociência.* 4ª ed. McGraw-Hill Companies, Inc; 2000. p 78.
72. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Aprendizagem e memória. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, eds. *Princípios da neurociência.* 4ª ed. McGraw-Hill Companies, Inc; 2000. p 1233.
73. Akirav I, Richter-Levin G. Biphasic modulation of hippocampal plasticity by behavioral stress and basolateral amygdala stimulation in the rat. *J Neurosci.* 1999;19(23):10530-5.
74. Akirav I, Richter-Levin G. Mechanisms of amygdala modulation of hippocampal plasticity. *J Neurosci.* 2002;22(22):9912-21.
75. Ikegaya Y, Saito H, Abe K. Attenuated hippocampal long-term potentiation in Basolateral amygdala-lesioned rats. *Brain Res.* 1994;656(1):157-64.
76. Ikegaya Y, Nakanishi K, Saito H, Abe K. Amygdala beta-noradrenergic influence on hippocampal long-term influence on hippocampal long-term potentiation in vivo. *Neuroreport.* 1997;8(14):3143-6.

77. Buckley MJ. The role of the perirhinal cortex and hippocampus in learning, memory and perception. *Q J Exp Psychol B*. 2005;58(3-4):246-68.
78. Goddard GV. Amygdaloid stimulation and learning in the rat. *J Comp Physiol Psychol*. 1964;58: 23-30.
79. LaLumiere RT, Nguyen LT, McGaugh JL. Post-training intrabasolateral amygdala infusions of dopamine modulate consolidation of inhibitory avoidance memory: involvement of noradrenergic and cholinergic systems. *Eur J Neurosci*. 2004;20:2804-10.
80. Gold PE, Van Buskirk R. Facilitation of time-dependent memory processes with posttrial epinephrine injections. *Behav Biol* 1975;13:145-53.
81. Berntson GG, Sarter M, Cacioppo JT. Review article: Ascending visceral regulation of cortical affective information processing. *Eur J Neurosci*. 2003;18:2103-9.
82. McGaugh JL, Roozendaal B. Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Curr Opin Neurobiol*. 2002;12:205-10.
83. Power AE, Thal LJ, McGaugh JL. Lesions of the nucleus basalis magnocellularis induced by 192 IgG-saporin block memory enhancement with post-training norepinephrine in the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;99:2315-19.
84. Liang KC, Juler R, McGaugh JL. Modulating effects of posttraining epinephrine on memory: involvement of the amygdala noradrenergic system. *Brain Res*. 1986; 368:125-33.
85. Ferry B, Roozendaal B, McGaugh JL. Basolateral Amygdala Noradrenergic Influences on Memory Storage are mediated by an interaction between β - and α -adrenoceptors. *J. Neurosci*. 1999;19(12):5119-23.

86. Roozendaal B, McGaugh JL. Glucocorticoid receptor agonist and antagonist administration into the basolateral but not central amygdala modulates memory storage. *Neurobiol Learn Mem.* 1997;67(2):176-9.
87. Roozendaal B, Nguyen BT, Power AE, McGaugh JL. Basolateral amygdala noradrenergic influence enables enhancement of memory consolidation induced by hippocampal glucocorticoid receptor activation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:11642-7.
88. Roozendaal B, McGaugh JL. Basolateral Amygdala Lesions block the memory enhancing effect of glucocorticoid administration in the dorsal hippocampus of rats. *Eur J Neurosci.* 1997;9(1):76-83.
89. Roozendaal B, Quirarte GL, McGaugh JL. Glucocorticoids interact with the basolateral amygdala beta-adrenoreceptor cAMP/cAMP/PKA system in influencing memory consolidation. *Eur J Neurosci.* 2002;15(3):553-60.
90. Roozendaal B, De Quervain DJ-F, Ferry B, Setlow B, McGaugh JL. Basolateral amygdala-nucleus accumbens interactions in mediating glucocorticoid enhancement of memory consolidation. *J Neurosci* 2001;21:2518-25.
91. Van Stegeren AH, Everaerd W, Cahill L, McGaugh JL, Gooren IJ. Memory for emotional events: differential effects of centrally versus peripherally acting beta-blocking agents. *Psychopharmacology.* 1998;138:305-10.
92. Luna-Munguia H, Manuel-Apolinar L, Rocha L, Meneses A. 5-HT_{1A} receptor expression during memory formation. *Psychopharmacology.* 2005;181(2):309-18.
93. Pollandt S, Drephal C, Albrecht D. 8-OH-DPAT suppresses the induction of LTP in brain slices of the rat lateral amygdala. *Neuroreport.* 2003;14(6):895-7.

94. Introini-Collison LB, Dalmaz C, McGaugh JL. Amygdala beta-noradrenergic influences on memory storage involve cholinergic activation. *Neurobiol Learn Mem.* 1996; 65:57-64.
95. LaLumiere RT, McGaugh JL. Memory enhancement induced by post-training intrabasolateral amygdala infusions of beta-adrenergic or muscarinic agonists requires activation of dopamine receptors: Involvement of right, but not left, basolateral amygdala. *Learn Mem.* 2005; sep-Oct;12(5):527-32.
96. Zanatta MS, Quillfeldt JH, Schaeffer E., Schmitz PK, Quevedo J, Medina JH, et al. Involvement of the hippocampus, amygdala, entorhinal cortex and posterior parietal cortex in memory consolidation. *Braz J Med Biol Res.* 1997;30:235-40.
97. Vianna MRM, Izquierdo LA, Barros DM, Ardenghi P, Pereira P, Rodrigues C, et al. Differential role of hippocampal cAMP-dependent protein kinase in short- and long-term memory. *Neuroch Res.* 2000;25(5):621-6.
98. Bonini JS, Cammarota M, Kerr DS, Bevilacqua LRM, Izquierdo I. Inhibition of PKC in basolateral amygdala and posterior parietal cortex impairs consolidation of inhibitory avoidance memory. *Pharmacol Biochem Behavior.* 2005; 80:63-7.
99. Medina JH, Izquierdo I. Retrograde messenger, long-term potentiation and memory processes. *Brain Res Review.* 1995;21:185-94.
100. Davis GW, Schuster CM, Goodman CS. Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. III CREB is necessary for presynaptic functional plasticity. *Neuron.* 1996;17:669-79.
101. Martin KC, Kandel ER. Cell adhesion molecules, CREB and the formation of new synaptic connections. *Neuron.* 1996;17:567-70.

SEGUNDA PARTE – Artigo 1
***European Journal of Neuroscience*, Vol. 19, pp. 1041-5, 2004**

**Bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in the basolateral amygdala
regulate memory consolidation**

Rafael Roesler^{1,2}, Daniela Lessa³, Roberta Venturella³, Mônica R. M. Vianna⁴,
Tatiana Luft⁴, João Antônio Pegas Henriques², Ivan Izquierdo⁴ and Gilberto
Schwartzmann³

¹Preclinical Neuropharmacology Laboratory, Department of Pharmacology,
Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 90046-900
Porto Alegre, RS, Brazil

²Center for Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, 91501-970
Porto Alegre, RS, Brazil

³Graduate Program in Medical Sciences and Hospital de Clínicas de Porto Alegre,
Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

⁴Center for Memory, Department of Biochemistry, Institute for Basic Health
Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

Running title: Amygdalar bombesin receptors regulate memory

Correspondence: Dr. Rafael Roesler, Departamento de Farmacologia, Instituto de
Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Rua
Sarmiento Leite, 500 (Campus Centro/UFRGS), 90046-900 Porto Alegre, RS, Brazil;
Phone: +55 51 3316 3183; Fax: +55 51 3316 6084; E-mail: rroesler@terra.com.br

Keywords: RC-3095; neuropeptides; memory modulation; rat

1. Abstract

Several receptor and intracellular signaling systems in the basolateral amygdala (BLA) regulate memory formation. In the present study we show that bombesin/gastrin-releasing peptide (GRP) receptors in the BLA are involved in the consolidation of affectively motivated memory. Adult male rats were trained in a single-trial step-down inhibitory avoidance task and tested for retention 24 h later. Post-training systemic injection of the bombesin/GRP receptor antagonist (D-Tpi6, Leu13 psi[CH₂NH]-Leu14) bombesin (6-14) (RC-3095) impaired memory retention. In rats implanted under thionembutal anesthesia with guide cannulae aimed at the BLA, post-training bilateral infusion of RC-3095 into the BLA dose-dependently impaired retention. Pre-training unilateral muscimol inactivation of the BLA blocked the memory-impairing effect of post-training systemic administration of RC-3095. The results suggest that bombesin/GRP receptors in the BLA are involved in the consolidation of aversive memory, and the BLA mediates the memory-impairing effect of systemic bombesin/GRP receptor blockade.

2. Introduction

Extensive evidence shows that the basolateral complex of the amygdala (BLA, consisting of the basal, lateral and accessory basal nuclei) is critically involved in mediating the modulatory effects of drugs and hormones on formation of emotionally influenced memory (for reviews see McGaugh *et al.*, 1996; McGaugh, 2000; McGaugh & Izquierdo, 2000; McIntyre *et al.*, 2003). Activation of several receptor systems within the BLA is required for emotional arousal to regulate memory formation. Thus, drugs affecting different neurotransmitter receptors affect memory consolidation when infused into the BLA, and either excitotoxic lesions or pharmacological inhibition of the BLA block the modulatory effects of drugs acting on different neurotransmitter and stress hormone systems on memory consolidation (for reviews see McGaugh *et al.*, 1996; McGaugh, 2000).

Bombesin-like peptides such as the bombesin mammalian homologue, gastrin-releasing peptide (GRP), are distributed throughout the mammalian central nervous system (CNS), and the amygdala contains a high density of bombesin/GRP receptors (Moody *et al.*, 1978; Pert *et al.*, 1980; Wolf & Moody, 1985; Zarbin *et al.*, 1985;

Hollingsworth, 1989). Bombesin-like peptides stimulate cell proliferation, display a range of neuroendocrine activities, and regulate several aspects of CNS function, including feeding, satiety (McCoy & Avery, 1990; Morley *et al.*, 1992), nociception, locomotion (Pert *et al.*, 1980), aversion, reward, anxiety (Yamada *et al.*, 2002), as well as learning and memory (Flood & Morley, 1988; Morley *et al.*, 1992; Williams & McGaugh, 1994; Rashidy-Pour & Razvani, 1998; Santo-Yamada *et al.*, 2001). Application of bombesin-like peptides to rat hippocampal neurons produces membrane depolarization (Lee *et al.*, 1999). Intracellular responses to the activation of bombesin/GRP receptors involve protein kinase signaling pathways (Hellmich *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000) that are also involved in synaptic plasticity and memory formation (for reviews, see Izquierdo & Medina, 1997; Izquierdo *et al.*, 2000; McGaugh & Izquierdo, 2000). Previous studies using peripheral injections of bombesin agonists in rodents have shown that activation of bombesin/GRP agonists enhance memory formation (Flood & Morley, 1988; Morley *et al.*, 1992; Rashidy-Pour & Razvani, 1998; Santo-Yamada *et al.*, 2001), whereas peripheral injections of bombesin/GRP receptor antagonists in mice (Santo-Yamada *et al.*, 2003), or post-training intra-hippocampal infusion of a bombesin/GRP antagonist in rats (Roesler *et al.*, 2003), impair aversively motivated memory.

The finding that reversible inactivation of the amygdala attenuates the memory-impairing effects of peripheral bombesin administration (Rashidy-Pour & Razvani, 1998) clearly suggests that the BLA is involved in mediating the memory-enhancing effects of bombesin/GRP receptor activation. However, studies have not yet determined whether bombesin/GRP receptor activation in the BLA is required for formation of memory for emotionally arousing events and if the BLA mediates the memory-impairing effects of bombesin/GRP receptor blockade. In the present study we investigated the involvement of the BLA in mediating the regulatory actions of bombesin/GRP receptors on consolidation of memory for aversive training.

3. Materials and Methods

Subjects

Adult male Wistar rats (220-325 g) obtained from the Department of Biochemistry (UFRGS, Porto Alegre) breeding colony were housed five to a cage with food and water available *ad libitum*, and maintained on a 12-hr light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m.). Behavioral procedures were conducted between 10:00 and 16:30. All experimental procedures were performed in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior (SBNeC) recommendations for animal care.

Surgery

Animals given intra-amygdala infusions (second and third experiments) were implanted under thionembutal anesthesia (30 mg/kg, i.p.) with bilateral 9.0-mm guide cannulae aimed 1.0 mm above the BLA as previously described (Roesler *et al.*, 2000a, b). Stereotaxic coordinates (A – 2.3 mm, L \pm 5.0 mm from bregma, and V - 6.0 mm from dura) were obtained from the atlas of Paxinos & Watson (1997) and adjusted according to previous studies and pilot data.

Behavioral procedures

Animals were submitted to the behavioral procedures (training and retention test trials in a step-down inhibitory avoidance task) at least 7 days after surgery. The inhibitory avoidance apparatus and procedures have been described in previous reports (Roesler *et al.*, 2000a, b; Walz *et al.*, 2000; Roesler *et al.*, 2003). Briefly, the training apparatus was a 50 X 25 X 25-cm acrylic box (Albarsch, Porto Alegre, Brazil) whose floor consisted of parallel caliber stainless steel bars (1 mm diameter) spaced 1 cm apart. A 7-cm wide, 2.5-cm high platform was placed on the floor of the box against the left wall. In the training trial, animals were placed on the platform and their latency to step down on the grid with all four paws was measured with an automatic device. Immediately after stepping down on the grid, animals received a 0.4-mA, 2.0-s footshock. A retention test trial was carried 24 h

after training. The retention test trial was procedurally identical to training, except that no footshock was presented. Retention test step-down latency (maximum 180 s) was used as a measure of IA retention.

Drugs and injection procedures

In the first experiment, animals were given an intraperitoneal (i.p.) injection of saline (NaCl 0.9%) or the bombesin/GRP receptor antagonist (D-Tpi6, Leu13 psi[CH₂NH]-Leu14) bombesin (6-14) (RC-3095; Zentaris AG, Farnkfurt, Germany) (0.2, 1.0 or 5.0 mg/kg in a 1.0 ml/kg injection volume) immediately after inhibitory avoidance training. Unoperated animals were used in this experiment.

In the second experiment, animals bilaterally implanted with cannulae aimed at the BLA were given a post-training infusion of saline or RC-3095 into the BLA. Immediately after inhibitory avoidance training, an infusion cannula was fitted into the guide cannula. The tip of the infusion cannula protruded 1.0 mm beyond the guide cannula and was thus aimed at the BLA (Roesler *et al.*, 2000a, b). Through the infusion cannulae animals received a bilateral 0.5 µl infusion of saline or RC-3095 (0.2, 1.0 or 5.0 µg/side) dissolved in saline (Roesler *et al.*, 2003). Saline or RC-3095 were infused during 1 min, and the infusion cannulae were left in place for an additional minute to allow diffusion of the drug away from the cannula tip.

In the third experiment, we evaluated inhibitory avoidance memory in rats given pre-training unilateral reversible pharmacological inactivation of the BLA followed by a post-training peripheral injection of saline or RC-3095. Animals received both a unilateral infusion of saline or the γ -aminobutyric acid type A (GABA_A) receptor agonist muscimol (0.5 µg in 0.5 µl) (Research Biochemicals International, Natick, MA, USA) into the left BLA 5 min before inhibitory avoidance training, and an i.p. injection of RC-3095 (1.0 mg/kg) immediately after training. Thus the four resulting experimental groups (intra-BLA pretraining infusion/i.p. post-training injection) were: saline/saline; muscimol/saline; saline/RC-3095; and muscimol/RC-3095. The dose of RC-3095 for this experiment was chosen on the basis of results of the first experiment (see Results below). As in the second experiment, animals used in this experiment were bilaterally implanted with cannulae in the BLA, however only the left cannula was used for infusions. No infusion

was given into the right cannula. Pilot experiments indicated that whereas bilateral infusions of muscimol or unilateral infusions of muscimol into the right BLA impaired inhibitory avoidance retention, unilateral infusions of muscimol into the left BLA did not affect retention, but blocked the effect of systemic injections of RC-3095. This effect of unilateral left BLA inactivation is consistent with previous reports (Coleman-Mesches & McGaugh, 1995; Rashidy-Pour & Razvani, 1998). Thus, only unilateral infusions of muscimol into the left BLA were used in the present study.

Histology

Postmortem verification of cannula placements in operated animals was performed as previously described (Roesler *et al.*, 2000 a, b). Animals were sacrificed by decapitation and a 0.5- μ l infusion of 4% methylene blue in saline was infused through the cannulae. Brains were removed and stored in formalin for at least 72 h before cannulae placements in the BLA were verified by histological examination. Only data from animals with correct cannula placements (i.e., within 1 mm³ of intended site; 119 animals) were included in the final analysis (Fig. 1).

Statistics

Comparisons of training and retention test step-down latencies among groups were performed using Kruskal-Wallis analysis of variance followed by Mann-Whitney *U* tests, two-tailed, when necessary. Comparisons between training and retention test performance within the same group were made by Wilcoxon tests (Roesler *et al.*, a, b; Walz *et al.*, 2000; Roesler *et al.*, 2003). In all comparisons, $p < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

4. Results

There was no significant difference among groups in training trial step-down latencies ($p = 0.97$ in a comparison among all 12 groups; overall median [interquartile ranges] training step-down latency (s) was 9.50 [6.00/12.95]).

Posttraining systemic administration of RC-3095 RC-3095 impaired inhibitory avoidance retention at the doses of 0.2 or 1.0 mg/kg, but not at the dose of 5.0 mg/kg (Fig. 2), suggesting that bombesin/GRP receptors are involved in consolidation of aversive memory. When infused into the BLA, RC-3095 dose-dependently impaired inhibitory avoidance memory (Fig. 3). Animals given RC-3095 at the dose of 5.0 μ g, but not at the doses of 0.2 or 1.0 μ g, showed impaired retention test performance when compared to saline-treated rats. This result shows that bombesin/GRP receptor activation in the BLA is required for consolidation of aversive memory.

Results of the third experiment are shown in Fig. 4. Pre-training unilateral muscimol inactivation of the left BLA did not affect inhibitory avoidance retention, but blocked the memory-impairing effect of systemic administration of RC-3095. Animals treated with a pre-training infusion of saline into the BLA followed by a post-training systemic injection of RC-3095 (1.0 mg/kg) showed impaired retention, whereas all other three experimental groups showed normal retention. This finding shows that a functionally intact BLA is essential in mediating the memory-impairing effects of the bombesin/GRP receptor antagonist.

5. Discussion

In the present study we investigated the role of the BLA in mediating the impairing effects of bombesin/GRP receptor blockade on consolidation of aversively motivated memory. The use of post-training injections of RC-3095 in our study excludes the possibility that the drug treatments altered memory retention performance by influences on sensorimotor functions such as anxiety, fear, locomotion, or attention during acquisition (McGaugh, 1989). In addition, we have previously shown (Roesler *et al.*, 2003) that the memory-impairing actions of RC-3095 are time-dependent and not related to long-lasting behavioral impairment or neuronal damage.

Post-training systemic administration of the bombesin/GRP receptor antagonist RC-3095 impaired inhibitory avoidance memory in rats at the two lower doses used, while the higher dose had no effect. This dose-response pattern is consistent with the effects of intra-hippocampal infusions of RC-3095 (Roesler *et al.*, 2003). A number of studies

evaluating the effects of injections of both memory-enhancing (McGaugh, 1989) and memory-impairing (Packard & Teather, 1997) drugs show that many treatments produce an inverted-U dose-response curve where specific doses are optimal whereas both lower and higher doses are ineffective. This result shows that bombesin/GRP receptors are involved in aversive memory consolidation, which is consistent with previous studies reporting enhancing effects of systemic administration of bombesin/GRP agonists on memory in rodents (Flood & Morley, 1988; Morley *et al.*, 1992; Rashidy-Pour & Razvani, 1998; Santo-Yamada *et al.*, 2001).

RC-3095 also impaired inhibitory avoidance memory when infused directly into the BLA after training, showing that bombesin/GRP receptor activation in the BLA is required for memory consolidation. In addition, unilateral reversible inactivation of the BLA blocked the memory-impairing effect of systemic administration of RC3095, clearly suggesting that the BLA mediates the memory-impairing effects of bombesin/GRP receptor blockade. A number of previous studies have shown that infusions of different receptor antagonists into the BLA impair inhibitory avoidance memory. Moreover, either lesions or pharmacological inhibition of the BLA can prevent the memory-enhancing and memory-impairing effects of drugs acting on different neurotransmitter systems. Thus, it has been shown that β -adrenergic, glutamatergic, glucocorticoid, cholinergic, opioid and GABAergic systems in the BLA regulate the formation of memory for inhibitory avoidance (for reviews, see McGaugh *et al.*, 1996; McGaugh, 2000). The present results extend that evidence by showing that the BLA modulates consolidation also through activation of the bombesin/GRP receptor system.

Although previous evidence has implicated the amygdala in the memory-enhancing effects of systemic administration of bombesin (Rashidy-Pour & Razvani, 1998), the role of amygdalar bombesin/GRP receptors in memory modulation has not yet been clarified. A recent report (Shumyatsky *et al.*, 2002) suggested that bombesin/GRP receptors in the lateral nucleus of the amygdala operate as a negative feedback system specifically involved in inhibiting fear-related memory. Thus, a bombesin antagonist enhances long-term potentiation (LTP) in mice lateral amygdala, and GRP receptor-deficient mice show both increased amygdalar LTP and enhanced fear memory. Consistent with an inhibitory role of the amygdalar bombesin/GRP pathway in emotional memory, Shumyatsky *et al.* (2002) also found that GRP receptors are preferentially expressed in GABAergic

interneurons in the lateral nucleus of the amygdala and contribute to GABAergic inhibitory transmission. In contrast, our findings show that inhibition of amygdalar bombesin/GRP receptors impairs fear-motivated memory, suggesting that activation of this receptor system in the BLA enables memory consolidation, which is consistent with the extensive evidence that bombesin or GRP injections enhance memory. Further research is required to address the discrepancy between our findings and those of Shumyatsky *et al.* (2002). To our knowledge, the present study is the first demonstration that bombesin/GRP receptors in the BLA are required for memory consolidation and that the BLA mediates the effects of systemically administered bombesin/GRP antagonists.

Possible signaling mechanisms underlying the memory-impairing effect of bombesin-GRP receptor blockade

Further research is necessary to clarify the intracellular signaling mechanisms underlying the memory-impairing effects of RC-3095. Studies using different cell types have suggested a role for protein kinase C (PKC) and mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) signaling pathways in the signal transduction events initiated by bombesin/GRP receptor activation. For instance, secretion regulated by activation of bombesin/GRP receptors in a human neuroendocrine-like cell line has been shown to require phospholipase C-mediated increase in intracellular free Ca^{2+} and activation of the PKC and MAPK cascades (Hellmich *et al.*, 1999). In hippocampal neurons, GRP-induced membrane depolarization is blocked by a bombesin/GRP receptor antagonist and reduced by application of a phospholipase C inhibitor (Lee *et al.*, 1999). Bombesin induces PKC- and protein tyrosine kinase-dependent expression of c-jun and jun-B in human gastric cancer SIIA cells, an effect that is blocked by bombesin/GRP receptor antagonists (Kim *et al.*, 2000). In HuTu 80 duodenal cancer cells, activation of GRP receptors stimulates sustained cyclic AMP response element binding protein phosphorylation through a PKC-dependent pathway (Qu *et al.*, 2002). Since both the PKC and MAPK/ERK pathways in the amygdala are involved in modulating aversive memory consolidation (Bianchin *et al.*, 1999; Walz *et al.*, 1999; 2000; Izquierdo *et al.*, 2000), it is possible that inhibition of those pathways by bombesin/GRP receptor blockade in the BLA is involved in the impairing effects of RC-3095. Consistent with the hypothesis that the PKC pathway is involved in mediating the modulatory action of amygdalar bombesin receptors on memory, we have recently observed (Roesler *et al.*,

unpublished results) that the impairing effect of posttraining intra-BLA infusion of RC-3095 is potentiated by co-infusion of a protein kinase C (PKC) inhibitor.

Clinical implications: possible involvement of bombesin/GRP receptors in degenerative diseases

In addition to regulating normal neural function, bombesin-like peptides and bombesin/GRP receptors might also play a role in neurodegenerative and neuropsychiatric disorders. It is possible that alterations in the bombesin/GRP receptor system are involved in Parkinson's disease (Bissette *et al.*, 1985), schizophrenia (Gerner *et al.*, 1985; Olincy *et al.*, 1999), autism (Ishikawa-Brush *et al.*, 1997) as well as in the cognitive deficits associated with Alzheimer disease (Ito *et al.*, 1994). In addition, bombesin-like peptides act as growth factors in the progression of several types of human cancers (Bologna *et al.*, 1989; Moody & Cuttitta, 1993; Wang *et al.*, 1996), which has led to the development of RC-3095 and other bombesin/GRP antagonists as potential antitumor agents (Qin *et al.*, 1994; Szepeshazi *et al.*, 1997; Chatzistamou *et al.*, 2001). Thus, the investigation of the effects of bombesin/GRP receptor antagonists in animal models of neural function might help to understand the effects and mechanisms of action of those drugs as well as to clarify the possible involvement of the bombesin/GRP in degenerative and neuropsychiatric disorders. Since neuropsychiatric disorders involve both cognitive and affective deficits, and the amygdala has been implicated in the pathogenesis of disorders such as autism and schizophrenia, our finding that the bombesin/GRP receptor system plays a crucial role in the processing of emotional memory supports the view that the bombesin/GRP pathway might be importantly involved in the pathogenesis of neuropsychiatric disorders, and the bombesin/GRP receptor should be considered a potential therapeutic drug target to the treatment of CNS diseases.

In summary, the present study shows that bombesin/GRP receptors in the BLA are involved in the consolidation of aversively motivated memory in rats, and the BLA is a crucial area mediating the memory-impairing effects of systemic bombesin/GRP receptor blockade. Thus the bombesin/GRP receptor system is one among several other systems in the BLA involved in regulating memory consolidation. These findings are consistent with the possibility that bombesin/GRP receptors are involved in the pathogenesis of neuropsychiatric disorders.

Acknowledgements

This research was supported by the South American Office for Anticancer Drug Development (SOAD) and grants from CNPq-Brazil and CAPES-Brazil. RC-3095 was a gift from Dr. J. Engel, Zentaris AG, Frankfurt, Germany. Authors thank Dr. Nadja Schröder for critical reading of the draft and assistance in preparing the manuscript.

6. Abbreviations

BLA, basolateral complex of the amygdala; CNS, central nervous system; ERK, extracellular signal-regulated protein kinase; GABA, γ -aminobutyric acid; GRP, gastrin-releasing peptide; LTP, long-term potentiation; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PKC, protein kinase C; RC-3095, (D-Tpi6, Leu13 psi[CH₂NH]-Leu14) bombesin (6-14).

7. References

1. Bianchin M, Mello e Souza T, Medina JH & Izquierdo I. The amygdala is involved in modulation of long-term memory, but not in working or short-term memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 1999;71, 127-131.
2. Bissette G, Nemeroff CB, Decker MW, Kizer JS, Agid Y & Javoy-Agid F. Alterations in regional brain concentrations of neurotensin and bombesin in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 1985;17, 324-328.
3. Bologna MC, Festuccia C, Muzi P, Biordi L & Ciomei M. Bombesin stimulates growth of human prostatic cancer cells in vitro. *Cancer.* 1985; 63, 1714-1720.
4. Chatzistamou I, Schally AV, Szepeshazi K, Groot K, Hebert F & Arencibia JM. Inhibition of growth of ES-2 human ovarian cancers by bombesin antagonist RC-3095, and luteinizing hormone-releasing hormone antagonist Cetrorelix. *Cancer Lett.* 2001; 171, 37-45.
5. Coleman-Mesches K & McGaugh JL. Muscimol injected into the right or left amygdaloid complex differentially affects retention performance following aversively motivated training. *Brain Res.* 1995;676, 183-188.
6. Flood JF & Morley JE. Effects of bombesin and gastrin-releasing peptide on memory processing. *Brain Res.* 1988;460, 314-322.
7. Gerner RH, van Kammen DP & Ninan PT. Cerebrospinal fluid cholecystokinin, bombesin and somatostatin in schizophrenia and normals. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 1985;9, 73-82.
8. Hellmich MR, Ives, KL, Udipi V, Soloff, MS, Greeley GH JR, Christensen BN & Townsend CM Jr. Multiple protein kinase pathways are involved in gastrin-releasing peptide receptor-regulated secretion. *J. Biol. Chem.* 1999;274, 23901-23909.

9. Hollingsworth EB. Gastrin-releasing peptide receptor in rat brain membranes: specific binding and stimulation of phosphoinositide breakdown. *Mol Pharmacol* 1989;35, 689-694.
10. Ishikawa-Brush Y, Powell JF, Bolton P, Miller AP, Francis F, Willard HF, Lehrach H & Monaco AP. Autism and multiple exostoses associated with an X;8 translocation occurring within the GRPR gene and 3' to the SDC2 gene. *Hum Mol Genet.* 1997;6, 1241-1250.
11. Ito E, Oka K, Etcheberrigaray R, Nelson TJ, McPhie DL, Tofel-Grehl B, Gibson GE & Alkon DL. Internal Ca²⁺ mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1994;91, 534-538.
12. Izquierdo I & Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem.* 1997;68, 285-316.
13. Izquierdo I, Quevedo J, Izquierdo LA, Vianna MRM, Szapiro G, Barros DM, Roesler R, Alonso M, Walz R & Medina JH. What can go wrong when memory fails: The main biochemical events underlying consolidation and retrieval in rats. In Palomo, T., Beninger, R.J. & Archer, T. (eds) *Neurodegenerative Brain Disorders.* Fundacion Cerebro y Mente, Madrid. 2000;pp. 131-151.
14. Kim HJ, Evers BM, Litvak DA, Hellmich MR & Townsend CM Jr. Signaling mechanisms regulating bombesin-mediated AP-1 gene induction in the human gastric cancer SIIA. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2000;279, C326-334.
15. Lee K, Dixon AK, Gonzalez I, Stevens EB, McNulty S, Oles R, Richardson PJ, Pinnock RD & Singh L. Bombesin-like peptides depolarize rat hippocampal interneurons through interaction with subtype 2 bombesin receptors. *J. Physiol.* 1999;518, 791-802.

16. McCoy JG & Avery DD. Bombesin: potential integrative peptide for feeding and satiety. *Peptides*. 1990;11, 595-607.
17. McGaugh J.L. Dissociating learning and performance: Drug and hormone enhancement of memory storage. *Brain Res. Bull.* 1989;23, 339-345.
18. McGaugh JL. Memory - a century of consolidation. *Science*. 2000; 287, 248-251.
19. McGaugh J.L., Cahill L. & Roozendaal, B. (1996) Involvement of the amygdala in memory storage: Interaction with other brain systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93, 13508-13514.
20. McGaugh JL & Izquierdo I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. *Trends Pharmacol Sci*. 2000;21, 208-210.
21. McIntyre CK, Power AE, Roozendaal B & McGaugh JL. Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003;985, 273-293.
22. Moody TW & Cuttitta F. Growth factor and peptide receptors in small lung cancer. *Life Sci*. 1993;52, 1161-1173.
23. Moody TW, Pert CB, Rivier J & Brown MR. Bombesin: specific binding to rat brain membranes. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1978;75, 5372-5376.
24. Morley JE, Flood J & Silver AJ. Effects of peripheral hormones on memory and ingestive behaviors. *Psychoneuroendocrinology*. 1992;17, 391-399.
25. Olincy A, Leonard S, Young DA, Sullivan B & Freedman R. Decreased bombesin peptide response to cigarette smoking in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 1999;20, 52-59.
26. Packard MG & Teather LA. Double dissociation of hippocampal and dorsal-striatal memory systems by posttraining intracerebral injections of 2-amino-5-phosphonopentanoic acid. *Behav. Neurosci.* 1997;111, 543-551.

27. Paxinos G & Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 3rd. edn. Academic Press, San Diego. 1997.
28. Pert A, Moody TW, Pert CB, Dewald LA & Rivier J. Bombesin: receptor distribution in brain and effects on nociception and locomotor activity. *Brain Res.* 1980;193, 209-220.
29. Qin Y, Ertl T, Cai RZ, Halmos G & Schally AV. Inhibitory effect of bombesin receptor antagonist RC-3095 on the growth of human pancreatic cancer cells in vivo and in vitro. *Cancer Res.* 1994;54, 1035-1041.
30. Qu X, Xiao D & Weber HC. Human gastrin-releasing peptide receptor mediates sustained CREB phosphorylation and transactivation in HuTu 80 duodenal cancer cells. *FEBS Lett.*, 2002;527, 109-113.
31. Rashidy-Pour A & Razvani ME. Unilateral reversible inactivations of the nucleus tractus solitarius and amygdala attenuate the effects of bombesin on memory storage. *Brain Res.* 1998;814, 127-132.
32. Roesler R, Meller CA, Kopschina MI, Souza, DO, Henriques, JAP & Schwartzmann G. Intrahippocampal infusion of the bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 impairs inhibitory avoidance retention. *Peptides.* 2003;24, 1069-1074.
33. Roesler R, Vianna MRM, deParis F, Quevedo J, Walz R & Bianchin M. Infusions of AP5 into the basolateral amygdala impair the formation, but not the expression, of step-down inhibitory avoidance. *Braz J Med Biol Res.* 2000a;33, 829-834.
34. Roesler R, Vianna MRM, deParis F, Rodrigues C, Sant'Anna MK, Quevedo J & Ferreira MBC. NMDA receptor antagonism in the basolateral amygdala blocks the enhancement of inhibitory avoidance learning in previously trained rats. *Behav Brain Res.* 2000b;112, 99-105.

35. Santo-Yamada Y, Yamada K, Wada E, Goto Y & Wada K. Blockade of bombesin-like peptide receptors impairs inhibitory avoidance learning in mice. *Neurosci. Lett.* 2003;340, 65-68.
36. Santo-Yamada Y, Yamada K & Wada K. Post-training administration of gastrin-releasing peptide (GRP) improves memory loss in scopolamine- and hypoxia-induced amnesic mice. *Physiol Behav.* 2001;74, 139-143.
37. Shumyatsky GP, Tsvetkov E, Malleret G, Vronskaya S, Hatton M, Hampton L, Battey JF, Dulac C, Kandel ER & Bolshakov EY. Identification of a signaling network in lateral nucleus of amygdala important for inhibiting memory specifically related to learned fear. *Cell.* 2002;111, 905-918.
38. Szepeshazi K, Schally AV, Halmos G, Lamharzi N, Groot K & Horvath JE. A single in vivo administration of bombesin antagonist RC-3095 reduces the levels and mRNA expression of epidermal growth factor receptors in MXT mouse mammary cancers. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1997;94, 10913-10918.
39. Walz R, Rockenbach IC, Amaral OB, Quevedo J & Roesler R. MAPK and memory. *Trends Neurosci.* 1999;22, 495.
40. Walz R, Roesler R, Quevedo J, Sant'Anna M, Madruga M, Rodrigues C, Gottfried C, Medina JH & Izquierdo I. Time-dependent impairment of inhibitory avoidance retention in rat by posttraining infusion of a mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor into cortical and limbic structures. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2000;73, 1-11.
41. Wang QJ, Knezetic AJ, Schally AV, Pour PM & Adrian T. Bombesin may stimulate proliferation of human pancreatic cancer cells through an autocrine pathway. *Int J Cancer* 1996;68, 1-7.

42. Williams CL & McGaugh JL. Enhancement of memory processing in an inhibitory avoidance and radial maze task by post-training infusion of bombesin into the nucleus tractus solitarius. *Brain Res.* 1994;654, 251-256.
43. Wolf SS & Moody TW. Receptors for GRP/bombesin-like peptides in the rat forebrain. *Peptides.* 1985;Suppl 1, 111-114.
44. Yamada K, Santo-Yamada Y, Wada E & Wada K. Role of bombesin (BN)-like peptides/receptors in emotional behavior by comparison of three strains of BN-like peptide receptor knockout mice. *Mol Psychiatry.* 2002;7, 113-117.
45. Zarbin MA, Kuhar MJ, O'Donohue TL, Wolf SS & Moody TW. Autoradiographic localization of (125I-Tyr4)bombesin-binding sites in rat brain. *J Neurosci.* 1985;5, 429-437.

8. Figures

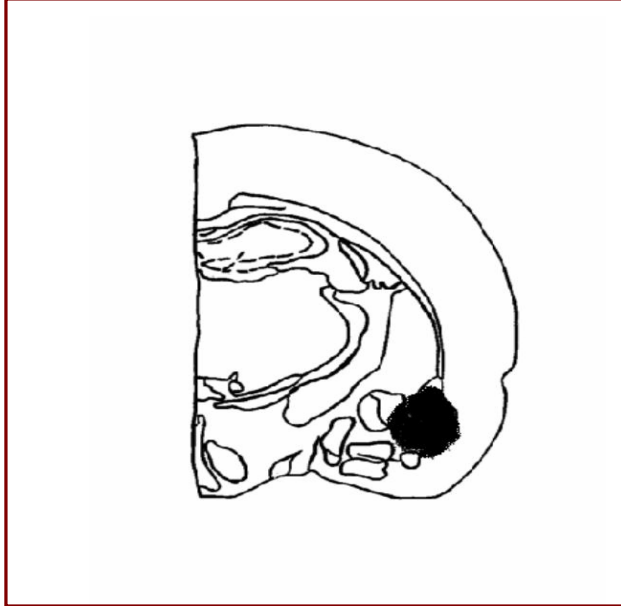


FIG. 1. Drawing of the plane A -2.3 mm of the atlas of Paxinos and Watson (1997) showing the area (hatched) where the infusion sites considered to be correct were placed.

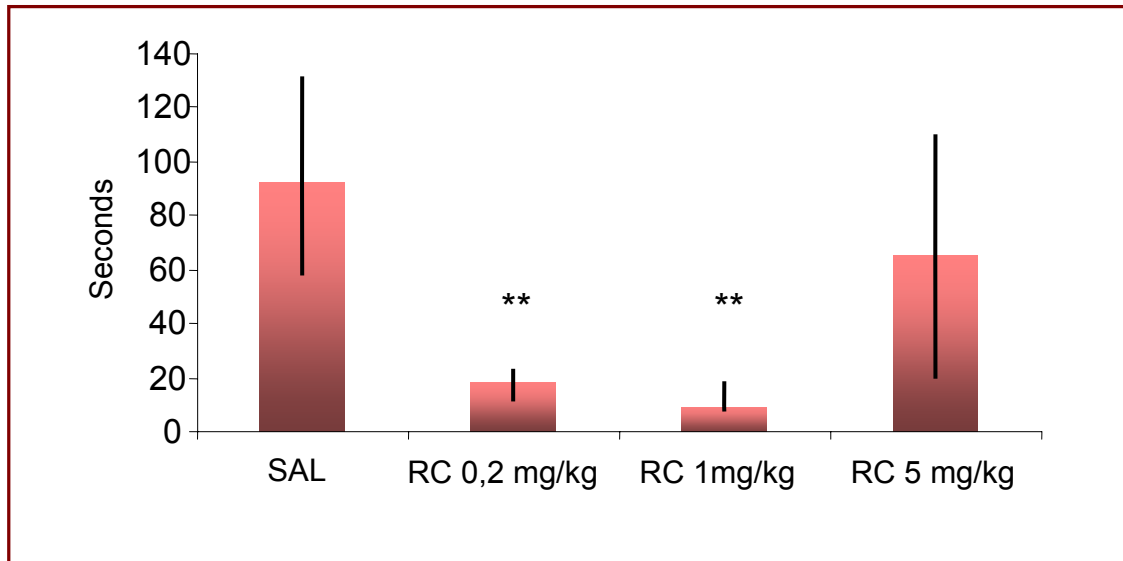


FIG. 2. Post-training peripheral administration of a bombesin/gastrin releasing peptide (GRP) receptor antagonist impairs aversively motivated memory. Rats were given an intraperitoneal (i.p.) injection of saline (SAL) or RC-3095 (RC) (0.2, 1.0 or 5.0 mg/kg) immediately after training in a step-down inhibitory avoidance task. Data are median (interquartile ranges) retention test step-down latencies; $n = 9-10$ animals per group; $**p < 0.01$ compared to the SAL-treated group.

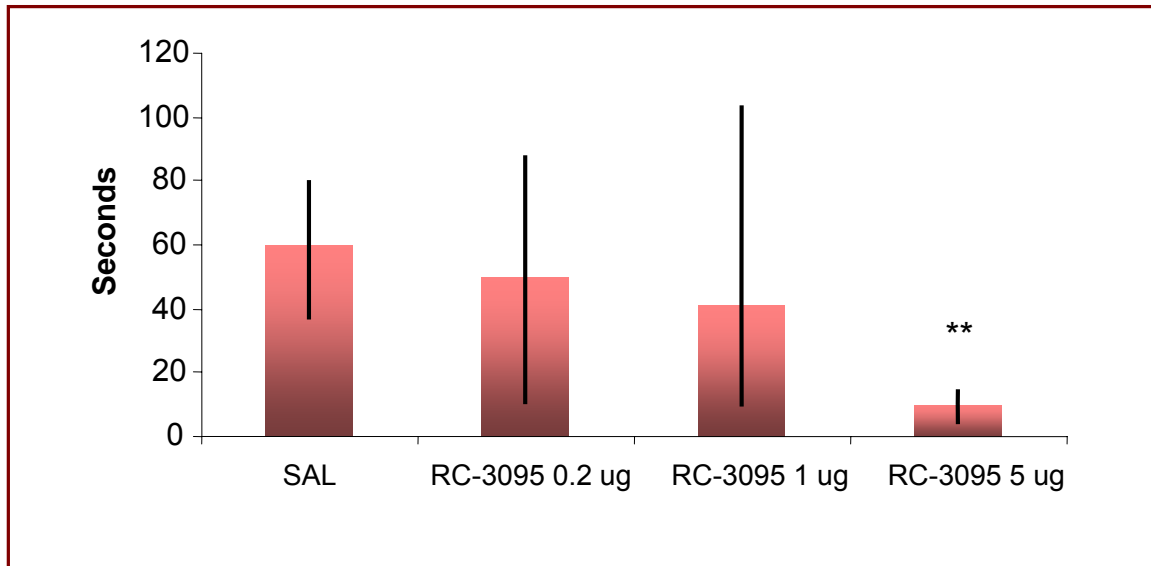


FIG. 3. Post-training blockade of bombesin/gastrin releasing peptide (GRP) receptors in the basolateral complex of the amygdala (BLA) impairs aversively motivated memory. Rats were given a bilateral 0.5 μ l micro-infusion of saline (SAL) or RC-3095 (0.2, 1.0 or 5.0 μ g/side) into the BLA immediately after training in a step-down inhibitory avoidance task. Data are median (interquartile ranges) retention test step-down latencies; $n = 9-12$ animals per group; ** $p < 0.01$ compared to the SAL-treated group.

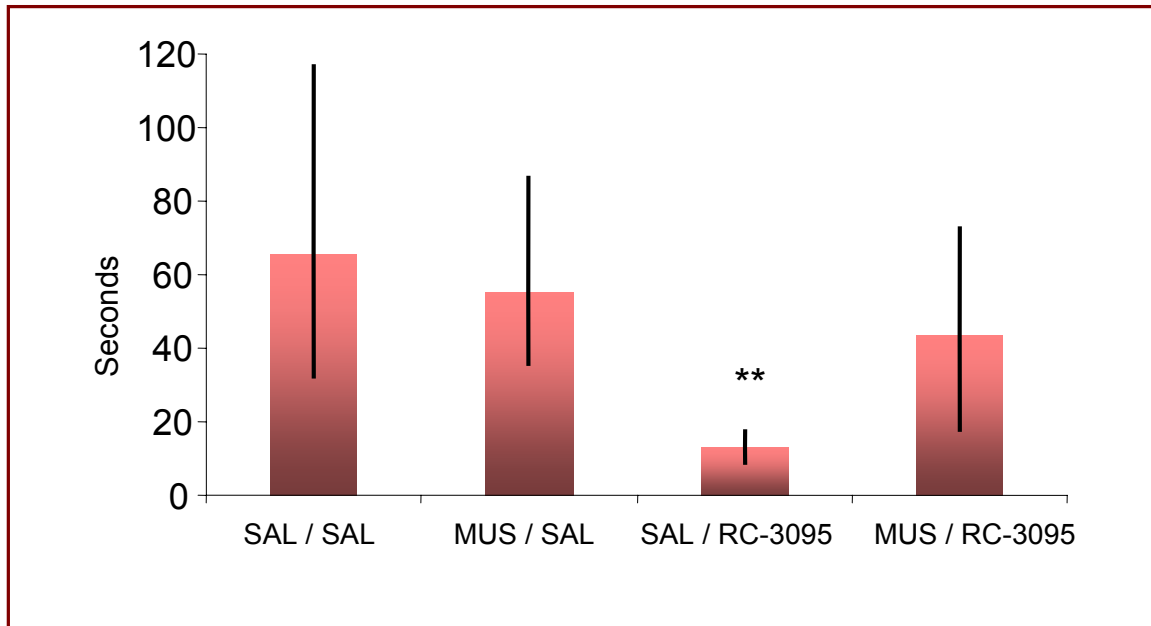


FIG. 4. Muscimol inactivation of the basolateral complex of the amygdala (BLA) blocks the memory-impairing effect of bombesin/gastrin-releasing peptide (GRP) receptor blockade. Rats were given a unilateral infusion of saline (SAL) or muscimol (MUS) (0.5 μ g) into the left BLA 5 min before training and an intraperitoneal (i.p.) injection of SAL or RC-3095 (1.0 mg/kg) immediately after training in a step-down inhibitory avoidance task. Data are median (interquartile ranges) retention test step-down latencies; $n = 9-11$ animals per group; ** $p < 0.01$ compared to the SAL-treated group.

TERCEIRA PARTE – Artigo 2

Jornal da Academia Nacional de Medicina, Vol. 163, n.1, pp. 7-12, 2005

Hippocampal gastrin-releasing peptide receptors are involved in fear-motivated memory but not in innate fear.

Daniela Lessa^a, Roberta Venturella^a, Gustavo Kellermann Reolon^b, Tatiana Luft^c, Rafael Roesler^{b,*}, Gilberto Schwartzmann^a

^a *Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas e Departamento de Medicina Interna, Universidade Federal do Rio Grande do Sul , 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil*

^b *Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90046-900 Porto Alegre, RS, Brazil*

^c *Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul , 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil*

Running title: GRP receptors and fear memory

*Corresponding author. Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmiento Leite, 500, Campus Central/UFRGS, 90046-900 Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: +55 51 3316 6069; Fax: +55 51 3316 6084.

E-mail address: rroesler@terra.com.br

1. Abstract

The bombesin/gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) has been implicated in memory and anxiety disorders. In the present study we evaluated the role of the GRPR in the dorsal hippocampus in formation of fear-motivated memory and innate fear. Adult male Wistar rats were given a bilateral microinfusion of saline or the GRPR antagonist (D-Tpi6, Leu13 psi[CH₂NH]-Leu14) bombesin (6-14) (RC-3095) (0.4 or 2.0 µg) into the dorsal hippocampus 5 min before they were trained in a continuous multiple trial inhibitory avoidance (CMIA) task. Retention was assessed 24 h after training. RC-3095 did not affect acquisition of the CMIA task. However, RC-3095 at the dose of 0.2 µg impaired retention test performance. Intrahippocampal infusion of RC-3095 did not affect innate fear and anxiety assessed in an elevated plus maze. The results suggest that the GRPR in the dorsal hippocampus is required for formation of fear-motivated memory but is not involved in modulating unlearned fear.

Keywords: RC-3095; Gastrin-releasing peptide; GRP receptor; Hippocampus; Neural plasticity; Anxiety; Memory

2. Introduction

Bombesin (BN)-like peptides such as the BN mammalian homologue, gastrin-releasing peptide (GRP), stimulate cell proliferation and display a range of neuroendocrine activities through activation of GRP receptors (GRPRs). The evidence that BN-like peptides also act as growth factors in the progression of human lung, pancreatic, prostatic, ovarian, and breast cancers as well as glioblastomas has led to the development of GRPRs antagonists such as (D-Tpi6, Leu13 psi[CH₂NH]-Leu14) bombesin (6-14) (RC-3095) as potential antitumor agents ^{3,22,32}.

The GRPR is distributed throughout the mammalian central nervous system (CNS). The hippocampus and the basolateral amygdala are limbic areas crucially involved in memory formation as well as psychiatric disorders and both areas contain a high density of GRPRs ¹⁸. GRPRs in limbic areas have been implicated in synaptic plasticity, memory formation, and neuropsychiatric disorders ^{18,24-28,31,35}. We have previously shown that infusion of the GRPR antagonist RC-3095 into the dorsal hippocampus or the basolateral amygdala impairs the consolidation of memory for single-trial aversive training ^{27,28}. In the present study we further investigated the role of GRPRs in fear-motivated memory and anxiety by evaluating the effects of intrahippocampal infusions of RC-3095 on formation of memory for aversive learning and plus maze behavior. A preliminary report of these findings was published in an abstract form ²⁶.

3. Materials and methods

Animals

The subjects were adult male Wistar rats (230-321 g) obtained from the Department of Biochemistry (UFRGS, Porto Alegre) breeding colony. Animals were housed five to a cage with food and water available *ad libitum*, and were maintained on a 12-hr light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m.). Behavioral procedures were conducted between 10:00 and 16:30. All experimental procedures were performed in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior (SBNeC) recommendations for animal care.

Surgery

Animals were implanted under thionembutal anesthesia (30 mg/kg, ip) with 9.0-mm guide cannulae aimed 1.0 mm above the CA1 area of the dorsal hippocampus as previously described²⁸. Coordinates (A – 4.3 mm, L \pm 3.0 mm from bregma, V -1.4 mm from dura) were obtained from the atlas of Paxinos and Watson²¹.

Behavioral procedures

Animals were submitted to the behavioral procedure at least 7 days after surgery. The inhibitory avoidance training apparatus was a 50 X 25 X 25-cm acrylic box (Albarsch, Porto Alegre) whose floor consisted of parallel caliber stainless steel bars (1 mm diameter) spaced 1 cm apart. A 7-cm wide, 2.5-cm high platform was placed on the floor of the box against the left wall. A continuous multiple-trial inhibitory avoidance (CMIA) training procedure modified from that described in previous studies^{1,29} was used. On the training day the rat was placed on the platform and its latency to step down to the grid floor was measured by an automatic device. As the animal stepped down on the grid, a low-intensity (0.2 mA) footshock was delivered for 2 s and the rat was placed back on the platform. Whenever the rat stepped down on the grid, shock was again delivered. The rat was retained in the apparatus until it remained on the platform continuously for 60 s, and then returned to its home cage. The total number of trials required to reach the acquisition criterion of 60 consecutive seconds on the platform was recorded. On the retention test trial 24 h after training, the rat was placed on the platform and the latency to step down on the grid (maximum 180 s) was recorded. No shock was delivered on the retention test trial.

The elevated plus-maze apparatus consisted of two open arms (50 x 10 cm) and two enclosed arms (50 x 10 x 40 cm) arranged in such a way that the two arms of each type were opposite to each other, and a central platform (5 x 5 cm). The maze's height was 50 cm and the tests were conducted under dim red light. Animals were allowed a 5-min exposure to red light in their own home cages before the testing procedure. Next, they were placed individually on the central platform of the plus-maze facing an open arm.

During a 5-min test period, the number of entries in the open and closed arms and the total number of arm entries were recorded.

Drugs and pharmacological procedures

Five min prior to behavioral training, an infusion cannula was fitted into the guide cannula. The tip of the infusion cannula protruded 1.0 mm beyond the guide cannula and was thus aimed at the CA1 area of the dorsal hippocampus. Through the infusion cannulae animals received a bilateral 1.0 μ l infusion of saline or RC-3095 (0.4 or 2.0 μ g) (Zentaris AG, Frankfurt, Germany) dissolved in saline. Saline or RC-3095 were infused during 1 min, and the infusion cannulae were left in place for an additional minute to allow diffusion of the drug away from the cannula tip²⁶.

Histology

Twenty-four to 48 h after the end of behavioral testing, animals were killed by decapitation and their brains were removed, stored in formalin for at least 72 hr and verified for infusion site placements in the dorsal hippocampus as described in previous reports²⁶.

Statistics

Comparisons among groups were performed using a one-way analysis of variance followed by a Fischer pos-hoc test if necessary. In all comparisons, $P < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

4. Results

Cannulae placement in the dorsal hippocampus was considered to be correct in 56 rats (data not shown). There was no significant difference among groups in the number of trials required to reach a 60 s criterion in CMIA training (Figure 1), indicating that the pretraining infusion of RC-3095 did not affect CMIA acquisition. RC-3095 at the dose of 0.4 μ g, but not at the dose of 2.0 μ g, impaired 24 h CMIA retention (Figure 2). Intrahippocampal infusion of RC-3095 did not affect the total number of arm entries (data

not shown) or the number of entries in open arms in an elevated plus maze (Figure 3). The results indicate that the GRPR in the dorsal hippocampus is required for retention, but not acquisition, of aversive training, but is not involved in innate fear and anxiety.

5. Discussion

Because the GRPR regulates several aspects of neural function and behavior and GRPR antagonists such as RC-3095 have been proposed as anticancer drugs^{3,22,32}, we have proposed that the investigation of the effects of GRPR antagonists on brain function might be clinically relevant. In addition, GRPR antagonists are useful pharmacological tools in research on the role of GRPRs in learning and memory²⁵⁻²⁸. The results of the present study suggest that the GRPR in the dorsal hippocampus is required for retention of memory for CMIA, but not for CMIA acquisition or anxiety assessed in a plus maze. We showed in previous reports that posttraining GRPR antagonism in the hippocampus or amygdala impairs consolidation of a single-trial inhibitory avoidance task^{27,28}, and systemic administration of RC-3095 blocks aversive memory without affecting memory of a nonaversive, nonspatial recognition memory task²⁵. The finding that the GRPR antagonist RC-3095 impairs fear memory is also consistent with a previous study showing that GRPR-deficient mice show altered amygdalar long-term potentiation and fear conditioning memory³¹, as well as with previous evidence that GRPR agonists enhances memory formation in rodents when injected peripherally^{4,30,34}. Together with the present findings, these results The present findings that intrahippocampal RC-3095 impairs fear motivated memory is consistent with the view that the GRPR system in limbic brain areas is a neuronal regulatory system specifically involved in modulating aversively motivated memory^{25,27,31}.

RC-3095 impaired CMIA retention at the dose of 0.4 μ g, whereas the dose of 2.0 μ g was ineffective. A number of studies evaluating the effects of injections of both memory-enhancing and memory-impairing drugs on memory show that many neuromodulatory treatments produce an inverted-U dose-response curve where specific doses are optimal whereas both lower and higher doses have no effect¹⁴. In addition, this dose-response pattern is consistent with our previous data using posttraining intrahippocampal or pre- or posttraining peripheral injections, where lower doses induced IA impairment while the higher dose used was ineffective^{25,27,28}.

Although intrahippocampal RC-3095 affected emotional memory, it had no effect on open arm entries in an elevated plus maze. Previous studies have implicated the hippocampus in modulating plus maze behavior ²⁰. Our results suggesting that hippocampal GRPRs modulate fear memory without affecting unlearned fear are consistent with the findings by Shumyatsky et al. ³¹ that GRPR-deficient mice show altered long-term fear memory but normal plus maze behavior.

It is possible that several intracellular signaling mechanisms are involved in the memory-impairing effects of intrahippocampal infusions of RC-3095. Secretion regulated by activation of the GRPR in a human neuroendocrine-like cell line has been shown to require phospholipase C (PLC)-mediated increase in intracellular free Ca^{2+} and activation of the protein kinase C (PKC) and mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) signaling pathways ⁶. In rat hippocampal neurons, GRP-induced membrane depolarization is blocked by a BN/GRP receptor antagonist and reduced by application of a PLC inhibitor ¹². Treatment with a GRP agonist induces PKC- and protein tyrosine kinase-dependent expression of c-jun and jun-B in human gastric cancer SIIA cells, an effect that is blocked by GRPR antagonists ¹¹. In HuTu 80 duodenal cancer cells, activation of GRPRs stimulates a cAMP-mediated element binding protein (CREB) phosphorylation through a PKC-dependent pathway ²³. Extensive evidence indicates that activation of PLC and the PKC and MAPK/ERK pathways, as well as CREB phosphorylation after training, are required for the consolidation of aversively motivated memory in the rat dorsal hippocampus ^{9,10,15,16,33}. Thus, it is possible that blockade of GRPRs receptors by RC-3095 affects several protein kinase signaling pathways crucially involved in memory formation in the hippocampus.

In addition to regulating normal neural function, GRPRs receptors might also play a role in neurodegenerative and neuropsychiatric disorders. It is possible that alterations in the GRPR system are involved in Parkinson's disease ², schizophrenia ^{5,19}, as well as in the cognitive deficits associated with Alzheimer disease ⁸. In addition, the GRPR is a candidate gene in autism ^{7,13}, and we have recently proposed that the GRPR should be considered as a novel therapeutic target in anxiety disorders ²⁴ and schizophrenia ¹⁷. The investigation of the effects of GRPR antagonists in animal models of neural function might help to clarify the possible involvement of the GRPR in brain disease.

Acknowledgements

This research was supported by the South American Office for Anticancer Drug Development, CNPq-MCT-Brazil, and Zentaris GmbH, Frankfurt, Germany. Authors thank Dr. Ivan Izquierdo for his support.

6. References

1. Bianchin MM, Spanis CW, Roesler R, McGaugh JL, Izquierdo I. (+/-)-Alpha-methyl-4-carboxyphenylglycine, a metabotropic glutamate receptor blocker, impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats when infused into the basolateral nucleus of the amygdala. *Brain Res.* 2000;852:436-43.
2. Bissette G, Nemeroff CB, Decker MW, Kizer JS, Agid Y, Javiv-Agid F. Alterations in regional brain concentrations of neurotensin and bombesin in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1985;17:324-8.
3. Chatzistamou I, Schally AV, Szepeshazi K, Groot K, Hebert F, Arencibia JM. Inhibition of growth of ES-2 human ovarian cancers by bombesin antagonist RC-3095, and luteinizing hormone-releasing hormone antagonist Cetrorelix. *Cancer Lett.* 2001;171:37-45.
4. Flood JF, Morley JE. Effects of bombesin and gastrin-releasing peptide on memory processing. *Brain Res.* 1988;460:314-22.
5. Gerner RH, van Kammen DP, Ninan PT. Cerebrospinal fluid cholecystikinin, bombesin and somatostatin in schizophrenia and normals. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 1985;9:73-82.
6. Hellmich MR, Ives KL, udupi V, Soloff MS, Greeley GH Jr, Christensen BN, Townsend CM Jr. Multiple protein kinase pathways are involved in gastrin-releasing peptide receptor-regulated secretion. *J Biol Chem.* 1999;274:23901-9.
7. Ishikawa-Brush Y, Powell JF, Bolton P, Miller AP, Francis F, Willard HF, Lehrach H, Monaco AP. Autism and multiple exostoses associated with an X;8 translocation occurring within the GRPR gene and 3' to the SDC2 gene. *Hum Mol Genet.* 1997;6:1241-50.

8. Ito E, Oka K, Etcheberrigaray R, Nelson TJ, McPhie DL, Tofel-Grehl B, Gibson GE, Alkon DL. Internal Ca^{2+} mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:534-8.
9. Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem*. 1997;68:285-316.
10. Izquierdo I, Quevedo J, Izquierdo LA, Vianna MRM, Szapiro G, Barros DM, Roesler R, Alonso M, Walz R, Medina, J.H. What can go wrong when memory fails: The main biochemical events underlying consolidation and retrieval in rats. In: Palomo T, Beninger RJ, Archer T, editors. *Neurodegenerative Brain Disorders*. Madrid: Fundacion Cerebro y Mente 2000. p. 131-151.
11. Kim HJ, Evers BM, Litvak DA, Hellmich MR, Townsend CM Jr. Signaling mechanisms regulating bombesin-mediated AP-1 gene induction in the human gastric cancer SIIA. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;279:C326-34.
12. Lee K, Dixon AK, Gonzalez I, Stevens EB, McNulty S, Oles R, Richardson PJ, Pinnock RD, Singh L. Bombesin-like peptides depolarize rat hippocampal interneurons through interaction with subtype 2 bombesin receptors. *J Physiol*. 1999;518:791-802.
13. Marui T, Hashimoto O, Nanba E, Kato C, Tochigi M, Umekage T, Kato N, Sasaki T. Gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) locus in Japanese subjects with autism. *Brain Dev*. 2004;26:5-7.
14. McGaugh JL. Dissociating learning and performance: Drug and hormone enhancement of memory storage. *Brain Res Bull*. 1989;23:339-45.
15. McGaugh JL. Memory - a century of consolidation. *Science*. 2000;287:248-51.

16. McGaugh JL, Izquierdo I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. *Trends Pharmacol Sci* 2000;21:208-10.
17. Meller CA, Henriques JA, Schwartzmann G, Roesler R. The bombesin/gastrin releasing peptide receptor antagonist RC-3095 blocks apomorphine but not MK-801-induced stereotypy in mice. *Peptides*. 2004;25:585-8.
18. Moody TW, Merali Z. Bombesin-like peptides and associated receptors within the brain: distribution and behavioral implications. *Peptides*. 2004;25:511-20.
19. Olincy A, Leonard S, Young DA, Sullivan B, Freedman R. Decreased bombesin peptide response to cigarette smoking in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 1999;20:52-59.
20. Ouagazzal AM, Kenny PJ, File SE. Modulation of behaviour on trials 1 and 2 in the elevated plus-maze test of anxiety after systemic and hippocampal administration of nicotine. *Psychopharmacology (Berl)*. 1999;144:54-60.
21. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, San Diego: Academic Press; 1997.
22. Qin Y, Ertl T, Cai RZ, Halmos G, Schally AV. Inhibitory effect of bombesin receptor antagonist RC-3095 on the growth of human pancreatic cancer cells in vivo and in vitro. *Cancer Res*. 1994;54:1035-41.
23. Qu X, Xiao D, Weber HC. Human gastrin-releasing peptide receptor mediates sustained CREB phosphorylation and transactivation in HuTu 80 duodenal cancer cells. *FEBS Lett*. 2002;527:109-13.
24. Roesler R, Henriques JAP, Schwartzmann G. Neuropeptides and anxiety disorders: bombesin receptors as novel therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25:241-2.

25. Roesler R, Kopschina MI, Rosa RM, Henriques JA, Souza DO, Schwartzmann G. RC-3095, a bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist, impairs aversive but not recognition memory in rats. *Eur J Pharmacol.* 2004;486:35-41.
26. Roesler R, Lessa D, Venturella R, Luft T, Henriques JAP, Schwartzmann G. Hippocampal bombesin/gastrin-releasing peptide receptors are involved in fear-motivated memory but not in innate fear. *FENS. Abstr.* 2004;2:A115-14.
27. Roesler R, Lessa D, Venturella R, Vianna MR, Luft T, Henriques JA, Izquierdo I, Schwartzmann G. Bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in the basolateral amygdala regulate memory consolidation. *Eur J Neurosci.* 2004;19:1041-5.
28. Roesler R, Meller CA, Kopschina MI, Souza DO, Henriques JA, Schwartzmann G. Intrahippocampal infusion of the bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 impairs inhibitory avoidance retention. *Peptides.* 2003;24:1069-74.
29. Roozendaal B, Carmi O, McGaugh JL. Adrenocortical suppression blocks the memory-enhancing effects of amphetamine and epinephrine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:1429-33.
30. Santo-Yamada Y, Yamada K, Wada K. Post-training administration of gastrin-releasing peptide (GRP) improves memory loss in scopolamine- and hypoxia-induced amnesic mice. *Physiol Behav.* 2001;74:139-43.
31. Shumyatsky GP, Tsvetkov E, Malleret G, Vronskaya S, Hatton M, Hampton L, Battey JF, Dulac C, Kandel ER, Bolshakov EY. Identification of a signaling network in lateral nucleus of amygdala important for inhibiting memory specifically related to learned fear. *Cell.* 2002;111:905-18.
32. Szepeshazi K, Schally AV, Halmos G, Lamharzi N, Groot K, Horvath JE. A single in vivo administration of bombesin antagonist RC-3095 reduces the levels and mRNA expression of epidermal growth factor receptors in MXT mouse mammary cancers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:10913-18.

33. Walz R, Roesler R, Quevedo J, Sant'Anna M, Madruga M, Rodrigues C, Gottfried C, Medina JH, Izquierdo I. Time-dependent impairment of inhibitory avoidance retention in rat by posttraining infusion of a mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor into cortical and limbic structures. *Neurobiol Learn Mem.* 2000;73:1-11.
34. Williams CL, McGaugh JL. Enhancement of memory processing in an inhibitory avoidance and radial maze task by post-training infusion of bombesin into the nucleus tractus solitarius. *Brain Res.* 1994;654:251-6.
35. Yamada K, Santo-Yamada Y, Wada E, Wada K. Role of bombesin (BN)-like peptides/receptors in emotional behavior by comparison of three strains of BN-like peptide receptor knockout mice. *Mol Psychiatry* 2002;7:113-7.

7. Figures

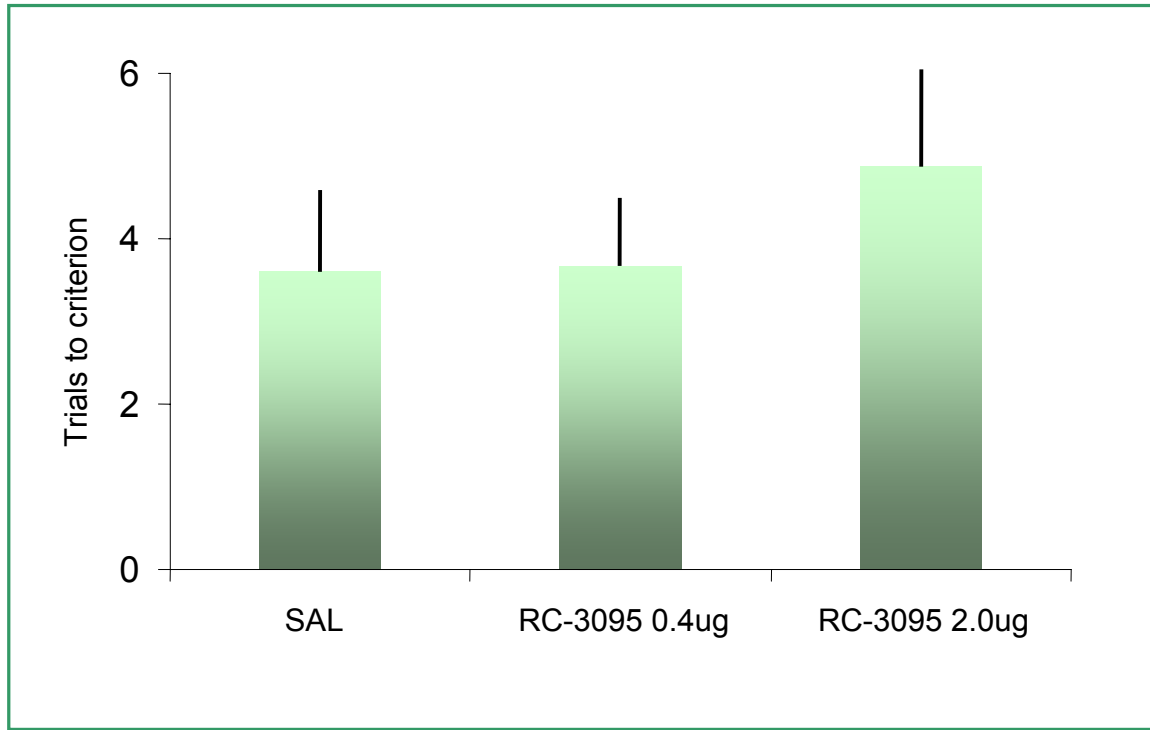


Figure 1. Pretraining intrahippocampal infusion of the GRPR antagonist RC-3095 does not affect acquisition of an aversively motivated task. Bars represent mean+SEM number of trials required to reach acquisition criterion in a continuous multiple trial inhibitory avoidance task. Animals were given a bilateral intrahippocampal 1.0 μ l infusion of saline or RC-3095 (0.4 or 2.0 μ g) 5 min before behavioral training. $N = 7-10$ animals per group. There was no significant difference among groups ($P = 0.70$).

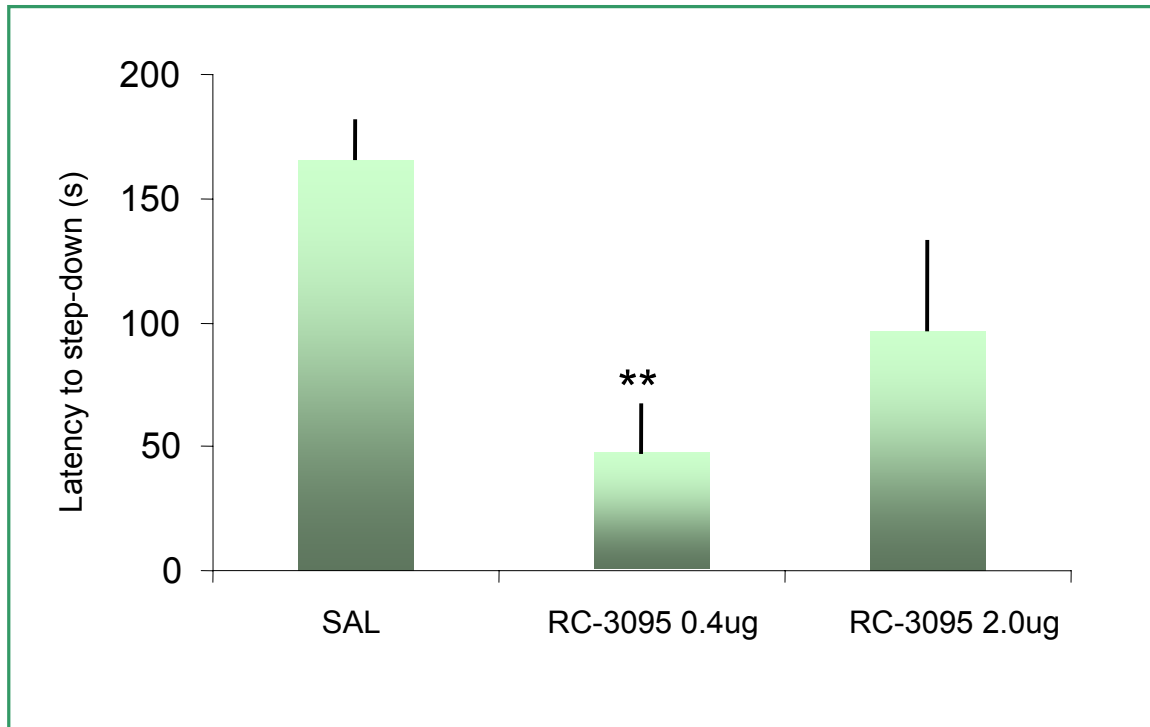


Figure 2. Pretraining intrahippocampal infusion of the GRPR antagonist RC-3095 impairs 24 h retention of aversively motivated training. Bars represent mean+SEM retention test latency to step-down (s) in a continuous multiple trial inhibitory avoidance task. Animals were given a bilateral intrahippocampal 1.0 μ l infusion of saline or RC-3095 (0.4 or 2.0 μ g) 5 min before behavioral training. $N = 7-10$ animals per group; **significant difference from the saline-treated group, $P < 0.01$).

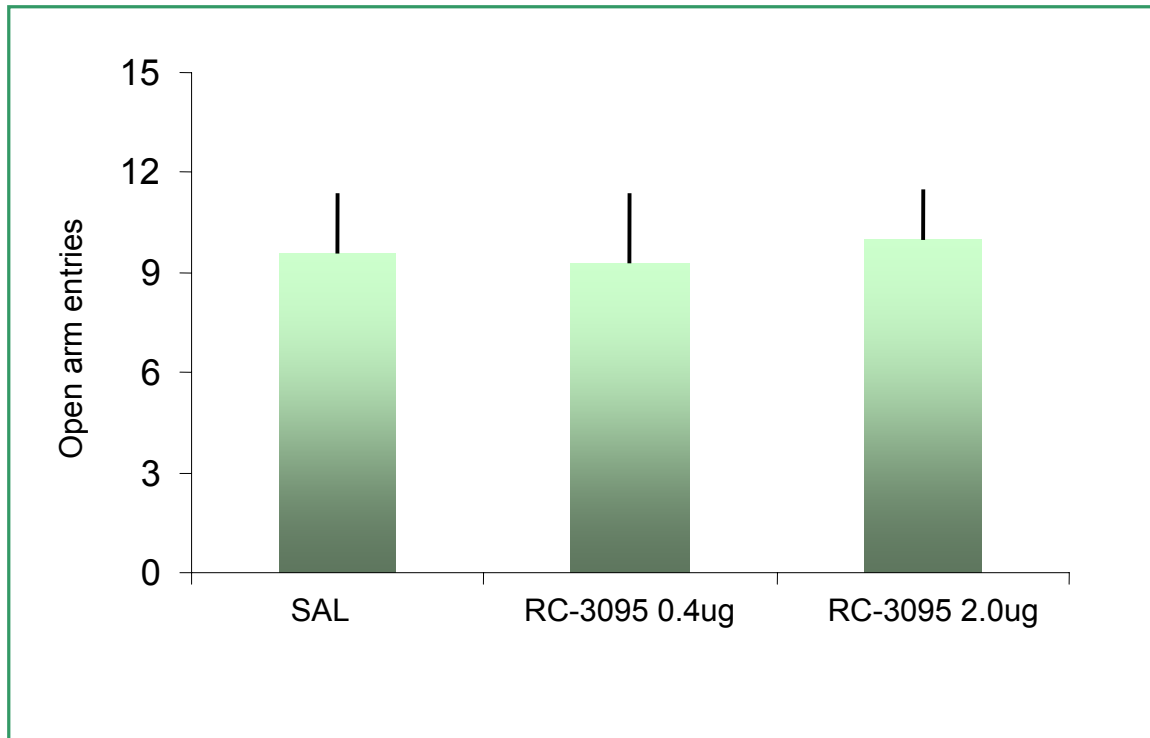


Figure 3. Pretraining intrahippocampal infusion of the GRPR antagonist RC-3095 does not affect anxiety assessed in an elevated plus maze. Bars represent mean+SEM number of open arm entries. Animals were given a bilateral intrahippocampal 1.0 μ l infusion of saline or RC-3095 (0.4 or 2.0 μ g) 5 min before behavioral training. $N = 10$ -11 animals per group. There were no significant differences among groups ($P = 0.96$).

QUARTA PARTE – Artigo 1
Tradução para a língua portuguesa

Receptores da bombesina / peptídeo liberador de gastrina na amígdala basolateral regulam a consolidação da memória

Rafael Roesler ^{1,2}, Daniela Lessa ³, Roberta Venturella ³, Mônica R.M. Vianna ⁴, Tatiana Luft ⁴, João Antônio Pegas Henriques ², Ivan Izquierdo ⁴ and Gilberto Schwartzmann ³

¹Laboratório de Neurofarmacologia pré-clínica, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90046-900 Porto Alegre, RS, Brasil

²Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brasil ³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas e Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil

⁴Centro de Memória, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 900035-003, Porto Alegre, RS, Brasil

Palavras chave: modulação da memória, neuropeptídeos, rato, RC-3095

1. Resumo

Vários receptores e sistemas de sinalização intracelular regulam a formação da memória na amígdala basolateral (ABL). No presente estudo, demonstramos que os receptores da bombesina / peptídeo liberador de gastrina (GRP) na ABL estão envolvidos na consolidação da memória emocional. Ratos machos adultos foram treinados em tarefa de esQUIVA inibitória de treino único e testados para retenção 24 horas após. A injeção pós-treino do antagonista de receptores bombesina / GRP (D-Tpi6, Leu13 psi[CH₂NH]-Leu14) bombesina (6-14) (RC-3095) reduziu a retenção da memória. Em ratos com cânulas implantadas sob anestesia com tionembutal na ABL, a infusão bilateral pós-treino de RC-3095 na ABL diminuiu a retenção de maneira dose-dependente. A inativação

pré-treino unilateral da ABL com muscimol bloqueou o efeito de redução da memória decorrente da administração sistêmica pós-treino de RC-3095. Os resultados sugerem que os receptores bombesina / GRP na ABL estão envolvidos na consolidação da memória aversiva, e que a ABL medeia o efeito de redução da memória do bloqueio sistêmico do receptor bombesina / GRP.

2. Introdução

Extensas evidências demonstram que o complexo basolateral da amígdala [(BLA) consistindo dos núcleos basal, lateral e acessório basal] está criticamente envolvido na mediação da modulação dos efeitos de drogas e hormônios na formação da memória influenciada emocionalmente (para revisões, ver McGaugh *et al.*, 1996, McGaugh & Izquierdo, 2000; McGaugh, 2000; McIntyre *et al.*, 2003). A ativação de vários sistemas de receptores na ABL é necessária para que um contexto emocional influencie a formação da memória. Assim, drogas que agem em diferentes receptores de neurotransmissores afetam a consolidação da memória quando administrados diretamente na ABL, e tanto lesões excitotóxicas quanto a inibição farmacológica da ABL bloqueiam as ações de drogas atuantes em diversos sistemas neurotransmissores e de hormônios relacionados ao estresse na consolidação da memória (para revisões, ver McGaugh *et al.*, 1996; McGaugh, 2000).

Os peptídeos similares à bombesina, como o homólogo mamífero da bombesina, o peptídeo liberador de gastrina (GRP), estão distribuídos no SNC dos mamíferos, e a amígdala contém uma alta densidade de receptores bombesina / GRP (Moody *et al.*, 1978; Pert *et al.*, 1980; Wolf & Moody, 1985; Zarbin *et al.*, 1985; Hollingsworth, 1989). Os peptídeos similares à bombesina estimulam a proliferação celular, demonstram uma variedade de atividades neuroendócrinas e regulam vários aspectos da função do SNC, incluindo fome, saciedade (McCoy & Avery, 1990; Morley *et al.*, 1992), nocicepção, locomoção (Pert *et al.*, 1980), aversão, recompensa, ansiedade (Yamada *et al.*, 2002), assim como aprendizado e memória (Flood & Morley, 1988; Morley *et al.*, 1992; Williams & McGaugh, 1994; Rashidy-Pour & Razvani, 1998; Santo-Yamada *et al.*, 2001). A administração de peptídeos similares à bombesina nos neurônios hipocámpais de ratos produz despolarização de membrana (Lee *et al.*, 1999). As respostas intracelulares à

ativação dos receptores bombesina / GRP envolvem vias de sinalização de proteínas-quinases (Hellmich *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000) que também estão envolvidas na plasticidade sináptica e formação de memória (para revisões, ver Izquierdo & Medina, 1997; Izquierdo *et al.*, 2000; McGaugh & Izquierdo, 2000). Estudos prévios utilizando injeções periféricas de agonistas da bombesina em roedores demonstraram que agonistas da bombesina / GRP facilitam a formação da memória (Flood & Morley, 1988; Morley *et al.*, 1992; Rashidy-Pour & Razvani, 1988; Santo-Yamada *et al.*, 2001), enquanto que injeções periféricas de antagonistas dos receptores bombesina / GRP em camundongos (Santo-Yamada *et al.*, 2003), ou a infusão intra-hipocampal pós-treino de antagonista bombesina / GRP em ratos (Roesler *et al.*, 2003), reduz a memória motivada aversivamente.

A observação de que a inativação reversível da amígdala atenua os efeitos facilitadores da administração periférica da bombesina (Rashidy-Pour & Razvani, 1988) sugerem claramente que a ABL está envolvida na mediação dos efeitos facilitadores de memória da ativação do receptor bombesina / GRP. Entretanto, ainda não há estudos determinando se a ativação do receptor bombesina / GRP na ABL é necessário para a formação da memória relacionada à emoção e se a ABL medeia os efeitos de redução da memória do bloqueio do receptor bombesina / GRP. No presente estudo, investigamos o envolvimento da ABL na mediação das ações regulatórias dos receptores da bombesina / GRP na consolidação da memória no treino aversivo.

3. Materiais e Métodos

Sujeitos

Ratos Wistar machos adultos (220-325g) obtidos do biotério do Departamento de Bioquímica (UFRGS, Porto Alegre) foram mantidos em grupos de cinco ratos por caixa, com água e comida disponíveis *ad libitum*, com ciclo claro-escuro de 12 horas (ciclo claro iniciando às 7h). Os procedimentos comportamentais foram conduzidos entre 10 e 16:30h. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o *NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* e as recomendações de cuidado animal da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC).

Cirurgia

Os animais que receberam infusões intra-amigdalinas (segundo e terceiro experimento) foram anestesiados com tionembotal (30 mg/kg, i.p.) para a implantação de cânulas bilaterais de 9.0-mm de comprimento, a 1.0 mm acima da ABL, conforme descrito previamente (Roesler *et al.*, 2000a,b). As coordenadas estereotáxicas (A – 2,3 mm, L \pm 5 mm do bregma, V – 6,0 mm da dura) foram obtidas do atlas de Paxinos & Watson (1997) e ajustadas de acordo com estudos prévios e piloto.

Procedimentos Comportamentais

Os animais foram submetidos aos procedimentos comportamentais (treino e testes de retenção na tarefa de esquiva inibitória) no mínimo sete dias após a cirurgia. O aparato e procedimentos de esquiva inibitória foram descritos em relatos prévios (Roesler *et al.*, 2000a,b, 2003; Waltz *et al.*, 2000). Concisamente, o aparato de treino consiste de uma caixa de acrílico de 50 x 25 x 25cm (Albarsch, Porto Alegre, Brasil), cuja base apresenta barras de aço paralelas (1 mm de diâmetro), com espaçamento de 1 cm entre elas. Uma plataforma de 7 cm de comprimento e 2,5 cm de altura é colocada na base da caixa e junto à parede esquerda da caixa. No treino, os animais foram posicionados na plataforma e suas latências de descida para a grade com as quatro patas foram medidas por um dispositivo automático. Imediatamente à descida para a grade, os animais receberam um choque de 0,4 mA por 2 segundos. O teste de retenção foi realizado 24 horas após o treino. O teste de retenção foi um procedimento quase idêntico ao treino, exceto por não ser aplicado o choque. A latência para a descida no teste de retenção (máximo de 180 segundos) foi usada como medida de retenção da esquiva inibitória (EI).

Drogas e administração

No primeiro experimento, os animais receberam uma injeção i.p. de salina (NaCl 0,9%) ou do antagonista dos receptores bombesina / GRP (D-Tpi6,Leu13 psi[CH₂NH]-Leu14) bombesin (6-14) (RC-3095; Zentaris AG, Frankfurt, Alemanha) (0,2, 1,0 ou 5,0 mg/kg em um volume de injeção de 1 mL/kg) imediatamente após o treino de esquiva inibitória. Foram utilizados animais não operados neste experimento.

No segundo experimento, os animais com cânulas bilaterais implantadas na ABL receberam uma infusão pós-treino de salina ou RC-3095 na ABL. Imediatamente após o treino de esQUIVA inibitória, uma cânula para infusão foi inserida dentro da cânula guia. A ponta da cânula de infusão protruiu 1,0 mm além da cânula guia e assim alvejou a ABL (Roesler *et al.*, 2000a,b). Através das cânulas de infusão os animais receberam 0,5 µL de salina ou RC-3095 (0,2, 1,0 ou 5,0 µg de cada lado) dissolvidos em salina (Roesler *et al.*, 2003). Salina ou RC-3095 foram infundidos durante 1 minuto, e a cânula de infusão permaneceu *in loco* por um minuto adicional para permitir a difusão da droga através da ponta da cânula.

No terceiro experimento, avaliamos a memória da esQUIVA inibitória em ratos que foram submetidos à inativação farmacológica unilateral reversível da ABL no pré-treino, seguido de injeção periférica pós-treino de salina ou RC-3095. Os animais receberam infusão unilateral de salina ou do agonista do receptor ácido gama-aminobutírico tipo A (GABA_A) muscimol (0,5 µg em 0,5 µL) (Research Biochemicals International, Natick, MA, USA) na ABL 5 minutos antes do treino de esQUIVA inibitória, e uma injeção i.p. de RC-3095 (1,0 mg/kg) imediatamente após o treino. Assim, os quatro grupos experimentais resultantes (infusão intra-ABL pré-treino / injeção i.p. pós-treino) foram: salina / salina; muscimol / salina; salina / RC-3095; e muscimol / RC-3095. A dose do RC-3095 para este experimento foi escolhida com base nos resultados do primeiro experimento (ver Resultados). Assim como no segundo experimento, os animais utilizados neste experimento tiveram implantadas cânulas bilateralmente na ABL; entretanto, somente as cânulas esquerdas foram utilizadas para as infusões. As cânulas direitas não foram utilizadas. Experimentos pilotos indicam que enquanto infusões bilaterais de muscimol ou infusões unilaterais de muscimol na ABL direita diminuem a retenção da esQUIVA inibitória, infusões unilaterais de muscimol na ABL esquerda não afetam a retenção, mas bloqueiam o efeito de injeções sistêmicas de RC-3095. Este efeito da inativação unilateral esquerda da ABL é consistente com relatos prévios (Coleman-Mesches & McGaugh, 1995; Rashidy-Pour & Razvani, 1998). Desta maneira, somente infusões unilaterais de muscimol na ABL esquerda foram utilizadas no presente estudo.

Histologia

A verificação *post mortem* da localização das cânulas nos animais operados foi realizada conforme previamente descrito (Roesler *et al.*, 2000a,b). Os animais foram mortos por decapitação e uma infusão de 0,5 µL de 4% de azul de metileno em salina foi infundida através das cânulas. Os cérebros foram removidos e armazenados em formalina por no mínimo 72 horas antes que o posicionamento das cânulas fosse verificado por exame histológico. Somente os dados dos animais com as cânulas posicionadas corretamente (dentro de 1 mm³ do sítio alvo; 119 animais) foram incluídos na análise final (Fig. 1).

Estatísticas

As comparações das latências dos treinos e testes de retenção entre os grupos foi realizada com a análise de variância de Kruskal-Wallis seguida por testes-U de Mann-Whitney, bicaudais, quando necessário. As comparações entre a performance nos treinos e testes de retenção dentro do mesmo grupo foram realizadas pelos testes de Wilcoxon (Roesler *et al.*, 2000a,b,2003; Walz *et al.*,2000). Em todas as comparações, $p < 0,05$ foi considerado para indicar significância estatística.

4. Resultados

Não houve diferença significativa entre os grupos nas latências para descida nos treinos [$p = 0,97$ em comparação entre todos os 12 grupos; a mediana (intervalo interquartil) das latências de descida nos treinos foi de 9,50 segundos (6,00/12,95)].

A administração sistêmica pós-treino de RC-3095 diminuiu a retenção da esquiva inibitória nas doses de 0,2 ou 1,0 mg/kg, mas não na dose de 5,0 mg/kg (Fig. 2), sugerindo que os receptores bombesina / GRP estão envolvidos na consolidação da memória aversiva. Quando infundido diretamente na ABL, o RC-3095 de maneira dose-dependente diminuiu a memória de esquiva inibitória (Fig. 3). Os animais que receberam RC-3095 na dose de 5,0 µg, mas não nas doses de 0,2 ou 1,0 µg, mostraram diminuição da memória no teste de retenção quando comparados aos que receberam salina. Este

resultado sugere que a ativação do receptor da bombesina / GRP na ABL é necessária para a consolidação da memória aversiva.

Os resultados do terceiro experimento são mostrados na Fig. 4. A inativação pré-treino com muscimol da ABL esquerda não afetou a retenção da esQUIVA inibitória, mas bloqueou o efeito de diminuição da memória causado pela administração sistêmica do RC-3095. Os animais tratados com uma infusão pré-treino de salina na ABL seguidos de uma injeção pós-treino sistêmica de RC-3095 (1,0 mg/kg) mostraram diminuição da retenção, enquanto que todos os outros três grupos experimentais mostraram retenção normal. Este achado demonstra que é essencial que a ABL esteja funcionando para mediar os efeitos de redução de memória ocasionados pelo antagonista dos receptores da bombesina / GRP.

5. Discussão

No presente estudo investigamos o papel da ABL na mediação dos efeitos inibitórios do bloqueio do receptor da bombesina / GRP na consolidação da memória aversivamente motivada. O uso de injeções pós-treino de RC-3095 em nosso estudo exclui a possibilidade de que o tratamento com a droga altere a performance na retenção da memória por influências nas funções sensorio-motoras, ansiedade, medo, locomoção ou atenção durante a aquisição (McGaugh, 1989). Além disso, demonstramos previamente (Roesler *et al.*, 2003) que as ações de redução da memória do RC-3095 são dependentes do tempo da infusão e não relacionadas à inibição comportamental ou a dano neuronal.

A administração pós-treino sistêmica do antagonista dos receptores bombesina / GRP RC-3095 reduziu a memória de esQUIVA inibitória em ratos nas duas doses mais baixas utilizadas, enquanto que a dose mais alta não causou efeito. Este padrão de dose-resposta é consistente com os efeitos de infusões intra-hipocâmpais do RC-3095 (Roesler *et al.*, 2003). Vários estudos avaliando os efeitos de injeções de drogas que aumentam (McGaugh, 1989) ou diminuem a memória (Packard & Teather, 1997) mostram que muitos tratamentos produzem uma curva dose-resposta em U invertido, com doses intermediárias ótimas, e as doses mais baixas e as mais altas inefetivas. Este resultado demonstra que os receptores da bombesina / GRP estão envolvidos na consolidação da

memória aversiva, o que é consistente com os estudos prévios relatando efeitos facilitatórios na memória de roedores quando administrados agonistas da bombesina / GRP sistemicamente (Flood & Morley, 1988; Morley *et al.*, 1992; Rashidy-Pour & Razvani, 1988; Santo-Yamada *et al.*, 2001).

O RC-3095 também inibiu a memória da esQUIVA inibitória quando infundido diretamente na ABL após o treino, demonstrando que a ativação do receptor da bombesina / GRP na ABL é necessário para a consolidação da memória. Além disso, a inativação reversível unilateral da ABL bloqueou o efeito de redução da memória associado à administração sistêmica do RC-3095, sugerindo claramente que a ABL medeia os efeitos de redução da memória causados pelo bloqueio de receptores bombesina / GRP. Uma série de estudos prévios demonstrou que infusões de antagonistas de diferentes receptores na ABL reduzem a memória de esQUIVA inibitória. Mais, tanto lesões quanto inativações funcionais da ABL podem prevenir os efeitos facilitadores ou inibidores da memória secundários a ações de drogas em diversos sistemas neurotransmissores. Foi demonstrado que os sistemas beta-adrenérgico, glutamatérgico, glicocorticóide, colinérgico, opióide e GABAérgico na ABL regulam a formação da memória para esQUIVA inibitória (para revisões, ver McGaugh *et al.*, 1996; McGaugh, 2000). Os resultados presentes ampliam as evidências demonstrando que a ABL modula a consolidação também através da ativação do sistema do receptor bombesina / GRP.

Apesar de evidências prévias terem implicado a amígdala nos efeitos facilitadores de memória pela administração sistêmica de bombesina (Rashidy-Pour & Razvani, 1998), o papel dos receptores da bombesina / GRP na amígdala na modulação da memória não foram ainda elucidados. Um relato recente (Shumyatsky *et al.*, 2002) sugeriu que os receptores bombesina / GRP no núcleo lateral da amígdala operem como sistema de retroalimentação negativa especificamente envolvido na inibição da memória relacionada ao medo. Mais, o antagonismo da bombesina aumenta a potenciação de longo-prazo na amígdala lateral de camundongos, e camundongos receptor GRP-deficientes mostram tanto aumento da potenciação de longo-prazo na amígdala quanto aumento da memória ao medo. Consistente com um papel inibitório da via de sinalização da bombesina / GRP na amígdala na memória emocional, Shumyatsky *et al.* (2002) também encontrou que os receptores GRP são expressos preferencialmente em interneurônios GABAérgicos no

núcleo lateral da amígdala e contribuem para a transmissão inibitória GABAérgica. Em contraste, nossos achados demonstram que a inibição dos receptores bombesina / GRP na amígdala diminuem a memória motivada pelo medo, sugerindo que a ativação deste sistema de receptores na ABL permite a consolidação da memória, o que é consistente com as extensas evidências de que injeções de bombesina ou GRP aumentam a memória. É necessário prosseguir com pesquisas para compreender as discrepâncias entre nossos achados e os de Shumyatsky *et al* (2002). Em nosso conhecimento, no presente estudo temos a primeira demonstração de que os receptores da bombesina / GRP na ABL são necessários para a consolidação da memória e que a ABL medeia os efeitos da administração sistêmica de antagonistas da bombesina / GRP.

Possíveis mecanismos de sinalização subjacentes ao efeito inibidor de memória do bloqueio de receptores da bombesina / GRP

É necessário seguir com pesquisas para clarear os mecanismos de sinalização intracelular subjacentes aos efeitos de inibição de memória do RC-3095. Estudos utilizando diferentes tipos celulares sugerem um papel para as vias de sinalização da proteína-quinase C (PKC) e proteína quinase mitogênio-ativada / proteína quinase extracelular sinal-regulada na transdução de sinais de eventos iniciados pela ativação do receptor bombesina / GRP. Por exemplo, em linhagens de células humanas neuroendócrinas, a secreção regulada pela ativação dos receptores bombesina / GRP demonstrou necessitar de um aumento do cálcio intracelular livre mediado pela fosfolipase C e ativação das cascatas da PKC e proteína quinase mitogênio-ativada (Hellmich *et al.*, 1999). Em neurônios hipocámpais, a despolarização de membrana induzida pelo GRP é bloqueada pelo antagonista do receptor bombesina / GRP e reduzida pela aplicação de inibidor da fosfolipase C (Lee *et al.*, 1999). A bombesina induz a expressão proteína tirosino-quinase-dependente de c-jun e jun-B em células humanas SIIA de câncer gástrico, um efeito que é bloqueado por antagonistas dos receptores bombesina / GRP (Kim *et al.*, 2000). Em células HuTu 80 de carcinoma de duodeno, a ativação dos receptores GRP estimula a fosforilação sustentada da proteína ligante ao elemento responsivo monofosfato adenilcíclico através de via PKC-dependente (Qu *et al.*, 2002). Devido a tanto as vias da PKC quanto da proteína-quinase mitogênio ativada / proteína-quinase regulada por sinal extracelular na amígdala estarem envolvidas na modulação da consolidação da memória aversiva (Bianchin *et al.*, 1999; Walz *et al.*, 1999,

2000; Izquierdo *et al.*, 2000), é possível que a inibição destas vias pelo bloqueio do receptor da bombesina / GRP na ABL esteja envolvida nos efeitos inibitórios do RC-3095. Consistente com a hipótese de que a via da PKC medeia a ação modulatória da memória dos receptores da bombesina na amígdala, observamos recentemente (Roesler *et al.*, resultados não publicados) que o efeito de diminuição da memória do RC-3095 intra-ABL pós-treino é potencializado pela co-infusão de um inibidor da PKC.

Implicações Clínicas: possível envolvimento dos receptores bombesina / GRP em doenças neurodegenerativas

Além da regulação da função neural normal, os peptídeos similares à bombesina e receptores bombesina / GRP podem também desempenhar papel em distúrbios neurodegenerativos e neuropsiquiátricos. É possível que alterações no sistema de receptor da bombesina / GRP esteja envolvido na Doença de Parkinson (Bissette *et al.*, 1985), esquizofrenia (Gerner *et al.*, 1985; Olincy *et al.*, 1999), autismo (Ishikawa-Brush *et al.*, 1997), assim como nos deficits cognitivos associados à Doença de Alzheimer (Ito *et al.*, 1994). Ainda, os peptídeos similares à bombesina agem como fatores de crescimento na progressão de diversos tipos de neoplasias humanas (Bologna *et al.*, 1989; Moody & Cuttitta, 1993; Wang *et al.*, 1996), o que levou ao desenvolvimento do RC-3095 e outros antagonistas bombesina / GRP como agentes anti-neoplásicos (Qin *et al.*, 1994; Szepeshazi *et al.*, 1997; Chatzistamou *et al.*, 2001). Deste modo, a investigação dos efeitos dos antagonistas dos receptores da bombesina / GRP em modelos animais de função neural podem ajudar a entender os efeitos e mecanismos de ação destas drogas assim como esclarecer o possível envolvimento da bombesina / GRP em distúrbios neurodegenerativos e neuropsiquiátricos. Como os distúrbios neuropsiquiátricos envolvem tanto deficits cognitivos quanto afetivos, e a amígdala tem sido implicada na patogenia de distúrbios como o autismo e esquizofrenia, nossos achados de que o sistema dos receptores da bombesina / GRP apresenta um papel crucial no processo da memória emocional corrobora a idéia de que a via bombesina / GRP possa estar envolvida de forma importante na patogênese de distúrbios neuropsiquiátricos, e que os receptores bombesina / GRP devam ser considerados como alvos terapêuticos potenciais para o desenvolvimento de drogas no tratamento de doenças do sistema nervoso central.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi apoiada pela *South American Office for Anticancer Drug Development* (SOAD) e CNPq e CAPES-Brasil. O RC-3095 foi doação do Dr. J. Engel, Zentaris AG, Frankfurt, Alemanha. Os autores agradecem à Dra. Nádia Schröder pela leitura crítica e assistência no preparo do manuscrito.

6. Abreviaturas

ABL, amígdala basolateral; GABA, ácido gama-aminobutírico; GRP, peptídeo liberador da gastrina; PKC, proteína-quinase C; RC-3095, (D-Tpi6,Leu13psi[CH2NH-Leu14) bombesin (6-14).

7. Referências

1. Bianchin M, Mello e Souza T, Medina JH & Izquierdo I. The amygdala is involved in modulation of long-term memory, but not in working or short-term memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 1999;71, 127-131.
2. Bissette G, Nemeroff CB, Decker MW, Kizer JS, Agid Y & Javoy-Agid F. Alterations in regional brain concentrations of neurotensin and bombesin in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 1985;17, 324-328.
3. Bologna MC, Festuccia C, Muzi P, Biordi L & Ciomei M. Bombesin stimulates growth of human prostatic cancer cells in vitro. *Cancer.* 1985; 63, 1714-1720.
4. Chatzistamou I, Schally AV, Szepeshazi K, Groot K, Hebert F & Arencibia JM. Inhibition of growth of ES-2 human ovarian cancers by bombesin antagonist RC-3095, and luteinizing hormone-releasing hormone antagonist Cetrorelix. *Cancer Lett.* 2001; 171, 37-45.
5. Coleman-Mesches K & McGaugh JL. Muscimol injected into the right or left amygdaloid complex differentially affects retention performance following aversively motivated training. *Brain Res.* 1995;676, 183-188.
6. Flood JF & Morley JE. Effects of bombesin and gastrin-releasing peptide on memory processing. *Brain Res.* 1988;460, 314-322.
7. Gerner RH, van Kammen DP & Ninan PT. Cerebrospinal fluid cholecystokinin, bombesin and somatostatin in schizophrenia and normals. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 1985;9, 73-82.
8. Hellmich MR, Ives, KL, Udupi V, Soloff, MS, Greeley GH JR, Christensen BN & Townsend CM Jr. Multiple protein kinase pathways are involved in gastrin-releasing peptide receptor-regulated secretion. *J. Biol. Chem.* 1999;274, 23901-23909.

9. Hollingsworth EB. Gastrin-releasing peptide receptor in rat brain membranes: specific binding and stimulation of phosphoinositide breakdown. *Mol Pharmacol* 1989;35, 689-694.
10. Ishikawa-Brush Y, Powell JF, Bolton P, Miller AP, Francis F, Willard HF, Lehrach H & Monaco AP. Autism and multiple exostoses associated with an X;8 translocation occurring within the GRPR gene and 3' to the SDC2 gene. *Hum Mol Genet.* 1997;6, 1241-1250.
11. Ito E, Oka K, Etcheberrigaray R, Nelson TJ, McPhie DL, Tofel-Grehl B, Gibson GE & Alkon DL. Internal Ca²⁺ mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1994;91, 534-538.
12. Izquierdo I & Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem.* 1997;68, 285-316.
13. Izquierdo I, Quevedo J, Izquierdo LA, Vianna MRM, Szapiro G, Barros DM, Roesler R, Alonso M, Walz R & Medina JH. What can go wrong when memory fails: The main biochemical events underlying consolidation and retrieval in rats. In Palomo, T., Beninger, R.J. & Archer, T. (eds) *Neurodegenerative Brain Disorders.* Fundacion Cerebro y Mente, Madrid. 2000;pp. 131-151.
14. Kim HJ, Evers BM, Litvak DA, Hellmich MR & Townsend CM Jr. Signaling mechanisms regulating bombesin-mediated AP-1 gene induction in the human gastric cancer SIIA. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2000;279, C326-334.
15. Lee K, Dixon AK, Gonzalez I, Stevens EB, McNulty S, Oles R, Richardson PJ, Pinnock RD & Singh L. Bombesin-like peptides depolarize rat hippocampal interneurons through interaction with subtype 2 bombesin receptors. *J. Physiol.* 1999;518, 791-802.

16. McCoy JG & Avery DD. Bombesin: potential integrative peptide for feeding and satiety. *Peptides*. 1990;11, 595-607.
17. McGaugh J.L. Dissociating learning and performance: Drug and hormone enhancement of memory storage. *Brain Res. Bull.* 1989;23, 339-345.
18. McGaugh JL. Memory - a century of consolidation. *Science*. 2000; 287, 248-251.
19. McGaugh J.L., Cahill L. & Roozendaal, B. (1996) Involvement of the amygdala in memory storage: Interaction with other brain systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93, 13508-13514.
20. McGaugh JL & Izquierdo I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. *Trends Pharmacol Sci*. 2000;21, 208-210.
21. McIntyre CK, Power AE, Roozendaal B & McGaugh JL. Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003;985, 273-293.
22. Moody TW & Cuttitta F. Growth factor and peptide receptors in small lung cancer. *Life Sci*. 1993;52, 1161-1173.
23. Moody TW, Pert CB, Rivier J & Brown MR. Bombesin: specific binding to rat brain membranes. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1978;75, 5372-5376.
24. Morley JE, Flood J & Silver AJ. Effects of peripheral hormones on memory and ingestive behaviors. *Psychoneuroendocrinology*. 1992;17, 391-399.
25. Olincy A, Leonard S, Young DA, Sullivan B & Freedman R. Decreased bombesin peptide response to cigarette smoking in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 1999;20, 52-59.
26. Packard MG & Teather LA. Double dissociation of hippocampal and dorsal-striatal memory systems by posttraining intracerebral injections of 2-amino-5-phosphonopentanoic acid. *Behav. Neurosci.* 1997;111, 543-551.

27. Paxinos G & Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 3rd. edn. Academic Press, San Diego. 1997.
28. Pert A, Moody TW, Pert CB, Dewald LA & Rivier J. Bombesin: receptor distribution in brain and effects on nociception and locomotor activity. *Brain Res.* 1980;193, 209-220.
29. Qin Y, Ertl T, Cai RZ, Halmos G & Schally AV. Inhibitory effect of bombesin receptor antagonist RC-3095 on the growth of human pancreatic cancer cells in vivo and in vitro. *Cancer Res.* 1994;54, 1035-1041.
30. Qu X, Xiao D & Weber HC. Human gastrin-releasing peptide receptor mediates sustained CREB phosphorylation and transactivation in HuTu 80 duodenal cancer cells. *FEBS Lett.*, 2002;527, 109-113.
31. Rashidy-Pour A & Razvani ME. Unilateral reversible inactivations of the nucleus tractus solitarius and amygdala attenuate the effects of bombesin on memory storage. *Brain Res.* 1998;814, 127-132.
32. Roesler R, Meller CA, Kopschina MI, Souza, DO, Henriques, JAP & Schwartzmann G. Intrahippocampal infusion of the bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 impairs inhibitory avoidance retention. *Peptides.* 2003;24, 1069-1074.
33. Roesler R, Vianna MRM, deParis F, Quevedo J, Walz R & Bianchin M. Infusions of AP5 into the basolateral amygdala impair the formation, but not the expression, of step-down inhibitory avoidance. *Braz J Med Biol Res.* 2000a;33, 829-834.
34. Roesler R, Vianna MRM, deParis F, Rodrigues C, Sant'Anna MK, Quevedo J & Ferreira MBC. NMDA receptor antagonism in the basolateral amygdala blocks the enhancement of inhibitory avoidance learning in previously trained rats. *Behav Brain Res.* 2000b;112, 99-105.

35. Santo-Yamada Y, Yamada K, Wada E, Goto Y & Wada K. Blockade of bombesin-like peptide receptors impairs inhibitory avoidance learning in mice. *Neurosci. Lett.* 2003;340, 65-68.
36. Santo-Yamada Y, Yamada K & Wada K. Post-training administration of gastrin-releasing peptide (GRP) improves memory loss in scopolamine- and hypoxia-induced amnesic mice. *Physiol Behav.* 2001;74, 139-143.
37. Shumyatsky GP, Tsvetkov E, Malleret G, Vronskaya S, Hatton M, Hampton L, Battey JF, Dulac C, Kandel ER & Bolshakov EY. Identification of a signaling network in lateral nucleus of amygdala important for inhibiting memory specifically related to learned fear. *Cell.* 2002;111, 905-918.
38. Szepeshazi K, Schally AV, Halmos G, Lamharzi N, Groot K & Horvath JE. A single in vivo administration of bombesin antagonist RC-3095 reduces the levels and mRNA expression of epidermal growth factor receptors in MXT mouse mammary cancers. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1997;94, 10913-10918.
39. Walz R, Rockenbach IC, Amaral OB, Quevedo J & Roesler R. MAPK and memory. *Trends Neurosci.* 1999;22, 495.
40. Walz R, Roesler R, Quevedo J, Sant'Anna M, Madruga M, Rodrigues C, Gottfried C, Medina JH & Izquierdo I. Time-dependent impairment of inhibitory avoidance retention in rat by posttraining infusion of a mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor into cortical and limbic structures. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2000;73, 1-11.
41. Wang QJ, Knezetic AJ, Schally AV, Pour PM & Adrian T. Bombesin may stimulate proliferation of human pancreatic cancer cells through an autocrine pathway. *Int J Cancer* 1996;68, 1-7.

42. Williams CL & McGaugh JL. Enhancement of memory processing in an inhibitory avoidance and radial maze task by post-training infusion of bombesin into the nucleus tractus solitarius. *Brain Res.* 1994;654, 251-256.
43. Wolf SS & Moody TW. Receptors for GRP/bombesin-like peptides in the rat forebrain. *Peptides.* 1985;Suppl 1, 111-114.
44. Yamada K, Santo-Yamada Y, Wada E & Wada K. Role of bombesin (BN)-like peptides/receptors in emotional behavior by comparison of three strains of BN-like peptide receptor knockout mice. *Mol Psychiatry.* 2002;7, 113-117.
45. Zarbin MA, Kuhar MJ, O'Donohue TL, Wolf SS & Moody TW. Autoradiographic localization of (125I-Tyr4)bombesin-binding sites in rat brain. *J Neurosci.* 1985;5, 429-437.

8.Figuras

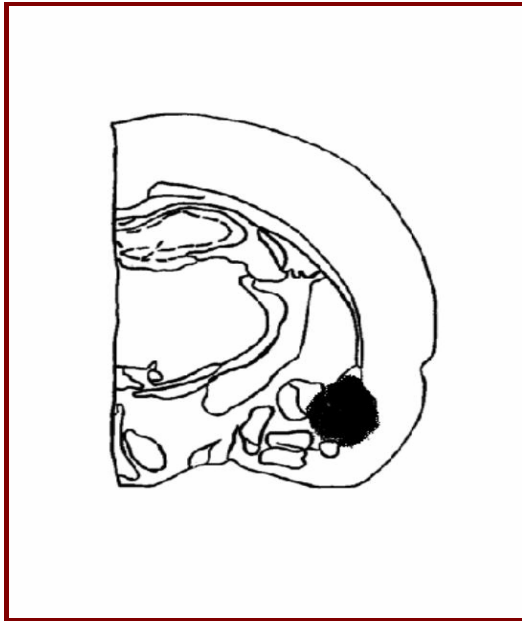


Figura 1. Representação do plano A, a - 2,3 mm no Atlas de Paxinos & Watson (1997) demonstrando a área (delimitada em preto) onde os sítios de infusão são considerados em posição correta.

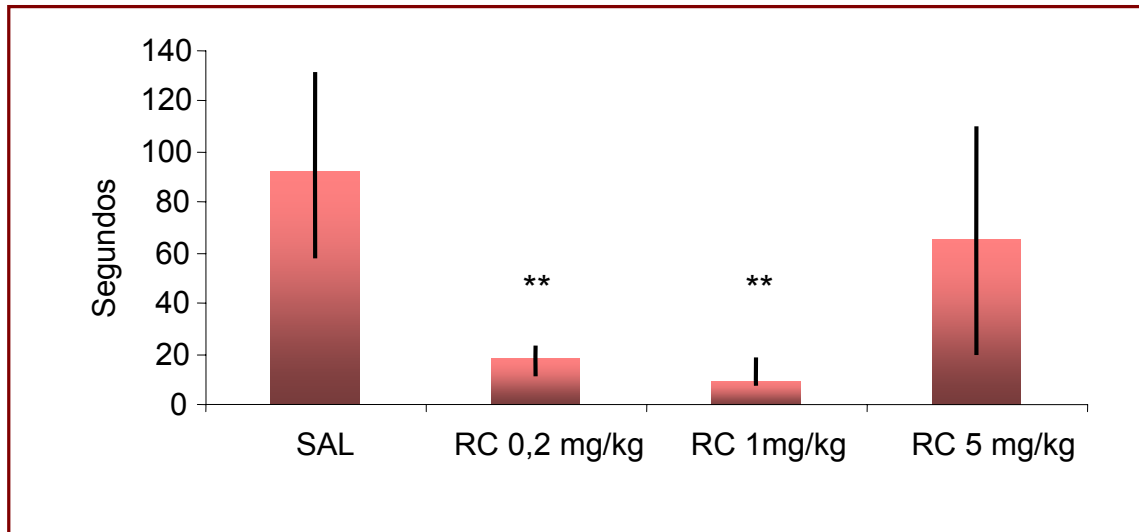


Figura 2. Administração pós-treino de antagonista do receptor de bombesina / GRP reduz a memória motivada aversivamente. Os ratos recebem uma injeção i.p. de salina (SAL) ou RC-3095 (RC) (0,2, 1,0 ou 5,0 mg/kg) imediatamente após o treino em tarefa de esquila inibitória. Os dados das latências de descidas nos testes de retenção são apresentados em medianas (intervalos interquartis); $n = 9-10$ animais por grupo; ** $p < 0,01$ comparado com o grupo tratado com salina.

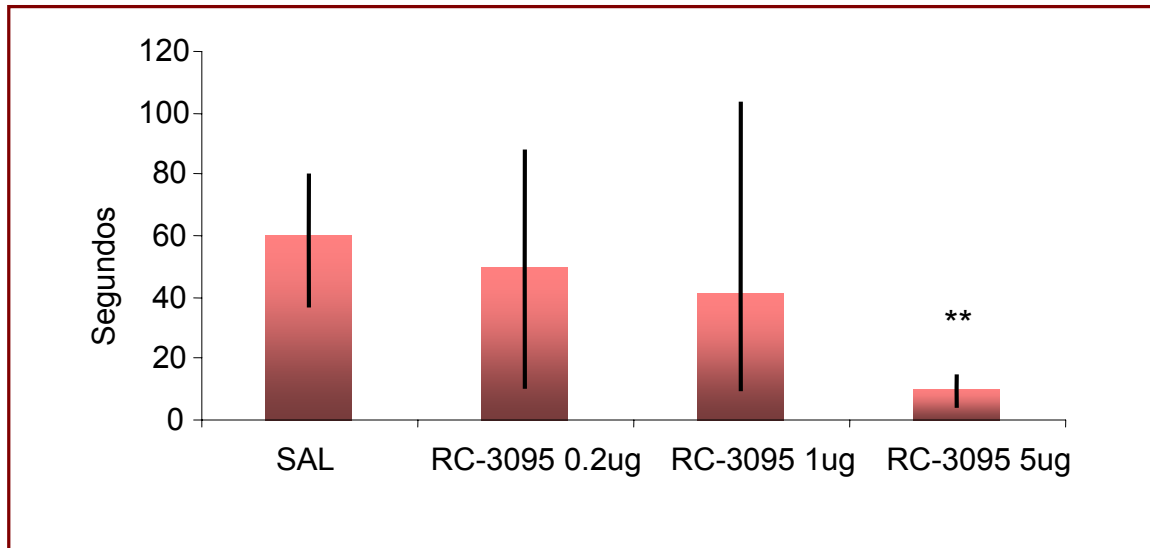


Figura 3. Bloqueio pós-treino dos receptores bombesina / GRP na ABL reduz a memória motivada aversivamente. Os ratos recebem uma microinfusão bilateral de 0,5 μ L de salina (SAL) ou RC-3095 (RC) (0,2, 1,0 ou 5,0 μ g de cada lado) na ABL imediatamente após treino em tarefa de esquila inibitória. Os dados das latências nos testes de retenção são apresentados em medianas (intervalos interquartis); $n = 9-12$ animais por grupo; ** $p < 0,001$ comparado ao grupo tratado com salina.

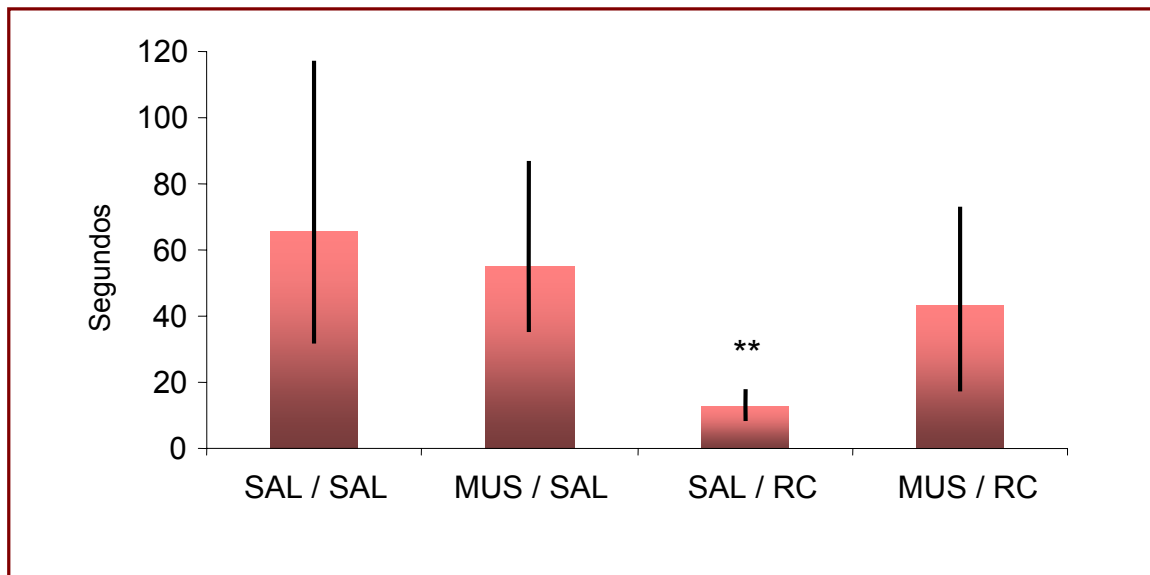


Figura 4. Inativação com muscimol da ABL inibe os efeitos de redução da memória do bloqueio de receptor bombesina / GRP. Os ratos recebem uma infusão unilateral de salina (SAL) ou muscimol (MUS) (0,5 µg) dentro da ABL 5 minutos antes do treino e uma injeção i.p. de SAL ou RC-3095 (RC) 1,0 mg/kg imediatamente após o treino em tarefa de esquila inibitória. Os dados das latências de descidas nos testes de retenção estão apresentados em medianas (intervalos interquartis); $n = 9-11$ animais por grupo; ** $p < 0,01$ comparado com o grupo tratado com salina.

QUINTA PARTE – Artigo 2
Tradução para a língua portuguesa

Os Receptores do Peptídeo Liberador de Gastrina no Hipocampo estão envolvidos na memória relacionada ao medo, porém não no medo inato

Daniela Lessa¹, Roberta Venturella¹, Gustavo Kellerman Reolon², Tatiana Luft³, Rafael Roesler², Gilberto Schwartzmann¹

1. Resumo

O receptor da bombesina / peptídeo liberador de gastrina (GRPR) tem sido relacionado a distúrbios de ansiedade e memória. No presente estudo avaliamos o papel do GRPR no hipocampo dorsal na formação da memória relacionada ao medo e medo inato. Ratos Wistar machos adultos receberam microinfusão bilateral de salina ou do antagonista da bombesina / GRPR (D-Tpi6, Leu13 psi[CH₂NH]-Leu14) bombesina (6-14), o RC-3095, na dose de 0,4 ou 2 µg, no hipocampo dorsal, cinco minutos antes do treino em uma tarefa de esquiva inibitória múltipla contínua (CMIA). A retenção foi avaliada 24 horas após o treino. O RC-3095 não afetou a aquisição na CMIA. Entretanto, o RC-3095 na dose de 0,4 µg reduziu a performance no teste de retenção. A infusão intrahipocampal de RC-3095 não afetou o medo inato e ansiedade, avaliados através do teste do labirinto elevado. Os resultados sugerem que o GRPR no hipocampo dorsal é necessário para a formação da memória relacionada ao medo mas não está envolvido na modulação da memória ao medo inato.

Palavras-chave: peptídeo liberador de gastrina, receptor GRP, hipocampo, plasticidade neural, ansiedade, memória.

1. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas do Departamento de Medicina Interna da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).
2. Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS.
3. Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS.

2. Introdução

Os peptídeos similares à bombesina (BN), como o homólogo da bombesina em mamíferos, o peptídeo liberador de gastrina (GRP), estimulam a proliferação celular e determinam uma série de atividades neuroendócrinas através da ativação de receptores GRP (GRPRs). As evidências de que os peptídeos similares à BN também atuam como fatores de crescimento na progressão de tumores de pulmão, pâncreas, próstata, ovário e mama humanos, assim como de glioblastomas, levou ao desenvolvimento de antagonistas de GRPRs como o D-Tpi6, Leu13 psi(CH₂NH)-Leu14 bombesina (6-14), o RC-3095, como potenciais agentes anti-tumorais ^(3,22,32).

O GRPR está distribuído em todo o sistema nervoso central (SNC) dos mamíferos. O hipocampo e a amígdala basolateral são áreas límbicas crucialmente envolvidas na formação da memória, assim como em distúrbios psiquiátricos, e ambas áreas contêm alta densidade de GRPRs ⁽¹⁸⁾. Os GRPRs nas áreas límbicas têm sido implicados na plasticidade sináptica, formação de memória, e distúrbios neuropsiquiátricos ^(18,24-28,31,35). Nosso grupo previamente demonstrou que a infusão do antagonista GRPR RC-3095 no hipocampo dorsal ou amígdala basolateral diminui a consolidação da memória em tarefa de esquivas inibitória única ^(27,28). No presente estudo também investigamos o papel dos GRPRs na memória relacionada ao medo e ansiedade através da avaliação dos efeitos de infusões intra-hipocámpais de RC-3095 na formação de memória em tarefas de esquivas inibitória e labirinto elevado. Estes achados foram relatados preliminarmente, publicados sob a forma de abstrato ⁽²⁶⁾.

3. Materiais e Métodos

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos (230-321g) obtidos do biotério do Departamento de Bioquímica (UFRGS, Porto Alegre). Os animais foram mantidos em grupos de cinco ratos por caixa, com água e comida disponíveis ad libitum, com ciclo claro-escuro de 12 horas (ciclo claro iniciando às 7h). Os procedimentos comportamentais foram conduzidos entre 10 e 16:30h. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals e as recomendações de cuidado animal da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC).

Cirurgia

Os animais foram anestesiados com tionembotal (30 mg/kg, ip) para a implantação de cânulas de 9.0-mm de comprimento, a 1.0 mm acima da área CA1 do hipocampo dorsal, conforme descrito previamente ⁽²⁸⁾. As coordenadas (A – 4,3 mm, L \pm 3 mm do bregma, V – 1,4 mm da dura) foram obtidas do atlas de Paxinos and Watson ⁽²¹⁾.

Procedimentos Comportamentais

Os animais foram submetidos aos procedimentos comportamentais no mínimo sete dias após a cirurgia. O aparato de treino de esquiva inibitória consistiu de uma caixa de acrílico de 50 x 25 x 25cm (Albarsch, Porto Alegre), cuja base apresenta barras de aço paralelas (1 mm de diâmetro), com espaçamento de 1 cm entre elas. Uma plataforma de 7 cm de comprimento e 2,5 cm de altura foi colocada junto à parede esquerda da caixa. Foi utilizado um procedimento de treino de esquiva inibitória de múltiplas tentativas, modificado do descrito em procedimentos prévios ^(1, 29). No dia do treino o rato foi colocado na plataforma e sua latência de descida para a grade foi medida por um dispositivo automático. Assim que o animal desceu para a grade, um choque de baixa intensidade (0,2 mA) foi aplicado por 2 segundos e o rato foi recolocado na plataforma. A cada descida do rato para a grade, o choque foi novamente administrado. O rato permaneceu no aparato até que tenha ficado na plataforma por 60 segundos consecutivos. Foi registrado o número total de descidas até que o critério de aquisição, a permanência na plataforma por 60 segundos consecutivos, tenha sido alcançado. No teste de retenção 24 horas após o treino, o rato é colocado na plataforma e a sua latência de descida até a grade (máximo de 180 segundos) foi registrada. No teste de retenção não foi aplicado o choque.

O teste do labirinto em cruz elevado consiste em um aparato de dois braços abertos (50 x 10 cm) e dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm), dispostos de modo que sejam opostos e perpendiculares um ao outro, com uma plataforma central de 5 x 5 cm. O dispositivo tem uma altura de 50 cm. Os testes foram conduzidos sob luz tênue avermelhada. Os animais foram expostos à esta luz por 5 minutos em suas próprias gaiolas antes do teste. Após, foram colocados individualmente na plataforma central de

face ao braço aberto. Durante um período de teste de 5 minutos, foram registradas o número de entradas nos braços fechados e abertos e o número total de entradas.

Drogas e procedimentos farmacológicos e comportamentais

Cinco minutos antes do treino comportamental, uma cânula para infusão foi posicionada dentro da cânula guia. A ponta da cânula infusional foi inserida 1 mm mais profundamente do que a cânula guia, almejando desta maneira a região CA1 do hipocampo dorsal. Os animais receberam, através de infusões bilaterais nas cânulas, 1 µl de solução salina ou RC-3095 (0,4 ou 2µg) (Zentaris AG, Frankfurt, Alemanha) dissolvido em solução salina. Salina ou RC-3095 foram infundidos durante um minuto, e a cânula para infusão foi mantida posicionada por mais um minuto para permitir a difusão da droga.

Histologia

Vinte e quatro a 48 horas após o final do teste comportamental, os animais foram sacrificados através de decapitação e seus cérebros foram removidos e armazenados em formalina por no mínimo 72 horas, e então confirmados os sítios de infusão no hipocampo dorsal conforme descrição em relatos anteriores ⁽²⁶⁾.

Estatística

As comparações entre os grupos foram realizadas utilizando análise de variância de uma via seguida por teste de Fischer pos hoc se necessário. Em todas as comparações, valores de $p < 0,05$ foram considerados para indicar diferenças estatisticamente significativas.

4. Resultados

O posicionamento das cânulas no hipocampo dorsal foi considerado correto em 56 ratos (dados não demonstrados). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos no número de tentativas necessárias para alcançar o critério de 60 segundos

no treino de CMIA (Figura 1), indicando que a infusão pré-treino de RC-3095 não afetou a aquisição na tarefa de CMIA. O RC-3095 na dose de 0,4µg, mas não na dose de 2µg, diminuiu a retenção de 24 horas na tarefa de CMIA (Figura 2). A infusão intra-hipocampal de RC-3095 não afetou o número total de entradas (dados não demonstrados) ou o número de entradas nos braços abertos do labirinto elevado (Figura 3). Os resultados indicam que o GRPR no hipocampo dorsal é necessário para a retenção, mas não para a aquisição, do treino aversivo, mas não está envolvido no medo inato ou ansiedade.

5. Discussão

Devido ao GRPR regular diversos aspectos da função neural e comportamento, e antagonistas GRPR como o RC-3095 terem sido propostos como drogas anti-câncer ^(3, 22, 32), entendemos que os efeitos dos antagonistas GRPR na função cerebral sejam clinicamente relevantes. Além disso, os antagonistas GRPR são ferramentas farmacológicas úteis na pesquisa do papel dos GRPRs no aprendizado e memória ⁽²⁵⁻²⁸⁾. Os resultados do presente estudo sugerem que o GRPR no hipocampo dorsal seja necessário para a retenção da memória para CMIA, mas não para a aquisição da CMIA ou ansiedade avaliada através do labirinto elevado. Nosso grupo demonstrou em estudos prévios que o antagonismo pós-treino do GRPR no hipocampo ou amígdala diminui a consolidação da memória na tarefa de esquiva inibitória única ^(27,28), e que a administração sistêmica de RC-3095 bloqueia a memória aversiva sem afetar a memória de reconhecimento ⁽²⁵⁾. O achado que o antagonista GRPR RC-3095 diminui a memória relacionada ao medo também é consistente com estudo prévio que demonstrou que camundongos GRPR-deficientes apresentam alterações na potenciação de longo prazo na amígdala, e na memória condicionada ao medo ⁽³¹⁾, assim como com evidências prévias de que agonistas GRPR aumentam a formação de memória em roedores quando injetados periféricamente ^(4, 30, 34). Os achados do presente estudo, de que o RC-3095 diminui a memória relacionada ao medo, são consistentes com a visão de que o sistema GRPR nas áreas cerebrais límbicas é um sistema regulatório neuronal especificamente envolvido na modulação da memória motivada pelo medo ^(25, 27, 31).

O RC-3095 reduziu a retenção da CMIA na dose de 0,4 µg, enquanto que na dose de 2 µg foi inefetivo. Estudos avaliando os efeitos da administração de drogas facilitadoras ou inibidoras da memória, mostram que muitos tratamentos

neuromodulatórios produzem uma curva dose-resposta em U invertido na memória, onde doses intermediárias são ótimas e doses mais altas ou baixas não produzem efeito ⁽¹⁴⁾. Além disso, este padrão de dose-resposta é consistente com nossos dados prévios usando injeções periféricas pré ou pós-treino, e injeções pós-treino intra-hipocampais, onde as doses mais baixas induziram diminuição da esQUIVA inibitória (EI), e as doses mais altas usadas foram inefetivas ^(26, 27, 28).

Apesar de o RC-3095 ter afetado a memória emocional, não apresentou efeito no número de entradas nos braços abertos no labirinto em cruz elevado. Estudos prévios implicaram o hipocampo na modulação do comportamento no labirinto em cruz ⁽²⁰⁾. Nossos resultados sugerindo que os GRPRs hipocampais modulam a memória relacionada ao medo sem afetar o medo inato são consistentes com os achados de Shumyatsky et al (31), em que camundongos GRPR-deficientes mostram memória de longo prazo alterada mas comportamento normal no labirinto em cruz elevado.

É possível que vários mecanismos de sinalização intracelular estejam envolvidos nos efeitos de diminuição de memória induzidos pelas infusões intra-hipocampais de RC-3095. Para secreção regulada pela ativação do GRPR em uma linhagem celular humana neuroendócrina demonstrou ser necessário um aumento no Ca^{2+} livre intracelular mediado pela fosfolipase C (PKC) e ativação das vias de sinalização da proteína quinase C (PKC) e proteína quinase mitogênio-ativada (MAPK)/proteína quinase extracelular sinal-regulada (ERK) ⁽⁶⁾. Em neurônios hipocampais, a despolarização da membrana induzida pelo GRP é bloqueada por antagonista do receptor BN/GRP e reduzida pela aplicação de um inibitor da PLC ⁽¹²⁾. O tratamento com um agonista GRP induz a expressão PKC e proteína quinase dependentes de c-jun e jun-B em células humanas de câncer gástrico SIIA, um efeito que é bloqueado por antagonistas GRPR ⁽¹¹⁾. Em células de carcinoma de duodeno HuTu 80, a ativação de GRPR estimula a fosforilação da proteína ligante ao elemento responsivo (CREB) AMPc-mediada através de via PKC dependente ⁽²³⁾. Extensas evidências indicam que a ativação da PLC e das vias da PKC e MAPK/ERK, assim como a fosforilação da CREB após o treino são necessárias para a consolidação da memória motivada pelo medo no hipocampo dorsal do rato ^(9, 10, 15, 16, 23). Ainda, é possível que o bloqueio dos receptores GRPR pelo RC-3095 afete várias vias de sinalização de proteína-quinases crucialmente envolvidas na formação da memória do hipocampo.

Em associação à regulação da função neuronal normal, os receptores GRP podem também apresentar papel em distúrbios neurodegenerativos e neuropsiquiátricos. É possível que alterações no sistema GRP estejam envolvidas na doença de Parkinson ⁽⁸⁾, esquizofrenia ^(5, 19), assim como em déficits cognitivos associados à doença de Alzheimer ⁽⁸⁾. Além disso, o GRPR é um gene candidato no autismo ^(7, 13), e foi proposto recentemente que o GRPR seja considerado como novo alvo terapêutico em distúrbios de ansiedade ⁽²⁴⁾ e esquizofrenia ⁽¹⁷⁾. A investigação dos efeitos dos antagonistas GRP em modelos animais da função neural podem ajudar a esclarecer o possível envolvimento do GRPR nas doenças neurológicas.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi apoiada pela SOAD (South American Office for Anticancer Drug Development), CNPq-MCT-Brasil, e Zentaris GmbH, Frankfurt, Alemanha. Os autores agradecem ao Dr. Ivan Izquierdo por sua colaboração.

6. Referências

1. Bianchin MM, Spanis CW, Roesler R, McGaugh JL, Izquierdo I. (+/-)-Alpha-methyl-4-carboxyphenylglycine, a metabotropic glutamate receptor blocker, impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats when infused into the basolateral nucleus of the amygdala. *Brain Res.* 2000;852:436-43.

2. Bissette G, Nemeroff CB, Decker MW, Kizer JS, Agid Y, Javiy-Agid F. Alterations in regional brain concentrations of neurotensin and bombesin in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1985;17:324-8.

3. Chatzistamou I, Schally AV, Szepeshazi K, Groot K, Hebert F, Arencibia JM. Inhibition of growth of ES-2 human ovarian cancers by bombesin antagonist RC-3095, and luteinizing hormone-releasing hormone antagonist Cetrorelix. *Cancer Lett* 2001;171:37-45.

4. Flood JF, Morley JE. Effects of bombesin and gastrin-releasing peptide on memory processing. *Brain Res.* 1988;460:314-22.

5. Gerner RH, van Kammen DP, Ninan PT. Cerebrospinal fluid cholecystokinin, bombesin and somatostatin in schizophrenia and normals. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 1985;9:73-82.

6. Hellmich MR, Ives KL, udupi V, Soloff MS, Greeley GH Jr, Christensen BN, Townsend CM Jr. Multiple protein kinase pathways are involved in gastrin-releasing peptide receptor-regulated secretion. *J Biol Chem.* 1999;274:23901-9.

7. Ishikawa-Brush Y, Powell JF, Bolton P, Miller AP, Francis F, Willard HF, Lehrach H, Monaco AP. Autism and multiple exostoses associated with an X;8 translocation occurring within the GRPR gene and 3' to the SDC2 gene. *Hum Mol Genet.* 1997;6:1241-50.

8. Ito E, Oka K, Etcheberrigaray R, Nelson TJ, McPhie DL, Tofel-Grehl B, Gibson GE, Alkon DL. Internal Ca^{2+} mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:534-8.

9. Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem.* 1997;68:285-316.

10. Izquierdo I, Quevedo J, Izquierdo LA, Vianna MRM, Szapiro G, Barros DM, Roesler R, Alonso M, Walz R, Medina, J.H. What can go wrong when memory fails: The main biochemical events underlying consolidation and retrieval in rats. In: Palomo T, Beninger RJ, Archer T, editors. *Neurodegenerative Brain Disorders*. Madrid: Fundacion Cerebro y Mente 2000. p. 131-151.

11. Kim HJ, Evers BM, Litvak DA, Hellmich MR, Townsend CM Jr. Signaling mechanisms regulating bombesin-mediated AP-1 gene induction in the human gastric cancer SIIA. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;279:C326-34.

12. Lee K, Dixon AK, Gonzalez I, Stevens EB, McNulty S, Oles R, Richardson PJ, Pinnock RD, Singh L. Bombesin-like peptides depolarize rat hippocampal interneurons through interaction with subtype 2 bombesin receptors. *J Physiol.* 1999;518:791-802.

13. Marui T, Hashimoto O, Nanba E, Kato C, Tochigi M, Umekage T, Kato N, Sasaki T. Gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) locus in Japanese subjects with autism. *Brain Dev.* 2004;26:5-7.

14. McGaugh JL. Dissociating learning and performance: Drug and hormone enhancement of memory storage. *Brain Res Bull.* 1989;23:339-45.

15 McGaugh JL. Memory - a century of consolidation. *Science.* 2000;287:248-51.

16. McGaugh JL, Izquierdo I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. *Trends Pharmacol Sci.* 2000;21:208-10.

17. Meller CA, Henriques JA, Schwartzmann G, Roesler R. The bombesin/gastrin releasing peptide receptor antagonist RC-3095 blocks apomorphine but not MK-801-induced stereotypy in mice. *Peptides*. 2004;25:585-8.
18. Moody TW, Merali Z. Bombesin-like peptides and associated receptors within the brain: distribution and behavioral implications. *Peptides*. 2004;25:511-20.
19. Olincy A, Leonard S, Young DA, Sullivan B, Freedman R. Decreased bombesin peptide response to cigarette smoking in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 1999;20:52-59.
20. Ouagazzal AM, Kenny PJ, File SE. Modulation of behaviour on trials 1 and 2 in the elevated plus-maze test of anxiety after systemic and hippocampal administration of nicotine. *Psychopharmacology (Berl)*. 1999;144:54-60.
21. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, San Diego: Academic Press; 1997.
22. Qin Y, Ertl T, Cai RZ, Halmos G, Schally AV. Inhibitory effect of bombesin receptor antagonist RC-3095 on the growth of human pancreatic cancer cells in vivo and in vitro. *Cancer Res*. 1994;54:1035-41.
23. Qu X, Xiao D, Weber HC. Human gastrin-releasing peptide receptor mediates sustained CREB phosphorylation and transactivation in HuTu 80 duodenal cancer cells. *FEBS Lett*. 2002;527:109-13.
24. Roesler R, Henriques JAP, Schwartzmann G. Neuropeptides and anxiety disorders: bombesin receptors as novel therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25:241-2.
25. Roesler R, Kopschina MI, Rosa RM, Henriques JA, Souza DO, Schwartzmann G. RC-3095, a bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist, impairs aversive but not recognition memory in rats. *Eur J Pharmacol*. 2004;486:35-41.

26. Roesler R, Lessa D, Venturella R, Luft T, Henriques JAP, Schwartzmann G. Hippocampal bombesin/gastrin-releasing peptide receptors are involved in fear-motivated memory but not in innate fear. *FENS Abstr.* 2004;2:A115-14.
27. Roesler R, Lessa D, Venturella R, Vianna MR, Luft T, Henriques JA, Izquierdo I, Schwartzmann G. Bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in the basolateral amygdala regulate memory consolidation. *Eur J Neurosci.* 2004;19:1041-5.
28. Roesler R, Meller CA, Kopschina MI, Souza DO, Henriques JA, Schwartzmann G. Intrahippocampal infusion of the bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 impairs inhibitory avoidance retention. *Peptides.* 2003;24:1069-74.
29. Roozendaal B, Carmi O, McGaugh JL. Adrenocortical suppression blocks the memory-enhancing effects of amphetamine and epinephrine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:1429-33.
30. Santo-Yamada Y, Yamada K, Wada K. Post-training administration of gastrin-releasing peptide (GRP) improves memory loss in scopolamine- and hypoxia-induced amnesic mice. *Physiol Behav.* 2001;74:139-43.
31. Shumyatsky GP, Tsvetkov E, Malleret G, Vronskaya S, Hatton M, Hampton L, Battey JF, Dulac C, Kandel ER, Bolshakov EY. Identification of a signaling network in lateral nucleus of amygdala important for inhibiting memory specifically related to learned fear. *Cell.* 2002;111:905-18.
32. Szepeshazi K, Schally AV, Halmos G, Lamharzi N, Groot K, Horvath JE. A single in vivo administration of bombesin antagonist RC-3095 reduces the levels and mRNA expression of epidermal growth factor receptors in MXT mouse mammary cancers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:10913-18.
33. Walz R, Roesler R, Quevedo J, Sant'Anna M, Madruga M, Rodrigues C, Gottfried C, Medina JH, Izquierdo I. Time-dependent impairment of inhibitory avoidance

retention in rat by posttraining infusion of a mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor into cortical and limbic structures. *Neurobiol Learn Mem.* 2000;73:1-11.

34. Williams CL, McGaugh JL. Enhancement of memory processing in an inhibitory avoidance and radial maze task by post-training infusion of bombesin into the nucleus tractus solitarius. *Brain Res.* 1994;654:251-6.

35. Yamada K, Santo-Yamada Y, Wada E, Wada K. Role of bombesin (BN)-like peptides/receptors in emotional behavior by comparison of three strains of BN-like peptide receptor knockout mice. *Mol Psychiatry.* 2002;7:113-7.

7. Figuras

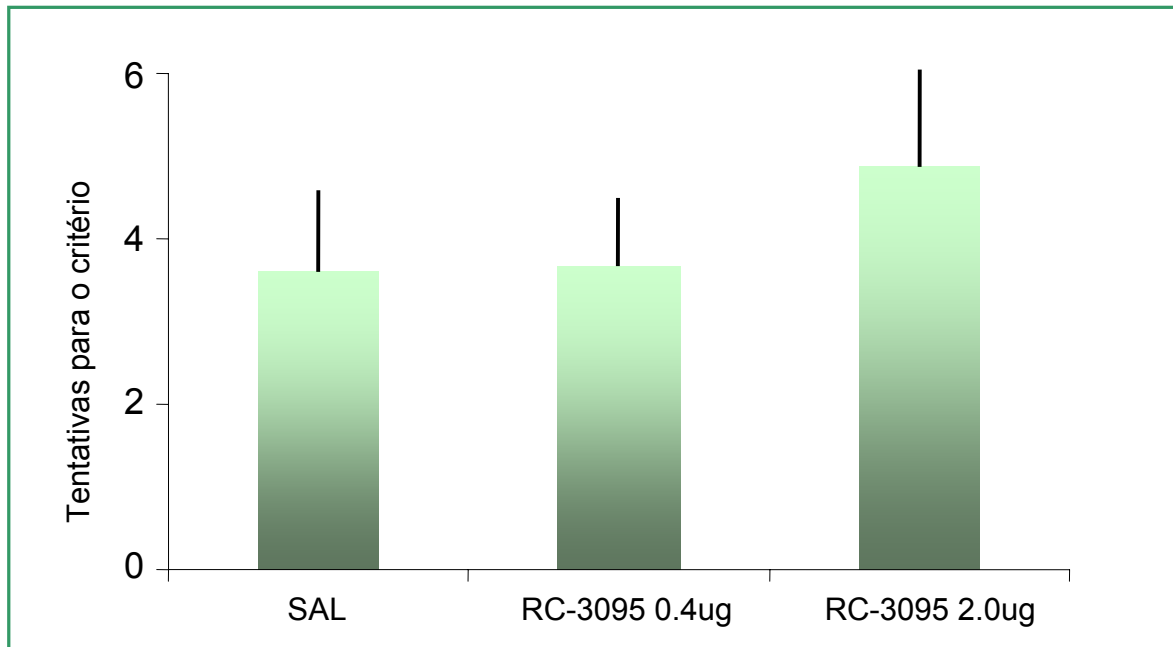


Figura 1. A infusão intra-hipocampal pré-treino do antagonista GRPR RC-3095 não afeta a aquisição de tarefa aversiva. As barras representam as médias + EPM (erro padrão médio) do número de tentativas necessárias para alcançar o critério de aquisição em tarefa de esquiva inibitória contínua de múltiplos testes. Os animais receberam infusões intra-hipocampais bilaterais de 0,1 µl de salina ou RC-3095 (0,4 ou 2,0 µg) 5 minutos antes do treino comportamental. $N = 7-10$ animais por grupo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,70$).

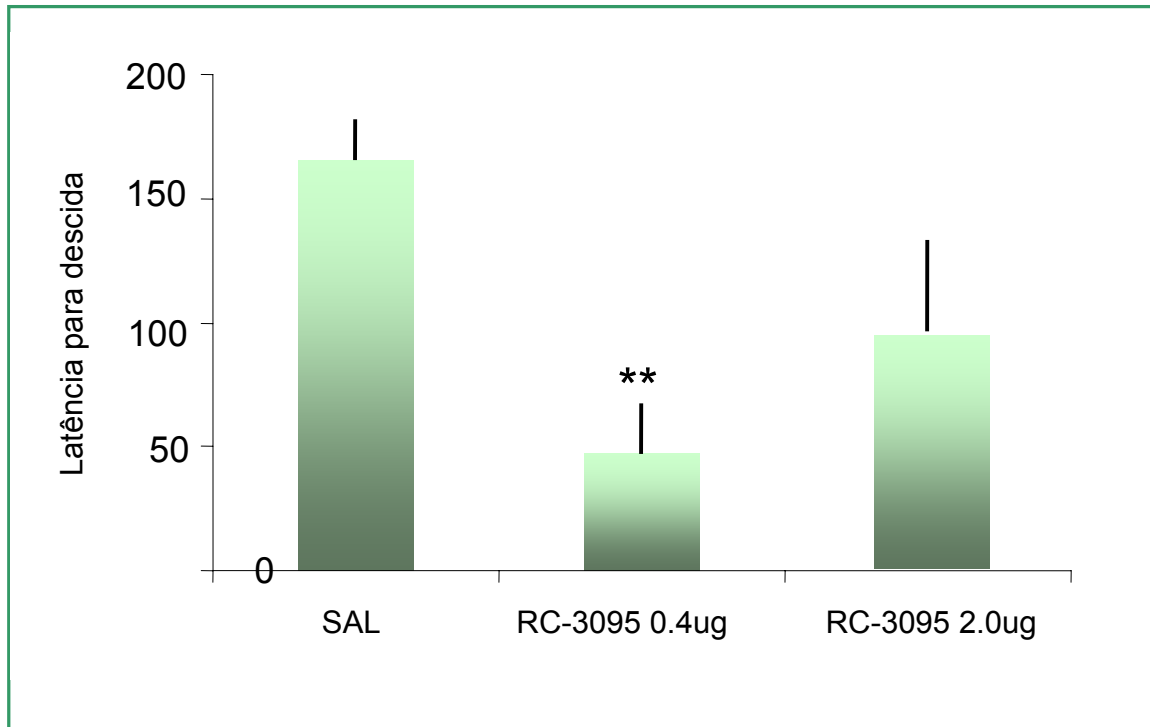


Figura 2. A infusão pré-treino intra-hipocampal do antagonista GRPR RC-3095 reduziu a retenção do treino aversivo em 24 horas. As barras representam as médias + EPM das latências para descida no teste de retenção em tarefa de esquiwa inibitória contínua de múltiplos testes. Os animais receberam infusões intra-hipocampais bilaterais de 0,1 μ l de salina ou RC-3095 (0,4 ou 2,0 μ g) 5 minutos antes do treino comportamental. $N = 7-10$ animais por grupo; ** diferença significativa para o grupo tratado com salina, $p < 0,01$).

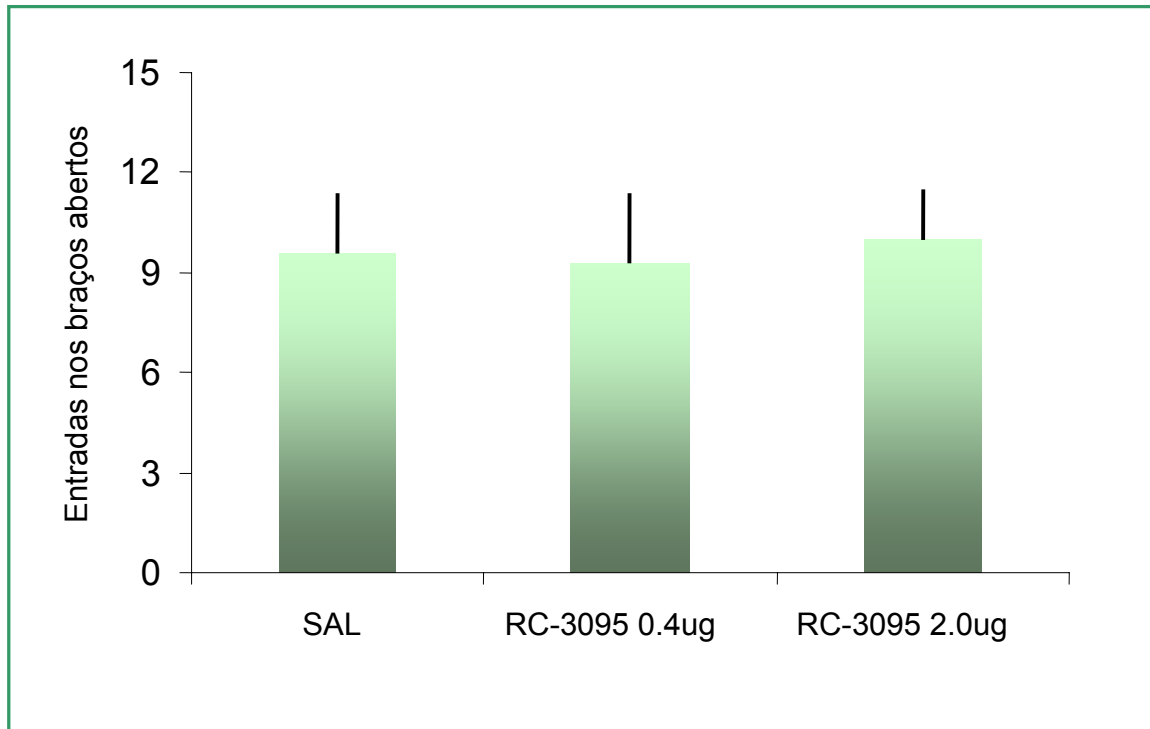


Figura 3. A infusão intra-hipocampal pré-treino do antagonista GRPR RC-3095 não afetou a ansiedade avaliada no labirinto em cruz elevado. As barras representam as médias±EPM do número de entradas nos braços abertos. Os animais receberam infusões intra-hipocampus bilaterais de 0,1 µl de salina ou RC-3095 (0,4 ou 2,0 µg) 5 minutos antes do treino comportamental. *N* = 10-11 animais por grupo. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,96$).

CONCLUSÕES

- a. Os receptores GRP estão envolvidos na consolidação da memória aversiva.
- b. A amígdala basolateral modula a consolidação da memória aversiva através da ativação do sistema de receptores GRP.
- c. A ação dos receptores GRP na memória aversiva requer que a ABL esteja funcionando.
- d. O sistema GRP, no hipocampo dorsal, está envolvido na retenção da memória aversiva, porém não na aquisição.
- e. Os resultados indicam que, no hipocampo dorsal, os receptores GRP não estão envolvidos na ansiedade.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os resultados de nossos experimentos confirmam que o sistema bombesina / GRP está envolvido na formação da memória na ABL e hipocampo e indicam que a inibição da memória relacionada ao bloqueio GRPR é mediada pela ABL. Com o conhecimento de que a memória relacionada ao medo na ABL sofre influências de diversos neurotransmissores e hormônios, torna-se interessante a realização de experimentos que associem a manipulação farmacológica integrada dos diferentes sistemas. Nosso grupo tem trabalhado neste sentido, assim como na avaliação das vias de sinalização moleculares subjacentes ao bloqueio GRP no SNC.

Além da regulação da memória, há evidências de que os receptores GRP também podem estar envolvidos em distúrbios psiquiátricos e neurodegenerativos. A investigação dos efeitos do antagonismo do GRPR em modelos animais específicos para esta classe de patologias pode trazer novos conhecimentos sobre a neurofisiologia destas doenças, assim como sobre a função neurobiológica normal.

Na área da oncologia clínica, nosso grupo teve a oportunidade de realizar a primeira investigação dos efeitos do RC-3095 em pacientes com neoplasias avançadas, resultados já publicados sob a forma de artigo em revista internacional.

Finalizando, o estudo do sistema GRP em modelos animais representa um avanço importante no conhecimento do funcionamento normal e patológico de funções celulares em diversos sistemas, com a perspectiva de se tornar novo alvo terapêutico em várias áreas da medicina.