

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEUROCIÊNCIAS

CAROLINA GARRIDO ZINN

**A VIA DE SINALIZAÇÃO NO/GMPc/PKG NA AMÍGDALA BASOLATERAL  
DESEMPENHA UM PAPEL FUNDAMENTAL NA CONSOLIDAÇÃO DE  
MEMÓRIAS AVERSIVAS EM RATOS**

Porto Alegre

2009

CAROLINA GARRIDO ZINN

**A VIA DE SINALIZAÇÃO NO/GMPc/PKG NA AMÍGDALA BASOLATERAL  
DESEMPENHA UM PAPEL FUNDAMENTAL NA CONSOLIDAÇÃO DE  
MEMÓRIAS AVERSIVAS EM RATOS**

Dissertação apresentada como requisito a obtenção de grau de Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Área de concentração Neurociências, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Martín Cammarota

Porto Alegre

2009

#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Z78v Zinn, Carolina Garrido

A via de sinalização NO/GMPc/PKG na amígdala basolateral desempenha um papel fundamental na consolidação de memórias aversivas em ratos / Carolina Garrido Zinn. Porto Alegre: PUCRS, 2009.

57 f.: Il. graf. tab.

Orientação: Prof. Dr. Martin Cammarota.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde. Área de Concentração: Neurociências.

1. MEMÓRIA. 2. OXIDO NÍTRICO. 3. TONSILA DO CEREBELO. 4. COMPORTAMENTO DE ESQUIVA. 5. RATOS. 6. ESTUDOS EXPERIMENTAIS. I. Cammarota, Martín. II. Título.

C.D.D. 616.8  
C.D.U. 612.821.2:599.323.4(043.3)  
N.L.M. WL 102

Dedico esta dissertação a uma grande mulher, minha mãe,  
Angela, que sempre me ensinou a seguir pelo caminho do bem.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família que sempre apoiou e incentivou meu crescimento profissional. A minha mãe por todos os conselhos, compreensão, dedicação, suporte, incentivo e amor infinito, e principalmente por ser o exemplo de pessoa e caráter, o qual eu pretendo seguir. Ao meu pai, Getúlio, e minha irmã, Virgínia, pelo apoio e amor incondicionais.

Agradeço aos mestres Iván Izquierdo, Martín Cammarota e Lia Bevilaqua pela oportunidade de me inserir em seu grupo de pesquisa, onde aprendemos a fazer pesquisa com ética e veracidade. Martín e Mestre, obrigada pela orientação, conselhos e ensinamentos diários. Parabéns por tornarem o Centro de Memória, além do centro de pesquisa conceituado que é, em uma grande família.

Aos colegas e amigos do Centro de Memória, obrigada a todos. Obrigada pelo companheirismo, apoio, amizade e pelos tantos momentos de diversão, que jamais serão esquecidos. A ajuda de vocês foi imprescindível para o desenvolvimento deste trabalho, especialmente a da amiga e companheira, Cristiane, que teve grande importância na realização dos experimentos.

Gostaria de agradecer em especial também a Janine, Juliana e Weber que me acompanharam desde o início, me ajudaram a dar os primeiros passos no laboratório e jamais se recusaram a tirar dúvidas e auxiliar. Certamente vocês serão grandes mestres também, assim como os nossos.

Ao meu namorado, Juliano, pela paciência, ajuda e carinho.

A todos os amigos que participaram de alguma forma desta conquista.

A PUCRS e a CAPES pelo financiamento da minha bolsa de estudos.

Muito Obrigada,  
Carolina Garrido Zinn

## RESUMO

Evidências sugerem que a via de sinalização NO/sGC/PKG tem papel chave no processamento da memória, entretanto a atuação desta cascata de sinalização na amígdala durante a consolidação da memória permanece desconhecida. Neste trabalho se comprova que quando infundido na amígdala de ratos imediatamente após o treino na tarefa de esquiva inibitória, porém não em outros tempos de infusão, o inibidor da NO sintase, L-NNA, prejudica a retenção da memória de longa duração, sem afetar a locomoção, o comportamento exploratório, o estado de ansiedade ou a expressão da resposta aversiva dos animais. O efeito amnésico do L-NNA não demonstra ser dependente de estado e foi mimetizado pelo inibidor da guanilil-ciclase solúvel, LY83583, e pelo inibidor da PKG, KT5823. Pelo contrário, a infusão pós-treino do substrato da NOS, L-Arg, do composto doador de NO, SNAP, e do análogo não-hidrolizável do GMPc, 8-Br-GMPc, aumentaram a retenção da memória de forma dose-dependente. A co-infusão de 8-Br-GMPc reverteu o efeito amnésico do L-NNA e do LY83583, porém não a do KT5823. Os dados indicam que a ativação da PKG induzida pelo NO na amígdala é um passo necessário à consolidação de memórias aversivas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Consolidação; Óxido Nítrico; Amígdala; Esquiva Inibitória.

## ABSTRACT

Evidence suggests that the NO/sGC/PKG pathway plays a key role in memory processing but the actual participation of this signaling cascade in the amygdala during memory consolidation remains unknown. Here we show that when infused in the amygdala immediately after inhibitory avoidance training, but not later, the NO synthase inhibitor L-NNA hindered long-term memory retention without affecting locomotion, exploratory behavior, anxiety state or retrieval of the avoidance response. The amnesic effect of L-NNA was not state dependent and was mimicked by the soluble guanylyl cyclase inhibitor LY83583 and the PKG inhibitor KT-5823. On the contrary, posttraining intra-amygdala infusion of the NOS substrate L-Arg, the NO-releasing compound SNAP or the non-hydrolysable analog of GMPc 8Br-GMPc increased memory retention in a dose-dependent manner. Co-infusion of 8Br-GMPc reversed the amnesic effect of L-NNA and LY83583 but not that of KT-5823. Our data indicate that the NO-induced activation of PKG in the amygdala is a necessary step for consolidation of inhibitory avoidance memory.

**KEYWORDS:** Consolidation; Nitric oxide; Amygdala; Inhibitory avoidance.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Classificação das memórias quanto ao tempo de retenção.....	12
<b>Tabela 2:</b> Classificação das memórias de longa duração de acordo com o seu conteúdo. ....	12
<b>Tabela 3:</b> Efeitos do óxido nítrico como mensageiro ou toxina no mesmo tecido, conforme concentração tissular relativa.....	15
<b>Tabela 4:</b> Infusões de L-NNA, LY83583, KT-5823, SNAP, 8-Br-GMPc ou L-Arg na amígdala não apresentam efeito sobre as atividades locomotoras e exploratória ou sobre o estado de ansiedade .....	34



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Cascata de sinalização NO/sGC/PKG .....	16
<b>Figura 2:</b> Cirurgia estereotáxica .....	21
<b>Figura 3:</b> Esquiva inibitória .....	22
<b>Figura 4:</b> Campo Aberto .....	23
<b>Figura 5:</b> Labirinto em cruz elevado .....	24
<b>Figura 6:</b> Representação esquemática de cortes histológicos de hemisfério cerebral .....	25
<b>Figura 7:</b> Cascata de sinalização do NO/sGC/PKG e ação dos fármacos sobre mesma .....	26
<b>Figura 8:</b> Infusão de fármacos através das cânulas-guia esterotaxicamente implantadas.....	27
<b>Figura 9:</b> A consolidação da memória aversiva requer a atividade da NOS na amígdala imediatamente após o treino .....	28
<b>Figura 10:</b> O efeito amnésico da inibição pós-treino da NOS na amígdala não se deve à dependência de estado .....	29
<b>Figura 11:</b> A infusão intra-amígdala de drogas que aumentam os níveis de NO melhoram a expressão da memória de esquiva inibitória .....	30
<b>Figura 12:</b> A consolidação da memória de EI necessita a atividade de sGC na amígdala imediatamente após o treino .....	31
<b>Figura 13:</b> A consolidação da memória de EI requer a atividade de PKG na amígdala imediatamente após o treino .....	32
<b>Figura 14:</b> A administração na BLA do análogo não-hidrolizável do GMPc, 8-Br- GMPc, melhora a expressão da memória de EI e reverte o efeito amnésico resultante da inibição da NOS e do sGC, porém não da inibição da PKG.....	33

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

8-Br-GMPc	8-bromoguanosina-3',5'-monofosfato cíclico
BLA	Amígdala basolateral
CO	Monóxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
EI	Esquiva inibitória de sessão única
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GTP	Guanosina trifosfato
L-Arg	L-Arginina
L-NNA	N $\omega$ -Nitro-L-arginina
LTP	Potenciação de longa duração
NMDA	N-metil-D-aspartado
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
PKG	Proteína cinase dependente de GMPc
sGC	Guanilil ciclase solúvel
SNAP	S-nitroso-acetilpenicilamina
SNC	Sistema nervoso central
VEH	Veículo

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
2.1	Objetivo Geral .....	19
2.2	Objetivo Específico .....	19
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
3.1	Amostra.....	20
3.1.1	Animais Experimentais .....	20
3.1.2	Cirurgia Estereotáxica.....	20
3.1.3	Manipulação.....	21
3.2	Protocolos experimentais.....	21
3.2.1	Esquiva inibitória.....	21
3.2.2	Campo Aberto.....	23
3.2.3	Labirinto em Cruz Elevado.....	23
3.2.4	Análise histológica .....	24
3.3	Tratamentos farmacológicos .....	25
3.4	Análise Estatística.....	27
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>28</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>35</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>38</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>39</b>
<b>8</b>	<b>ANEXO – ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	<b>50</b>

# 1 INTRODUÇÃO

O aprendizado e a memória são essenciais para a experiência humana. A memória é o resultado de um processo pelo qual o que é aprendido persiste ao longo do tempo. Logo, aprendizado e memória estão fortemente conectados. Tudo o que sabemos foi adquirido por meio de experiências e mantido pela memória, por exemplo, o rosto e o nome de um amigo ou familiar, matemática, um número de telefone, aprender a andar de bicicleta ou tocar uma música no violão. E isso tudo resulta no indivíduo único que cada um de nós é (Squire, 2003).

As memórias podem ser classificadas de acordo com sua duração (memória de trabalho, memórias de curta duração e memórias de longa duração; ver Tabela 1) e conteúdo (memórias declarativas e não declarativas; ver Tabela 2) (Izquierdo, 2002).

**Tabela 1:** Classificação das memórias quanto ao tempo de retenção.

Tipo de Memória	Características
<b>Memória de trabalho</b>	Permanece por frações de segundos a alguns segundos; memória sensorial.
<b>Memória de curta duração</b>	Permanece por minutos ou horas; garante o sentido de continuidade do presente.
<b>Memória de longa duração</b>	Permanece por dias, semanas ou anos; garante o registro do passado autobiográfico e dos conhecimentos do indivíduo.

**Tabela 2:** Classificação das memórias de longa duração de acordo com o seu conteúdo.

Tipo de Memória	Características
<b>Explícitas/ Declarativas</b>	Contêm informações que usualmente sabemos que possuímos e as quais temos acesso consciente. Podem ser <b>Episódicas</b> , que guardam informações acerca de nossas próprias vidas e eventos, ou <b>Semânticas</b> , que armazenam informações acerca do mundo que nos rodeia, mas que lembramos sem saber como, quando e onde as adquirimos.
<b>Implícitas/ Não-declarativas</b>	Contêm informações as quais não temos acesso consciente, tal como o conhecimento procedimental e a informação obtida a partir de aprendizados simples como aqueles produzidos pelo treino em tarefas de condicionamento clássico e habituação.

O processo de formação da memória requer o desencadeamento de três etapas. Primeiramente ocorre a aquisição da informação, fase que corresponde ao aprendizado. Posteriormente acontece a consolidação da memória, que consiste

num processo de filtração das informações relevantes e fixação do traço mnemônico. Finalmente, o acesso à informação caracteriza a evocação, ou lembrança, processo pelo qual uma informação armazenada pode ser requisitada para uso na cognição, emoção ou expressão de um comportamento (Izquierdo *et al.*, 1998).

O Sistema Nervoso Central (SNC) possui diversos mecanismos biológicos, os quais regulam todas as funções corpóreas. Esses mecanismos podem ser modulados, de modo que suas funções podem ser ativadas ou desativadas, estimuladas ou inibidas, fortalecidas ou enfraquecidas de acordo com a necessidade de cada momento. Da mesma forma, a memória, uma função do SNC, pode ser modulada por situações que ocorrem nos momentos de sua formação, já que durante este período o traço mnemônico é lábil e suscetível a interferências, até que seja consolidado completamente (Cahill & McGaugh, 1998).

Os sistemas moduladores consistem em diversos conjuntos de fibras que terminam de modo difuso em vastas áreas do SNC. Essas fibras se originam de núcleos localizados no tronco encefálico, no diencefalo e no prosencéfalo basal e atuam por meio de neurotransmissores clássicos e bem conhecidos, especialmente as aminas e a acetilcolina. Os principais sistemas moduladores são: noradrenérgico, dopaminérgico, serotoninérgico, colinérgico e histaminérgico (Barros *et al.*, 2001; Cahill & McGaugh, 1998; Izquierdo & McGaugh, 2000).

O papel das vias sinalizadoras intracelulares, envolvendo a atividade de moléculas mensageiras e a modulação da atividade de enzimas, já foi bem caracterizado. Entre estas últimas, as proteínas quinases, responsáveis por modificações covalentes em substratos neuronais específicos, demonstraram a importância do processo de fosforilação para a sinalização intracelular e para a manutenção temporária da facilitação da transmissão sináptica subjacente à plasticidade (Micheau & Riedel, 1999).

Contudo, além dos sistemas de neurotransmissores já conhecidos, o SNC faz uso de neuromoduladores, que diferem dos primeiros nos locais de ação. Os neurotransmissores são aqueles que exercem suas ações diretamente sobre os receptores de membrana, produzindo então um potencial pós-sináptico, este podendo ser excitatório ou inibitório, enquanto que os neuromoduladores são substâncias atuantes na sinapse, na membrana pós-sináptica, na pré-sináptica e mesmo nas vesículas sinápticas. Conceitualmente o neuromodulador influencia a

ação do neurotransmissor sem modificá-la essencialmente, ou seja, modula a transmissão sináptica.

Os neuromoduladores mais estudados atualmente são o óxido nítrico (NO) e o monóxido de carbono (CO), que são moléculas gasosas muito pequenas, produzidas por enzimas específicas existentes em alguns neurônios. Ao serem sintetizados, suas moléculas difundem-se imediatamente através da membrana em todas as direções. Por essa razão não há possibilidade de contê-las em vesículas ou grânulos de secreção, e também por esse motivo sua ação é pouco específica, atuando tanto nos elementos pós-sinápticos, quanto nos pré-sinápticos e até mesmo em sinapses vizinhas. Quando atuam retrogradamente, provocam uma facilitação da transmissão sináptica que causou a sua síntese e liberação, criando-se um circuito de retroação positiva, em que os neuromoduladores gasosos agem aumentando cada vez mais a transmissão sináptica que os origina, e esta cada vez mais a ação dos gases. Em função disso, tem-se admitido a hipótese de que esses neuromoduladores estejam ligados a processos moleculares de memória (Lent, 2004; Kandel, 2003).

O NO é um radical livre, gasoso, inorgânico, encontrado no ar atmosférico em pequenas quantidades. As suas propriedades químicas fazem dele um composto potencialmente tóxico, por ser extremamente reativo. O NO é sintetizado a partir da oxidação do aminoácido L-arginina por uma família de enzimas conhecidas coletivamente pelo nome de óxido nítrico sintases (NOS). Existem três isoformas desta enzima. São estas a NOS neuronal (nNOS), a NOS endotelial (eNOS) e a NOS induzível (iNOS) (Forstermann *et al.*, 1991; Bredt *et al.*, 1992). Entre outras propriedades do NO, cabem destacar três que resultam essenciais para determinar sua funcionalidade biológica. Assim sendo, o NO atravessa as membranas lipídicas prontamente e, portanto, é capaz de afetar não só as células que o produzem e liberam, senão também outras vizinhas, sem necessitar para tanto agir através de receptores de superfície, atuando como mensageiro transcelular. Porém, sua natureza gasosa determina que a meia-vida do NO seja extremamente curta, condicionando assim o tempo durante o qual ele pode agir nos seus alvos moleculares.

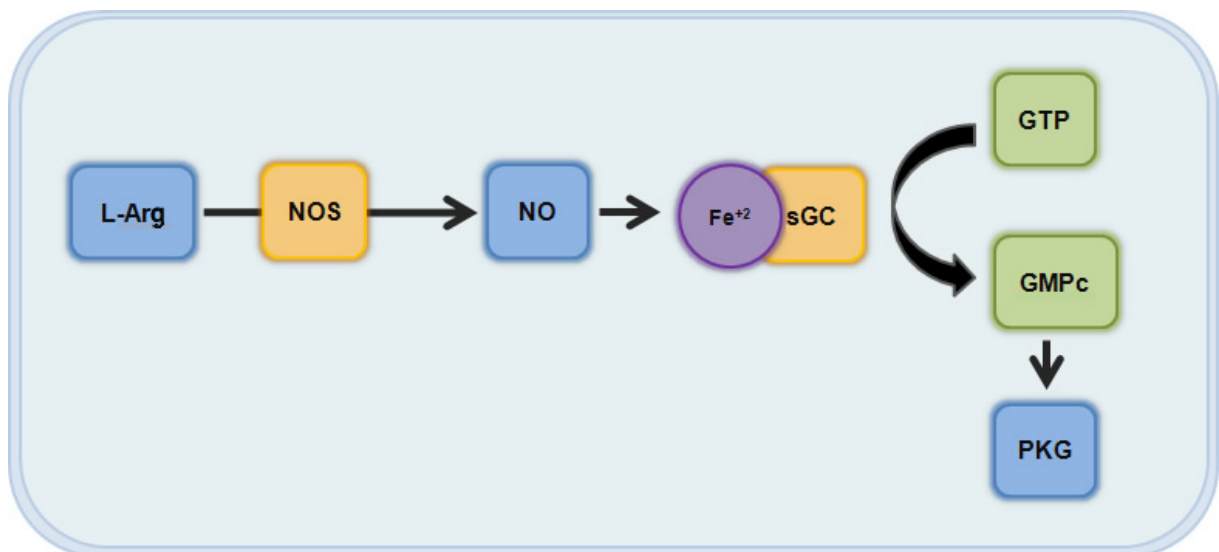
As funções do NO até hoje descobertas são complexas e antagônicas. Um aspecto marcante desta molécula é a sua capacidade de ser benéfica ou potencialmente tóxica, de acordo com sua concentração ou depuração tecidual. O

NO constitui um importante mensageiro intercelular nos mamíferos superiores. O mecanismo de sinalização intercelular é, em geral, realizado através de receptores de membrana celular na célula alvo; estes receptores são, habitualmente, transmembranosos tendo contato com o citoplasma e desencadeando uma cascata de sinais intracelulares que finalizarão em uma mudança na célula. Como já foi descrito anteriormente, devido a suas características químicas de alta difusibilidade, a sinalização do NO é exercida diretamente intracelularmente, sem receptores transmembranosos. Devido à sua penetração intracelular facilitada, sem intermediários membranosos, o organismo utiliza o NO em funções fisiológicas nas quais é necessária uma resposta rápida. Logo, o NO modula diferentes processos fisiológicos (ver Tabela 1), incluindo a progressão da resposta do sistema imune (Coleman, 2001), da inflamação (Sharma *et al.*, 2007), regula a homeostase do sódio, assim como a excreção renal (Pollock & Pollock, 2008), o fluxo sanguíneo e a liberação de oxigênio aos tecidos (Buerk, 2007). No sistema nervoso, o NO pode atuar como mensageiro retrógrado (Son *et al.*, 1996) regulando a liberação de neurotransmissores e neuropeptídeos de maneira dependente de sua atividade (Hanbauer *et al.*, 1992). O óxido nítrico tem sido aceito como um novo mensageiro neuronal (Bredt *et al.*, 1992; Dawson *et al.*, 1992; Garthwaite, 1991; Moncada *et al.*, 1991), que demonstra atuar como mensageiro retrógrado nos receptores NMDA, mediando a potenciação de longa duração (LTP), a qual é considerada um modelo celular de certas formas de memória (Bliss & Collingridge, 1993).

**Tabela 3: Efeitos do óxido nítrico como mensageiro ou toxina no mesmo tecido, conforme concentração tissular relativa.**

<b>Sistema</b>	<b>NO como mensageiro</b>	<b>NO como toxina</b>
<b>Sistema cardiovascular</b>	Antitrombótico, antiaterosclerótico; proteção à isquemia, antiadesivo plaquetário, perfusão coronariana.	Choque séptico, inflamação, extravasamento microvascular, síndrome de reperfusão após isquemia.
<b>Sistema broncopulmonar</b>	Manutenção ventilação-perfusão, motilidade bronquiolar, secreção de muco, defesa imune.	Alveolite autoimune.
<b>Sistema renal</b>	Feedback túbulo-glomerular, perfusão glomerular, secreção de renina.	Glomerulonefrite.
<b>Sistema nervoso central</b>	Vasodilatador, neuromodulador, memória tardia.	Neurotoxicidade, aumento da irritabilidade (pró-convulsivo), enxaqueca, hiperalgesia.

A sinalização pelo NO é mediada principalmente pela forma solúvel da guanilil ciclase (sGC) (Arnold *et al.*, 1977; Marsault & Frelin, 1992; Davis *et al.*, 2001). A ligação do NO ao grupo heme do sítio ativo da sGC aumenta a atividade desta enzima, convertendo cataliticamente a guanosina trifosfato (GTP) ao segundo mensageiro guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (Murad, 2004). O GMPc regula canais iônicos (Thompson, 1997) e é outro segundo mensageiro citoplasmático altamente difusível que ativa uma proteína cinase específica, a proteína cinase dependente de GMPc (PKG) (Figura 1). Por sua vez, a PKG promove a mobilização das vesículas sinápticas no terminal pré-sináptico levando ao aumento da liberação de neurotransmissores e também induzindo a ativação da maquinaria de transcrição neuronal (Lu *et al.*, 1999), bem como a montagem do spliceosoma (Wang *et al.*, 1999), dois processos necessários para a consolidação de memórias (Gold, 2003; Colombo, 2004).



**Figura 1: Cascata de sinalização NO/sGC/PKG.** A L-arginina é convertida em NO pela óxido nítrico sintase. O NO se liga ao grupo heme da sGC, causando a conversão de GTP em GMPc, o qual irá ativar a PKG.

De fato, muitos estudos sugerem que o NO tem um papel essencial no processamento mnemônico e na plasticidade sináptica, inclusive na potenciação de longa-duração (LTP), um processo plástico dependente da atividade elétrica, que muitos acreditam ser um dos substratos celulares da formação de memórias (Hölscher & Rose, 1992; Böhme *et al.*, 1993; Stevens & Wang, 1993; Rickard, Ng & Gibbs, 1994; Mogensen *et al.*, 1995; Bernabeu *et al.*, 1995; Baratti & Kopf, 1996; Telegdy & Kokavszky, 1997; Susswein *et al.*, 2004). Evidências demonstram que



inibidores da NOS, tais como a L-Nitro-Arginina e L-Nitro-Arginina-Metil-Éster bloqueiam a indução da LTP hipocampal (Mizutani, 1993; Zorumski, 1993), assim como os inibidores da sGC. Inversamente, análogos do GMPc produzem uma elevação duradoura do potencial pós-sináptico excitatório, associado com um aumento na atividade da PKG (Arancio *et al.*, 1995).

Estudos comportamentais revelam que o NO é necessário para a consolidação das memórias associadas a diferentes tarefas comportamentais. Assim, a administração sistêmica de inibidores da NOS produz déficits no aprendizado da tarefa de esQUIVA inibitória em aves (Hölscher & Rose, 1992) bem como no aprendizado espacial em ratos submetidos aos labirintos radial e aquático (Chapman *et al.*, 1992; Böhme *et al.*, 1993; Hölscher *et al.*, 1995; Yamada *et al.*, 1995; Noda *et al.*, 1997; Majlessi, *et al.*, 2003; Koylu *et al.*, 2005), além de prejudicar a memória olfatória na tarefa de reconhecimento social (Böhme *et al.*, 1993). Investigações a respeito do papel do NO hipocampal, nos processos relacionados à memória têm comprovado que a inibição da NOS no hipocampo de ratos prejudica a memória de trabalho na tarefa de múltipla escolha (Ohno, Yamamoto & Watanabe, 1993) e a retenção da memória na tarefa de esQUIVA inibitória (Bernabeu *et al.*, 1995; Fin *et al.*, 1995; Huang & Lee, 1995).

Com relação ao papel do GMPc na formação de memórias, experimentos usando a tarefa de esQUIVA inibitória em ratos, demonstraram um aumento nos níveis de GMPc no hipocampo imediatamente após o treino. Utilizando a administração de um análogo do GMPc no hipocampo imediatamente após o treino, verificou-se também um aumento da expressão da memória (Bernabeu *et al.*, 1996), e uma elevação da atividade da PKG imediatamente após o treino (Bernabeu *et al.*, 1997). Além disso, a administração periférica de inibidores da nNOS prejudicam (Prickaerts *et al.*, 1997), enquanto que doadores de NO aumentam (Pitsikas *et al.*, 2005) a retenção da memória de curta duração no paradigma de reconhecimento de objetos.

Evidências experimentais indicam que o núcleo basolateral da amígdala (BLA) modula a consolidação de memórias com forte conteúdo emocional (McGaugh, 2004). Sabe-se ainda que estímulos aversivos tais como os utilizados nas tarefas de aprendizado de medo condicionado ativam sistemas hormonais relacionados ao estresse e modificam a liberação de diferentes neurotransmissores na amígdala (Ma & Morilak, 2005; Morilak *et al.*, 2005; Delaney, Crane & Sah, 2007).

Embora tenha sido demonstrado recentemente que a inibição da NOS durante o período imediatamente anterior ao treino, bloqueia a aquisição da memória condicionada ao medo (Schafe *et al.*, 2005), pouco se conhece a respeito do papel do óxido nítrico na amígdala durante a consolidação de memórias aversivas.

A amígdala trata-se de uma estrutura cerebral localizada no lobo temporal, que faz parte do sistema límbico e é de enorme relevância uma vez que é responsável pelo recebimento de informações de natureza emocional, tais como as memórias de medo, conectando-as com informações mnemônicas em processo de consolidação, fortalecendo ou enfraquecendo a retenção do traço. Esse papel modulador é de difícil verificação em seres humanos, todavia sabe-se do envolvimento da amígdala humana em memórias de tipo emocional, devido a estudos com pacientes com lesão nesta estrutura e indivíduos normais submetidos a métodos de imagem funcional (Lent, 2004).

Com base no descrito acima, decidimos avaliar em ratos, o efeito na expressão de memórias aversivas, da administração de diferentes compostos que atuam sobre a via de sinalização NO/sGC/PKG, no núcleo basolateral da amígdala. Para tanto, foi utilizado o paradigma denominado Esquiva Inibitória de Sessão Única (EI) em combinação com a infusão de drogas na BLA, a qual está envolvida na consolidação de memórias aversivas.

A esquiva inibitória é uma tarefa aversiva de apenas uma sessão, na qual o animal aprende a inibir uma resposta para evitar receber um choque elétrico de baixa intensidade, levando então a formação de uma memória. A esquiva tornou-se um dos modelos de paradigma de aprendizado mais utilizados, pois permite, após o aprendizado, a determinação precisa do momento no qual os tratamentos farmacológicos utilizados nos estudos afetam a consolidação da memória, algo difícil de discernir em outras tarefas que requerem mais de uma sessão de treino (Cammara *et al.*, 2004). As características da tarefa de esquiva inibitória de única sessão constituem-se em uma escolha quase obrigatória para os estudos acima mencionados, pois:

1. Esta tarefa está baseada em um comportamento universal e inato: a aversão produzida pelo medo.
2. Para a aquisição duradoura da resposta condicionada, somente uma sessão de treino é necessária, o que permite fazer uma clara distinção entre os eventos relacionados com a consolidação do traço e aqueles envolvidos com sua expressão.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Verificar a participação da via de sinalização da NO/sGC/PKG na amígdala sobre a consolidação de memória aversivas em ratos Wistar.

### **2.2 Objetivo Específico**

Investigar o efeito da infusão bilateral na amígdala basolateral de inibidores da via de sinalização NO/GMPc/PKG, L-NNA, LY83583 e KT5823, em diferentes tempos após o treino na tarefa de esquiva inibitória.

Investigar o efeito da infusão na amígdala basolateral dos ativadores da via de sinalização, L-Arg, SNAP e 8-Br-GMPc, em diferentes tempos após o treino na tarefa de esquiva inibitória.

Verificar se o possível efeito amnésico causado pela infusão intra-amígdala de LY-83583, KT-5823, L-NNA pode ser revertido com a co-infusão de um análogo não- hidrolisável do GMPc, o 8-Br-GMPc, imediatamente após o treino na tarefa de esquiva inibitória.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Amostra

A amostra é constituída por ratos Wistar, machos, adultos, submetidos à cirurgia estereotáxica, como será descrito a seguir.

##### 3.1.1 Animais Experimentais

Foram utilizados ratos Wistar, machos de 3 meses de idade, pesando em média 300 g. Os animais permaneceram alojados em caixas-moradia, agrupados em 5 por caixa, em ambiente climatizado (temperatura de 21-23° C), submetidos a um ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e comida *ad libitum*. Os animais foram adquiridos pela Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) e mantidos no biotério do Centro de Memória do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS. Foram tomadas precauções com o intuito de minimizar o sofrimento dos animais e de reduzir o número de animais utilizados. Todos os experimentos realizados estiveram de acordo com as normas dos “*Principles of laboratory animal care*” (NIH publication N° 85-23, revised 1996).

##### 3.1.2 Cirurgia Estereotáxica

Para fim de experimentação farmacológica, os animais utilizados foram submetidos à cirurgia estereotáxica (Figura 2) para implantação bilateral de cânulas guia de 0,2 mm de calibre, posicionadas 1,0 mm acima da amígdala basolateral, seguindo as coordenadas (A -2,3; L  $\pm$ 4,6; V -8,4 mm) do Atlas de Paxinos e Watson (1986). Através destas cânulas-guia foram infundidos diferentes fármacos.

Todo o procedimento foi realizado com os animais previamente anestesiados com ketamina, juntamente com Xilazina, que tem efeito sedativo, miorrelaxante e analgésico, administrados intra-peritonealmente (*i.p.*), nas doses de 75 mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente. Uma vez recuperados da anestesia, os

animais eram recolocados em suas caixas-moradia. Os mesmos ficavam em recuperação durante 4 dias antes de serem submetidos a qualquer procedimento.



**Figura 2: Cirurgia estereotáxica.** Implantam-se estereotaxicamente no crânio dos animais cânulas-guia direcionadas 1,0 mm acima da amígdala basolateral destes animais, conforme coordenadas adaptadas do Atlas anatômico de Paxinos e Watson (1986).

### 3.1.3 Manipulação

No quinto dia após a cirurgia, os animais foram submetidos a duas sessões de manipulação. Durante cada sessão eram levados do biotério até a sala onde os experimentos seriam conduzidos, retirados da gaiola e manuseados durante 2 minutos.

## 3.2 Protocolos experimentais

### 3.2.1 Esquiva inibitória

A esquiva inibitória baseia-se no aprendizado associativo estabelecido por Pavlov. Trata-se de um paradigma de condicionamento ao medo muito utilizado, no qual o estímulo condicionado é a parte segura da caixa, a plataforma, o estímulo incondicionado é um choque nas patas do animal quando o mesmo desce da plataforma e a resposta condicionada é permanecer na área segura, resultando no

aumento da latência de descida da plataforma após a exposição ao estímulo incondicionado (Camarota *et al.*, 2004; Bevilaqua *et al.*, 2003).

O aparato utilizado na tarefa de esquiva inibitória consiste em uma caixa nas dimensões 50 x 25 x 25 cm (L x A x C), com uma plataforma do lado esquerdo, medindo 5 cm de altura, 8 cm de largura e 25 cm de comprimento, e barras metálicas que constituem o assoalho da caixa e podem conduzir corrente elétrica. Durante o treino, o animal era colocado cuidadosamente na plataforma. Ao descer da plataforma e colocar as quatro patas no assoalho metálico, recebia um choque elétrico de 0,5 mA por 2 segundos e era imediatamente retirado da caixa. A retenção da memória na esquiva inibitória foi avaliada em uma sessão de teste realizado 24 horas depois do treino. No teste, o animal treinado era colocado novamente na plataforma da caixa de treino e se fazia a medição do tempo até ele descer ao assoalho com as quatro patas. O procedimento utilizado na sessão de teste era idêntico ao empregado na sessão de treino, exceto que ao descer da plataforma o animal não recebia choque. Para as sessões de treino e teste foram adotados tempos máximos de descida, sendo 30 segundos para a sessão de treino e 300 segundos para a sessão de teste, após os quais o animal era devolvido à sua caixa moradia. Aqueles animais que durante a sessão de treino não desceram da plataforma antes de transcorridos 30 segundos foram eliminados do estudo.



**Figura 3: Esquiva inibitória.**

No momento da infusão da droga, uma agulha de infusão 30-gauge era colocada dentro da cânula implantada. As infusões (0,5  $\mu$ L/lado) se davam ao longo

de 60 segundos e a agulha de infusão ficava no lugar por mais 60 segundos para evitar refluxo. A localização exata do implante das cânulas foi verificada *postmortem* através de análise histológica.

### 3.2.2 Campo Aberto

A fim de verificar se a atividade locomotora e o comportamento exploratório dos animais não estavam alterados devido aos tratamentos farmacológicos, utilizou-se a tarefa denominada de campo aberto. O aparelho utilizado nesta tarefa consiste em uma caixa de madeira com dimensões de 60 x 40 x 50 cm (comprimento x profundidade x altura) com a sua parede frontal de vidro transparente, sendo o assoalho da caixa dividido em 12 quadrantes iguais. Vinte e quatro horas após a infusão do fármaco na BLA, o animal era gentilmente colocado na arena do campo aberto e deixado ali para explorar a caixa livremente por 5 minutos. Foram registrados o número de linhas cruzadas e o número de elevações (em inglês *rearings*), e tomados como indicadores de locomoção e atividade exploratória respectivamente (Bonini *et al.*, 2006).



**Figura 4: Campo Aberto**

### 3.2.3 Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz elevado constitui um modelo animal utilizado em estudos para a compreensão de processos neurobiológicos associados à ansiedade (Da

Silva *et al.*, 2006). O aparato consiste em dois braços abertos, medindo 50 x 10 cm, dispostos perpendicularmente a dois braços fechados por paredes laterais desprovidas de teto, medindo 50 x 10 x 40 cm. O labirinto fica elevado a uma altura de 1 metro do chão.

No intuito de verificar possíveis alterações causadas pela infusão dos fármacos no estado de ansiedade dos animais, 24 horas após a administração farmacológica os mesmos eram colocados no centro do labirinto em cruz elevado e ficavam livres para explorá-lo. Durante uma sessão de 5 minutos, foram registrados o número total de entradas nos quatro braços, bem como o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos (Bevilaqua *et al.*, 2003; Kerr *et al.*, 2005).



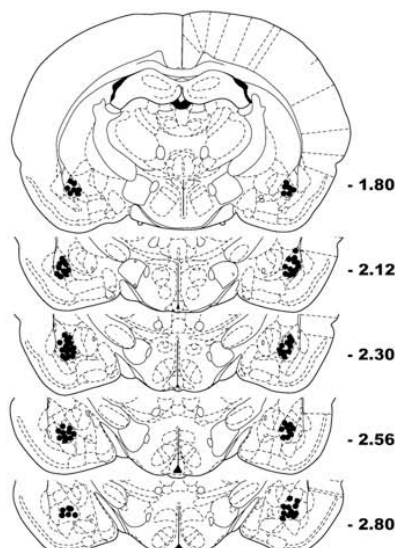
**Figura 5: Labirinto em cruz elevado**

#### 3.2.4 Análise histológica

Duas a quatro horas após o último teste comportamental, se infundia 0,5 $\mu$ L de azul de metileno 4% como descrito acima e os animais eram sacrificados através de decapitação 30 minutos após, tempo provável de difusão da droga ou veículo administrado. O cérebro era retirado e colocado em formol 10% por pelo menos 4 dias, com um volume de formol 3 vezes maior que o volume do cérebro. Após esse período o cérebro era fatiado e as fatias que envolvem a amígdala eram analisadas



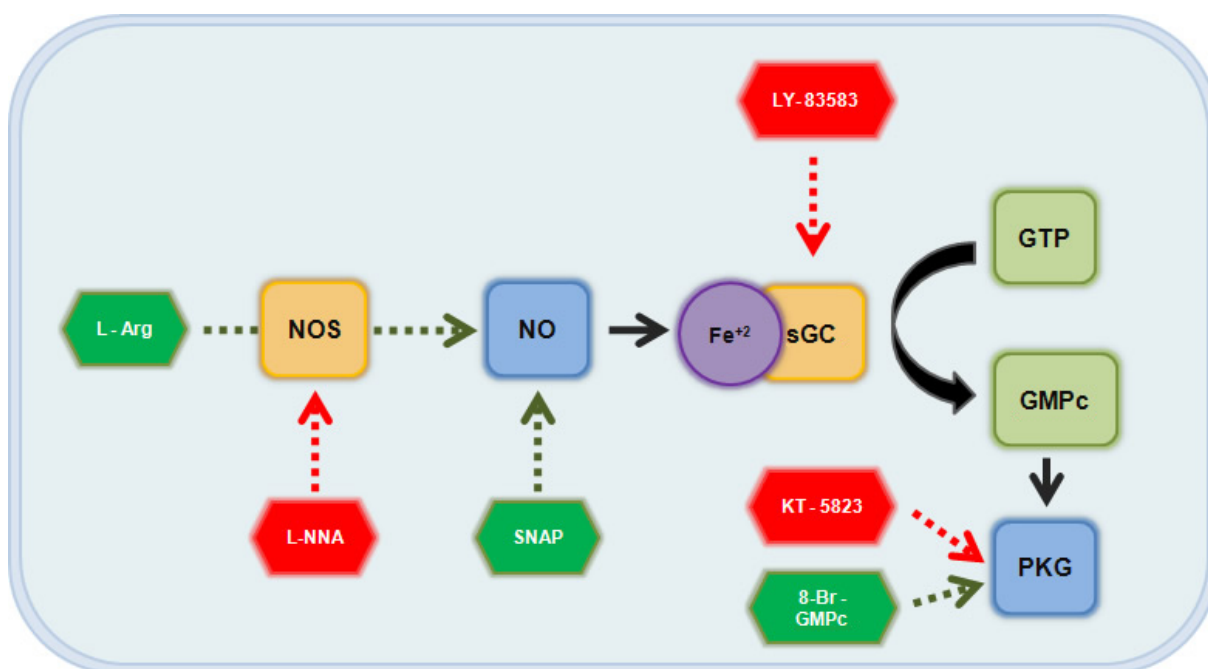
em lupa, em aumento de 10 vezes. Apenas dados de animais com as cânulas implantadas corretamente foram incluídos nas análises estatísticas.



**Figura 6: Representação esquemática de cortes histológicos de hemisfério cerebral.** A parte grifada mostra a área alvo das infusões realizadas nos experimentos apresentados nesta dissertação. Animais nos quais a infusão de azul de metileno, realizada durante a verificação de posicionamento das cânulas, estava fora da área indicada acima não foram considerados durante a análise dos dados.

### 3.3 Tratamentos farmacológicos

Os fármacos utilizados neste estudo são L-Arginina (L-Arg), N $\omega$ -Nitro-L-arginina (L-NNA), KT-5823 e 8-bromoguanosina-3',5'-monofosfato cíclico (8-Br-GMPc) obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). 6-Anilinoquinoline-5,8-quinona (LY-83583) e S-nitroso-acetilpenicilamina (SNAP) foram obtidos da Calbiochem (La Jolla, CA, USA). A L-Arginina trata-se do substrato para a síntese do NO. O L-NNA é um potente inibidor da NOS. KT-5823 é um inibidor seletivo da proteína kinase G. O 8-Br-GMPc é um ativador da PKG. LY-83583 é um inibidor da sGC. SNAP é um doador de NO. As ações dos fármacos podem ser visualizadas na figura 7.

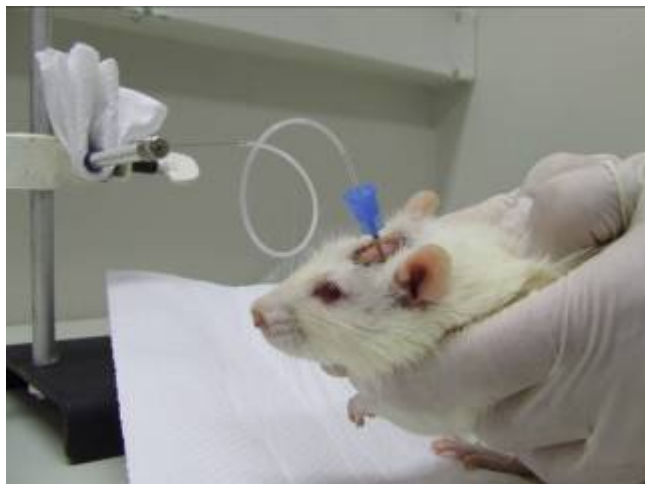


**Figura 7: Cascata de sinalização do NO/sGC/PKG e ação dos fármacos sobre a mesma.** As linhas pontilhadas indicam a ação dos fármacos, sendo que os em vermelho indicam inibição, enquanto que os verdes, ativação dos seus substratos.

Os fármacos doadores de NO e substratos foram preparados imediatamente antes do uso, uma vez que sofrem degradação. Os fármacos foram dissolvidos em DMSO ou solução salina 0,9% e armazenados protegidos da luz, a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso. Instantes antes da administração, uma alíquota era degelada e diluída até a concentração de trabalho com 0,1% de DMSO em salina (pH 7.2).

As doses utilizadas foram determinadas baseadas em experimentos pilotos e estudos prévios mostrando o efeito de cada composto sobre o aprendizado ou performance comportamental.

Para a realização do tratamento farmacológico utilizou-se uma micro-seringa Hamilton, acoplada a um tubo de polietileno com uma agulha de infusão (0,05 mm de diâmetro). Foram infundidos bilateralmente  $0,5\ \mu\text{l/lado}$  dos fármacos ou seu veículo (0,1% DMSO em solução salina 0,9%) a uma velocidade de  $0,5\ \mu\text{l/min}$  com o auxílio de uma bomba de infusão (KDSscientific). Ao término, a agulha de infusão era deixada no local por 60 segundos adicionais para evitar refluxo.



**Figura 8: Infusão de fármacos através das cânulas-guia esterotaxicamente implantadas.** A agulha de infusão, 1,0 mm maior em comprimento do que a cânula-guia é introduzida na luz desta, atingindo a região-alvo onde se deseja que o fármaco ou salina sejam infundidos.

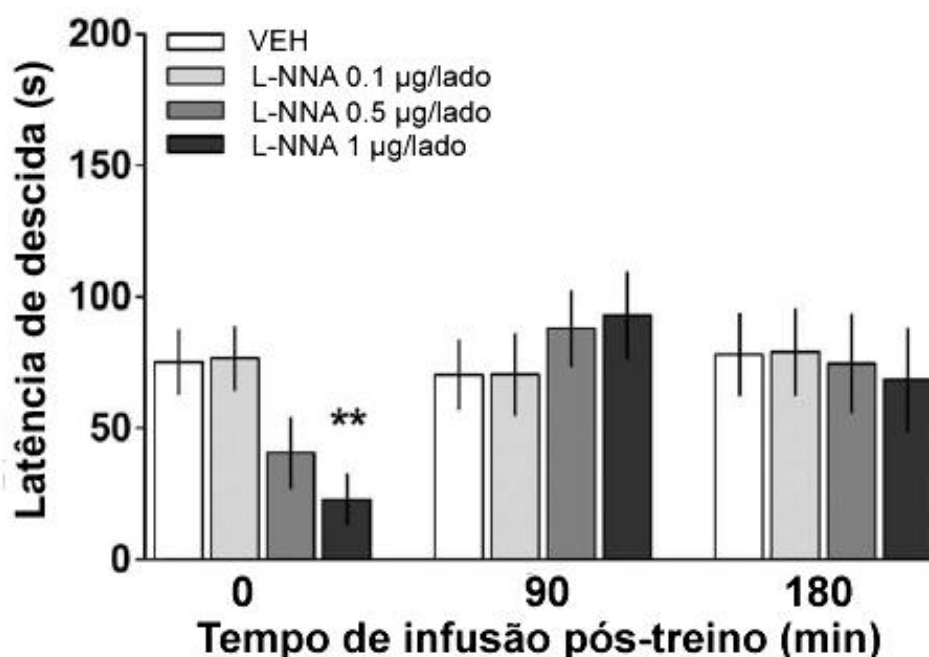
### 3.4 Análise Estatística

Para a análise dos dados obtidos na tarefa de esquiva inibitória foram utilizados testes de estatística paramétrica, sendo eles: ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunnett. Para a análise dos dados das tarefas de campo aberto e do labirinto em cruz elevado foi utilizado teste *t de Student*. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos.

A análise estatística foi realizada utilizando o *software Prism Graph-Pad 5.1*.

## 4 RESULTADOS

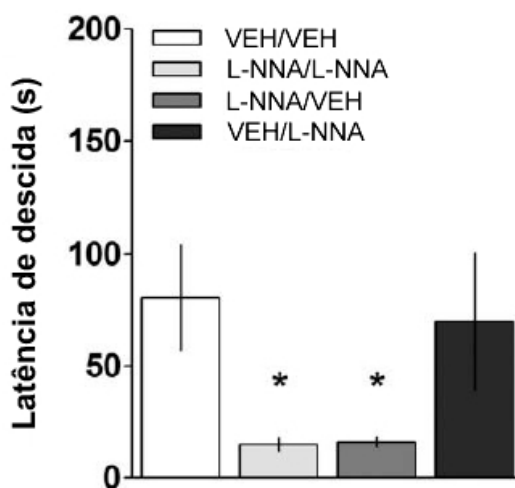
A fim de analisar o efeito da inibição da NOS no processamento da memória aversiva, ratos Wistar machos foram treinados no paradigma da Esquiva Inibitória de sessão única, recebendo, imediatamente após o treino, infusões bilaterais intra-amígdala de veículo (VEH; 0.1% DMSO em salina) ou do inibidor da NOS, N $\omega$ -Nitro-L-arginina (L-NNA). A expressão da memória de esquiva inibitória foi avaliada em uma sessão de teste, sem reforço de choque, realizada vinte e quatro horas após o treino. O L-NNA (0.1-1  $\mu$ g/lado) prejudicou a expressão de forma dose-dependente (Figura 9). Não foi observado efeito significativo sobre a memória de EI quando o L-NNA foi administrado na amígdala 90 ou 180 minutos após o treino, apenas quando administrada imediatamente após o treino.



**Figura 9: A consolidação da memória aversiva requer a atividade da NOS na amígdala imediatamente após o treino.** Os animais foram treinados na tarefa de EI e em diferentes tempos após o treino (0, 90 ou 180 min), receberam infusões bilaterais de veículo (VEH; 0.1% DMSO em salina) ou L-NNA (0.1, 0.5 ou 1  $\mu$ g/lado) na BLA (0.5  $\mu$ l/lado). As barras representam média  $\pm$  erro padrão das latências de descida durante o teste de retenção, realizados 24 horas após o treino. \* $p < 0.05$  vs. VEH, ANOVA seguida de comparações múltiplas de Dunnett;  $n = 12$  animais por grupo.

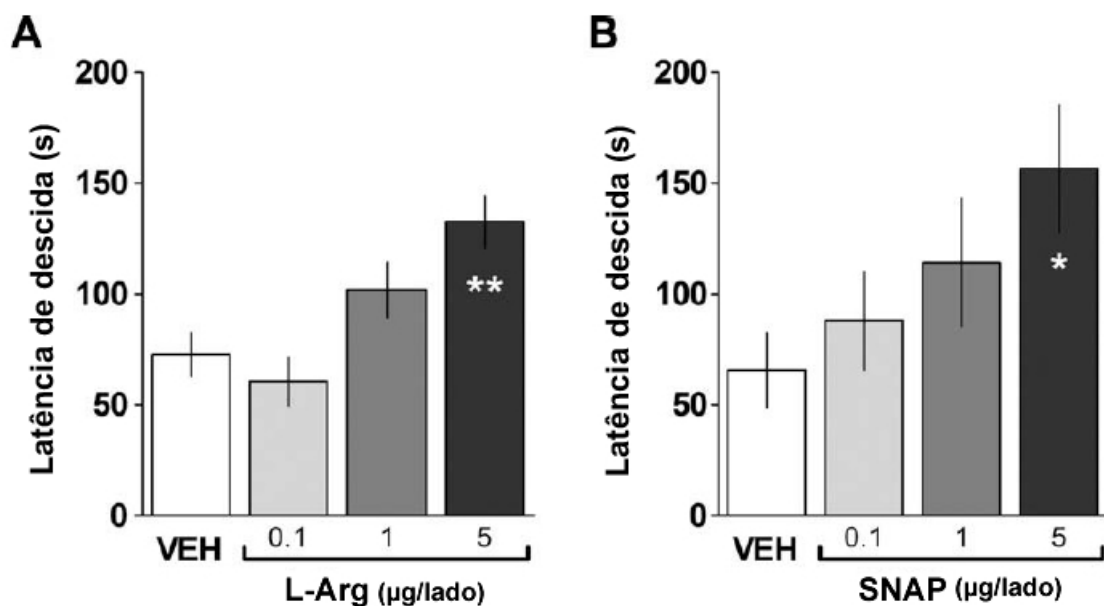
Para analisar se o efeito amnésico da inibição da NOS se devia a dependência de estado, os animais foram treinados na tarefa de EI e imediatamente após o treino receberam a infusão de L-NNA (1µg/lado) ou veículo na BLA. Quinze minutos antes da sessão de teste, realizada 24 horas após a sessão de treino, os mesmos animais receberam a infusão de L-NNA(1µg/lado) ou veículo. Desta forma obtivemos quatro grupos de animais: 1) animais que receberam veículo pós-treino e veículo pré-teste; 2) animais que receberam veículo pós-treino e L-NNA pré-teste; 3) animais que receberam L-NNA pós-treino e veículo pré-teste; e por fim 4) animais que receberam L-NNA pós-treino e L-NNA pré-teste.

Como se pode verificar na figura 10, a infusão de L-NNA imediatamente após o treino acarretou uma fraca retenção da memória de EI nos animais que receberam veículo antes do teste, efeito amnésico este que já havia sido demonstrado anteriormente (Fig. 9). O efeito amnésico obtido pela administração pós-treino de L-NNA não foi revertido pela infusão pré-teste de L-NNA (1µg/lado), indicando que o efeito amnésico de L-NNA não se deve a dependência de estado. Além disso, quando administrado L-NNA (1µg/lado) 15 minutos antes da sessão de teste em animais que haviam recebido veículo imediatamente após o treino, não foi verificado efeito na expressão da memória (Fig 10).



**Figura 10: O efeito amnésico da inibição pós-treino da NOS na amígdala não se deve à dependência de estado.** Os animais foram treinados na tarefa de EI e imediatamente após o treino receberam a infusão (0.5 µl/lado) de veículo (VEH; 0.1% DMSO em salina) ou L-NNA (1 µg/lado) na BLA. Após isso os animais foram divididos em quatro diferentes grupos: dois grupos (VEH/VEH e L-NNA/VEH) receberam infusões bilaterais na BLA de VEH (0.5 µl/lado) e os outros dois grupos (VEH/L-NNA e L-NNA/L-NNA) receberam infusões bilaterais de L-NNA (1 µg/lado), na mesma estrutura, quinze minutos antes da sessão de teste realizada 24 horas após a sessão de treino. As barras representam a média ± erro padrão das latências de descida na sessão de teste. \*p < 0.05 vs. VEH/VEH na comparação múltipla de Dunnett após ANOVA; n = 12–15 por grupo.

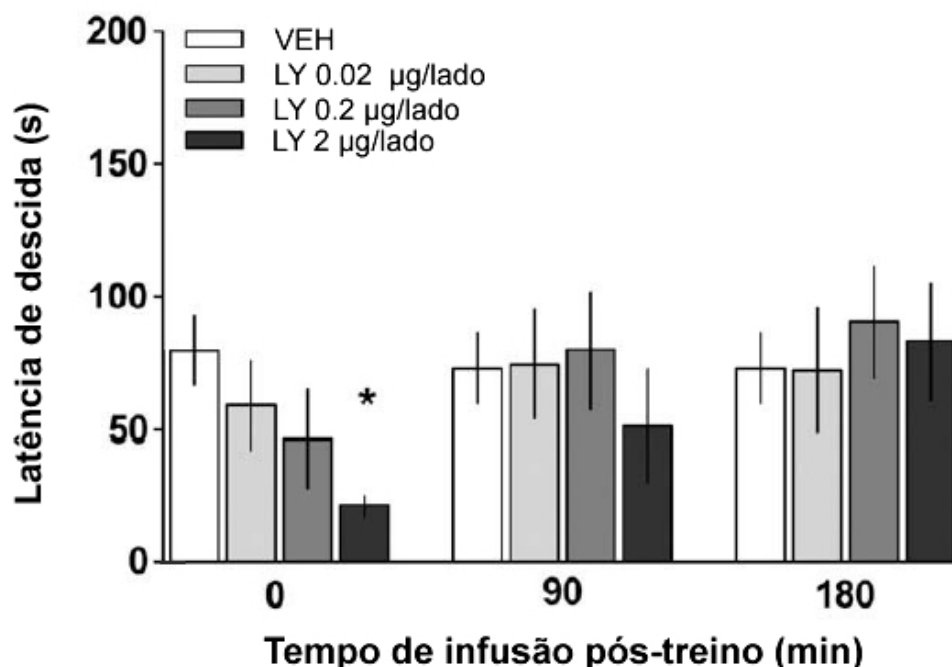
Com o intuito de verificar o efeito dos ativadores da via de sinalização, os animais foram treinados na tarefa de EI e receberam, imediatamente após o treino, diferentes doses do substrato da NOS, L-Arginina (L-Arg), e do composto doador de NO, SNAP. Em contraste com o que ocorreu com o uso de L-NNA, a L-Arg (0.1-5  $\mu\text{g/lado}$ ; Telegdy & Kokavszky, 1997; Khavandgar, Homayoun & Zarrindast, 2003; Yildirim & Marangoz, 2004; Hara *et al.*, 2004), e o SNAP (0.1-5  $\mu\text{g/lado}$ ; Fin *et al.*, 1995; Watts *et al.*, 2005) aumentaram a expressão da memória quando administrados imediatamente após o treino (Fig 11).



**Figura 11: A infusão intra-amígdala de drogas que aumentam os níveis de NO melhoram a expressão da memória de esquivas inibitória.** Os animais foram treinados no paradigma de EI e imediatamente após o treino receberam infusões bilaterais (0.5  $\mu\text{l/lado}$ ) de veículo (VEH; 0.1% DMSO em salina), L-Arg (0.1, 1 ou 5  $\mu\text{g/lado}$ ; ver gráfico A) ou SNAP (0.1, 1 ou 5  $\mu\text{g/lado}$ ; ver gráfico B) na BLA. Barras representam média  $\pm$  erro padrão das latências de descida durante a sessão de teste realizada 24 horas após a sessão de treino. \*\* $p < 0.01$  and \* $p < 0.05$  vs. VEH na comparação múltipla de Dunnett após ANOVA;  $n = 12-15$  por grupo.

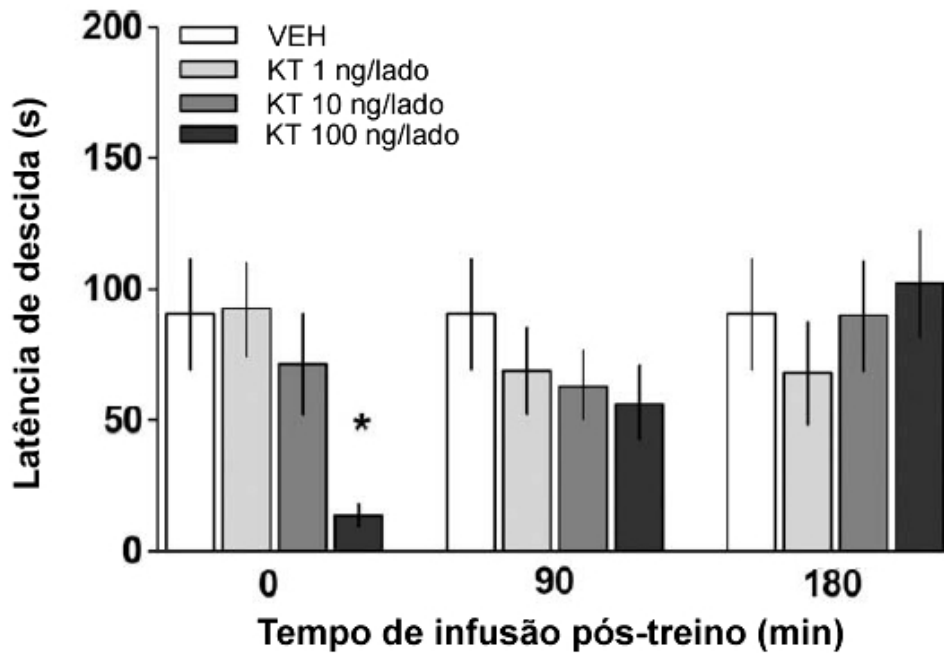
Sabendo que a via de sinalização do sGC/GMPc/PKG regula a maioria das respostas fisiológicas ao NO em diferentes ensaios experimentais (Spolidório *et al.*, 2007; Bouallegue, Daou & Srivastava, 2007; Haghikia *et al.*, 2007; Prieto-Castelló *et al.*, 2007; Kempfert & Behrends, 2003), foi estudada a participação desta cascata de sinalização na retenção da memória de EI. As infusões bilaterais intra-amígdala do inibidor da sGC, LY83583 (0.02-2  $\mu\text{g/lado}$ ; Fig 12) ou do inibidor da PKG, KT-5823 (1-100 ng/lado; Fig 13), imediatamente após o treino bloquearam a expressão da

memória de EI, contudo o mesmo não ocorreu quando as drogas foram administradas 90 ou 180 minutos após o treino.



**Figura 12:** A consolidação da memória de EI necessita a atividade de sGC na amígdala imediatamente após o treino. Os animais foram treinados na EI e em diferentes tempos após o treino (0, 90 ou 180 minutos) receberam a infusão de veículo (VEH; 0.1% DMSO em salina) ou LY83583 (LY; 0.02, 0.2 or 2 µg/lado) na BLA (0.5 µl/lado). As barras representam a média ± erro padrão das latências de descida durante a sessão de teste realizada 24 horas após o treino na EI. \*p < 0.05 vs. VEH na comparação múltipla de Dunnett após ANOVA; n = 12 por grupo.

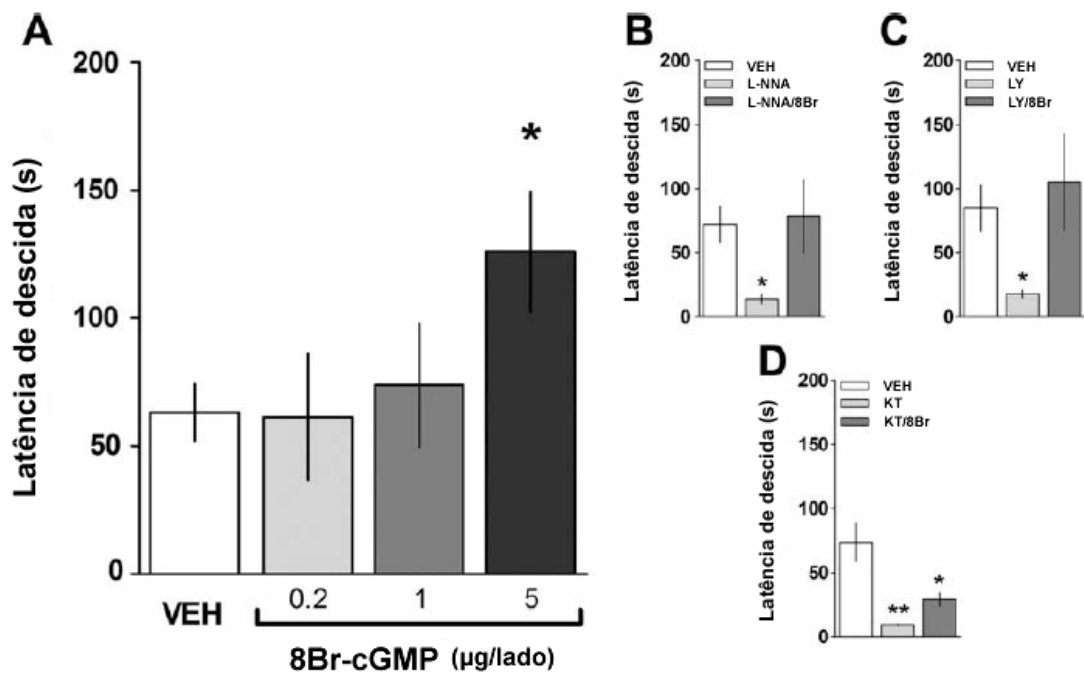
Ao contrário, quando administrado o análogo não-hidrolisável do GMPc, 8-Br-GMPc (0.2-5µg/lado) na BLA, imediatamente após o treino, a memória da EI foi reforçada (Fig. 14A). Tendo em vista o efeito pró-mnésico do 8-Br-GMPc, decidiu-se averiguar se o 8-Br-GMPc poderia reverter o efeito amnésico causado pelos outros fármacos. Para isso foi realizada uma infusão conjunta de 8-Br-GMPc com os outros fármacos. A co-infusão de 8-Br-GMPc (5µg/lado) reverteu o efeito amnésico do L-NNA (1 µg/lado; Fig 14B, grupo L-NNA/8Br) e LY83583 (2 µg/lado; Fig 14C, grupo LY/8Br), entretanto não afetou a amnésia induzida por KT5823 (100 ng/lado; Fig 14D, grupo KT/8Br).



**Figura 13: A consolidação da memória de EI requer a atividade de PKG na amígdala imediatamente após o treino.** Os animais foram treinados no paradigma de EI e em diferentes tempos após o treino (0, 90 ou 180 min) receberam infusões bilaterais de veículo(VEH; 0.1% DMSO em salina) ou KT-5823 (KT; 1, 10 or 100 ng/lado) na BLA (0.5 µl/lado). As barras representam a média ± erro padrão das latências de descida durante o teste de expressão realizado 24 horas após o treino. \* $p < 0.05$  vs. VEH na comparação múltipla de Dunnett após ANOVA;  $n = 12$  por grupo.

No intuito de averiguar se os efeitos dos fármacos utilizados nos experimentos anteriores não se deviam a alterações nas atividades exploratória e locomotora ou no estado de ansiedade dos animais, os mesmos foram submetidos às tarefas de campo aberto e labirinto em cruz elevado, vinte e quatro horas após receberem infusões bilaterais na BLA dos distintos fármacos. Nenhum dos fármacos afetou o desempenho dos animais nestas tarefas, como pode ser observado na tabela 4.





**Figura 14:** A administração na BLA do análogo não-hidrolizável do GMPc, 8-Br-GMPc, melhora a expressão da memória de EI e reverte o efeito amnésico resultante da inibição da NOS e do sGC, porém não da inibição da PKG. (A) Os animais foram treinados na EI e receberam imediatamente após o treino infusões bilaterais (0.5 µl/lado) de veículo (VEH; 0.1% DMSO em salina) ou 8Br-GMPc (0.2, 1 ou 5 µg/lado) na BLA. As barras representam a média ± erro padrão das latências de descida durante a sessão de teste realizada 24 horas após a sessão de treino; \* $p < 0.05$  vs. VEH na comparação múltipla de Dunnett após ANOVA;  $n = 11-12$  por grupo. (B-D) Os animais foram treinados na EI e imediatamente após o treino receberam infusões bilaterais na BLA (0.5 µl/lado) de veículo (VEH; 0.1% DMSO em salina), L-NNA (5 µg/lado), LY83583 (2 µg/lado), KT-5823 (100 ng/lado) ou 8-Br-GMPc (5 µg/lado). Os animais que receberam 8-Br-GMPc ainda receberam L-NNA (gráfico B), LY83583 (gráfico C) ou KT-5823 (gráfico D). As barras representam a média ± erro padrão das latências de descida durante a sessão de teste realizada 24 horas após a sessão de treino; \*\* $p < 0.01$  e \* $p < 0.05$  vs. VEH na comparação múltipla de Dunnett após ANOVA;  $n = 10-14$  por grupo.

**Tabela 4: Infusões de L-NNA, LY83583, KT-5823, SNAP, 8-Br-GMPc ou L-Arg na amígdala não apresentam efeito sobre as atividades locomotoras e exploratória ou sobre o estado de ansiedade.** L-NNA (1µg/lado), LY83583 (2 µg/lado), KT-5823 (100 ng/lado), SNAP (5 µg/lado), 8-Br-GMPc (5 µg/lado), L-Arg (5 µg/lado) ou veículo (VEH; 0.1% DMSO em salina) foram infundidos na BLA 24 horas antes da exposição às tarefas de labirinto em cruz elevado e campo aberto. Os dados são expressos como média ± erro padrão do número total de entradas, do número de entradas nos braços abertos e a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (Labirinto em cruz elevado; n = 8 por grupo) e o número de cruzamentos e elevações (Campo aberto; n = 8 por grupo), teste *t de Student*. Diferentes grupos de animais foram utilizados para cada teste comportamental.

	<b>VEH</b>	<b>L-NNA</b>	<b>LY83583</b>	<b>KT-5823</b>	<b>SNAP</b>	<b>8-Br-GMPc</b>	<b>L-Arg</b>
<b>Total de entradas</b>	15.2 ± 0.9	13.65 ± 0.9	9.7 ± 2.0	13.2 ± 0.8	16.3 ± 1.4	13.1 ± 0.8	12.5 ± 0.9
<b>Entradas nos braços abertos</b>	8.5 ± 0.8	7.0 ± 0.7	5.9 ± 1.6	7.2 ± 0.6	8.3 ± 0.8	7.4 ± 0.6	7.1 ± 0.7
<b>% de tempo nos braços abertos</b>	41.6 ± 3.7	46.9 ± 8.3	44.2 ± 7.9	39.6 ± 3.7	42.9 ± 3.7	39.7 ± 3.6	43.0 ± 3.9
<b>Cruzamentos</b>	42.0 ± 7.9	48.6 ± 8.4	40.1 ± 10.4	54.3 ± 9.7	40.1 ± 5.3	42.0 ± 8.0	44.1 ± 6.5
<b>Elevações</b>	16.7 ± 2.0	20.2 ± 3.6	14.1 ± 4.1	17.6 ± 4.1	17.4 ± 4.7	14.6 ± 3.2	16.3 ± 3.1

## 5 DISCUSSÃO

Nossos resultados estão de acordo com relatos anteriores que sugerem o NO como parte do processamento de memórias aversivas. De fato se sabe que os inibidores da NOS prejudicam a memória aversiva em aves (Holscher & Rose, 1993; Holscher, 1994; Rickard, Ng & Gibbs, 1998), peixes (Xu *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2007), camundongos (Baratti & Kopf, 1996) e ratos (Myslivecek *et al.*, 1996; Qiang *et al.*, 1997; Yildiz Akar *et al.*, 2007; but see Maren, 1998), enquanto os ativadores da NOS e os doadores de NO aumentam a expressão da mesma (Telegdy & Kokavszky, 1997; Khavandgar, Homayoun & Zarrindast, 2003; Yildirim & Marangoz, 2004; Pitsikas *et al.*, 2005). Da mesma forma, drogas que diminuem a sGC ou a atividade de PKG dificultam a memória, enquanto compostos que aumentam os níveis de GMPc intensificam a retenção (Bernabeu *et al.*, 1996; Bernabeu *et al.*, 1997; Chien *et al.*, 2005). Contudo, quase todos os estudos que analisaram a função da via de sinalização do NO no processamento da memória utilizaram injeções sistêmicas ou, no máximo, intra-hipocampais antes do treino. Assim, informações quanto ao papel desempenhado por esta via em outras áreas cerebrais essenciais à consolidação da memória de medo, como a amígdala, são raras. De fato, existem apenas duas publicações a respeito dos efeitos do NO ou agentes moduladores da sGC sobre a memória e plasticidade, quando infundidos na amígdala. Distintos estudos mostram que o derivado de benzilindazole, YC-1, o qual é capaz de ativar a sGC e sensibilizando-a a ação do NO (Ko *et al.*, 1994; Friebe, Schultz & Koesling, 1996; Friebe *et al.*, 1998) intensifica a potenciação de longa duração (LTP) na amígdala (Chien *et al.*, 2003), e a administração pré-treino e pré-teste do inibidor da NOS, 7-nitroindazole, ou do seqüestrador de NO, c-PTIO, na amígdala lateral impede a aquisição e evocação da memória de condicionamento de medo com estímulo auditivo (Schafe *et al.*, 2005).

Neste trabalho encontramos que, quando infundido na BLA, o L-NNA impede a fixação da memória de EI. Esse efeito apenas foi observado quando o L-NNA foi administrado imediatamente após o treino, e 90 ou 180 minutos após o mesmo, sugerindo que a amnésia induzida pela inibição da atividade da NOS se deve à interferência com o processo de consolidação e não ao detrimento da atividade comportamental e/ou evocação da memória. De fato, o L-NNA não modificou o comportamento dos animais no labirinto em cruz elevado, tampouco no campo

aberto, quando administrado 24 horas antes das respectivas sessões comportamentais, o que indicaria mudança no estado de ansiedade e na locomoção e atividade exploratória. O LNNA também não afetou a expressão da memória de EI, quando administrado 15 minutos antes do teste de retenção, realizado 24 horas após a sessão de treino. Além disso, a infusão de L-NNA pré-teste não prejudicou a expressão da resposta aversiva, sequer reverteu a amnésia causada pela sua infusão pós-treino, indicando que o efeito amnésico gerado pela inibição da NOS na amígdala não se deve a dependência de estado. O termo dependência de estado refere-se a um fenômeno no qual uma memória previamente adquirida é mais facilmente evocada se o indivíduo encontra-se no mesmo estado neuro-humoral em que se encontrava no momento da aquisição da mesma. Assim sendo, o estado neuro-humoral participaria da aquisição da memória como mais um fator contextual do aprendizado, agindo como um estímulo condicionado. Esse tipo de acontecimento pode ser observado em diversas substâncias endógenas, como, por exemplo, os hormônios do estresse, e algumas exógenas, como morfina e álcool. Essa observação é importante, uma vez que foi relatado que a inibição da NOS hipocampal induz um déficit na memória de reconhecimento, ocasionada por este fenômeno (Blokland *et al.*, 1998), e que o NO modula uma amnésia estado-dependente causada pela administração pré-treino de morfina e lítio (Khavandgar, Homayoun & Zarrindast, 2003; Zarrindast, Shendy & Ahmadi, 2007).

A função desempenhada pelo NO/sGC/PKG na amígdala durante a consolidação da memória de EI foi ainda corroborada por experimentos mostrando que: 1) o substrato da NOS, L-Arg, e o doador de NO, SNAP, melhoram a expressão da memória aversiva de forma dose-dependente; 2) o inibidor da sGC, LY-83583, e o inibidor da PKG, KT 5823, mimetizaram o efeito amnésico do L-NNA, ao passo que o análogo não-hidrolizável do GMPc, 8-Br-GMPc, aumentou a expressão e ainda reverteu a amnésia induzida por L-NNA e LY-83583, mas não a de KT5823. Esses achados indicam que a indução farmacológica do aumento dos níveis de NO na amígdala podem melhorar a memória e que o provável mecanismo, através do qual o NO produz alterações fisiológicas envolvidas na consolidação da memória na amígdala, implica na ativação sequencial de sGC e PKG.

A primeira evidência de que o NO aumenta os níveis de GMPc em diferentes preparações de tecidos, incluindo o cérebro, foi estabelecida por Arnold e colaboradores (Arnold *et al.*, 1977) e foi confirmada posteriormente por Gerzer,

Hofmann & Schultz (1981), que purificaram o nitroprussiato de sódio solúvel de pulmão, que estimula a atividade da sGC, e posteriormente por Garthwaite, Charles & Chess-Williams (1988) e Bredt & Snyder (1989). De fato, existem muitas evidências a respeito da importância da regulação da via sGC/PKG mediada por NO na plasticidade. Por exemplo, se sabe que a LTP e a depressão de longa duração (LTD) necessitam da atividade de sGC e PKG no hipocampo (East & Garthwaite, 1991; Chetkovich, Klann & Sweatt, 1993; Arancio, Kandel & Hawkins, 1995; Boulton, Southam & Garthwaite, 1995; Bon & Garthwaite, 2003; Zhuo, Kandel & Hawkins, 1994; Gage, Reyes & Stanton, 1997; Stanton *et al.*, 2003), assim como no córtex visual (Haghikia *et al.*, 2007), no cerebelo (Shin & Linden, 2005), na medula espinhal (Zhang, Zhang & Zhao, 2006) e na amígdala (Chien *et al.*, 2003). Diversos estudos comportamentais e farmacológicos, incluindo relatos muito recentes (Domek-Łopacińska & Strosznajder, 2008; Wang *et al.*, 2008) apontam para a existência de uma ligação causal entre a síntese de NO e o aumento dos níveis de GMPc e da atividade da PKG, importante para a memória. Ainda que as vias de sinalização controladas por PKG durante o processamento da memória não sejam conhecidas, achados recentes mostram que a ativação farmacológica de sGC durante o treino na esquiwa de duas vias melhora o aprendizado, aumenta a fosforilação de ERK1/2 e Akt e potencializa a expressão de BDNF e CREB na amígdala (Chien, Liang & Fu, 2008), sugerindo que a ativação da transcrição de CREB mediada por ERK pode ser um alvo da PKG importante para a consolidação. De fato, se sabe que em neurônios, o NO promove a ativação de CREB dependente de GMP, e estimula a S-nitrosilação de proteínas nucleares que favorecem a ligação do CREB com seus promotores alvo. Tem sido relatado também que a via NO/GMPc/PKG contribui para a fosforilação do CREB induzida durante a LTP no hipocampo, através de um mecanismo envolvendo um aumento da liberação de  $Ca^{2+}$  intracelular.

## 6 CONCLUSÕES

A partir da análise dos resultados obtidos neste trabalho, se pode concluir que os inibidores da via de sinalização em estudo, L-NNA, LY-83583 e KT-5823, quando infundidos bilateralmente no núcleo basolateral da amígdala de ratos, prejudicam a retenção de memórias aversivas de longa duração relativas à EI, de maneira dose-dependente. Esses efeitos ocorreram quando os fármacos em questão foram infundidos imediatamente após a sessão de treino, não se obtendo o mesmo efeito quando a infusão se dava em outros tempos, como 90 ou 180 minutos após o treino.

Contrariamente a esses fatos, os ativadores da via, como L-Arg, 8-Br-GMPc e SNAP, quando administrados nas mesmas condições anteriores, levaram a uma melhora na retenção da memória, também de forma dose-dependente e apenas quando infundido imediatamente após o treino, o que nos leva a acreditar na necessidade imediata da disparada desta cascata para a consolidação da memória.

Por fim, o 8-Br-GMPc reverteu os efeitos amnésicos causados por L-NNA e LY-83583, porém não reverteu o efeito de KT-5823, pois o 8-Br-GMPc trata-se de um análogo do GMPc e sua ativação é posterior às atividades de L-NNA e LY-83583, os quais constituem um inibidor da NOS e da sGC respectivamente, entretanto é anterior ao efeito do KT-5823 nas cascata, o qual é um inibidor seletivo da PKG.

## 7 REFERÊNCIAS

ARANCIO, O., KANDEL, E. R., HAWKINS, R. D. Activity-dependent long-term enhancement of transmitter release by presynaptic 3',5'-cyclic GMP in cultured hippocampal neurons. **Nature**. 376: 74-80, 1995.

ARNOLD, W. P., MITTAL, C. K., KATSUKI, S., MURAD, F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 74: 3203-7, 1977.

BARATTI, C.M., KOPF, S.R. A nitric oxide synthase inhibitor impairs memory storage in mice. **Neurobiology of Learning and Memory**. 65(3):197-201, 1996.

BARROS, D.M.; MELLO E SOUZA, T.; DE DAVID, T.; CHOI, H.; AGUZZOLI, A.; MADCHE, C.; ARDENGHI, P.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Simultaneous modulation of retrieval by dopaminergic D1,  $\beta$ -noradrenergic, serotonergic1A and cholinergic muscarinic receptors in cortical structures of the rat. **Behavioural Brain Research**. 124: 1-7, 2001.

BERNABEU, R., SCHMITZ, P., FAILLACE, M. P., IZQUIERDO, I., MEDINA, J. H. Hippocampal GMPc and cAMP are differentially involved in memory processing of inhibitory avoidance learning. **Neuroreport**. 7: 585-8, 1996.

BERNABEU, R., SCHRODER N., QUEVEDO J., CAMMAROTA M, IZQUIERDO I, MEDINA J. H. Further evidence for the involvement of a hippocampal GMPc/GMPc-dependent protein kinase cascade in memory consolidation. **Neuroreport**. 8: 2221-4, 1997.

BERNABEU, R.; DE STEIN, M. L.; FIN, C.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Role of hippocampal NO in the acquisition and consolidation of inhibitory avoidance learning. **Neuroreport**, 6 (11): 1498-1500, 1995.

BEVILAQUA, L.R.; ROSSATO, J.I.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Src kinase activity is required for avoidance memory formation and recall. **Behavioural pharmacology**, 14 (8): 649-652, 2003.

BLISS, T.V.P.; COLLINGRIDGE, G.L.. A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, 361(6407): 31-9, 1993.

BLOKLAND, A., PRICKAERTS, J., HONIG, W., DE VENDE, J. State-dependent impairment in object recognition after hippocampal NOS inhibition. **Neuroreport**. 9: 4205-8, 1998.

BÖHME, G. A.; BON, C.; LEMAIRE, M.; REIBAUD, M.; PIOT, O.; STUTZMANN, J. M.; DOBLE, A.; BLANCHARD, J.C. Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 90 (19): 9191-4, 1993.

BON, C. L., GARTHWAITE, J. On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. **The Journal of Neuroscience**. 23,1941-8, 2003.

BONINI, J. S.; BEVILAQUA, L. R.; ZINN, C. G.; KERR, D. S.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Angiotensin II disrupts inhibitory avoidance memory retrieval. **Hormones and Behavior**, 50 (2): 308-13, 2006.

BOUALLEGUE, A., DAOU, G. B., SRIVASTAVA, A. K. Nitric oxide attenuates endothelin-1-induced activation of ERK1/2, PKB, and Pyk2 in vascular smooth muscle cells by a GMPc-dependent pathway. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**. 293: 2072-9, 2007.

BOULTON, C. L., SOUTHAM, E., GARTHWAITE, J. Nitric oxide-dependent long-term potentiation is blocked by a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. **Neuroscience**. 69: 699-703, 1995.

BRETT, D. S., SNYDER, S. H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of GMPc levels in the cerebellum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 86: 9030–9033, 1989.

BRETT, D.S.; SNYDER, S.H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. **Neuron**, 8 (1): 3-11, 1992.

BUERK, D. G. Nitric oxide regulation of microvascular oxygen. **Antioxidants & Redox Signaling**, 9 (7): 829-43, 2007.

CAHILL, L.; MCGAUGH, J.L. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. **Trends in Neurosciences**, 11: 294-299, 1998.

CAMMAROTA, M., BARROS, D. M., VIANNA, M. R., BEVILAQUA, L. R., COITINHO, A., SZAPIRO, G., IZQUIERDO, L. A., MEDINA, J. H. E IZQUIERDO, I. The transition



from memory retrieval to extinction. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 76(3): 573-582, 2004.

CHAPMAN, P. F.; ATKINS, C. M.; ALLEN, M. T.; HALEY, J. E.; STEINMETZ, J. E. (1992). Inhibition of nitric oxide synthesis impairs two different forms of learning. **Neuroreport**, 3 (7): 567-70, 1992.

CHETKOVICH, D. M., KLANN, E., SWEATT, J. D. Nitric oxide synthase-independent long-term potentiation in area CA1 of hippocampus. **Neuroreport**. 4: 919-22, 1993.

CHIEN, W. L., LIANG, K. C., FU, W. M. Enhancement of active shuttle avoidance response by the NO-GMPc-PKG activator YC-1. **European Journal of Pharmacology**. 590: 233-240, 2008.

CHIEN, W. L., LIANG, K. C., TENG, C. M., KUO, S. C., LEE, F. Y., FU, W. M. Enhancement of long-term potentiation by a potent nitric oxide-guanylyl cyclase activator, 3-(5-hydroxymethyl-2-furyl)-1-benzyl-indazole. **Molecular Pharmacology**. 63: 1206-8, 2003

CHIEN, W. L., LIANG, K. C., TENG, C. M., KUO, S. C., LEE, F. Y., FU, W. M. Enhancement of learning behaviour by a potent nitric oxide-guanylate cyclase activator YC-1. **The European Journal of Neuroscience**. 21: 1679-88, 2005.

COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **International Immunopharmacology**, 1 (8): 1397-406, 2001.

COLOMBO, P.J. Learning-induced activation of transcription factors among multiple memory systems. **Neurobiology of Learning and Memory**. 82(3):268-77, 2004.

DA SILVA, W.C.; BONINI, J.S.; BEVILAQUA, L.R.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Histamine enhances inhibitory avoidance memory consolidation through a H2 receptor-dependent mechanism. **Neurobiology of Learning and Memory**, 86: 100-6, 2006.

DAVIS, K. L., MARTIN, E., TURKO, I. V., MURAD, F. Novel effects of nitric oxide. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. 41: 203-36, 2001.

DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L.; SNYDER, S. H. A novel neuronal messenger molecule in brain: The free radical, nitric oxide. **Annals of Neurology**, 32 (3): 297-311, 1992.

DELANEY, A. J., CRANE, J. W., SAH, P. Noradrenaline modulates transmission at a central synapse by a presynaptic mechanism. **Neuron**. 56: 757-9, 2007.

DOMEK-ŁOPACIŃSKA, K., STROSZNAJDER, J. B. The effect of selective inhibition of cyclic GMP hydrolyzing phosphodiesterases 2 and 5 on learning and memory processes and nitric oxide synthase activity in brain during aging. **Brain Research**. 1216: 68-77, 2008.

EAST, S. J., GARTHWAITE, J. NMDA receptor activation in rat hippocampus induces cyclic GMP formation through the L-arginine-nitric oxide pathway. **Neuroscience Letters**. 123: 17-9, 1991.

FIN, C., DA CUNHA, C., BROMBERG, E., SCHMITZ, P. K., BIANCHIN, M., & MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. Experiments suggesting a role for nitric oxide in the hippocampus in memory processes. **Neurobiology of Learning and Memory**, 63 (2): 113-5, 1995.

FORSTERMANN, U.; SCHMIDT, H.H.; POLLOCK, J.S.; SHENG, H.; MITCHELL, J.A.; WARNER, T.D.; NAKANE, M.; MURAD, F. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. **Biochemical Pharmacology**, 42 (10): 1849-57, 1991.

FRIEBE, A., MÜLLERSHAUSEN, F., SMOLENSKI, A., WALTER, U., SCHULTZ, G., KOESLING, D. YC-1 potentiates nitric oxide- and carbon monoxide-induced cyclic GMP effects in human platelets. **Molecular Pharmacology**. 54: 962-7, 1998.

FRIEBE, A., SCHULTZ, G., KOESLING, D. Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme. **The EMBO Journal**. 15: 6863-8, 1996.

GAGE, A. T., REYES, M., STANTON, P. K. Nitric-oxide-guanylyl-cyclase-dependent and -independent components of multiple forms of long-term synaptic depression. **Hippocampus**. 7, 286-95, 1997.

GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. **Trends in Neurosciences**, 14 (2): 60-7; 1991.

GARTHWAITE, J., CHARLES, S. L., CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. **Nature**. 336: 385-8, 1988.

GERZER, R., HOFMANN, F., SCHULTZ, G. Purification of a soluble, sodium-nitroprusside-stimulated guanylate cyclase from bovine lung. **European Journal of Biochemistry**. 116: 479-86, 1981.

GOLD, P.E. Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. **Neurobiology of Learning and Memory**. 80(3):194-210, 2003.

HAGHIKIA, A., MERGIA, E., FRIEBE, A., EYSEL, U. T., KOESLING, D., MITTMANN, T. Long-term potentiation in the visual cortex requires both nitric oxide receptor guanylyl cyclases. **The Journal of Neuroscience**. 27: 818-23, 2007.

HANBAUER, I.; WINK, D.; OSAWA, Y.; EDELMAN, G. M.; GALLY, J. A. Role of nitric oxide in NMDA-evoked release of [3H]-dopamine from striatal slices. **Neuroreport**, 3 (5): 409-12, 1992.

HARA, S., MUKAI, T., KUROSAKI, K., MIZUKAMI, H., KURIWA, F., ENDO, T. Different response to exogenous L-arginine in nitric oxide production between hippocampus and striatum of conscious rats: a microdialysis study. **Neuroscience Letters**. 366: 302-7, 2004.

HÖLSCHER, C. 7-Nitro indazole, a neuron-specific nitric oxide synthase inhibitor, produces amnesia in the chick. **Learning and Memory**. 1: 213-6, 1994.

HÖLSCHER, C., & ROSE, S. P. An inhibitor of nitric oxide synthesis prevents memory formation in the chick. **Neuroscience Letters**, 145 (2): 165-7, 1992.

HÖLSCHER, C., ROSE, S. P. Inhibiting synthesis of the putative retrograde messenger nitric oxide results in amnesia in a passive avoidance task in the chick. **Brain Research**. 619: 189-94, 1993.

HÖLSCHER, C.; CANEVARI, L.; RICHTER-LEVIN, G. (1995). Inhibitors of pla2 and no synthase cooperate in producing amnesia of a spatial task. **Neuroreport**, 6 (5): 730-2, 1995.

HUANG, A. M.; LEE, E. H. Role of hippocampal nitric oxide in memory retention in rats. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, 50 (3): 327-32, 1995.

IZQUIERDO, I. Memória. Artmed, Porto Alegre, 2002. 92 p.

IZQUIERDO, I.; BARROS, D.M.; MELLO e SOUZA, T.; de SOUZA, M.M.; IZQUIERDO, L.A.; MEDINA, J.H. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, 393 (6686): 635-6, 1998.

IZQUIERDO, I.; MCGAUGH, J.L. Behavioral pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. **Behavioral Pharmacology**. 11: 517-534, 2000.

KANDEL, E. R., SCHWARTZ, J. H., JESSELL, T. M. **Princípios da Neurociência**. 4 ed. São Paulo: Manole, 2003.

KEMPFERT, J., BEHRENDTS, S. Analysis of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase in human platelets before and after aggregation. **Platelets**. 14: 429-35, 2003.

KERR, D.S.; BEVILAQUA, L.R.; BONINI, J.S.; ROSSATO, J.I.; KOHLER, C.A.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Angiotensin II blocks memory consolidation through an AT<sub>2</sub> receptor-dependent mechanism. **Psychopharmacology**, 179 (3): 529-35, 2005.

KHAVANDGAR, S., HOMAYOUN, H., ZARRINDAST, M. R. The effect of L-NAME and L-arginine on impairment of memory formation and state-dependent learning induced by morphine in mice. **Psychopharmacology**. 167: 291-6, 2003.

KO, F. N., WU, C. C., KUO, S. C., LEE, F. Y., TENG, C. M. YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. **Blood**. 84: 4226-33, 1994.

KOYLU, E.O.; KANIT, L.; TASKIRAN, D.; DAGCI, T.; BALKAN, B.; POGUN, S. Effects of nitric oxide synthase inhibition on spatial discrimination learning and central DA<sub>2</sub> and mACh receptors. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 81 (1): 32-40, 2005.

LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios**. 1. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2004.

LU, Y.F., KANDEL, E.R., HAWKINS, R.D. Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. **Journal of Neuroscience**. 19(23):10250-61, 1999.

MA, S., MORILAK, D.A. Norepinephrine release in medial amygdala facilitates activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to acute immobilisation stress. **Journal of Neuroendocrinology**. 17(1):22-8, 2005.

MAJLESSI, N., KADKHODAEI, M., PARVIZ, M., & NAGHDI, N. Serotonin depletion in rat hippocampus attenuates L-NAME-induced spatial learning deficits. **Brain Research**, 963 (1-2): 244-51, 2003.

MAREN, S. Effects of 7-nitroindazole, a neuronal nitric oxide synthase (nNOS) inhibitor, on locomotor activity and contextual fear conditioning in rats. **Brain Research**. 804: 155-8, 1998.

MARSAULT, R.; FRELIN, C. Activation by nitric oxide of guanylate cyclase in endothelial cells from brain capillaries. **Journal of Neurochemistry**. 59(3):942-5, 1992.

MCGAUGH, J.L. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. **Annual Review of Neuroscience**. 27:1-28, 2004.

MICHEAU, J., RIEDEL, G. Protein Kinases: which one is the memory molecule? **Cellular and Molecular Life Science**. 55: 534-48, 1999.

MIZUTANI, A., SAITO, H., ABE, K. Involvement of nitric oxide in long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo. **Brain Research**. 605: 309-311, 1993.

MOGENSEN, J., WÖRTWEIN, G., HASMAN, A., NIELSEN, P., WANG, Q. Functional and neurochemical profile of place learning after L-nitro-arginine in the rat. **Neurobiology of Learning and Memory**. 63: 54-65, 1995.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, 43 (2):109-42, 1991.

MORILAK, D. A., BARRERA, G., ECHEVARRIA, D. J., GARCIA, A. S., HERNANDEZ, A., MA, S., PETRE, C. O. Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**. 29: 1214-24, 2005.

MURAD, F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. **Bioscience Reports**. 24(4-5):452-74, 2004.

MYSLIVECEK, J., HASSMANNOVÁ, J., BARCAL, J., SAFANDA, J., ZALUD, V. Inhibitory learning and memory in newborn rats influenced by nitric oxide. **Neuroscience**. 71: 299-312, 1996.

NODA, Y.; YAMADA, K.; NABESHIMA, T. Role of nitric oxide in the effect of aging on spatial memory in rats. **Behavioural Brain Research**, 83 (1-2): 153-8, 1997.

OHNO, M.; YAMAMOTO, T.; WATANABE, S. Deficits in working memory following inhibition of hippocampal nitric oxide synthesis in the rat. **Brain Research**, 632 (1-2): 36-40, 1993.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. **Academic Press: San Diego**, 119p, 1986.

PITSIKAS, N., RIGAMONTI, A. E., CELLA, S. G., SAKELLARIDIS, N., MULLER, E. E. The nitric oxide donor molsidomine antagonizes age-related memory deficits in the rat. **Neurobiology of Aging**. 26: 259-64, 2005.

POLLOCK, J. S.; POLLOCK, D. M. Endothelin and NOS1/nitric oxide signaling and regulation of sodium homeostasis. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, 17 (1): 70-5, 2008.

PRICKAERTS, J.; STEINBUSCH, H. W. M.; SMITS, J. F. M.; DE VENETE, J. Possible role of nitric oxide-cyclic GMP pathway in object recognition memory: Effects of 7-nitroindazole and zaprinast. **European Journal of Pharmacology**. 337: 125-136, 1997.

PRIETO-CASTELLÓ, M. J., HERNÁNDEZ-VADEL, M. L., CARDONA, A., MARHUENDA, D., FELIPO, V. Activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide is increased in lymphocytes from both rats chronically exposed to 2,5-hexanedione and workers chronically exposed to n-hexane. **Toxicology**. 229: 73-8, 2007.

QIANG, M., CHEN, Y. C., WANG, R., WU, F. M., QIAO, J. T. Nitric oxide is involved in the formation of learning and memory in rats: studies using passive avoidance response and Morris water maze task. **Behavioral Pharmacology**. 8: 183-7, 1997.

RICKARD, N. S., NG, K. T., GIBBS, M. E. A nitric oxide agonist stimulates consolidation of long-term memory in the 1-day-old chick. **Behavioral Neuroscience**. 108: 640-4, 1994.

RICKARD, N. S., NG, K. T., GIBBS, M. E. Further support for nitric oxide-dependent memory processing in the day-old chick. **Neurobiology of Learning and Memory**. 69: 79-86, 1998.

SCHAFE, G.E., BAUER, E.P., ROSIS, S., FARB, C.R., RODRIGUES, S.M., LEDOUX, J.E. Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning requires nitric oxide signaling in the lateral amygdala. **European Journal of Neuroscience**. 22(1):201-11, 2005.

SHARMA, J. N.; AL-OMRAN, A.; PARVATHY, S. S. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. **Inflammopharmacology**, 15 (6): 252-9, 2007.

SHIN, J. H., LINDEN, D. J. An NMDA receptor/nitric oxide cascade is involved in cerebellar LTD but is not localized to the parallel fiber terminal. **Journal of Neurophysiology**. 94: 4281-9, 2005.

SON, H.; HAWKINS, R. D.; MARTIN, K.; KIEBLER, M.; HUANG, P. L.; FISHMAN, M. C.; KANDEL, E. R. Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. **Cell**, 87 (6): 1015-23, 1996.

SPOLIDÓRIO, P. C., ECHEVERRY, M. B., IYOMASA, M., GUIMARÃES, F. S., DEL BEL, E. A. Anxiolytic effects induced by inhibition of the nitric oxide-GMPc pathway in the rat dorsal hippocampus. **Psychopharmacology**. 195: 183-92, 2007.

SQUIRE, L. R., Kandel. E. R. **Memória: Da mente às moléculas**. Porto Alegre: Artmed. 2003.

STANTON, P. K., WINTERER, J., BAILEY, C. P., KYROZIS, A., RAGINOV, I., LAUBE, G., VEH, R. W., NGUYEN, C. Q., MÜLLER, W. Long-term depression of presynaptic release from the readily releasable vesicle pool induced by NMDA receptor-dependent retrograde nitric oxide. **The Journal of Neuroscience**. 23: 5936-44, 2003.

STEVENS, C. F., WANG, Y. Reversal of long-term potentiation by inhibitors of haem oxygenase. **Nature**. 364: 104-5, 1993.

SUSSWEIN, A.J., KATZOFF, A., MILLER, N., HURWITZ, I. Nitric oxide and memory. **Neuroscientist**. 10(2):153-62, 2004.

TELEGDY, G., KOKAVSZKY, R. The role of nitric oxide in passive avoidance learning. **Neuropharmacology**. 36: 1583-7, 1997.

THOMPSON, S.H. Cyclic GMP-gated channels in a sympathetic neuron cell line. **Journal of General Physiology**. 110(2):155-64, 1997.

WANG, X., BRUDERER, S., RAFI, Z., XUE, J., MILBURN, P.J., KRÄMER, A., ROBINSON, P.J. Phosphorylation of splicing factor SF1 on Ser20 by GMPc-dependent protein kinase regulates spliceosome assembly. **EMBO Journal**. 18(16):4549-59,1999.

WANG, Z., PAN, Y., LI, W., JIANG, H., CHATZIMANOLIS, L., CHANG, J., GONG, Z., LIU, L. Visual pattern memory requires foraging function in the central complex of *Drosophila*. **Learning and Memory**. 15: 133-42, 2008.

WATTS, J., FOWLER, L., WHITTON, P. S., PEARCE, B. Release of arginine, glutamate and glutamine in the hippocampus of freely moving rats: Involvement of nitric oxide. **Brain Research Bulletin**. 65: 521-8, 2005.

XU, X., RUSSELL, T., BAZNER, J., HAMILTON, J. NMDA receptor antagonist AP5 and nitric oxide synthase inhibitor 7-NI affect different phases of learning and memory in goldfish. **Brain Research**. 889: 274-7, 2001.

XU, X., SCOTT-SCHEIERN, T., KEMPKER, L., SIMONS, K. Active avoidance conditioning in zebrafish (*Danio rerio*). **Neurobiology of Learning and Memory**. 87: 72-7, 2007.

YAMADA, K.; NODA, Y.; NAKAYAMA, S.; KOMORI, Y.; SUGIHARA, H.; HASEGAWA, T.; NABESHIMA, T. Role of nitric oxide in learning and memory and in monoamine metabolism in the rat brain. **British Journal of Pharmacology**, 115 (5): 852-8, 1995.

YILDIRIM, M., MARANGOZ, C. Effects of nitric oxide on passive avoidance learning in rats. **The International Journal of Neuroscience**. 114: 597-606, 2004.

YILDIZ AKAR, F., ULAK, G., TANYERI, P., ERDEN, F., UTKAN, T., GACAR, N. 7-Nitroindazole, a neuronal nitric oxide synthase inhibitor, impairs passive-avoidance and elevated plus-maze memory performance in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavioral**. 87: 434-43, 2007.



ZARRINDAST, M. R., SHENDY, M. M., AHMADI, S. Nitric oxide modulates state dependency induced by lithium in an inhibitory avoidance task in mice. **Behavioral Pharmacology**. 18: 289-95, 2007.

ZHANG, X. C., ZHANG, Y. Q., ZHAO, Z. Q. Different roles of two nitric oxide activated pathways in spinal long-term potentiation of C-fiber-evoked field potentials. **Neuropharmacology**. 50: 748-54, 2006.

ZHUO, M., KANDEL, E. R., HAWKINS, R. D. Nitric oxide and GMPC can produce either synaptic depression or potentiation depending on the frequency of presynaptic stimulation in the hippocampus. **Neuroreport**. 5: 1033-6, 1994.

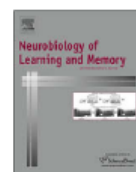
ZORUMSKI, C. F., IZUMI, Y. Nitric oxide and hippocampal synaptic plasticity. **Biochemical Pharmacology**. 46: 777-85, 1993.

**8 ANEXO – ARTIGO CIENTÍFICO**



Contents lists available at ScienceDirect

## Neurobiology of Learning and Memory

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ynlme](http://www.elsevier.com/locate/ynlme)

## On the requirement of nitric oxide signaling in the amygdala for consolidation of inhibitory avoidance memory

Carolina G. Zinn, Lia R. Bevilaqua, Janine I. Rossato, Jorge H. Medina, Iván Izquierdo, Martín Cammarota \*

Centro de Memória, Instituto de Pesquisas Biomédicas and Instituto do Cérebro, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6690, RS 90610-000 Porto Alegre, Brazil

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 14 August 2008  
Revised 18 September 2008  
Accepted 30 September 2008  
Available online 31 October 2008

**Keywords:**  
Consolidation  
Nitric oxide  
Amygdala  
Inhibitory avoidance

### ABSTRACT

Evidence suggests that the NO/sGC/PKG pathway plays a key role in memory processing but the actual participation of this signaling cascade in the amygdala during memory consolidation remains unknown. Here, we show that when infused in the amygdala immediately after inhibitory avoidance training, but not later, the NO synthase inhibitor L-NNA hindered long-term memory retention without affecting locomotion, exploratory behavior, anxiety state or retrieval of the avoidance response. The amnesic effect of L-NNA was not state-dependent and was mimicked by the soluble guanylyl cyclase inhibitor LY83583 and the PKG inhibitor KT-5823. On the contrary, post-training intra-amygdala infusion of the NOS substrate L-Arg, the NO-releasing compound SNAP or the non-hydrolysable analog of cGMP 8Br-cGMP increased memory retention in a dose-dependent manner. Co-infusion of 8Br-cGMP reversed the amnesic effect of L-NNA and LY83583 but not that of KT-5823. Our data indicate that the NO-induced activation of PKG in the amygdala is a necessary step for consolidation of inhibitory avoidance memory.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Nitric oxide (NO) is a labile and highly diffusible gaseous radical synthesized from L-arginine (L-Arg) by a family of enzymes known as NO synthases. NO modulates different physiological processes, including progression of the immune response (Coleman, 2001), inflammation (Sharma, Al-Omran, & Parvathy, 2007), sodium homeostasis (Pollock & Pollock, 2008) as well as blood flow and oxygen delivery to tissue (Buerk, 2007). In the nervous system, NO acts as a retrograde messenger (Son et al., 1996) regulating neurotransmitter and neuropeptide release in an activity-dependent manner (Hanbauer, Wink, Osawa, Edelman, & Gally, 1992). NO signaling is mostly mediated by soluble guanylyl cyclase (sGC) (Arnold, Mittal, Katsuki, & Murad, 1977; Marsault & Frelin, 1992; but see also Davis, Martin, Turko, & Murad, 2001 for other possible biochemical targets of NO). Binding of NO to the heme group of sGC increases the activity of this enzyme several hundredfold to produce the second messenger cGMP (Murad, 2004), which upregulates cyclic nucleotide-gated cation channels (Barnstable, Wei, & Han, 2004; Thompson, 1997) and stimulates cGMP-dependent protein kinase (PKG). In turn, PKG promotes mobilization of synaptic vesicles in the pre-synaptic terminal leading to enhanced transmitter release (Hawkins, Kandel, & Siegelbaum, 1993; Hawkins, Son, & Arancio,

1998) and induces activation of the neuronal transcription machinery (Lu, Kandel, & Hawkins, 1999) as well as assembly of the spliceosome (Wang et al., 1999), two processes required for memory consolidation (Antunes-Martins, Mizuno, Irvine, Lepicard, & Giese, 2007; Beffert et al., 2005; Colombo, 2004; Gold, 2008; McClung & Nestler, 2008; Pepeu & Giovannini, 2004; Powell, 2006; Ule & Darnell, 2006). In fact, several reports suggest that NO plays an essential role in synaptic plasticity and memory formation (Baratti & Kopf, 1996; Bernabeu, de Stein, Fin, Izquierdo, & Medina, 1995; Böhme et al., 1993; Hölscher & Rose, 1992; Mogensen, Wörtwein, Hasman, Nielsen, & Wang, 1995; Rickard, Ng, & Gibbs, 1994; Stevens & Wang, 1993; Susswein, Katzoff, Miller, & Hurwitz, 2004; Telegdy & Kokavszky, 1997).

Extensive evidence indicates that the baso-lateral amygdala (BLA) modulates memory consolidation of emotionally arousing or stressful experiences (McGaugh, 2004). Indeed, it is known that aversive stimuli such as those utilized in fear learning experiments activate stress-related hormonal systems and modify the release of different neurotransmitters in the amygdala (Delaney, Crane, & Sah, 2007; Ma & Morilak, 2005; Morilak et al., 2005). However, although it was recently shown that pre-training inhibition of NOS blocks acquisition of auditory fear conditioning memory (Schafe et al., 2005), little else is known about the role played by NO signaling within the amygdala during the consolidation of aversive memory. Here, we analyzed the effect of the post-training intra-amygdala infusion of different compounds acting on the NO/cGMP/PKG signaling pathway on inhibitory avoidance memory retention.

\* Corresponding author. Fax: +55 51 3320 3312.

E-mail addresses: [mcammaro@terra.com.br](mailto:mcammaro@terra.com.br), [martin.cammarota@puccs.br](mailto:martin.cammarota@puccs.br) (M. Cammarota).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Male Wistar rats (3 months of age, 250–280 g of weight) from our own breeding stock were used. Animals were housed in plastic cages and maintained at 22–23°C under a 12 h light/dark cycle (lights on at 7:00AM) with water and food freely available. For the pharmacological experiments, rats were bilaterally implanted under deep thionembutal anesthesia with 27-gauge guides aimed 1.0 mm above the baso-lateral amygdala (BLA), in accordance with coordinates taken from the atlas of Paxinos and Watson (A –2.3, L ±4.6, V 8.4; Paxinos & Watson, 1986). Animals were allowed to recover for 4 days before submitting them to any behavioral procedure. All efforts were made to reduce the number of animals used and minimize their suffering. In all the experiments the “Principles of laboratory animal care” (NIH publication N° 85-23, revised 1996) were strictly followed.

### 2.2. Inhibitory avoidance training

Rats were trained in a one-trial, step-down inhibitory avoidance paradigm (IA; Cammarota, Bevilaqua, Köhler, Medina, & Izquierdo, 2005a; Cammarota, Bevilaqua, Medina, & Izquierdo, 2004; Cammarota et al., 2005b). The IA training apparatus was a 50 × 25 × 25 cm plexiglas box with a 5 cm high, 8 cm wide and 25 cm long platform on the left end of a series of bronze bars that constitutes the floor of the box. In the training session, the animals were gently placed on the platform facing the left rear corner of the training box. When they stepped down and placed the four paws on the grid, the animals received a 2 s, 0.5 mA scrambled footshock and were immediately withdrawn from the training box. Memory retention was evaluated in a test session carried out 24 h after training. In the test session, the animals were placed back on the training box platform until they eventually stepped down to the grid. The latency to step-down during the test session was taken as an indicator of memory retention. At the time of drug delivery, 30-gauge infusion cannulas were tightly fitted into the guide cannulas. Infusions (0.5 µl/side) were carried out over 60 s using an infusion pump. The infusion cannulas were left in place for 60 additional seconds to minimize backflow. Placement of the cannulas was verified postmortem. Two to four hours after the behavioral test the animals received 0.5 µl of 4% methylene-blue through the implanted cannulas. The extension of the dye 30 min thereafter was taken as indication of the presumable diffusion of the drugs under analysis. Only data from animals with correct cannulas implants were taken into account for analysis. Data were analyzed using Student's *t*-test or ANOVA followed by post hoc comparisons, as appropriate.

### 2.3. Open field and plus maze

To analyze their exploratory behavior and locomotor activity, the animals were placed on the left rear quadrant of a 50 × 50 × 39 cm open field with black plywood walls and a brown floor divided into 12 equal squares. The number of line crossings and the number of rearings were measured over 5 min and taken as an indicator of locomotor and exploratory activities, respectively. To evaluate their anxiety state, rats were exposed to an elevated plus maze exactly as described (Pellow, Chopin, File, & Briley, 1985). The number of entries and the time spent into the maze arms were recorded over a 5 min session. Twenty-four hours before exposure to the open field or the plus maze, the animals received bilateral 0.5 µl intra-BLA infusions. The animals used for inhibitory avoidance training were not reutilized in the open field and plus maze experiments.

### 2.4. Reagents

L-Arginine (L-Arg), *N*<sub>ω</sub>-Nitro-L-arginine (L-NNA), KT-5823 and 8-bromoguanosine 3',5'-cyclic monophosphate (8Br-cGMP) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). 6-anilino-5,8-quinolinedione (LY83583) and S-nitroso-acetylpenicillamine (SNAP) were from Calbiochem (La Jolla, CA, USA). NO donors and substrates were prepared right before use. All other drugs were dissolved in saline or DMSO and stored protected from light at –20°C until use. Right before that an aliquot was thawed and diluted to working concentration with 0.1% DMSO in saline (pH 7.2). The doses utilized were determined based on pilot experiments and on previous studies showing the effect of each compound on learning or behavioral performance.

## 3. Results

To analyze the effect of NOS inhibition on aversive memory processing, male Wistar rats were trained in a one-trial, step-down inhibitory avoidance task (IA) and immediately after that received bilateral intra-amygdala infusions of vehicle (VEH; 0.1% DMSO in saline) or the NOS inhibitor L-NNA. IA memory retention was evaluated in a non-reinforced test session carried out 24 h after training. L-NNA (0.1–1 µg/side) hindered retention in a dose-dependent manner (Fig. 1A;  $F_{(3,44)} = 5.05$ ,  $p < 0.01$  for 1 µg/side vs. VEH in Dunnett's multiple comparison test after ANOVA). No significant effect on IA memory was observed when L-NNA was given in the BLA 90 or 180 min post-training. The amnesic effect of NOS inhibition was not due to state-dependency (Fig. 2). Intra-amygdala infusion of L-NNA (1 µg/side) immediately after training led to poor IA memory retention in rats given either vehicle or L-NNA (1 µg/side) 15 min before a retention test session carried 24 h post-training ( $F_{(3,48)} = 3.61$ ,  $p < 0.05$  vs. VEH/VEH group in Dunnett's multiple comparison test after ANOVA). Note also that L-NNA (1 µg/side) given 15 min before the test session to rats that had received vehicle immediately after training had no effect on memory expression (Fig 2; VEH/L-NNA group).

In contrast to what happened with L-NNA, the NOS substrate L-Arg (0.1–5 µg/side; Hara et al., 2004; Khavandgar, Homayoun, & Zarrindast, 2003; Telegdy & Kokavszky, 1997; Yildirim & Marangoz, 2004) and the NO-releasing compound SNAP (0.1–5 µg/side; Fin et al., 1995; Watts, Fowler, Whitton, & Pearce, 2005) increased memory retention when infused immediately post-training (Fig 3;  $F_{(3,44)} = 8.15$ ,  $p < 0.01$  for 5 µg/side L-Arg vs. VEH and  $F_{(3,48)} = 3.83$ ,  $p < 0.05$  for 5 µg/side SNAP vs. VEH in Dunnett's multiple comparison test after ANOVA). Neither L-NNA (1 µg/side) nor SNAP (5 µg/side) affected the animals' performance in an open field or in an elevated plus maze when given in the amygdala 24 h before the respective behavioral session (Table 1).

Since the sGC/cGMP/PKG pathway mediates most of the physiological responses to NO in different experimental preparations (Bouallegue, Daou, & Srivastava, 2007; Haghikia et al., 2007; Kempfert & Behrends, 2003; Prieto-Castelló, Hernández-Viadel, Cardona, Marhuenda, & Felipe, 2007; Spolidório, Echeverry, Iyomasa, Guimarães, & Del Bel, 2007), we studied the participation of this signaling cascade in IA memory retention. Bilateral intra-amygdala infusion of the sGC inhibitor 6-anilino-5,8-quinolinedione (LY83583; 0.02–2 µg/side; Fig. 4) or of the PKG inhibitor KT-5823 (1–100 ng/side; Fig. 5) immediately but not 90 or 180 min after training blocked IA memory retention ( $F_{(3,44)} = 8.05$ ,  $p < 0.05$  for 2 µg/side LY83583 and  $F_{(3,44)} = 8.73$ ,  $p < 0.05$  for 100 ng/side KT-5823 vs. VEH in Dunnett's multiple comparison test after ANOVA). Conversely, when given in the amygdala right after the training session (Fig. 6A), the non-hydrolysable analog of cGMP, 8Br-cGMP (0.2–5 µg/side) enhanced IA memory ( $F_{(3,43)} = 8.50$ ,  $p < 0.05$

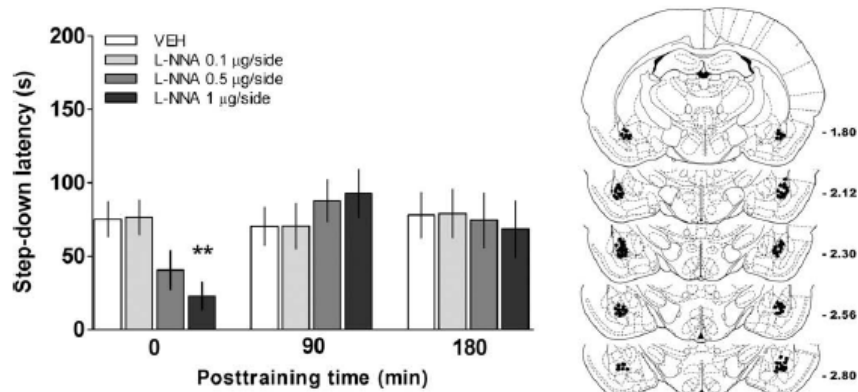


Fig. 1. Consolidation of inhibitory avoidance memory requires NOS activity in the amygdala early after training. Rats were trained in IA and at different times after training (0, 90 or 180 min) received bilateral infusions of vehicle (VEH; 0.1% DMSO in saline) or L-NNA (0.1, 0.5 or 1 µg/side) in the BLA (0.5 µl/side). Bars represent mean  $\pm$  SEM of step-down latencies during a memory retention test session carried out 24 h after training. \* $p < 0.05$  vs. VEH in Dunnett's multiple comparison test after ANOVA;  $n = 12$  per group. On the right of the figure, location of microinjection cannulas within the BLA for rats that received infusions 0 min post-training. Distances on the atlas templates (adapted from Paxinos & Watson, 1986) are indicated in millimeters from bregma.

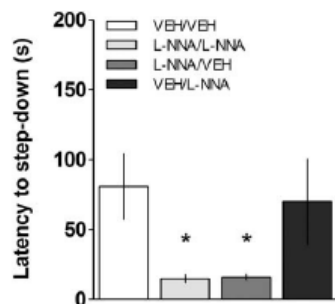


Fig. 2. The amnesic effect of the post-training inhibition of NOS in the amygdala is not due to state-dependency. Rats were trained in the IA task and immediately after that received bilateral infusions (0.5 µl/side) of vehicle (VEH; 0.1% DMSO in saline) or L-NNA (1 µg/side) in BLA. After that the animals were divided in four different groups. Two groups (VEH/VEH and L-NNA/VEH) received bilateral intra-BLA infusions (0.5 µl/side) of VEH and the other two (VEH/L-NNA and L-NNA/L-NNA) received intra-BLA L-NNA (1 µg/side) 15 min before a memory retention test session carried out 24 h post-training. Bars represent mean  $\pm$  SEM of step-down latencies in the retention test session. \* $p < 0.05$  vs. VEH/VEH in Dunnett's multiple comparison test after ANOVA;  $n = 12$ –15 per group.

for 5 µg/side vs. VEH in Dunnett's multiple comparison test after ANOVA). Co-infusion of 8Br-cGMP (5 µg/side) reversed the amnesic effect of L-NNA (1 µg/side; Fig. 6B, L-NNA/8Br group) and LY83583 (2 µg/side; Fig. 6C, LY/8Br group) but did not affect the amnesia induced by KT-5823 (100 ng/side; Fig. 6D, KT/8Br group).

#### 4. Discussion

Our results are in agreement with previous reports implicating NO in aversive memory processing. Indeed, it is known that NOS inhibitors impair avoidance memory in chicks (Hölscher, 1994; Hölscher & Rose, 1993; Rickard, Ng, & Gibbs, 1998), fishes (Xu, Russell, Bazner, & Hamilton, 2001; Xu, Scott-Scheiern, Kempker, & Simons, 2007), mice (Baratti & Kopf, 1996) and rats (Myslivecek, Hassmannová, Barcal, Safanda, & Zalud, 1996; Qiang, Chen, Wang, Wu, & Qiao, 1997; Yildiz Akar et al., 2007; but see Maren, 1998) while NOS activators and NO donors increase retention (Khavandgar et al., 2003; Pitsikas, Rigamonti, Cella, Sakellaridis, & Muller, 2005; Telegdy & Kokavszky, 1997; Yildirim & Marangoz, 2004). Likewise, drugs that decrease sGC or PKG activity hamper memory

while compounds that increase cGMP levels enhance retention (Bernabeu, Schmitz, Faillace, Izquierdo, & Medina, 1996; Bernabeu et al., 1997; Chien et al., 2005). However, nearly all the studies that examined the role played by NO signaling in memory processing utilized systemic or, at best, intrahippocampal pre-training injections of drugs. Thus, information regarding the role played by NO signaling in other areas of the brain essential for fear memory consolidation, such as the amygdala, is scarce. Indeed, there are only two published reports about the effects of NO- or sGC-modulating agents given in the amygdala on memory and plasticity. In this respect, it has been shown that the benzylindazole derivative YC-1, which activates sGC and sensitizes it for NO (Friebe, Schultz, & Koesling, 1996; Friebe et al., 1998; Ko, Wu, Kuo, Lee, & Teng, 1994) enhances long-term potentiation (LTP) in the amygdala (Chien et al., 2003) and that pre-training and pre-test administration of the NOS inhibitor 7-nitroindazole or of the NO scavenger c-PTIO in the lateral amygdala hampers acquisition and retrieval of auditory fear conditioning, respectively (Schafe et al., 2005).

We found that, when infused in the amygdala, L-NNA hindered IA memory retention. This effect was only observed when L-NNA was given immediately but not 90 or 180 min after training, suggesting that the amnesia induced by inhibition of NOS activity is due to interference with the consolidation process and not to a delayed detrimental action on behavioral activity and/or memory retrieval. In fact, L-NNA did not modify performance in an elevated plus maze or in an open field when administered 24 h before the respective behavioral session and, when given in the amygdala 15 min before a retention test session carried out 24 h post-training, it did not affect IA memory expression. Moreover, pre-test infusion of L-NNA did not reverse the amnesia caused by its post-training administration, indicating that the amnesic effect caused by NOS inhibition in the amygdala was not due to state-dependent learning. This observation is important, since it has been reported that inhibition of hippocampal NOS induces a state-dependent deficit in recognition memory (Blokland, Prickaerts, Honig, & de Vente, 1998) and that NO modulates the state-dependent amnesia caused by pre-training administration of morphine and lithium (Khavandgar et al., 2003; Zarrindast, Shendy, & Ahmadi, 2007).

The role played by the NOS/cGS/PKG pathway in the amygdala during IA memory consolidation was further demonstrated by results showing that: (1) the NOS substrate L-Arg and the NO donor SNAP improved retention in a dose-dependent manner; (2) the sGC inhibitor LY83583 and the PKG inhibitor KT-5823 mimicked the

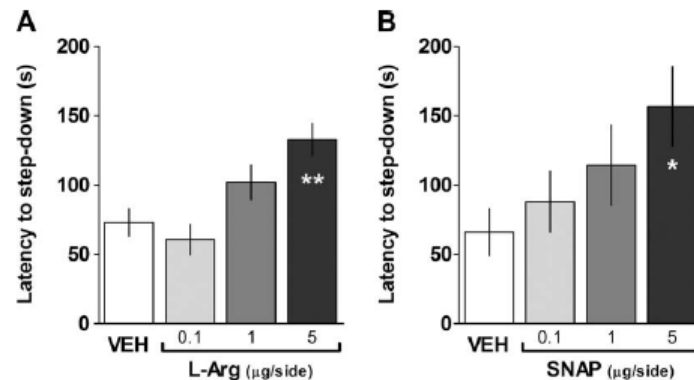


Fig. 3. Intra-amygdala infusion of drugs that increase NO levels enhances retention of inhibitory avoidance memory. Rats were trained in IA and immediately after training received bilateral infusions (0.5 µl/side) of vehicle (VEH; 0.1% DMSO in saline), L-Arg (0.1, 1 or 5 µg/side; see graph A) or SNAP (0.1, 1 or 5 µg/side; see graph B) in the BLA. Bars represent mean  $\pm$  SEM of step-down latencies during a memory retention test session carried out 24 h after training. \*\*  $p < 0.01$  and \*  $p < 0.05$  vs. VEH in Dunnett's multiple comparison test after ANOVA;  $n = 12$ –15 per group.

Table 1

Infusion of L-NNA or SNAP in the amygdala has no effect on locomotor and exploratory activities or anxiety. L-NNA (5 µg/side) or SNAP (5 µg/side) were infused into the BLA 24 h before an open field or a plus maze session. Data are expressed as mean ( $\pm$  SEM) of the total number of entries, the number of entries into the open arms and the percentage of time spent in the open arms (Plus maze;  $n = 8$  per group) and of the number of crossings and rearings (Open field;  $n = 8$  per group). VEH, vehicle. A different set of animals was utilized for each behavioral test.

	VEH	L-NNA	SNAP
Total entries	15.2 $\pm$ 0.9	13.65 $\pm$ 0.9	16.3 $\pm$ 1.4
Entries in open arms	8.5 $\pm$ 0.8	7.0 $\pm$ 0.7	8.3 $\pm$ 0.8
% Time in open arms	41.6 $\pm$ 3.7	46.9 $\pm$ 8.3	42.9 $\pm$ 3.7
Crossings	42.0 $\pm$ 7.9	48.6 $\pm$ 8.4	40.1 $\pm$ 5.3
Rearings	16.7 $\pm$ 2.0	20.2 $\pm$ 3.6	17.4 $\pm$ 4.7

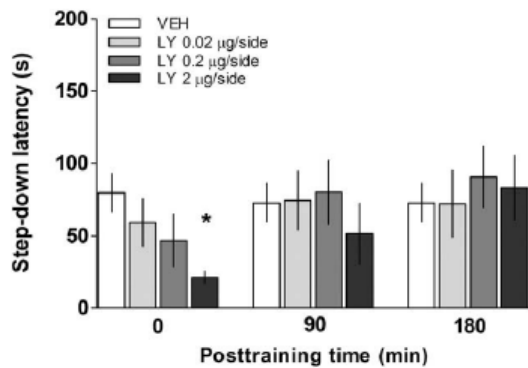


Fig. 4. Consolidation of inhibitory avoidance memory requires sGC activity in the amygdala early after training. Rats were trained in IA and at different times after training (0, 90 or 180 min) received bilateral infusions of vehicle (VEH; 0.1% DMSO in saline) or LY83583 (LY; 0.02, 0.2 or 2 µg/side) in the BLA (0.5 µl/side). Bars represent mean  $\pm$  SEM of step-down latencies during a memory retention test session carried out 24 h after training. \*  $p < 0.05$  vs. VEH in Dunnett's multiple comparison test after ANOVA;  $n = 12$  per group.

amnesic effect of L-NNA whereas the non-hydrolysable analog of cGMP 8Br-cGMP increased retention and reversed the amnesia induced by L-NNA and LY83583 but not KT-5823. These findings indicate that a pharmacologically-induced increase of NO levels in the amygdala can enhance memory and that the likely mechanism through which NO brings about the physiological changes involved

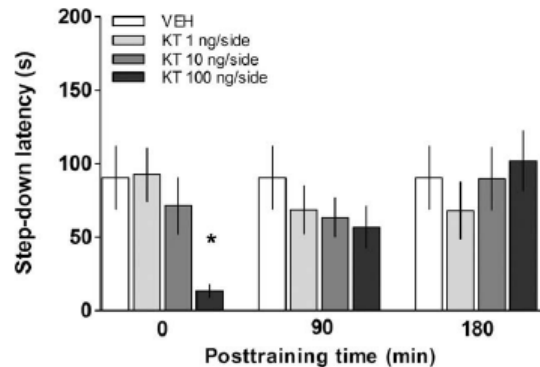
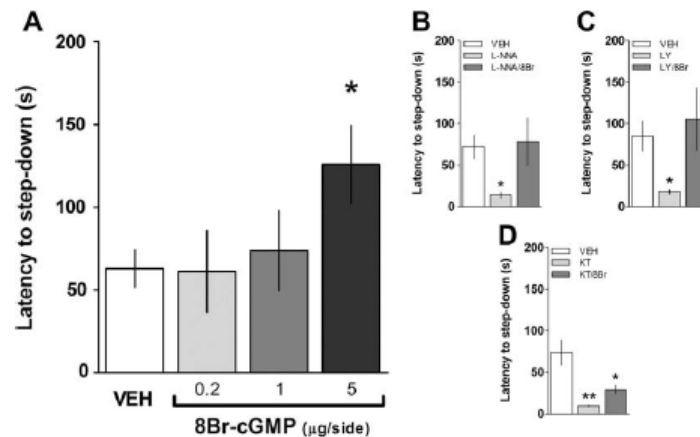


Fig. 5. Consolidation of inhibitory avoidance memory requires PKG activity in the amygdala early after training. Rats were trained in IA and at different times after training (0, 90 or 180 min) received bilateral infusions of vehicle (VEH; 0.1% DMSO in saline) or KT-5823 (KT; 1, 10 or 100 ng/side) in the BLA (0.5 µl/side). Bars represent mean  $\pm$  SEM of step-down latencies during a memory retention test session carried out 24 h after training. \*  $p < 0.05$  vs. VEH in Dunnett's multiple comparison test after ANOVA;  $n = 12$  per group.

in memory consolidation in the amygdala entails the sequential activation of sGC and PKG.

The first evidence that NO increases cGMP levels in different tissue preparations, including the brain, was provided by Arnold et al. (1977) and was confirmed firstly by Gerzer, Hofmann, and Schultz (1981), who purified a soluble sodium-nitroprusside-stimulated guanylate cyclase from the lung, and later by Garthwaite, Charles, and Chess-Williams (1988), Bredt and Snyder (1989). Indeed, there is abundant evidence about the importance of the NO-mediated upregulation of the sGC/PKG pathway in plasticity. For example, it is known that LTP and/or long-term depression (LTD) require sGC and PKG activity in the hippocampus (Arancio, Kandel, & Hawkins, 1995; Bon & Garthwaite, 2003; Boulton, Southam, & Garthwaite, 1995; Chetkovich, Klann, & Sweatt, 1993; East & Garthwaite, 1991; Gage, Reyes, & Stanton, 1997; Stanton et al., 2003; Zhuo, Kandel, & Hawkins, 1994), the visual cortex (Haghikia et al., 2007), the cerebellum (Shin & Linden, 2005), the spinal cord (Zhang, Zhang, & Zhao, 2006) and the amygdala (Chien et al., 2003). More importantly, several behavioral and pharmacological studies, including some very recent reports (Domek-Łopacińska & Strosznajder, 2008; Wang et al., 2008) point to the existence of a



**Fig. 6.** Intra-amygdala infusion of the non-hydrolysable analog of cGMP 8Br-cGMP enhances retention of inhibitory avoidance memory and reverses the amnesic effect of NOS and sGC but not of PKG inhibition. (A) Rats were trained in IA and immediately after training received bilateral infusions (0.5 µl/side) of vehicle (VEH; 0.1% DMSO in saline) or 8Br-cGMP (0.2, 1 or 5 µg/side) in the BLA. Bars represent mean ± SEM of step-down latencies during a memory retention test session carried out 24 h after training; \* $p < 0.05$  vs. VEH in Dunnett's multiple comparison test after ANOVA;  $n = 11-12$  per group. (B–D) Rats were trained in IA and immediately after that received bilateral intra-BLA infusions (0.5 µl/side) of vehicle (VEH; 0.1% DMSO in saline), L-NNA (5 µg/side), LY83583 (2 µg/side), KT-5823 (100 ng/side) or 8Br-cGMP (5 µg/side) plus either L-NNA (panel B), LY83583 (panel C) or KT-5823 (panel D). Bars represent mean ± SEM of step-down latencies during a memory retention test session carried out 24 h after training; \* $p < 0.01$  and \*\* $p < 0.05$  vs. VEH in Dunnett's multiple comparison test after ANOVA;  $n = 10-14$  per group.

causal link between NO synthesis and increased cGMP levels and PKG activity important for memory. Although the pathways controlled by PKG during memory processing are not known, recent findings showing that pharmacological activation of sGC during two-way shuttle-avoidance training enhances the learning-induced increase in ERK1/2 and Akt phosphorylation and potentiates the expression of BDNF and CREB in the amygdala (Chien, Liang, & Fu, 2008), suggest that ERK-mediated activation of CREB-regulated transcription could be a downstream target of PKG important for consolidation. In fact, it is known that in neurons, NO promotes the cGMP-dependent activation of CREB and stimulates S-nitrosylation of nuclear proteins that favor binding of CREB to its target promoters and it has been reported that the NO-cGMP-PKG pathway contributes to the LTP-induced phosphorylation of CREB in the hippocampus through a mechanism involving increase of intracellular  $Ca^{2+}$  release (Lu & Hawkins, 2002; Lu et al., 1999).

#### Acknowledgments

This work was supported by Grants and research fellowships from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) to L.R.B. I.L., J.H.M. and M.C.

#### References

- Antunes-Martins, A., Mizuno, K., Irvine, E. E., Lepicard, E. M., & Giese, K. P. (2007). Sex-dependent up-regulation of two splicing factors, Psf and Srp20, during hippocampal memory formation. *Learning and Memory*, 14, 693–702.
- Arancio, O., Kandel, E. R., & Hawkins, R. D. (1995). Activity-dependent long-term enhancement of transmitter release by presynaptic 3',5'-cyclic GMP in cultured hippocampal neurons. *Nature*, 376, 74–80.
- Arnold, W. P., Mittal, C. K., Katsuki, S., & Murad, F. (1977). Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3',5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, 3203–3207.
- Baratti, C. M., & Kopf, S. R. (1996). A nitric oxide synthase inhibitor impairs memory storage in mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, 65, 197–201.
- Barnstable, C. J., Wei, J. Y., & Han, M. H. (2004). Modulation of synaptic function by cGMP and cGMP-gated cation channels. *Neurochemistry International*, 45, 875–884.
- Beffert, U., Weeber, E. J., Durudas, A., Qiu, S., Masiulis, I., Sweatt, J. D., et al. (2005). Modulation of synaptic plasticity and memory by Reelin involves differential splicing of the lipoprotein receptor Apoer2. *Neuron*, 47, 567–579.

- Bernabeu, R., de Stein, M. L., Fin, C., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (1995). Role of hippocampal NO in the acquisition and consolidation of inhibitory avoidance learning. *Neuroreport*, 6, 1498–1500.
- Bernabeu, R., Schmitz, P., Faillace, M. P., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (1996). Hippocampal cGMP and cAMP are differentially involved in memory processing of inhibitory avoidance learning. *Neuroreport*, 7, 585–588.
- Bernabeu, R., Schroder, N., Quevedo, J., Cammarota, M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (1997). Further evidence for the involvement of a hippocampal cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascade in memory consolidation. *Neuroreport*, 8, 2221–2224.
- Blokland, A., Prickaerts, J., Honig, W., & de Vente, J. (1998). State-dependent impairment in object recognition after hippocampal NOS inhibition. *Neuroreport*, 9, 4205–4208.
- Böhme, G. A., Bon, C., Lemaire, M., Reibaud, M., Piot, O., Stutzmann, J. M., et al. (1993). Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 9191–9194.
- Bon, C. L., & Garthwaite, J. (2003). On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *The Journal of Neuroscience*, 23, 1941–1948.
- Bouallegue, A., Daou, G. B., & Srivastava, A. K. (2007). Nitric oxide attenuates endothelin-1-induced activation of ERK1/2, PKB, and Pyk2 in vascular smooth muscle cells by a cGMP-dependent pathway. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 293, 2072–2079.
- Boulton, C. L., Southam, E., & Garthwaite, J. (1995). Nitric oxide-dependent long-term potentiation is blocked by a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Neuroscience*, 69, 699–703.
- Bredt, D. S., & Snyder, S. H. (1989). Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 9030–9033.
- Buerk, D. G. (2007). Nitric oxide regulation of microvascular oxygen. *Antioxidants & Redox Signaling*, 9, 829–843.
- Cammarota, M., Bevilaqua, L. R., Köhler, C., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2005a). Learning twice is different from learning once and from learning more. *Neuroscience*, 132, 273–279.
- Cammarota, M., Bevilaqua, L. R., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2004). Retrieval does not induce reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Learning and Memory*, 11, 572–578.
- Cammarota, M., Bevilaqua, L. R., Rossato, J. I., Ramirez, M., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2005b). Relationship between short- and long-term memory and short- and long-term extinction. *Neurobiology of Learning and Memory*, 84, 25–32.
- Chetkovich, D. M., Klann, E., & Sweatt, J. D. (1993). Nitric oxide synthase-independent long-term potentiation in area CA1 of hippocampus. *Neuroreport*, 4, 919–922.
- Chien, W. L., Liang, K. C., & Fu, W. M. (2008). Enhancement of active shuttle avoidance response by the NO-cGMP-PKG activator YC-1. *European Journal of Pharmacology*, 590, 233–240.
- Chien, W. L., Liang, K. C., Teng, C. M., Kuo, S. C., Lee, F. Y., & Fu, W. M. (2003). Enhancement of long-term potentiation by a potent nitric oxide-guanylyl cyclase activator, 3-(5-hydroxymethyl-2-furyl)-1-benzyl-indazole. *Molecular Pharmacology*, 63, 1206–1208.

- Chien, W. L., Liang, K. C., Teng, C. M., Kuo, S. C., Lee, F. Y., & Fu, W. M. (2005). Enhancement of learning behaviour by a potent nitric oxide-guanylate cyclase activator YC-1. *The European Journal of Neuroscience*, *21*, 1679–1688.
- Coleman, J. W. (2001). Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology*, *8*, 1397–1406.
- Colombo, P. J. (2004). Learning-induced activation of transcription factors among multiple memory systems. *Neurobiology of Learning and Memory*, *82*, 268–277.
- Davis, K. L., Martin, E., Turko, I. V., & Murad, F. (2001). Novel effects of nitric oxide. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *41*, 203–236.
- Delaney, A. J., Crane, J. W., & Sah, P. (2007). Noradrenaline modulates transmission at a central synapse by a presynaptic mechanism. *Neuron*, *56*, 757–759.
- Domek-Łopacińska, K., & Strosznajder, J. B. (2008). The effect of selective inhibition of cyclic GMP hydrolyzing phosphodiesterases 2 and 5 on learning and memory processes and nitric oxide synthase activity in brain during aging. *Brain Research*, *1216*, 68–77.
- East, S. J., & Garthwaite, J. (1991). NMDA receptor activation in rat hippocampus induces cyclic GMP formation through the L-arginine-nitric oxide pathway. *Neuroscience Letters*, *123*, 17–19.
- Fin, C., da Cunha, C., Bromberg, E., Schmitz, P. K., Bianchini, M., Medina, J. H., et al. (1995). Experiments suggesting a role for nitric oxide in the hippocampus in memory processes. *Neurobiology of Learning and Memory*, *63*, 113–115.
- Friebe, A., Müllershausen, F., Smolenski, A., Walter, U., Schultz, G., & Koesling, D. (1998). YC-1 potentiates nitric oxide- and carbon monoxide-induced cyclic GMP effects in human platelets. *Molecular Pharmacology*, *54*, 962–967.
- Friebe, A., Schultz, G., & Koesling, D. (1996). Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme. *The EMBO Journal*, *15*, 6863–6868.
- Gage, A. T., Reyes, M., & Stanton, P. K. (1997). Nitric-oxide-guanylyl-cyclase-dependent and -independent components of multiple forms of long-term synaptic depression. *Hippocampus*, *7*, 286–295.
- Garthwaite, J., Charles, S. L., & Chess-Williams, R. (1988). Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*, *336*, 385–388.
- Gerzer, R., Hofmann, F., & Schultz, G. (1981). Purification of a soluble, sodium-nitroprusside-stimulated guanylate cyclase from bovine lung. *European Journal of Biochemistry*, *116*, 479–486.
- Gold, P. E. (2008). Protein synthesis inhibition and memory: Formation vs. amnesia. *Neurobiology of Learning and Memory*, *89*, 201–211.
- Haghighi, A., Mergia, E., Friebe, A., Eysel, U. T., Koesling, D., & Mittmann, T. (2007). Long-term potentiation in the visual cortex requires both nitric oxide receptor guanylyl cyclases. *The Journal of Neuroscience*, *27*, 818–823.
- Hanbauer, I., Wink, D., Osawa, Y., Edelman, G. M., & Gally, J. A. (1992). Role of nitric oxide in NMDA-evoked release of [3H]-dopamine from striatal slices. *Neuroreport*, *3*, 409–412.
- Hara, S., Mukai, T., Kurosaki, K., Mizukami, H., Kuriwa, F., & Endo, T. (2004). Different response to exogenous L-arginine in nitric oxide production between hippocampus and striatum of conscious rats: A microdialysis study. *Neuroscience Letters*, *366*, 302–307.
- Hawkins, R. D., Kandel, E. R., & Siegelbaum, S. A. (1993). Learning to modulate transmitter release: Themes and variations in synaptic plasticity. *Annual Review of Neuroscience*, *16*, 625–665.
- Hawkins, R. D., Son, H., & Arancio, O. (1998). Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus. *Progress in Brain Research*, *118*, 155–172.
- Hölscher, C. (1994). 7-Nitro indazole, a neuron-specific nitric oxide synthase inhibitor, produces amnesia in the chick. *Learning and Memory*, *1*, 213–216.
- Hölscher, C., & Rose, S. P. (1992). An inhibitor of nitric oxide synthesis prevents memory formation in the chick. *Neuroscience Letters*, *145*, 165–167.
- Hölscher, C., & Rose, S. P. (1993). Inhibiting synthesis of the putative retrograde messenger nitric oxide results in amnesia in a passive avoidance task in the chick. *Brain Research*, *619*, 189–194.
- Kempfert, J., & Behrends, S. (2003). Analysis of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase in human platelets before and after aggregation. *Platelets*, *14*, 429–435.
- Khavandgar, S., Homayoun, H., & Zarrindast, M. R. (2003). The effect of L-NAME and L-arginine on impairment of memory formation and state-dependent learning induced by morphine in mice. *Psychopharmacology*, *167*, 291–296.
- Ko, F. N., Wu, C. C., Kuo, S. C., Lee, F. Y., & Teng, C. M. (1994). YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. *Blood*, *84*, 4226–4233.
- Lu, Y. F., & Hawkins, R. D. (2002). Ryanodine receptors contribute to cGMP-induced late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. *Journal of Neurophysiology*, *88*, 1270–1278.
- Lu, Y. F., Kandel, E. R., & Hawkins, R. D. (1999). Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, *19*, 10250–10261.
- Ma, S., & Morilak, D. A. (2005). Norepinephrine release in medial amygdala facilitates activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to acute immobilisation stress. *Journal of Neuroendocrinology*, *17*, 22–28.
- Maren, S. (1998). Effects of 7-nitroindazole, a neuronal nitric oxide synthase (nNOS) inhibitor, on locomotor activity and contextual fear conditioning in rats. *Brain Research*, *804*, 155–158.
- Marsault, R., & Frelin, C. (1992). Activation by nitric oxide of guanylate cyclase in endothelial cells from brain capillaries. *Journal of Neurochemistry*, *59*, 942–945.
- McClung, C. A., & Nestler, E. J. (2008). Neuroplasticity mediated by altered gene expression. *Neuropsychopharmacology*, *33*, 3–17.
- McGaugh, J. L. (2004). The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annual Review of Neuroscience*, *27*, 1–28.
- Mogensen, J., Wörtwein, G., Hasman, A., Nielsen, P., & Wang, Q. (1995). Functional and neurochemical profile of place learning after L-nitro-arginine in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, *63*, 54–65.
- Morilak, D. A., Barrera, G., Echevarria, D. J., Garcia, A. S., Hernandez, A. Ma, S., et al. (2005). Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, *29*, 1214–1224.
- Murad, F. (2004). Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. *Bioscience Reports*, *24*, 452–474.
- Mysliviček, J., Hassmannová, J., Barcal, J., Safanda, J., & Zalud, V. (1996). Inhibitory learning and memory in newborn rats influenced by nitric oxide. *Neuroscience*, *71*, 299–312.
- Paxinos, G., & Watson, C. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (2nd ed.). San Diego: Academic Press.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open/closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, *14*, 149–167.
- Pepeu, G., & Giovannini, M. G. (2004). Changes in acetylcholine extracellular levels during cognitive processes. *Learning and Memory*, *11*, 21–27.
- Pitsikas, N., Rigamonti, A. E., Cella, S. G., Sakellari, N., & Müller, E. E. (2005). The nitric oxide donor molsidomine antagonizes age-related memory deficits in the rat. *Neurobiology of Aging*, *26*, 259–264.
- Pollock, J. S., & Pollock, D. M. (2008). Endothelin and NOS1/nitric oxide signaling and regulation of sodium homeostasis. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, *17*, 70–75.
- Powell, C. M. (2006). Gene targeting of presynaptic proteins in synaptic plasticity and memory: Across the great divide. *Neurobiology of Learning and Memory*, *85*, 2–15.
- Prieto-Castelló, M. J., Hernández-Viadel, M. L., Cardona, A., Marhuenda, D., & Felipo, V. (2007). Activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide is increased in lymphocytes from both rats chronically exposed to 2,5-hexanedione and workers chronically exposed to n-hexane. *Toxicology*, *229*, 73–78.
- Qiang, M., Chen, Y. C., Wang, R., Wu, F. M., & Qiao, J. T. (1997). Nitric oxide is involved in the formation of learning and memory in rats: Studies using passive avoidance response and Morris water maze task. *Behavioral Pharmacology*, *8*, 183–187.
- Rickard, N. S., Ng, K. T., & Gibbs, M. E. (1994). A nitric oxide agonist stimulates consolidation of long-term memory in the 1-day-old chick. *Behavioral Neuroscience*, *108*, 640–644.
- Rickard, N. S., Ng, K. T., & Gibbs, M. E. (1998). Further support for nitric oxide-dependent memory processing in the day-old chick. *Neurobiology of Learning and Memory*, *69*, 79–86.
- Schafe, G. E., Bauer, E. P., Rosis, S., Farb, C. R., Rodrigues, S. M., & LeDoux, J. E. (2005). Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning requires nitric oxide signaling in the lateral amygdala. *The European Journal of Neuroscience*, *22*, 201–211.
- Sharma, J. N., Al-Omran, A., & Parvathy, S. S. (2007). Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*, *15*, 252–259.
- Shin, J. H., & Linden, D. J. (2005). An NMDA receptor/nitric oxide cascade is involved in cerebellar LTD but is not localized to the parallel fiber terminal. *Journal of Neurophysiology*, *94*, 4281–4289.
- Son, H., Hawkins, R. D., Martin, K., Kiebler, M., Huang, P. L., Fishman, M. C., et al. (1996). Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. *Cell*, *87*, 1015–1023.
- Spolidório, P. C., Echeverry, M. B., Iyomasa, M., Guimarães, F. S., & Del Bel, E. A. (2007). Anxiolytic effects induced by inhibition of the nitric oxide-cGMP pathway in the rat dorsal hippocampus. *Psychopharmacology*, *195*, 183–192.
- Stanton, P. K., Winterer, J., Bailey, C. P., Kyrozis, A., Reginov, I., Laube, G., et al. (2003). Long-term depression of presynaptic release from the readily releasable vesicle pool induced by NMDA receptor-dependent retrograde nitric oxide. *The Journal of Neuroscience*, *23*, 5936–5944.
- Stevens, C. F., & Wang, Y. (1993). Reversal of long-term potentiation by inhibitors of haem oxygenase. *Nature*, *364*, 147–149.
- Susswein, A. J., Katzoff, A., Miller, N., & Hurwitz, I. (2004). Nitric oxide and memory. *Neuroscientist*, *10*, 153–162.
- Telegdy, G., & Kokavszky, R. (1997). The role of nitric oxide in passive avoidance learning. *Neuropharmacology*, *36*, 1583–1587.
- Thompson, S. H. (1997). Cyclic GMP-gated channels in a sympathetic neuron cell line. *The Journal of General Physiology*, *110*, 155–164.
- Ule, J., & Darnell, R. B. (2006). RNA binding proteins and the regulation of neuronal synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, *16*, 102–110.
- Wang, X., Bruderer, S., Rafi, Z., Xue, J., Milburn, P. J., Krämer, A., et al. (1999). Phosphorylation of splicing factor SF1 on Ser20 by cGMP-dependent protein kinase regulates spliceosome assembly. *The EMBO Journal*, *18*, 549–559.
- Wang, Z., Pan, Y., Li, W., Jiang, H., Chatzimanolis, L., Chang, J., et al. (2008). Visual pattern memory requires foraging function in the central complex of *Drosophila*. *Learning and Memory*, *15*, 133–142.
- Watts, J., Fowler, L., Whitton, P. S., & Pearce, B. (2005). Release of arginine, glutamate and glutamine in the hippocampus of freely moving rats: Involvement of nitric oxide. *Brain Research Bulletin*, *65*, 521–528.
- Xu, X., Russell, T., Bazner, J., & Hamilton, J. (2001). NMDA receptor antagonist AP5 and nitric oxide synthase inhibitor 7-NI affect different phases of learning and memory in goldfish. *Brain Research*, *889*, 274–277.
- Xu, X., Scott-Scheiern, T., Kempker, L., & Simons, K. (2007). Active avoidance conditioning in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurobiology of Learning and Memory*, *87*, 72–77.
- Yildirim, M., & Marangoz, C. (2004). Effects of nitric oxide on passive avoidance learning in rats. *The International Journal of Neuroscience*, *114*, 597–606.



- Yildiz Akar, F., Ulak, G., Tanyeri, P., Erden, F., Utkan, T., & Gacar, N. (2007). 7-Nitroindazole, a neuronal nitric oxide synthase inhibitor, impairs passive-avoidance and elevated plus-maze memory performance in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavioral*, *87*, 434–443.
- Zarrindast, M. R., Shendy, M. M., & Ahmadi, S. (2007). Nitric oxide modulates state dependency induced by lithium in an inhibitory avoidance task in mice. *Behavioral Pharmacology*, *18*, 289–295.
- Zhang, X. C., Zhang, Y. Q., & Zhao, Z. Q. (2006). Different roles of two nitric oxide activated pathways in spinal long-term potentiation of C-fiber-evoked field potentials. *Neuropharmacology*, *50*, 748–754.
- Zhuo, M., Kandel, E. R., & Hawkins, R. D. (1994). Nitric oxide and cGMP can produce either synaptic depression or potentiation depending on the frequency of presynaptic stimulation in the hippocampus. *Neuroreport*, *5*, 1033–1036.