

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

RECEPTOR DO PEPTÍDEO LIBERADOR DE GASTRINA E CONSOLIDAÇÃO DA
MEMÓRIA HIPOCAMPAL: POSSÍVEL INTERAÇÃO FUNCIONAL COM O
SISTEMA GABAÉRGICO

ANDREA DOS SANTOS DANTAS

PORTO ALEGRE, 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

RECEPTOR DO PEPTÍDEO LIBERADOR DE GASTRINA E CONSOLIDAÇÃO DA
MEMÓRIA HIPOCAMPAL: POSSÍVEL INTERAÇÃO FUNCIONAL COM O
SISTEMA GABAÉRGICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau Mestre em Ciências.

ANDREA DOS SANTOS DANTAS

ORIENTADOR: PROF. DR. RAFAEL ROESLER

PORTO ALEGRE, 2007

*“Porque a loucura de Deus é mais sábia do
que os homens, e a fraqueza de Deus mais
forte do que os homens”.*

I Co 1:25

*Ao Rômani, meu bebê,
Jeferson, meu marido,
e Ana Maria, minha mãe
Com todo meu carinho*

Agradeço,

*Ao Prof. Dr. Rafael Roesler, pela orientação e
confiança na elaboração desse trabalho...*

*Ao Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques, pela
indicação e disposição no trabalho entre equipes...*

*Ao grupo de pesquisa em Neurofarmacologia Celular e
Molecular, pelo apoio e presença...*

*Ao grupo do Laboratório Genotox, pelo incentivo e
amizade...*

Os procedimentos experimentais desse trabalho foram realizados no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e South American Office for Anticancer Drug Development (SOAD).

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO.....	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1 Peptídeo Liberador de Gastrina (GRP)	13
2.1.1 Histórico	13
2.1.2 Distribuição pelo Corpo Humano	14
2.1.3 Funções Fisiológicas	15
2.2 Receptores GRP e Análogos	16
2.2.1 Características Estruturais do Receptor.....	16
2.2.2 Localização dos Receptores.....	17
2.2.3 Vias de Sinalização Celular	19
2.3 Envolvimento de GRPR na Formação e Consolidação da Memória	21
2.4 Envolvimento de GRP e GRPR nos Distúrbios do Sistema Nervoso Central	27
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo Geral.....	29
3.2 Objetivos Específicos.....	29
4 CAPÍTULO I.....	30
Opposite effects of low and high doses of the gastrin-releasing peptide receptor antagonist RC-3095 on memory consolidation in the hippocampus: possible involvement of the GABAergic system	
5 DISCUSSÃO	31
5.1 Efeito Facilitatório da Memória por Antagonismo de GRPR	32
5.2 Envolvimento de GRPR e Sistema GABAérgico.....	34
6 PERSPECTIVAS.....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estrutura da Bombesina (BB) e Peptídeo Liberador de Gastrina (GRP)

Tabela 2. Estrutura Molecular do Receptor do Peptídeo Liberador de Gastrina (GRPR)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sequência de aminoácidos de mGRPR e disposição transmembrana.

Figura 2. Localização de GRPR no cérebro de rato selvagem.

Figura 3. Diagrama esquemático para o mecanismo de sinalização que medeia as ações de GRPR sobre consolidação da memória no hipocampo.

Artigo. Fig. 1. Drawing of the plane A – 4,3 mm of the atlas of Paxinos and Watson showing the area (hatched) where the infusion sites considered to be correct were placed.

Fig. 2. Opposite effects of low and high doses of RC-3095 on memory consolidation in the hippocampus.

Fig. 3. RC-3095-induced enhancement of memory consolidation in the hippocampus is prevented by the GABA_A receptor agonist muscimol.

Fig. 4. Schematic diagram for a model of possible mechanisms mediating RC-3095-induced enhancement of memory consolidation in the hippocampus.

RESUMO

O receptor de peptídeo liberador de gastrina (GRPR ou Receptor BB2) é um membro da subfamília de receptores de peptídeos semelhantes à bombesina (BB) e é capaz de mediar as ações do peptídeo BB e do peptídeo liberador de gastrina (GRP), cujos efeitos neurais incluem mudanças no comportamento e o aumento do aprendizado e da retenção de memória, entre outros papéis fisiológicos. Os GRPRs distribuem-se no cérebro em dendritos e corpos celulares de neurônios em regiões que incluem o hipocampo dorsal. GRPR tem emergido como um sistema de importante papel na regulação da formação da memória e a observação dos efeitos de agonistas desse receptor sobre o desempenho de roedores em tarefa de memória, mostra que a administração sistêmica de BB/GRP pode aumentar a formação de memória. Já o bloqueio do receptor por alguns antagonistas avaliando diferentes tipos de memória em ratos tratados com infusões intracerebrais ou sistêmicas, indica um papel seletivo e importante dos receptores de BB/GRP hipocampais (e de outras áreas) na memória emocional. A maioria das evidências farmacológicas indica que a ativação de GRPR por agonistas aumenta, enquanto antagonistas bloqueiam a memória e plasticidade sináptica, no entanto, há dados de um efeito facilitatório de um antagonista de GRPR sobre potenciação de longa duração (LTP), e de camundongos deficientes em GRPR que apresentaram memória hipocampal normal, sugerindo que GRPR é um sistema que contribui na modulação da memória exercendo papel inibitório. Além disso, apresenta interação funcional com outros sistemas de neurotransmissores e receptores (receptores GABA, dopamina e glicocorticóides). Este trabalho avaliou os efeitos de diferentes doses de um antagonista de GRPR [D-Tpi⁶, Leu¹³ psi (CH₂NH)-Leu¹⁴] bombesin (6-14) (RC-3095) sobre a consolidação da memória, onde se observou que a infusão pós-treino de uma alta dose na área CA1 hipocampal induziu um aumento na retenção da memória aversiva, que foi bloqueado pela infusão pré-treino de uma dose inefetiva de um agonista de receptor GABA_A, muscimol. Esses dados suportam a visão de que o efeito facilitatório da memória através do bloqueio de GRPR poderia envolver uma interação funcional entre esses receptores e neurônios GABAérgicos.

ABSTRACT

The gastrin-releasing peptide-preferring receptor (GRPR, BB2 receptor) is a member of the bombesin (BB)-like peptide receptor subfamily activated by the peptide BB and gastrin-releasing peptide (GRP). The neural effects include changes in animal behavior and improvement of learning and memory, and several other physiological activities. The GRPR is detected within the brain in dendrites and cell bodies of neurons in regions including the dorsal hippocampus. The GRPR has also emerged as a system importantly involved in regulating memory formation and the observation of the agonist effects in rodents in memory tasks showed that systemic administration of BB/GRP can improve memory retention. In contrast, intracerebral or systemic infusions of the GRPR agonists, in different types of memory, showed a selective and important role of the GRPR hippocampal (and other areas) on emotionally-motivated memory. Pharmacological evidence indicates GRPR activation by agonists induce memory enhancement where as GRPR antagonists cause memory and synaptic plasticity impairment. However, studies about long-term potentiation (LTP) showing memory-enhancing effect by GRPR antagonist and genetic experiments showing that GRPR-deficient mice have normal hippocampal memory suggest GRPR as a system with inhibitory role on memory modulation. Moreover, it presents functional interaction with other neurotransmitter and receptor systems (GABA-receptors, dopamine, glucocorticoids). The present study examined the effects of infusions of different doses of the GRPR antagonist [D-Tpi⁶, Leu¹³ psi (CH₂NH)-Leu¹⁴] bombesin (6-14) (RC-3095) on memory consolidation. The posttraining intrahippocampal infusion of a high dose induced memory enhancement, but it was blocked by pretraining infusion with a low dose of the GABA_A receptor agonist, muscimol. The data support the view that the memory-enhancement effect of GRPR blockade may involve a functional interaction between the GRPR and GABAergic neurons.

INTRODUÇÃO

Estudos farmacológicos e genéticos em roedores têm demonstrado que receptores de peptídeo liberador de gastrina (GRPR) em áreas como a região dorsal do hipocampo, são importantes na regulação da plasticidade sináptica e em aspectos do comportamento que podem estar alterados em desordens como ansiedade, depressão, demência e outras. Várias modificações comportamentais têm sido descritas em roedores sob a influência de GRPRs, como ingesta alimentar, estereotipia, retenção de memória e aprendizado motivado por emoção.

Existem várias linhas de evidências indicativas de que peptídeos análogos à bombesina (BNPs) através da ativação de seus receptores possam estar envolvidos em alterações neuroquímicas associadas a doenças psiquiátricas e neurológicas, por exemplo pela interação com outros sistemas de neurotransmissores. Considera-se que GRPRs estejam localizados em uma classe de interneurônios GABAérgicos no hipocampo. Através do estímulo desse receptor ao longo do hipocampo, GRP aumenta os níveis extracelulares de GABA pela despolarização dos interneurônios e, em consequência, aumenta a neurotransmissão mediada por GABA nesta área.

Este grupo de pesquisa tem proposto que o fato de GRPRs em áreas límbicas exercerem um papel regulatório na cognição e no processamento da informação relacionada à emoção é consistente com a visão que uma disfunção no sistema GRP possa estar envolvido em doenças psiquiátricas.

Considerando essas observações, tem-se esses peptídeos e a via mediada por GRPR como um potencial alvo terapêutico em doenças do sistema nervoso central. Para que

sejam desenvolvidas novas drogas tendo GRPR como facilitador do potencial cognitivo, faz-se necessário elucidar o papel regulatório de GRPR sobre memória.

Com este objetivo o presente trabalho foi elaborado, a partir do interesse em identificar o papel dos receptores de bombesina/peptídeo liberador de gastrina (BB/GRP) na formação da memória hipocampal.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Peptídeo Liberador de Gastrina (GRP)

2.1.1 Histórico

Em 1971, foi isolado da pele da rã *Bombina bombina*, o peptídeo de 14-aminoácidos bombesina (BB) (3). Em 1979, usando um anti-soro desenvolvido contra BB, pesquisadores identificaram seu análogo em mamíferos, um peptídeo de 27 aminoácidos denominado peptídeo liberador de gastrina (GRP), uma vez que sua primeira atividade conhecida foi a indução da secreção de gastrina nas células G no estômago. GRP apresenta além da mesma seqüência carboxi-terminal (Tabela 1), funções biológicas semelhantes às da BB (46).

Outros peptídeos com estruturas semelhantes foram isolados de anfíbios e dois peptídeos análogos à bombesina também foram encontrados nos tecidos de mamíferos, o peptídeo neuromedina B e o peptídeo neuromedina C, que possuem atividades biológicas semelhantes à BB e GRP (5, 27, 52-54).

Tabela 1. Estrutura da Bombesina (BB) e Peptídeo Liberador de Gastrina (GRP) (73).

Bombesina:

Pyr-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-**Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂**

Peptídeo liberador de gastrina:

Ala-Pro-Val-Ser-Val-Gly-Gly-Gly-Thr-Val-Leu-Ala-Lys-Met-Tyr-Pro-Arg-Gly-Asn-His-**Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂**

Assim como muitos neuropeptídeos, GRP surgiu de uma série de etapas de processamento bem definidas de um precursor com 148 aminoácidos de ampla tradução (PreproGRP) (90, 91). O cDNA codificando GRP humano foi primeiramente clonado de uma metástase hepática de um tumor carcinóide pulmonar rico em imunoreatividade a GRP (91). Sua descoberta e a disponibilidade de um anti-soro contra esse peptídeo, conduziram à demonstração de imunoreatividade em extratos de tecidos e à localização imunohistoquímica de GRP em diferentes tecidos e tipos celulares (64).

2.1.2 Distribuição pelo Corpo Humano

Em mamíferos, a presença de BB/GRP distribuído por todo o sistema nervoso central e fibras nervosas ao longo do trato gastrointestinal está bem documentada, apresentando alta densidade no pâncreas (9, 30) e no plexo mioentérico do estômago (10, 16, 38). A ocorrência de imunoreatividade a GRP também tem sido bem documentada em tecidos de pulmão humano: adulto e fetal (96, 113).

Os peptídeos também estão presentes no fluido cerebrospinal, fluido bronquial e ainda é secretado no leite materno (1, 42). O útero gravídico de uma série de espécies incluindo a humana é um dos maiores sítios de produção de GRP, embora a maioria pareça incompletamente processado (22, 103). Outras pesquisas ainda incluem sua presença no timo, próstata e uretra (64).

A distribuição regional de GRP através do cérebro e sistema nervoso central tem sido bem descrita por alguns grupos de pesquisadores (55, 63). Estudos de hibridização *in situ* avaliaram a distribuição de GRP no cérebro de ratos, encontrando altos níveis de GRP mRNA na área amígdalohipocámpal, giro dentado, hipotálamo e isocórtex (101) e baixa densidade de

peptídeos análogos à bombesina no córtex (55). A maior parte das áreas contendo GRP mRNA também apresenta imunoreatividade para GRP (12, 54, 101, 116).

2.1.3 Funções Fisiológicas

Os peptídeos GRP exercem diversos papéis fisiológicos, incluindo a regulação de funções metabólicas, influência na secreção e/ou inibição de hormônios gastrintestinais como gastrina e somatostatina e atuação sobre a secreção exócrina pancreática, incluindo a secreção de insulina e glucagon (9, 37, 38, 67, 86). Em adição ao estímulo da secreção gástrica, tem-se a contratilidade da musculatura lisa, termorregulação, saciedade e outras atividades relacionadas (23, 27, 45, 89, 108). Os efeitos neurais de GRP quando administrado em algumas espécies de mamíferos, incluem mudanças no comportamento do animal, o aumento do aprendizado e da retenção de memória por ativação vagal periférica (14) e o aumento na atividade espontânea quando administrados via exógena (5, 31, 109-112).

Há alguns estudos que sugerem a existência de um balanço no processo de proliferação celular e morte celular programada, provocado pela administração de BB. Foi demonstrado que células do pulmão fetal de ratos sofrem apoptose, inibida pela BB, através da interação com os seus respectivos receptores (36). Além disso, a administração crônica de GRP pode aumentar o conteúdo do DNA (35) e induzir hiperplasia das células da mucosa (93).

In vivo, esse peptídeo apresenta um importante papel na diferenciação e crescimento do pulmão fetal, estando envolvido como fator de crescimento autócrino. Essa hipótese autócrina para crescimento do câncer, postula que uma célula produz ambos fator de crescimento e seu receptor, e que dessa interação resulta a proliferação. O reconhecimento de GRP como um protótipo de fator de crescimento autócrino foi originalmente baseado na

detecção de GRP e seu receptor, e sobre o efeito anti-proliferativo de anticorpos GRP, em carcinomas de pulmão de células pequenas (SCLC) (64).

Estudos têm demonstrado sua proliferação em outros tipos celulares, o que pode estar relacionado com o desenvolvimento e a progressão de outras neoplasias, como câncer gástrico, pancreático, cólon, mama e próstata, considerando que também atua como fator de crescimento em diversos órgãos e sistemas envolvidos com a sinalização mediada por seu receptor (5, 8, 93).

2.2 Receptores GRP e Análogos

2.2.1 Características Estruturais do Receptor

O receptor para o peptídeo liberador de gastrina (GRPR ou Receptor BB2) com 384 aminoácidos (Tabela 2, Figura 1) é um membro da subfamília de receptores de peptídeos semelhantes à bombesina (BB) e é capaz de mediar as ações do peptídeo BB e do peptídeo liberador de gastrina (GRP).

Tabela 2. Estrutura Molecular do Receptor do Peptídeo Liberador de Gastrina (GRPR) (54, 73).

(1-60) MALNDCFLLN LEVDHFMHCN ISSHSADLPV NDDWSHPGIL YVIPAVYGV IILIGLIGNIT
(61-120) LIKIFCTVKS MRNVNLFIS SLALGDLLLL ITCAPVDASR YLADRWFGR IGCKLIPFIQ
(121-180) LTSVGVSVFT LTALSADRYK AIVRPMDIQA SHALMKICK AAFIWIISML LAIPEAVFSD
(181-240) LHPFHEESTN QTFISCAPYP HSNELHPKIH SMASFLVFYV IPLSIISVYY YFIKLNLIQS
(241-300) AYNLPVEGNI HVKEQIESRK RLAKTVLVFV GLEAFCWLPN HVIIYLRSYH YSEVDTSMLH
(301-360) FVTSICARLL AFTNSCVNPF ALYLLSKSFR KQFNTQLLCC QPGLIIRSHS TGRSTTCMTS
(361-384) LKSTNPSVAT FSLINGNICH ERYV

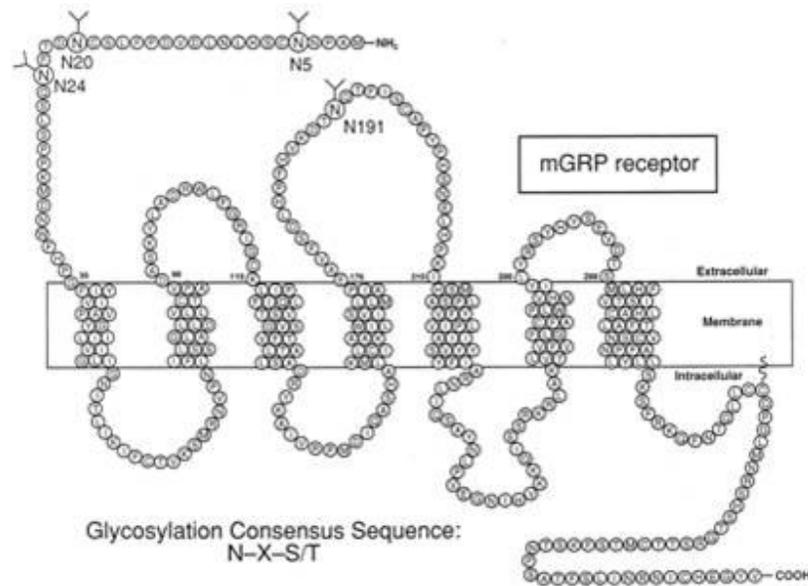


Figura 1. Sequência de aminoácidos de mGRP e disposição transmembrana. Benya *et al*, 2000 (74)

Outros três diferentes subtipos de receptores para essa família têm sido descritos: receptor NMB (ou receptor Bombesina 1 – BB1), BRS-3 e BB4-R (39, 54, 60, 73, 85).

Todos os subtipos são caracterizados como membros da superfamília de receptores acoplados à proteína G, com sete domínios transmembrana e capazes de estimular a fosfolipase C a aumentar as concentrações intracelulares de fosfato de inositol, diacilglicerol e cálcio (80).

Outros mediadores intracelulares ativados por GRPR incluem a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), cinase de adesão focal (FAK), fosfatidilinositol-3-quinase e em algumas situações proteína de resposta ao AMPc (65, 69, 80).

2.2.2 Localização dos Receptores

Em um estudo investigando a presença de sítios de ligação à BB no SNC, observou-se que BB liga com alta afinidade às membranas cerebrais de ratos. A área cerebral com a mais alta densidade de sítios de ligação específica é o hipocampo, que está envolvido

na plasticidade sináptica, memória e doenças neuropsiquiátricas como esquizofrenia e Doença de Alzheimer. Foi também demonstrada a ocorrência de peptídeos endógenos análogos à BB no cérebro de ratos usando técnicas de radioimunoensaio (55-57).

Para um maior detalhamento sobre a distribuição do GRPR no cérebro foi realizado estudo com hibridização *in situ* em ratos (99), onde uma expressão proeminente de GRPR foi detectada na região hipotalâmica, além da presença de GRPR mRNA no giro dentado, isocórtex, trato olfatório, gânglio basal e hipotálamo (5, 54). Estudos usando técnicas autoradiográficas indicaram que as áreas cerebrais que contêm altas densidades de GRPRs incluem ainda bulbo olfatório, amígdala central, formação hipocampal dorsal (área CA3 e giro dentado) e núcleo talâmico (54, 105, 106, 114).

Um estudo mais recente de imunohistoquímica (Figura 2) determinando a distribuição de GRPR no cérebro de ratos confirma que os receptores se encontram em dendritos e corpos celulares de neurônios em regiões cerebrais que incluem hipocampo dorsal e amígdala (5, 32, 105, 114).

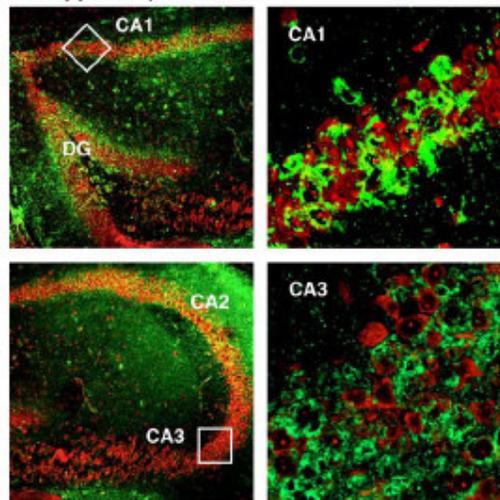


Figura 2. Localização de GRPR no cérebro de rato selvagem. A coluna da esquerda mostra imagens de microscópio e regiões selecionadas e aumentadas na coluna da direita. Após imunossinais para GRPR-anticorpos (verde) terem sido observados, seções foram coradas com iodeto de propidium (vermelho) para delimitar o núcleo da célula. Abreviações: CA1 = região CA1 do hipocampo; CA2 = região CA2 do hipocampo; CA3 = região CA3 do hipocampo; DG = giro dentado. Adaptado de (32).

Através da utilização de técnicas de ligação a receptores e ligantes seletivos a receptores para BB, foi comprovado ainda que BB e GRP ligam com alta afinidade a GRPR (receptor BB2) (6, 54, 90, 100), enquanto NMB apresenta baixa afinidade por esse receptor (100).

2.2.3 Vias de Sinalização Celular

Respostas intracelulares para a ativação de GRPR em células de câncer e linhas celulares neuroendócrinas têm mostrado um envolvimento de cascatas de sinalização, particularmente da via da proteína quinase C (PKC) e via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK/ERK). A secreção de cromogranin-A mediada por GRPR em linhas celulares neuroendócrinas é bloqueada por inibidores de fosfolipase C (PLC), PKC e MAPK (24). Confirmando esses estudos, nosso grupo apresenta resultados que indicam claramente que a modulação da memória por GRPRs hipocâmpais requerem ambas PKC e MAPK (74).

Em câncer gástrico, a indução gênica pela ativação de GRPR também foi bloqueada por inibidores de PKC, enquanto um inibidor de proteína quinase A (PKA) apresentou efeitos mínimos (33). Com relação à via da PKA, nossos resultados indicaram que a modulação da memória por BB foi bloqueada por uma dose inefetiva de um inibidor de PKA e potencializada por ativadores da via PKA. Isso talvez ocorra por mecanismos envolvidos em *crosstalk* entre as vias PKC, MAPK e PKA, já que GRPR está acoplado à proteína G que ativa diretamente a via PKC (74) (Figura 3).

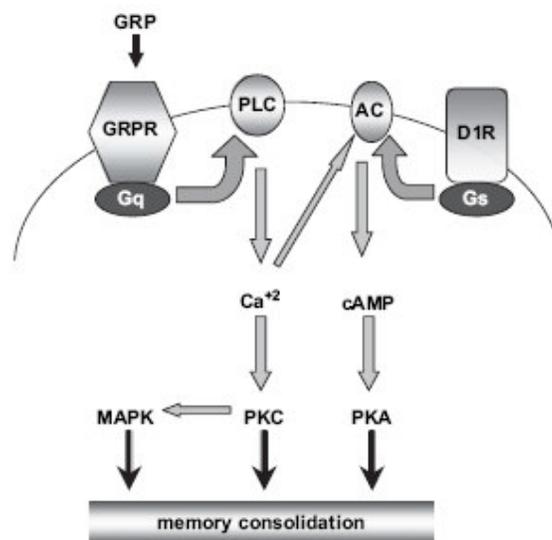


Figura 3. Diagrama esquemático para o mecanismo de sinalização que medeia as ações de GRPR sobre consolidação da memória no hipocampo. GRP liberado na fenda sináptica se liga a GRPR acoplado à proteína G no sítio pós-sináptico. A ativação de GRPR induz um aumento no Ca²⁺ intracelular e, em seqüência, leva à ativação da via da fosfolipase C (PLC)/proteína quinase C (PKC), que por sua vez, ativa MAPK (74).

Um outro estudo tem descrito que a ativação de GRPR regula a via MAPK/ERK em fibroblastos através de um complexo mecanismo dependente dos níveis de expressão de GRPR e concentração do agonista (11). Embora os efeitos da ativação de GRPR mediando mecanismos de sinalização em neurônios precisem ser mais bem caracterizados, os estudos usando tipos celulares indicam que as vias PKC e MAPK estão envolvidas na resposta intracelular à ativação de GRPR na membrana neuronal, visto que a despolarização induzida por GRP no hipocampo de ratos é bloqueada por um inibidor de PLC (40).

Quando ativado pelos peptídeos BB/GRP, GRPR regula uma variedade de funções celulares e neuroendócrinas como já citado, incluindo proliferação e diferenciação celular, crescimento tumoral, alimentação e respostas ao estresse (54, 60, 73, 85). Recentes estudos têm relacionado GRPR também com a patogênese da doença inflamatória (13) e doenças do sistema nervoso central (73), mas o envolvimento na regulação da formação da memória é que tem despertado um maior interesse (43, 72-76, 79, 81, 82, 87, 97, 104).

2.3 Envolvimento de GRPR na Formação e Consolidação da Memória

De acordo com a classificação mais aceita atualmente, as memórias podem ser divididas em memórias ditas declarativas e memórias chamadas procedurais ou “hábitos”. Muitas memórias humanas começam como declarativas (o indivíduo pode “declarar” que existem e afirmar do que se trata) e, com a reiteração, tornam-se hábitos. Todos aprendem a bater num teclado para produzir palavras ou músicas de maneira declarativa; mas, ao longo dos dias ou dos anos, realizamos a mesma tarefa por hábito, sem olhar, de forma quase automática. O mesmo se aplica a dirigir um veículo, ou a realizar ou inibir qualquer atividade motora (48, 49, 84, 88).

Quando a memória é formada, a nova informação adquirida pelo sistema nervoso é inicialmente lábil e só irá tornar-se estável com a ocorrência de modificações sinápticas que caracterizam o processo de consolidação (74).

Desde a década de 60, laboratórios dedicados à farmacologia da memória empenham-se na análise da modulação da memória, através do uso de drogas, hormônios, neurotransmissores e neuromoduladores na consolidação da memória, compreendendo que substâncias moduladoras podiam influenciar os mecanismos básicos do processamento da memória. Após o sucesso desses estudos visando o aumento da consolidação da memória, as drogas passaram a ser administradas imediatamente após o treino, para evitar confusão de efeitos na aquisição, performance ou evocação (28, 29, 48).

O modelo de esquia inibitória (ou passiva) tornou-se a atividade de aprendizado mais utilizada nesse tipo de estudo, pois é rapidamente aprendida e permite a determinação precisa do momento após o aprendizado, no qual os tratamentos afetam a consolidação da memória, algo difícil de discernir em tarefas que requerem muitos procedimentos (28, 29, 48).

A base bioquímica da formação dessa memória envolve a ativação de três tipos diferentes de receptores glutamatérgicos em uma sub-região da área cerebral conhecida como hipocampo dorsal, mais especificamente região CA1. Essa ativação é seguida de vários eventos moleculares, como a ativação seqüencial de várias enzimas. Paralelamente, e em dois picos, um imediatamente após o treino e outro, três horas mais tarde, estimula-se no hipocampo a expressão dos genes e, em seguida, a síntese de proteínas. A intensidade e a seqüência desses eventos independem da intensidade do aprendizado e da memória correspondente: eles são observados quando o animal é treinado com um choque fraco, mas também com um choque forte. Embora em diferente seqüência, essas e outras alterações ocorrem ainda em outras regiões cerebrais, notadamente na amígdala basolateral e no córtex entorrinal (28, 29, 48, 49).

GRPR tem emergido como um sistema de importante papel na regulação da formação da memória. Os efeitos comportamentais da administração sistêmica ou intracerebral de agonistas ou antagonistas de GRPR têm sido relatado em vários estudos farmacológicos investigando o papel de peptídeos análogos à BB e GRP. A observação dos efeitos de agonistas de GRPR sobre o desempenho de roedores em tarefa de memória, permite avaliar a participação desses receptores no aprendizado.

Estudos mostram que a administração sistêmica de BB ou GRP pode aumentar a formação de memória em camundongos (14) e ratos (72). Além disso, foi mostrado que a administração sistêmica de GRP atenua déficit de memória em modelo de amnésia induzido por escopolamina e hipóxia em camundongos (82). O 'nucleus tractus solitarius' (NTS) é proposto como uma área importante que medeia os efeitos de agonistas de GRPR sobre a memória, uma vez que infusões de BB no NTS aumentam a formação de memória em ratos (104), enquanto a inativação farmacológica de NTS atenua os efeitos da BB sobre a memória quando administrada via sistêmica (72).

[D-Tpi⁶, Leu¹³ psi(CH₂NH)-Leu¹⁴] bombesin (6-14) (RC-3095) é um dos antagonistas de GRPR, sintetizado por Shally e colaboradores como droga antitumoral, que tem sido utilizado como ferramenta para elucidar a participação do bloqueio de GRPR na formação da memória (73). Para investigar as conseqüências desse bloqueio, já foram examinados diferentes tipos de memória em ratos tratados com infusões intracerebrais ou sistêmicas dessa droga.

Em um estudo do grupo, observou-se que ratos que receberam uma injeção sistêmica de RC-3095 apresentaram diminuição na retenção de curta e longa duração para condicionamento de esquiva inibitória, tipo de tarefa de memória motivada aversivamente, mas sem afetar o reconhecimento de objeto, tipo de memória não emocional, indicando um papel seletivo e importante dos receptores de GRP na formação da memória emocional (75). Consistente com esse resultado, Santo-Yamada et al. (81) também mostrou um efeito prejudicial da administração sistêmica de antagonistas de GRPR sobre memória de esquiva inibitória em camundongos.

Com a administração de micro-infusões bilaterais de RC-3095 na área CA1 do hipocampo dorsal também se pode observar prejuízo na consolidação da memória em tarefa de esquiva inibitória em ratos, o que indica a participação de GRPRs hipocampais na consolidação da memória motivada emocionalmente (79).

Considerando-se que a infusão de RC-3095 no hipocampo dorsal não afetou nem a performance no treino de uma tarefa de múltiplas vias nem o procedimento em tarefa de plus maze elevado, tem-se que GRPRs hipocampais não estão envolvidos na aquisição da memória ou medo não aprendido (78). Consistente com o papel de GRPRs na regulação da plasticidade hipocampal, um estudo eletrofisiológico mostrou que GRP induz despolarização da membrana em neurônios hipocampais em ratos, efeito este que é bloqueado por um antagonista de GRPR (40).

É importante notar que os efeitos prejudiciais à memória pela infusão de RC-3095 puderam ser revertidos pela administração sistêmica de dexametasona, um agonista de receptor glicocorticóide, indicando que GRPR exerce um papel regulatório na consolidação da memória emocional, mas não é um sistema crítico requerido para formação da memória (97). Além disso, esses achados apóiam a possibilidade de que ocorram interações funcionais entre GRPR e receptores glicocorticóides no SNC (73).

Sabe-se que o complexo basolateral da amígdala (BLA, consistindo do núcleo basal, núcleo lateral e núcleo basal acessório) está criticamente envolvido na regulação da memória e emoção e medeia os efeitos modulatórios de drogas e hormônios na memória motivada emocionalmente (47, 49), portanto, anormalidades da amígdala são propostas como exercendo papel em doenças psiquiátricas como esquizofrenia, ansiedade e autismo (2, 59, 115).

Nosso grupo de pesquisa tem examinado o papel de GRPRs da amígdala no processamento da memória emocional. RC-3095 mostrou diminuir a retenção em esQUIVA inibitória em ratos após injeção bilateral na amígdala basolateral (BLA) sugerindo que os receptores de GRP presentes nessa região também estão envolvidos na consolidação da memória (76). Além disso, a inativação farmacológica de BLA com muscimol, um agonista de receptores ácido γ -aminobutyric (GABA) tipo A, bloqueou o efeito prejudicial da administração sistêmica de RC-3095 na consolidação da memória (76).

Estudos de outro grupo com microinfusão do agonista GABAérgico muscimol ou de picrotoxina no septo medial, amígdala ou hipocampo demonstraram que mecanismos GABAérgicos atuam como reguladores precoces da evolução da formação da memória nestas regiões. Por exemplo, parece claro que memória de esQUIVA inibitória é feita no hipocampo e nas suas conexões com o neocórtex (28).

A picrotoxina (bloqueador do canal de Cl⁻ do receptor γ -aminobutírico do tipo A - GABA_A) era utilizada como estimulador central para aumento da consolidação da memória

(48). Após o entendimento de que essa droga age através do sistema GABA_A, tornou-se claro que esses receptores são os responsáveis por um importante sistema de modulação inibitória da fase inicial da consolidação da memória, que determina se o processo será completado (28, 29).

Juntas, as descobertas de experimentos examinando os efeitos de agonistas e antagonistas de GRPRs sobre a memória em roedores indica que a ativação de GRPR no hipocampo e amígdala (e possivelmente outras áreas) está importantemente envolvida na modulação da memória e aprendizado motivado emocionalmente. Embora a maioria das evidências farmacológicas indica que ativação de GRPR por agonistas aumenta, enquanto antagonistas bloqueiam a memória e plasticidade sináptica, o papel dos receptores GRPR hipocampais na formação da memória permanece controverso.

Estudo feito por Shumyatsky et al. (87) mostrou um efeito facilitatório de um antagonista de GRPR sobre potenciação de longa duração (LTP). Este efeito foi consistente com os dados de experimentos de comportamento e eletrofisiológicos usando camundongos geneticamente modificados deficientes em GRPRs (98) usados para acessar o papel de GRPRs na plasticidade sináptica e comportamento.

Camundongos deficientes em GRPR mostraram aumento da atividade locomotora, comportamento social não-agressivo (98, 112) e preferência social alterada por machos (110). Importaneamente, camundongos deficientes em GRPR têm mostrado destacada memória de longa duração motivada aversivamente e aumento em LTP na amígdala, suportando a visão de que GRPRs na amígdala são importantemente envolvidos na regulação do medo aprendido; no entanto, esse estudo não foi capaz de detectar um papel para GRPRs hipocampais na regulação da memória, uma vez que a memória hipocampal se apresentou normal (87).

Baseado nesses estudos, Shumyatsky et al. (87) propuseram que GRPR é um sistema exercendo um papel inibitório na memória motivada aversivamente. Embora outros

estudos sejam necessários para esclarecer o exato papel de GRPR na regulação da memória, há fortes evidências de que GRPR esteja entre os diversos sistemas de receptores neuronais que participam da modulação da memória (73).

Mecanismos de sinalização celular mediando as ações da ativação de GRPR na plasticidade sináptica e comportamento ainda não foram determinadas. Dados eletrofisiológicos têm indicado que ativação de GRPR interfere com a neurotransmissão no hipocampo ventral de ratos e com modulação de níveis extracelulares de GABA em camundongos (4). Tem sido proposto que GRPR esteja localizado predominantemente em interneurônios inibitórios liberadores de GABA, e a ativação de GRPR levaria ao aumento na transmissão GABAérgica, que por sua vez inibiria plasticidade sináptica e memória (4, 40, 87).

Estudos usando células não neuronais têm implicado as vias de sinalização PKC e MAPK/ERK nos eventos de transdução de sinal iniciado por ativação de GRPR (11, 24, 33, 69, 107). Uma vez que essas cascatas estão envolvidas na consolidação da memória motivada emocionalmente no hipocampo e amígdala (28, 29, 48, 70, 83, 84), considera-se possível que elas mediem os efeitos da ativação de GRPR sobre a memória.

Uma outra possibilidade é que os efeitos sobre a memória induzidos por GRP envolvam o fator de crescimento epidermal (EGF) e seus receptores. Uma administração única de RC-3095 tem mostrado induzir uma diminuição prolongada nos níveis e na expressão de mRNA de receptores EGF em câncer de mama em camundongos (94).

Uma vez que EGF exerce ações neurotróficas em neurônios do SNC e a aplicação de EGF aumenta a potenciação de longa duração em fatias hipocampais de ratos (95), é possível que as ações sobre a memória de drogas relacionadas à GRPR sejam ao menos parcialmente mediadas por uma interferência com níveis de EGF ou expressão e/ou função de receptor de EGF.

Nosso grupo de pesquisa tem proposto que o fato de GRPRs em áreas límbicas exercerem um papel regulatório na cognição e no processamento da informação relacionada à emoção é consistente com a visão de que uma disfunção no sistema GRP possa estar envolvida em doenças psiquiátricas como esquizofrenia, autismo e doenças relacionadas à ansiedade (77). Além disso, a elucidação de um papel regulatório de GRPR sobre memória parece conduzir ao desenvolvimento de novas drogas visando GRPR como facilitador do potencial cognitivo.

2.4 Envolvimento de GRP e GRPR nos Distúrbios do Sistema Nervoso Central

O GRP e seus receptores estão presentes em todo o sistema nervoso central, em particular em áreas límbicas cerebrais como hipocampo e amígdala, as quais estão envolvidas de forma importante na regulação emocional, na função cognitiva e em transtornos neuropsiquiátricos e neurodegenerativos (54). Pacientes com doenças do SNC apresentaram níveis alterados de numerosos peptídeos (7, 17, 18, 58), no entanto, a significância dessas alterações para a patofisiologia das doenças ainda não é bem clara.

Sistemas de sinalização celular anormal parecem estar implicados na patofisiologia da Doença de Alzheimer (AD) (20). Pacientes que apresentam AD e modelos animais da doença exibem diversas alterações celulares e moleculares que podem estar relacionadas com o aumento nos estoques intracelulares de cálcio induzidos por BB/GRP em fibroblastos (19-21, 26, 41). Alterações nos níveis de GRP no SNC humano parecem estar envolvidas ainda em casos de anorexia, bulimia nervosa e transtornos de humor (15, 51).

A concentração de peptídeos análogos à BB encontrada em pacientes com Doença de Parkinson foi significativamente reduzida no núcleo caudado e 'globus pallidus' (7), mas inalterada no tecido da medula adrenal (92). Acredita-se que haja também um envolvimento

de GRPR na patofisiologia do autismo, relacionado com a ausência da expressão do gene *GRPR* ou mesmo uma translocação X;8 que ocorre no gene que expressa os receptores para GRP (25, 44, 100). Além disso, BB/GRP possivelmente está envolvido com outros distúrbios neuropsiquiátricos como a esquizofrenia, em cujos pacientes os níveis desses peptídeos são reduzidos na urina e fluido cerebrospinal (1, 17, 58, 62, 92).

Estudos revelam que BB/GRP possui a capacidade de despolarizar interneurônios GABAérgicos no hipocampo e esta função pode levar ao aumento dos níveis extracelulares de GABA (4, 40). Shumyatsky et al, descobriram que a ativação de GRPR pode aumentar significativamente os níveis de GABA inibitório no núcleo lateral da amígdala. Baseados nesse resultado, pesquisadores propuseram um modelo para a ação do GRP na amígdala, que ao se ligar no GRPR dos interneurônios GABAérgicos, levaria à liberação de GABA, promovendo o controle inibitório de processos ocorridos em outras células (87).

Outros estudos demonstraram que camundongos mutantes deficientes de GRPR apresentaram pouca preferência social quando comparados com o tipo selvagem, entretanto, quando anestesiados, os mutantes possuem maior interesse investigatório no teste de atividade social. Esses resultados sugerem que possivelmente a função GABAérgica esteja em parte alterada nos camundongos mutantes (110).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar o papel de receptores de peptídeo liberador de gastrina (GRPR), localizados na região do hipocampo, na formação da memória.

3.2 Objetivos Específicos

Visando atender o objetivo geral desse trabalho, têm-se como objetivos específicos:

- a) Examinar os efeitos sobre a consolidação da memória de microinfusões de diferentes doses de um antagonista de GRPR (RC-3095) na região CA1 do hipocampo dorsal;
- b) Investigar a interação entre GRPRs e receptores GABA tipo A na modulação da consolidação da memória no hipocampo.

4 CAPÍTULO I

Opposite effects of low and high doses of the gastrin-releasing peptide receptor antagonist RC-3095 on memory consolidation in the hippocampus: possible involvement of the GABAergic system

Peptides 27 (2006) 2307-2312



ELSEVIER

available at www.sciencedirect.com



journal homepage: www.elsevier.com/locate/peptides



Opposite effects of low and high doses of the gastrin-releasing peptide receptor antagonist RC-3095 on memory consolidation in the hippocampus: Possible involvement of the GABAergic system

Andrea dos Santos Dantas^{a,b}, Tatiana Luft^{a,c}, João Antônio Pêgas Henriques^{b,d}, Gilberto Schwartzmann^{e,f}, Rafael Roesler^{a,b,e,*}

^aCellular and Molecular Neuropharmacology Research Group, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 90046-900 Porto Alegre, RS, Brazil

^bGraduate Program in Cellular and Molecular Biology, Center for Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^cDepartment of Biochemistry, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

^dSchool of Pharmacy, Lutheran University of Brazil, 92420-280 Canoas, RS, Brazil

^eCancer Research Laboratory, Academic Hospital Research Center, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

^fDepartment of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 February 2006

Received in revised form

21 March 2006

Accepted 22 March 2006

Published on line 2 May 2006

Keywords:

Bombesin-like peptides

Gastrin-releasing peptide receptor

RC-3095

Hippocampus

Memory consolidation

ABSTRACT

Although the gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) has recently emerged as a system importantly involved in regulating memory formation, the role of hippocampal GRPRs in memory remains controversial. The present study examined the effects of GRPR antagonism on memory consolidation in area CA1 of the hippocampus. Male Wistar rats received bilateral infusions of the GRPR antagonist [D-Tpi⁶, Leu¹³psi(CH₂NH)-Leu¹⁴] bombesin (6–14) (RC-3095; 1, 3, or 10 μg/side) into the dorsal hippocampus immediately after inhibitory avoidance (IA) training. RC-3095 at 1 μg impaired, whereas the dose of 10 μg enhanced, 24-h IA retention. A second experiment showed that the RC-3095-induced enhancement of memory consolidation was prevented by pretraining infusion of an otherwise ineffective dose of the gamma-aminobutyric acid type A (GABA_A) receptor agonist muscimol. The results indicate that high doses of GRPR antagonists can induce enhancement of memory consolidation in the hippocampus. In addition, the memory-enhancing effect of GRPR antagonists might be mediated by inhibition of GABAergic transmission.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The gastrin-releasing peptide-preferring receptor (GRPR, BB2 receptor) is a member of the bombesin (BB)-like peptide

receptor subfamily of G-protein coupled receptors that is activated by the amphibian peptide BB or its mammalian counterpart gastrin-releasing peptide (GRP). The GRPR regulates a range of cellular and neuroendocrine functions,

* Corresponding author. Tel.: +55 51 33126 3183; fax: +55 51 3316 3121.

E-mail address: rroesler@terra.com.br (R. Roesler).

0196-9781/\$ – see front matter © 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.peptides.2006.03.021

including cell proliferation and differentiation, cancer growth, feeding behavior, and stress responses (for recent reviews, see [9,10,14,20]). Recent evidence has implicated the GRPR also in the pathogenesis of inflammatory disease [2] and central nervous systems (CNS) disorders (for a review, see [14]).

The GRPR has also emerged as a system importantly involved in regulating memory formation [8,13,15–19,21,23,24]. Within the brain, the GRPR occurs on dendrites and cell bodies of neurons in regions including the dorsal hippocampus [5]. Early pharmacological studies have indicated that systemic administration of GRPR agonists can improve memory retention in rodents [3]. Conversely, systemic injections of GRPR antagonists impair memory retention [15,18]. We have previously shown that brain areas mediating memory modulation by the GRPR include the dorsal hippocampus and amygdala. Thus, infusions of the GRPR antagonist [D-Tyr⁶, Leu¹³ psi(CH₂NH)-Leu¹⁴] bombesin (6-14) (RC-3095) into either the CA1 area of the dorsal hippocampus or the basolateral amygdala impair consolidation of memory for inhibitory avoidance (IA), a single-trial type of aversive conditioning, in rats [16,17,23].

Together, the findings reviewed above indicate that GRPR activation in brain areas including the dorsal hippocampus enhances, whereas GRPR antagonism impairs, memory formation. However, the role of hippocampal GRPRs in memory formation remains controversial. It has been proposed that the GRPR is located predominantly on inhibitory interneurons releasing gamma-aminobutyric acid (GABA), and GRPR activation would lead to an increase in GABAergic transmission, which would in turn inhibit synaptic plasticity and memory [1,7,21]. In addition, a genetic study failed to find a role for GRPRs in the hippocampus in regulating memory. Thus, GRPR-

deficient mice show enhanced fear-motivated conditioning and synaptic plasticity in the amygdala, but normal hippocampal memory [21]. In order to further evaluate the role of hippocampal GRPRs in memory formation, the present study examined the effects of infusions of different doses of the GRPR antagonist RC-3095 into the dorsal hippocampus on memory consolidation. A second experiment investigated the interaction between GRPRs and GABA type A (GABA_A) receptors in modulating memory consolidation in the hippocampus.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Adult male Wistar rats (235–300 g at time of surgery) from the State Health Research Foundation (FEPPS-RS) were housed five to a cage in a temperature-controlled colony room with food and water available ad libitum, and maintained on a 12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m.). Behavioral procedures were conducted during the light phase of the cycle between 9:00 and 17:00. All experimental procedures were performed in accordance with the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication No. 80-23 revised 1996). All efforts were made to minimize the number of animals and their suffering.

2.2. Surgery

Animals were implanted under thionembutal anesthesia (30 mg/kg, ip) with bilateral 9.0 mm, 23-gauge guide cannulae aimed 1.0 mm above the CA1 area of the dorsal hippocampus as described in previous studies [17,23]. Coordinates (anteroposterior, –4.3 mm from bregma, mediolateral, ±3.0 mm from bregma, ventral, –1.4 mm from dura) were obtained from the atlas of Paxinos and Watson [11]. Animals were allowed to recover at least 7 days after surgery.

2.3. Behavioral training

We used IA as an established model of aversively motivated, hippocampus-dependent memory (for a review, see [4]). In IA training, animals learn to associate a location in the training apparatus with an aversive stimulus (footshock). The IA behavioral training and retention test procedures were described in previous reports [15–17,23]. The IA apparatus was a 50 cm × 25 cm × 25 cm acrylic box (Albarsch, Porto Alegre, Brazil) whose floor consisted of parallel caliber stainless steel bars (1 mm diameter) spaced 1 cm apart. A 7-cm wide, 2.5-cm high platform was placed on the floor of the box against the left wall. On the training trial, rats were placed on the platform and their latency to step down on the grid with all four paws was measured with an automatic device. Immediately after stepping down on the grid, rats received a 0.3 mA, 2.0 s footshock and were removed from the apparatus immediately after the footshock. A retention test trial was carried out 24 h after training. The retention test trial was procedurally identical to training, except that no footshock was presented. Step-down latencies on the retention test trial (maximum 180 s) were used as a measure of IA retention.

2.4. Drugs and infusion procedures

Intrahippocampal infusion procedures have been described in previous reports [17,23]. At the time of infusion, a 30-gauge infusion needle was fitted into the guide cannula. The tip of the infusion needle protruded 1.0 mm beyond the guide cannula and was aimed at the CA1 area of the dorsal hippocampus. Drugs were infused during a 30-s period. After the infusion of drug or vehicle, the infusion needle was left in place for an additional minute to allow diffusion of the drug away from the needle tip. For the first experiment, rats were given a bilateral 0.8 µl infusion of vehicle (VEH, 2% dimethylsulfoxide (DMSO) in saline (SAL, 0.9% NaCl)) or RC-3095 (1, 3, or 10 µg/side; Zentaris GmbH, Frankfurt, Germany) immediately after IA training. RC-3095 is a selective GRPR antagonist developed by Schally and colleagues as an experimental anticancer drug [12,22].

For the second experiment, animals were given a bilateral 0.8 µl infusion of SAL or the GABA_A receptor agonist muscimol (MUS, 0.01 µg; Sigma, St. Louis, MO, USA) 10 min before training and a bilateral 0.8 µl infusion of VEH or RC-3095 (10 µg/side) immediately after training. Pilot experiments indicated that pretraining infusion of that dose of MUS did not affect IA retention. Drug solutions were prepared freshly before each experiment.



Fig. 1 - Drawing of the plane A -4.3 mm of the atlas of Paxinos and Watson [11] showing the area (hatched) where the infusion sites considered to be correct were placed.

2.5. Histology

Twenty-four to 72 h after behavioral testing, the animals were killed by decapitation and their brains were removed, stored in 5% formalin for at least 72 h and verified for infusion site placements in the dorsal hippocampus as described in previous reports [17,23]. Only data from animals with correct cannula placements (77 animals) were included in the final analysis (Fig. 1).

2.6. Statistics

Data are mean \pm S.E.M. retention test latencies to step-down (s). Comparisons of training and retention test step-down latencies among groups were performed using Kruskal-Wallis analysis of variance followed by Mann-Whitney *U*-tests, two-tailed, when necessary [15-17,23]. In all comparisons, $P < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

3. Results

3.1. Opposite effects of low and high doses of RC-3095 on memory consolidation in CA1 area of the dorsal hippocampus

The first experiment examined the effects of posttraining intrahippocampal infusions of different doses of RC-3095 on 24-h retention of IA. Results are shown in Fig. 2. Consistent with previous studies [17,23], infusion of RC-3095 at 1 μ g impaired retention ($P < 0.01$ compared to the VEH-treated group). In contrast, the dose of 10 μ g RC-3095 induced

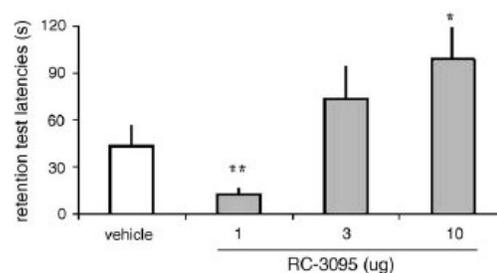


Fig. 2 - Opposite effects of low and high doses of RC-3095 on memory consolidation in the hippocampus. Data are mean \pm S.E.M. 24-h retention step-down latencies (s) of rats given bilateral 0.8 μ l infusions of vehicle (VEH) or RC-3095 (1, 3, or 10 μ g) into the CA1 area of the dorsal hippocampus immediately after inhibitory avoidance (IA) training; $N = 8-12$ animals per group. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared to the VEH-treated group.

retention enhancement ($P < 0.05$ compared to the VEH-treated group). The intermediate dose of RC-3095 (3 μ g) did not affect IA retention ($P = 0.38$ compared to the VEH-treated group). There was no significant difference among groups in training trial latencies ($P = 0.59$, overall mean \pm S.E.M. training trial step-down latency (s) was 10.1 ± 0.9). The results indicate that RC-3095 at a lower dose impaired, whereas a higher dose enhanced, consolidation of aversive memory in the CA1 hippocampal area.

3.2. A GABA_A receptor agonist prevents RC-3095-induced enhancement of memory consolidation in the hippocampus

Previous studies have suggested that the GRPR interacts with GABAergic transmission in affecting hippocampal function [1,7] and memory formation [21]. The second experiment examined whether stimulation of GABA_A receptors could

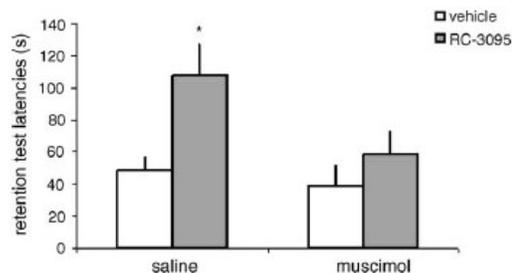


Fig. 3 - RC-3095-induced enhancement of memory consolidation in the hippocampus is prevented by the GABA_A receptor agonist muscimol. Data are mean \pm S.E.M. 24-h retention step-down latencies (s) of rats given bilateral 0.8 μ l infusions of saline (SAL) or muscimol (0.01 μ g) 10 min before inhibitory avoidance (IA) training, and vehicle (VEH) or RC-3095 (10 μ g) immediately after training; $N = 8-11$ animals per group. * $P < 0.05$ compared to the group treated with SAL and VEH.

affect the enhancement of consolidation induced by a high dose of RC-3095 observed in the first experiment. Results are shown in Fig. 3. Animals given pretraining SAL and posttraining RC-3095 at 10 μ g showed significant retention enhancement compared to the control group given SAL and VEH ($P < 0.05$). Pretraining infusion of a low dose of the GABA_A receptor agonist MUS did not affect IA retention ($P = 0.11$) compared to the control group treated with SAL and VEH but prevented the RC-3095-induced retention enhancement. There was no significant difference in retention between the group given MUS and RC-3095 and the control group given SAL and VEH ($P = 0.71$). There was no significant difference among groups in training trial latencies ($P = 0.90$, overall mean \pm S.E.M. training trial step-down latency (s) was 8.0 ± 1.2). The results indicate that GABA_A receptor activation prevented RC-3095-induced enhancement of IA memory consolidation in the hippocampus.

4. Discussion

The main findings of the present study can be summarized as follows: posttraining infusion of a high dose of the GRPR antagonist RC-3095 into the CA1 hippocampal area induced an enhancement of aversive memory retention, whereas, consistent with previous studies [17,23], a lower dose of RC-3095 produced memory impairment. In addition, the RC-3095-induced memory enhancement was blocked by pretraining infusion of an otherwise ineffective dose of the GABA_A receptor agonist muscimol. These data provide the first evidence of a memory-enhancing effect of a GRPR antagonist.

We have previously shown that posttraining intrahippocampal or intraamygdala infusions of lower doses of RC-3095 produced IA memory impairment [15-17,23]. Conversely, systemic or intracerebral administration of GRPR agonists has been reported to induce memory enhancement in both rats and mice [3,13,19,24]. However, the present results show that, at higher doses, a GRPR antagonist can induce memory enhancement. One simple explanation for this finding would be that at higher doses RC-3095 displays agonist activity. Partial agonist activities of high doses of other BB receptor antagonists have been described [6]. However, the view that RC-3095 produced memory enhancement through GRPR blockade would be consistent with several lines of evidence, including: (1) genetic experiments showing that GRPR-deficient mice show decreased GABA function associated with enhanced amygdalar synaptic plasticity and aversive memory [21]; (2) electrophysiological experiments indicating that GRP, possibly released from excitatory hippocampal neurons, activates GRPR which in turn stimulates GABA release and thus promotes neuronal inhibition in the hippocampus [1,7]; and (3) our recent observation that intrahippocampal infusions of high doses of BB impair IA memory (Roesler et al., unpublished observation). It is thus possible that the memory-enhancing effect of the higher dose of RC-3095 used in the present study is not attributable to drug-induced GRPR activation. One possibility to explain the differential effects of low and high doses of RC-3095 is that the GRPR is expressed on both inhibitory GABAergic interneurons and excitatory

glutamatergic neurons, as well as on neurons releasing other neurotransmitters. The recent finding by Kamichi et al. [5] that in the lateral amygdala only a subpopulation of cells expressing GRPRs are GABAergic neurons is consistent with the possibility that GRPRs are expressed on non-GABAergic neurons releasing glutamate or other neurotransmitters. Thus, different doses of GRPR antagonist could induce differential effects on excitatory and inhibitory neurons, either stimulating or inhibiting synaptic plasticity and memory. A higher dose of RC-3095 might act predominantly on GABAergic neurons, thus, reducing inhibitory function and allowing for facilitation of synaptic plasticity and memory formation. Such a model would reconcile the findings from pharmacological studies showing that GRPR agonists enhance, and antagonists impair, memory [3,8,15-19,23,24] with genetic and electrophysiological evidence suggesting that the GRPR acts as an inhibitory system that impairs synaptic plasticity and memory by stimulating GABAergic transmission [1,7,21].

In order to investigate this possibility, in the second experiment we have examined whether a low dose of a GABA_A receptor agonist, which did not affect memory retention per se, could alter the memory enhancement induced by RC-3095. Consistent with the possibility that the memory-enhancing effect of RC-3095 involves a reduction of GABAergic transmission, stimulation of GABA_A receptors with muscimol prevented the effect of RC-3095. GABA_A receptor stimulation by muscimol might have compensated for the decrease in GABAergic activity induced by RC-3095. Fig. 4 shows a schematic for a working model of the possible mechanism mediating RC-3095-induced memory enhancement in the hippocampus, based on the present results together with previous studies [7,21].

GRPR antagonists have potential therapeutic uses for the treatment of different conditions. RC-3095 was developed as an experimental anticancer drug that effectively reduces tumor growth in a number of models [12,22]. In addition, we have recently demonstrated that RC-3095 might also be useful in the treatment of sepsis and inflammatory diseases [2]. Regarding CNS disorders, current evidence indicates that the GRPR might play a role in neurodegenerative and neuropsychiatric disorders including autism, schizophrenia, anxiety, and cognitive dysfunction associated with Alzheimer's disease (for a review, see [14]). The present finding suggesting that at least under some experimental conditions GRPR antagonists can display cognitive-enhancing properties supports the view that the GRPR is a therapeutic target for the treatment of cognitive dysfunction associated with CNS disorders.

In summary, the present study is the first report of a memory-enhancing effect of a GRPR antagonist, namely, RC-3095. In addition, the data support the view that the memory-enhancing effect of GRPR blockade might involve a functional interaction between the GRPR and GABAergic neurons. Future studies should further investigate the cellular mechanisms mediating the differential effects of low and high doses of RC-3095 and possibly other GRPR antagonists on memory. One possibility worth examining is that the memory impairment induced by GRPR antagonists might be prevented by glutamate receptor agonists.

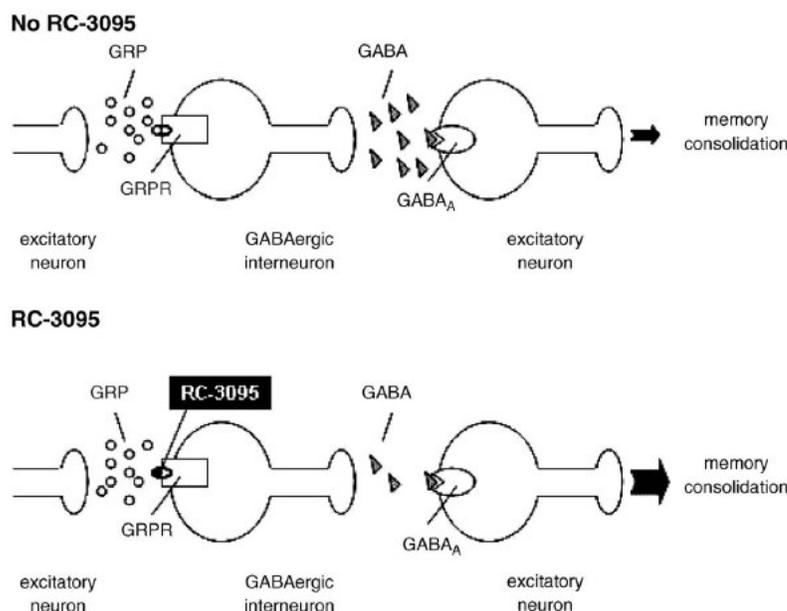


Fig. 4 – Schematic diagram for a model of possible mechanisms mediating RC-3095-induced enhancement of memory consolidation in the hippocampus. Gastrin-releasing peptide (GRP) released from hippocampal excitatory neurons [7] binds to GRP receptors (GRPRs) on inhibitory interneurons and stimulates gamma-aminobutyric acid (GABA) release [1,7,21]. RC-3095 blocks GRPRs, which might lead to reduced GABA-mediated inhibition of excitatory neurons, thus, facilitating synaptic plasticity and memory consolidation.

Acknowledgements

This research was supported by CNPq-MCT (grants 306413/2003-5 and 474700/2004-6 to R.R.), the South American Office for Anticancer Drug Development, the Children's Cancer Institute (Porto Alegre, Brazil), and Zentaris GmbH (Frankfurt, Germany). T.L. is supported by a CNPq fellowship.

REFERENCES

- [1] Andrews N, Davis B, Gonzalez MI, Oles R, Singh L, McKnight AT. Effect of gastrin-releasing peptide on rat hippocampal extracellular GABA levels and seizures in the audiogenic seizure-prone DBA/2 mouse. *Brain Res* 2000;859:386-9.
- [2] Dal-Pizzol F, Di Leone LP, Ritter C, Martins MR, Reinke A, Pens Gelain D, et al. Gastrin-releasing peptide receptor antagonist effects on an animal model of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:84-90.
- [3] Flood JF, Morley JE. Effects of bombesin and gastrin-releasing peptide on memory processing. *Brain Res* 1988;460:314-22.
- [4] Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 1997;68:285-316.
- [5] Kamichi S, Wada E, Aoki S, Sekiguchi M, Kimura I, Wada K. Immunohistochemical localization of gastrin-releasing peptide receptor in the mouse brain. *Brain Res* 2005;1032:162-70.
- [6] Kirkham TC, Gibbs J, Smith GP, Geary N. Meal pattern analysis in rats reveals partial agonist activity of the bombesin receptor antagonist BW2258U89. *Pharmacol Biochem Behav* 1995;52:101-6.
- [7] Lee K, Dixon AK, Gonzalez I, Stevens EB, McNulty S, Oles R, et al. Bombesin-like peptides depolarize rat hippocampal interneurons through interaction with subtype 2 bombesin receptors. *J Physiol* 1999;518:791-802.
- [8] Martins MR, Reinke A, Valvassori SS, Machado RA, Quevedo J, Schwartzmann G, et al. Non-associative learning and anxiety in rats treated with a single systemic administration of the gastrin-releasing peptide receptor antagonist RC-3095. *Peptides* 2005;26:2525-9.
- [9] Moody TW, Merali Z. Bombesin-like peptides and associated receptors within the brain: distribution and behavioral implications. *Peptides* 2004;25:511-20.
- [10] Ohki-Hamazaki H, Iwabuchi M, Maekawa F. Development and function of bombesin-like peptides and their receptors. *Int J Dev Biol* 2005;49:293-300.
- [11] Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates* San Diego: Academic Press; 1997.
- [12] Radulovic S, Cai RZ, Serfozo P, Groot K, Redding TW, Pinski J, et al. Biological effects and receptor binding affinities of new pseudonapeptide bombesin/GRP receptor antagonists with N-terminal D-Trp or D-Tpi. *Int J Pept Protein Res* 1991;38:593-600.
- [13] Rashidy-Pour A, Razvani ME. Unilateral reversible inactivations of the nucleus tractus solitarius and amygdala attenuate the effects of bombesin on memory storage. *Brain Res* 1998;814:127-32.
- [14] Roesler R, Henriques JAP, Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for

- psychiatric and neurological disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2006;5:197–204.
- [15] Roesler R, Kopschina MI, Rosa RM, Henriques JA, Souza DO, Schwartzmann G. RC-3095, a bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist, impairs aversive but not recognition memory in rats. *Eur J Pharmacol* 2004;486:35–41.
- [16] Roesler R, Lessa D, Venturella R, Vianna MR, Luft T, Henriques JA, et al. Bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in the basolateral amygdala regulate memory consolidation. *Eur J Neurosci* 2004;19:1041–5.
- [17] Roesler R, Meller CA, Kopschina MI, Souza DO, Henriques JA, Schwartzmann G. Intrahippocampal infusion of the bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 impairs inhibitory avoidance retention. *Peptides* 2003;24:1069–74.
- [18] Santo-Yamada Y, Yamada K, Wada E, Goto Y, Wada K. Blockade of bombesin-like peptide receptors impairs inhibitory avoidance learning in mice. *Neurosci Lett* 2003;340:65–8.
- [19] Santo-Yamada Y, Yamada K, Wada K. Post-training administration of gastrin-releasing peptide (GRP) improves memory loss in scopolamine- and hypoxia-induced amnesic mice. *Physiol Behav* 2001;74:139–43.
- [20] Schally AV, Szepeshazi K, Nagy A, Comaru-Schally AM, Halmos G. New approaches to therapy of cancers of the stomach, colon and pancreas based on peptide analogs. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:1042–68.
- [21] Shumyatsky GP, Tsvetkov E, Malleret G, Vronskaya S, Hatton M, Hampton L, et al. Identification of a signaling network in lateral nucleus of amygdala important for inhibiting memory specifically related to learned fear. *Cell* 2002;111:905–18.
- [22] Szepeshazi K, Schally AV, Halmos G, Lamharzi N, Groot K, Horvath JE. A single in vivo administration of bombesin antagonist RC-3095 reduces the levels and mRNA expression of epidermal growth factor receptors in MXT mouse mammary cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:10913–8.
- [23] Venturella R, Lessa D, Luft T, Roozendaal B, Schwartzmann G, Roesler R. Dexamethasone reverses the memory impairment induced by antagonism of hippocampal gastrin-releasing peptide receptors. *Peptides* 2005;26:821–5.
- [24] Williams CL, McGaugh JL. Enhancement of memory processing in an inhibitory avoidance and radial maze task by post-training infusion of bombesin into the nucleus tractus solitarius. *Brain Res* 1994;654:251–6.

5 DISCUSSÃO

Os estudos farmacológicos e genéticos que avaliam o papel de GRPRs no comportamento e plasticidade sináptica em roedores indicam que GRPRs em áreas límbicas do cérebro, tais como a amígdala e o hipocampo, estão importantemente envolvidos nos comportamentos relacionados à resposta emocional, aprendizagem do medo, interação estereotipada e social.

Como está bem estabelecido que os comportamentos estereotipados, disfunção de processamento emocional, cognição e comportamento social, bem como alterações no hipocampo e na amígdala, são características de doenças psiquiátricas e neurodegenerativas como esquizofrenia, ansiedade, autismo e Doença de Alzheimer, os modelos roedores suportam a visão de que GRPR pode estar envolvido na patogênese de desordens psiquiátricas e neurológicas.

Apesar de não diretamente envolvido nessas patologias, as evidências sugerem que GRPR poderia ser considerado um alvo molecular para o desenvolvimento de drogas e modelos terapêuticos para doenças do SNC.

Estudos indicaram que peptídeos como BB e GRP são distribuídos através do SNC e exercem um importante papel neuromodulatório em áreas cerebrais envolvidas na patogênese de diversas doenças. Além disso, peptídeos como BB e ativação de GRPR regulam aspectos do comportamento (*grooming*, movimentos estereotipados, aprendizagem emocional e comportamento social) que podem estar alterados em patologias como ansiedade, depressão, esquizofrenia, autismo e demência. Como referido anteriormente, o sistema GRPR tem apresentado uma interação funcional com outros sistemas de neurotransmissores e receptores

(receptores GABA, dopamina e glicocorticóides) implicados na patogênese da Doença de Parkinson, esquizofrenia e mediando respostas de ansiedade e estresse.

Antagonistas de GRPR têm potencial uso terapêutico para o tratamento de diferentes processos patológicos. [D-Tpi⁶, Leu¹³ psi(CH₂NH)-Leu¹⁴] bombesin (6-14) (RC-3095) foi desenvolvido como uma droga experimental anti-câncer que efetivamente reduz o crescimento tumoral em uma variedade de modelos e que tem sido utilizado como ferramenta para elucidar a participação do bloqueio de GRPR na consolidação da memória. Para investigar as consequências desse bloqueio, já foram examinados diferentes tipos de memória em ratos tratados com infusões intracerebrais ou sistêmicas de RC-3095, como citado.

Visando avaliar o papel de receptores de peptídeo liberador de gastrina (GRPR), localizados na região do hipocampo, na formação da memória, foi realizado o presente estudo, publicado como artigo científico na revista Peptides. Os principais resultados encontrados são que a infusão pós-treino de uma alta dose de um antagonista de GRPR na área CA1 hipocampal induziu um aumento na retenção da memória aversiva, enquanto, consistente com estudos prévios (79, 97), uma baixa dose de RC-3095 produziu bloqueio da memória.

Em adição, o aumento de memória induzido por RC-3095 foi bloqueado pela infusão pré-treino de uma dose inefetiva de um agonista de receptor GABA_A, muscimol. Esses dados suportam as primeiras evidências de um efeito facilitatório da memória por um antagonista de GRPR, envolvendo talvez o sistema GABAérgico.

5.1 Efeito Facilitatório da Memória por Antagonismo de GRPR

Nosso grupo tem mostrado que infusões pós-treino intra-hipocampais ou intra-amidulares de baixas doses de RC-3095 produz bloqueio da memória por esQUIVA inibitória (75, 76, 79, 97). Inversamente, administração sistêmica ou intra-cerebral de agonistas de

GRPR têm sido reportados por induzir aumento da memória em ambos ratos e camundongos (14, 72, 82, 104). Entretanto, os presentes resultados mostram que, em altas doses, um antagonista de GRPR pode induzir um aumento de memória.

Uma explicação para esse resultado poderia ser que em altas doses RC-3095 exerce atividade agonista. Atividades agonistas parciais de altas doses de outro antagonista de receptor BB têm sido descritas (34). Entretanto, a visão que RC-3095 produziu aumento de memória através do bloqueio de GRPR poderia ser consistente com diversas linhas de evidências.

A primeira é a de que, em experimentos genéticos, camundongos deficientes em GRPR apresentaram diminuição da função GABA associada com aumento da plasticidade sináptica amigdalár e memória aversiva (87). Também cooperam para essa visão, experimentos eletrofisiológicos indicando que GRP, possivelmente liberado de neurônios excitatórios hipocámpais, ativa GRPR, o qual estimula liberação de GABA e então promove a inibição neuronal no hipocampo (4,40). Um resultado da mesma forma importante é o de observações do grupo de que infusões intrahipocámpais de altas doses de BB impedem formação da memória por esquivas inibitórias (74).

É então possível que o efeito facilitatório da memória da alta dose de RC-3095 usada no presente estudo não esteja relacionada à ativação de GRPR induzida pela droga. Uma possibilidade para explicar os diferentes efeitos de baixa e alta dose de RC-3095 é que GRPR está expresso em ambos interneurônios inibitórios GABAérgicos e neurônios excitatórios glutamatérgicos, bem como em neurônios que liberam outros neurotransmissores.

Os recentes achados de Kamishi et al (32) indicando que na amígdala lateral somente uma sub-população de células expressando GRPRs são neurônios GABAérgicos é consistente com a possibilidade que GRPRs estão expressos em neurônios não-GABAérgicos liberadores de glutamato ou outro neurotransmissor. Então, diferentes doses de agonistas de

GRPR poderiam induzir diferentes efeitos sobre neurônios excitatórios e inibitórios, uma hora estimulando, outra inibindo plasticidade sináptica e memória.

Uma alta dose de RC-3095 poderia atuar predominantemente em neurônios GABAérgicos, então reduzindo a função inibitória e permitindo a facilitação da plasticidade sináptica e formação da memória. Tal modelo poderia conciliar os achados de estudos farmacológicos mostrando que agonistas de GRPR aumentam e antagonistas bloqueiam a memória (14, 43, 75, 76, 79, 81, 82, 97, 104) com evidências genéticas e eletrofisiológicas sugerindo que GRPR atua como um sistema inibitório que impede plasticidade sináptica e memória por estimulação da transmissão GABAérgica (4, 40, 87).

A importância desses resultados está relacionada ao fato de que esse é o primeiro relato de um efeito facilitatório da memória causado por um antagonista de GRPR, RC-3095.

5.2 Envolvimento de GRPR e Sistema GABAérgico

Para investigar a possibilidade de interação entre GRPR e sistema GABAérgico, no segundo experimento nós examinamos se uma baixa dose de um agonista de receptor GABA_A, que não afeta a retenção da memória per se, poderia alterar o aumento da memória induzido por RC-3095. Consistente com a possibilidade que o efeito facilitatório da memória de RC-3095 envolve uma redução da transmissão GABAérgica, a estimulação de receptores GABA_A com muscimol preveniu o efeito de RC-3095. Estimulação do receptor GABA_A por muscimol poderia ter compensado a diminuição na atividade GABAérgica induzida por RC-3095.

Esses dados suportam a visão de que o efeito facilitatório da memória através do bloqueio de GRPR poderia envolver uma interação funcional entre esses receptores e neurônios GABAérgicos.

6 PERSPECTIVAS

Futuros estudos poderiam investigar os mecanismos celulares mediando os diferentes efeitos de alta e baixa dose de RC-3095 e possivelmente outros antagonistas de GRPR sobre a memória. Uma possibilidade seria examinar se o bloqueio na consolidação da memória induzido por antagonistas de GRPR poderia ser prevenido por agonistas de receptor glutamatérgico.

Outras importantes avaliações são referentes à caracterização do papel neuromodulatório de GRPRs e se drogas que atuam nesses receptores poderiam apresentar propriedades neuroprotetoras, antipsicóticas ou de facilitação do aprendizado.

Considerando que estudos prévios, investigando os efeitos da administração de GRP sobre a saciedade e fome, têm indicado que GRP não induz efeitos adversos quando administrado via intravenosa em humanos, uma possibilidade seria investigar o potencial efeito terapêutico do próprio GRP como facilitador do aprendizado em humanos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguayo SM, Kane MA, King TE, Shwartz MI, Grauer L, Miller YE. Increased levels of bombesin-like peptides in the lower respiratory tract of asymptomatic cigarette smokers. *The Journal of Clinical Investigation* 1989; 84:1105-1113.
2. Anand A, Shekhar A. Brain imaging studies in mood and anxiety disorders: Special emphasis on the amygdala. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003; 985:370-388.
3. Anastasi A, Erspamer V, Bucchi M. Isolation and structure of bombesin and alytensin, two analogous active peptides from the skin of the European amphibians *Bombina* and *Alytes*. *Experientia* 1971; 27:166-167.
4. Andrews N, Davis B, Gonzalez MI, Oles R, Singh L, McKnight AT. Effect of gastrin-releasing peptide on rat hippocampal extracellular GABA levels and seizures in the audiogenic seizure-prone DBA/2 mouse. *Brain Research* 2000; 859:386-389.
5. Battey J, Wada, E. Two distinct receptor subtypes for mammalian bombesin-like peptides. *Trends in Neurosciences* 1991; 14:524-528.
6. Battey JF, Way JM, Corjay MH, Shapira H, Kusano K, Harkins R, Wu JM, Slattery T, Mann E, Feldman RI. Molecular cloning of the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor from Swiss 3T3 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 1991; 88:395-399.
7. Bissette G, Nemeroff CB, Decker MW, Kizer JS, Agid Y, Javoy-Agid F. Alterations in regional brain concentrations of neurotensin and bombesin in Parkinson's disease. *Annals of Neurology* 1985; 17:324-328.
8. Bologna MC, Festuccia C, Muzi P, Biordi L, Ciomei M. Bombesin stimulates growth of human prostatic cancer cells in vitro. *Cancer* 1989; 63:1714-1720.
9. Bunnnett N. Gastrin-releasing peptide. In: Walsh JH, Dockray GJ, eds. *Gut peptides: biochemistry and physiology*. New York: Raven Press Ltd, 1994; 423-445.

10. Burghardt B, Wenger C, Barabás K, Rácz G, Olah A, Flautner L, Coy DH, Gress TM, Varga G. GRP-receptor-mediated signal transduction, gene expression and DNA synthesis in the human pancreatic adenocarcinoma cell line HPAF. *Peptides* 2001; 22:1119-1128.
11. Chen PW, Kroog GS. Alterations in receptor expression or agonist concentration change the pathways gastrin-releasing peptide receptor uses to regulate extracellular signal-regulated kinase. *Molecular Pharmacology* 2004; 66:1625-1634.
12. Chronwall BM, Pisano JJ, Bishop JF, Moody TW, O'Donohue TL. Biochemical and histochemical characterization of ranatensin immunoreactive peptides in rat brain: Lack of coexistence with bombesin/GRP. *Brain Research* 1985; 338:97-113.
13. Dal-Pizzol F, Di Leone LP, Ritter C, Martins MR, Reinke A, Pens Gelain D, Zanotto-Filho A, de Souza LF, Andrades M, Barbeiro DF, Bernard EA, Cammarota M, Bevilaqua LR, Soriano FG, Claudio J, Moreira F, Roesler R, Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptor antagonist effects on an animal model of sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2006; 173:84-90.
14. Flood JF, Morley JE. Effects of bombesin and gastrin-releasing peptide on memory processing. *Brain Research* 1988; 460:314-22.
15. Frank GK, Kaye WH, Ladenheim EE, McConaha C. Reduced gastrin releasing peptide in cerebrospinal fluid after recovery from bulimia nervosa. *Appetite* 2001; 37:9-14.
16. Furness JB. Types of neurons in the enteric nervous system. *Journal of the Autonomic Nervous System* 2000; 81:87-96.
17. Gerner RH, Van Kammen DP, Ninan PT. Cerebrospinal fluid cholecystokinin bombesin and somatostatin in schizophrenia and normals. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry* 1985; 9:73-82.
18. Gerner RH, Yamada T. Altered neuropeptide concentrations in cerebrospinal fluid of psychiatric patients. *Brain Research* 1982; 238:298-302.
19. Gibson GE, Zhang H, Xu H, Park LCH, Jeitner TM. Oxidative stress increases internal calcium stores and reduces a key mitochondrial enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002; 1586:177-189.
20. Gibson GE, Vestling M, Zhang H, Szolosi S, Alkon D, Lannfelt L, Gandy S, Cowburn RF. Abnormalities in Alzheimer's Disease fibroblasts bearing the APP670/671 mutation. *Neurobiology of Aging* 1997; 18:573-580.

21. Gibson GE, Zhang H, Toral-Barza L, Szolosi S, Tofel-Grehl B. Calcium stores in cultured fibroblasts and their changes with Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1996; 1316:71-77.
22. Giraud A, Whitley J, Shulkes A, Parker L. The pregnant ovine endometrium constitutively expresses and secretes a highly stable bombesin-like peptide, which shares C-terminal sequence but differs structurally from gastrin-releasing peptide. *Biochimica et Biophysica Acta* 1996; 1296:189-197.
23. Hampton LL, Ladenheim EE, Akesson M, Way JM, Weber HC, Sutliff VE, Jensen RT, Wine LJ, Arnheiter H, Battey JF. Loss of bombesin-induced feeding suppression in gastrin-releasing peptide receptor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 1998; 95:3188-3192.
24. Hellmich MR, Ives KL, Udupi V, Soloff MS, Greeley GH Jr., Christensen BN, Townsend CM Jr. Multiple protein kinase pathways are involved in gastrin-releasing peptide receptor-regulated secretion. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274:23901-23909.
25. Ishikawa-Brush Y, Powell JF, Bolton P, Miller AP, Francis F, Willard HF, Lehrach H, Monaco AP. Autism and multiple exostoses associated with an X;8 translocation occurring within the GRPR gene and 3' to the SDC2 gene. *Human Molecular Genetics* 1997; 6:1241-1250.
26. Ito E, Oka K, Etcheberrigaray R, Nelson TJ, McPhie DL, Tofel-Grehl B, Gibson GE, Alkon DL. Internal Ca^{2+} mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 1994; 91:534-538.
27. Itoh S, Takashima A, Itoh T, Morimoto T. Effects of neuromedins and related peptides on the body temperature of rats. *The Japanese Journal of Physiology* 1995; 45:37-45.
28. Izquierdo I, Quevedo J, Izquierdo LA, Vianna MRM, Szapiro G, Barros DM, Roesler R, Alonso M, Walz R, Medina JH. What can go wrong when memory fails: the main biochemical events underlying consolidation and retrieval in rats. In: Palomo T, Beninger RJ, Archer T, eds. *Neurodegenerative Brain Disorders*. Madrid: Fundacion Cerebro y Mente, 2000; 131-151.
29. Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of Learning and Memory* 1997; 68:285-316.

30. Jensen RT, Coy DH, Saeed ZA, Heinz-Erian P, Mantey S, Gardner JD. Interaction of bombesin and related peptides with receptors on pancreatic acinar cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1988; 547:138-149.
31. Johnston AS, Merali Z. Specific neuroanatomical and neurochemical correlates of locomotor and grooming effects of bombesin. *Peptides* 1988; 9:245-256.
32. Kamichi S, Wada E, Aoki S, Sekiguchi M, Kimura I, Wada K. Immunohistochemical localization of gastrin-releasing peptide receptor in the mouse brain. *Brain Research* 2005; 1032:162-70.
33. Kim HJ, Evers BM, Litvak DA, Hellmich MR, Townsend CM Jr. Signaling mechanisms regulating bombesin-mediated AP-1 gene induction in the human gastric cancer SIIA. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2000; 279:C326-C334.
34. Kirkham TC, Gibbs J, Smith GP, Geary N. Meal pattern analysis in rats reveals partial agonist activity of the bombesin receptor antagonist BW2258U89. *Pharmacology Biochemistry and Behavioral* 1995; 52:101-106.
35. Konturek SJ, Dembinski A, Warzecha Z, Jaworek J, Konturek PK, Cai RZ, Schally AV. Antagonism of receptors for bombesin, gastrin and cholecystokinin in pancreatic secretion and growth. *Digestion* 1991; 48:89-97.
36. Kresh M, Christian C, Zhu L, Obe M, Sanders MM, Hussain N. Bombesin inhibits apoptosis in developing fetal rat lung. *Lung* 1999; 177:241-251.
37. Ladenheim EE, Hampton LL, Whitney AC, White WO, Battey JF, Moran TH. Disruptions in feeding and body weight control in gastrin-releasing peptide receptor deficient mice. *The Journal of Endocrinology* 2002; 174:273-281.
38. Ladenheim EE, Moore KA, Salorio CF, Mantey SA, Taylor JE, Coy DH, Jensen RT, Moran TH. Characterization of bombesin binding sites in the rat stomach. *European Journal of Pharmacology* 1997; 319:245-251.
39. Ladenheim EE, Jensen RT, Mantey SA, Moran TH. Distinct distributions of two bombesin receptor subtypes in the rat central nervous system. *Brain Research* 1992; 593:168-178.
40. Lee K, Dixon AK, Gonzalez I, Stevens EB, McNulty S, Oles R, Richardson PJ, Pinnock RD, Singh L. Bombesin-like peptides depolarize rat hippocampal interneurons through interaction with subtype 2 bombesin receptors. *Journal of Physiology* 1999; 518:791-802.

41. Leissring MA, Akbari Y, Fanger CM, Cahalan MD, Mattson MP, LaFerla FM. Capacitative calcium entry deficits and elevated luminal calcium content in mutant presenilin-1 knockin mice. *The Journal of Cell Biology* 2000; 149:793-798.
42. Lynn RB, Hyde TM, Cooperman RR, Miselis RR. Distribution of bombesin-like immunoreactivity in the nucleus of the solitary tract and dorsal motor nucleus of the rat and human: colocalization with tyrosine hydroxylase. *The Journal of Comparative Neurology* 1996; 369:552-570.
43. Martins MR, Reinke A, Valvassori SS, Machado RA, Quevedo J, Schwartzmann G, Roesler R. Non-associative learning and anxiety in rats treated with a single systemic administration of the gastrin-releasing peptide receptor antagonist RC-3095. *Peptides* 2005; 26:2525-2529.
44. Marui T, Hashimoto O, Nanba E, Kato C, Tochigi M, Umekage T, Kato N, Sasaki T. Gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) locus in Japanese subjects with autism. *Brain & Development* 2004; 26:5-7.
45. McCoy JG, Avery DD. Bombesin: potential integrative peptide for feeding and satiety. *Peptides* 1990; 11:595-607.
46. McDonald TJ, Jornvall H, Nilsson G, Vagne M, Ghatei M, Bloom SR, Mutt V. Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1979; 90:227-233.
47. McGaugh JL. Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective *Trends in Neurosciences* 2002; 25:456-461.
48. McGaugh JL. Memory – a century of consolidation. *Science* 2000; 287:248-251.
49. McGaugh JL, Cahill L, Roozendaal B. Involvement of the amygdala in memory storage: interaction with other brain systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 1996; 93:13508-13514.
50. Meller C, Henriques JAP, Schwartzmann G, Roesler R. The bombesin/gastrin releasing peptide receptor antagonist RC-3095 blocks apomorphine but not MK-801-induced stereotypy in mice. *Peptides* 2004; 25:585-588.
51. Merali Z, McIntosh J, Anisman H. Role of bombesin-related peptides in the control of food intake. *Neuropeptides* 1999; 33:376-386.

52. Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Neuromedin B is a major bombesin-like peptide in rat brain: regional distribution of neuromedin B and neuromedin C in rat brain, pituitary and spinal cord. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1984; 124:925-932.
53. Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Neuromedin B: a novel bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1983; 114:541-548.
54. Moody TW, Merali Z. Bombesin-like peptides and associated receptors within the brain: distribution and behavioral implications. *Peptides* 2004; 25:511-20.
55. Moody TW, O'Donohue TL, Jacobowitz DM. Biochemical localization and characterization of bombesin-like peptides in discrete regions of rat brain. *Peptides* 1981; 2:75-79.
56. Moody TW, Pert CB. Bombesin-like peptides in rat brain: quantitation and biochemical characterization. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1979; 90:7-14.
57. Moody TW, Pert CB, Rivier J, Brown MR. Bombesin: specific binding to rat brain membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 1978; 75:5372-5376.
58. Nemeroff CB, Kizer JS, Reynolds GP, Bissette G. Neuropeptides in Alzheimer's disease: a postmortem study. *Regulatory Peptides* 1989; 25:123-130.
59. Niu L, Matsui M, Zhou SY, Hagino H, Takahashi T, Yoneyama E, Kawasaki Y, Suzuki M, Seto H, Ono T, Kurachi M. Volume reduction of the amygdala in patients with schizophrenia: a magnetic resonance imaging study. *Psychiatry Research* 2004; 132:41-51.
60. Ohki-Hamazaki H, Iwabuchi M, Maekawa F. Development and function of bombesin-like peptides and their receptors. *International Journal of Developmental Biology* 2005; 49:293-300.
61. Ohki-Hamazaki. Neuromedin B. *Progress in Neurobiology* 2000; 62:297-312.
62. Olincy A, Leonard S, Young DA, Sullivan B, Freedman R. Decreased bombesin peptide response to cigarette smoking in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 1999; 20:52-59.

63. Panula P, Hadjiconstantinou M, Yang HY, Costa E. Immunohistochemical localization of bombesin/gastrin-releasing peptide and substance P in primary sensory neurons. *The Journal of Neuroscience* 1983; 3:2021-2029.
64. Patel O, Shulkes A, Baldwin GS. Gastrin-releasing peptide and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006; 1766:23-41.
65. Patel O, Dumesny C, Giraud AS, Baldwin GS, Shulkes A. Stimulation of proliferation and migration of a colorectal cancer cell line by amidated and glycine-extended gastrin-releasing peptide via the same receptor. *Biochem Pharmacol* 2004; 68:2129–2142.
66. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Third edition. San Diego: Academic Press; 1997.
67. Persson K, Pacini G, Sundler F, Ahren B. Islet function phenotype in gastrin-releasing peptide receptor gene-deficient mice. *Endocrinology* 2002; 143:3717-3726.
68. Piantelli M, Maggiano N, Larocca LM, Ricci R, Ranelletti FO, Lauriola L, Capelli A. Neuropeptide-immunoreactive cells in human thymus. *Brain, Behavior and Immunity* 1990; 4:189–197.
69. Qu X, Xiao D, Weber HC. Human gastrin-releasing peptide receptor mediates sustained CREB phosphorylation and transactivation in HuTu 80 duodenal cancer cells. *FEBS Letters* 2002; 527:109-113.
70. Quevedo J, Vianna MR, Martins MR, Barichello T, Medina JH, Roesler R, Izquierdo I. Protein synthesis, PKA and MAP kinase are differentially involved in short- and long-term memory in rats. *Behavioral Brain Research* 2004; 154:339-343.
71. Radulovic S, Cai RZ, Serfozo P, Groot K, Redding TW, Pinski J, Schally AV. Biological effects and receptor binding affinities of new pseudonapeptide bombesin/GRP receptor antagonists with N-terminal D-Trp or D-Tpi. *International Journal of Peptide and Protein Research* 1991; 38:593-600.
72. Rashidy-Pour A, Razvani ME. Unilateral reversible inactivations of the nucleus tractus solitarius and amygdala attenuate the effects of bombesin on memory storage. *Brain Research* 1998; 814:127-32.
73. Roesler R, Henriques JAP, Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for psychiatric and neurological disorders. *CNS and Neurological Disorders – Drug Targets* 2006; 5:197-204.

74. Roesler R, Luft T, Oliveira SHS, Farias CB, Almeida VR, Quevedo J, Dal Pizzol F, Schröder N, Izquierdo I, Schwartzmann G. Molecular mechanisms mediating gastrin-releasing peptide receptor modulation of memory consolidation in the hippocampus. *Neuropharmacology* 2006; 51:350-357.
75. Roesler R, Kopschina MI, Rosa RM, Henriques JA, Souza DO, Schwartzmann G. RC-3095, a bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist, impairs aversive but not recognition memory in rats. *European Journal of Pharmacology* 2004; 486:35-41.
76. Roesler R, Lessa D, Venturella R, Vianna MR, Luft T, Henriques JA, Izquierdo I, Schwartzmann G. Bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in the basolateral amygdala regulate memory consolidation. *European Journal of Neuroscience* 2004; 19:1041-1045.
77. Roesler R, Henriques JA, Schwartzmann G. Neuropeptides and anxiety disorders: bombesin receptors as novel therapeutic targets. *Trends in Pharmacological Sciences* 2004; 25: 241-242.
78. Roesler R, Lessa D, Venturella R, Luft T, Henriques JAP, Schwartzmann G. Hippocampal bombesin/gastrin-releasing peptide receptors are involved in fear-motivated memory but not innate fear. *FENS Forum Abstr.* 2004; 2:A115.
79. Roesler R, Meller CA, Kopschina MI, Souza DO, Henriques JA, Schwartzmann G. Intrahippocampal infusion of the bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 impairs inhibitory avoidance retention. *Peptides* 2003; 24:1069-1074.
80. Rozengurt E. Signal transduction pathways in the mitogenic response to G protein-coupled neuropeptide receptor agonists. *Journal of Cellular Physiology* 1998; 177:507-517.
81. Santo-Yamada Y, Yamada K, Wada E, Goto Y, Wada K. Blockade of bombesin-like peptide receptors impairs inhibitory avoidance learning in mice. *Neuroscience Letters* 2003; 340:65-68.
82. Santo-Yamada Y, Yamada K, Wada K. Post-training administration of gastrin-releasing peptide (GRP) improves memory loss in scopolamine- and hypoxia-induced amnesic mice. *Physiology and Behavior* 2001; 74:139-143.
83. Schafe GE, Atkins CM, Swank MW, Bauer EP, Sweatt JD, LeDoux JE. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *The Journal of Neuroscience* 2000; 20:8177-8187.

84. Schafe GE, LeDoux JE. Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdala. *The Journal of Neuroscience* 2000; 20:RC96.
85. Schally AV, Szepeshazi K, Nagy A, Comaru-Schally AM, Halmos G. New approaches to therapy of cancers of the stomach, colon and pancreas based on peptide analogs. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2004; 61:1042-68.
86. Schusdziarra V, Rouiller D, Harris V, Pfeiffer EF, Unger RH. Effect of bombesin upon plasma somatostatin-like immunoreactivity, insulin and glucagons in normal and chemically sympathectomized dogs. *Regulatory Peptides* 1980; 1:89-96.
87. Shumyatsky GP, Tsvetkov E, Malleret G, Vronskaya S, Hatton M, Hampton L, Battey JF, Dulac C, Kandel ER, Bolshakov EY. Identification of a signaling network in lateral nucleus of amygdala important for inhibiting memory specifically related to learned fear. *Cell* 2002; 111:905-18.
88. Silva AJ. Molecular and cellular cognitive studies of the role of synaptic plasticity in memory. *Journal of Neurobiology* 2003; 54:224-237.
89. Silver AJ, Flood JF, Morley JE. Effect of gastrointestinal peptides on ingestion in old and young mice. *Peptides* 1988; 9:221-225.
90. Spindel ER, Chin WW, Price J, Rees LH, Besser GM, Habener JF. Cloning and characterization of cDNAs encoding human gastrinreleasing peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 1984; 81:5699-5703.
91. Spindel ER, Giladi E, Brehm P, Goodman RH, Segerson TP. Cloning and functional characterization of a complementary DNA encoding the murine fibroblast bombesin/gastrin-releasing peptide receptor. *Molecular Endocrinology* 1990; 4:1956-1963.
92. Stoddard SL, Tyce GM, Ahlskog JE, Zinsmeister AR, Nelson DK, Carmichael SW. Decreased levels of [Met]enkephalin, neuropeptide Y, substance P, and vasoactive intestinal peptide in parkinsonian adrenal medulla. *Experimental Neurology* 1991; 114:23-27.
93. Sunday ME, Hua J, Dai HB, Nusrat A, Torday JS. Bombesin increases fetal lung growth and maturation in utero and in organ culture. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1990; 3:19-205.

94. Szepeshazi K, Schally AV, Halmos G, Lamharzi N, Groot K, Horvath JE. A single in vivo administration of bombesin antagonist RC-3095 reduces the levels and mRNA expression of epidermal growth factor receptors in MXT mouse mammary cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 1997; 94:10913-8.
95. Terlau H, Seifert W. Influence of epidermal growth factor on long-term potentiation in the hippocampal slice. *Brain Research* 1989; 484:352-356.
96. Tsutsumi Y, Osamura RY, Watanabe K, Yanaihara N. Simultaneous immunohistochemical localization of gastrin releasing peptide (GRP) and calcitonin (CT) in human bronchial endocrine-type cells. *Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histopathology* 1983; 400:163-171.
97. Venturella R, Lessa D, Luft T, Roozendaal B, Schwartzmann G, Roesler R. Dexamethasone reverses the memory impairment induced by antagonism of hippocampal gastrin-releasing peptide receptors. *Peptides* 2005; 26:821-825.
98. Wada E, Watase K, Yamada K, Ogura H, Yamano M, Inomata Y, Eguchi J, Yamamoto K, Sunday ME, Maeno H, Mikoshiba K, Ohki-Hamazaki H, Wada K. Generation and characterization of mice lacking gastrin-releasing peptide receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997; 239:28-33.
99. Wada E, Wray S, Key S, Battey J. Comparison of gene expression for two distinct bombesin receptor subtypes in postnatal rat central nervous system. *Molecular and Cellular Neurosciences* 1992; 3:446-460.
100. Wada E, Way J, Shapira H, Kusano K, Lebacqz-Verheyden AM, Coy D, Jensen R, Battery J. cDNA cloning, characterization, and brain region-specific expression of a neuromedin-B-preferring bombesin receptor. *Neuron* 1991; 6:421-430.
101. Wada E, Way J, Lebacqz-Verheyden AM, Battey JF. Neuromedin B and gastrin-releasing peptide mRNAs are differentially distributed in the rat nervous system. *The Journal of Neuroscience* 1990; 10:2917-2930.
102. Wharton J, Polak JM, Cole GA, Marangos PJ, Pearse AG. Neuron-specific enolase as an immunocytochemical marker for the diffuse neuroendocrine system in human fetal lung. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1981; 29:1359-1364.

103. Whitley JC, Giraud AS, Shulkes A. Expression of gastrin-releasing peptide (GRP) and GRP receptors in the pregnant human uterus at term. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996; 81:3944–3950.
104. Williams CL, McGaugh JL. Enhancement of memory processing in an inhibitory avoidance and radial maze task by post-training infusion of bombesin into the nucleus tractus solitarius. *Brain Research* 1994; 654:251-256.
105. Wolf SS, Moody TW. Receptors for GRP/bombesin-like peptides in the rat forebrain. *Peptides Supplement* 1985; 6:111-114.
106. Wolf SS, Moody TW, O'Donohue TL, Zarbin MA, Kuhar MJ. Autoradiographic visualization of rat brain binding sites for bombesin-like peptides. *European Journal of Pharmacology* 1983; 87:163-164.
107. Xiao D, Qu X, Weber HC. Activation of extracellular signal-regulated kinase mediates bombesin-induced mitogenic responses in prostate cancer cells. *Cellular Signalling* 2003; 15:945-953.
108. Yamada K, Wada E, Santo-Yamada Y, Wada K. Bombesin and its family of peptides: prospects for the treatment of obesity. *European Journal of Pharmacology* 2002; 440:281-290.
109. Yamada K, Santo-Yamada Y, Wada E, Wada K. Role of bombesin (BN)-like peptides/receptors in emotional behavior by comparison of three strains of BN-like peptide receptor knockout mice. *Molecular Psychiatry* 2002; 7:113–117.
110. Yamada K, Wada E, Wada K. Female gastrin-releasing peptide receptor (GRP-R)-deficient mice exhibit altered social preference for male conspecifics: implications for GRP/GRP-R modulation of GABAergic function. *Brain Research* 2001; 894:281–287.
111. Yamada K, Wada E, Wada K. Bombesin-like peptides: studies on food intake and social behaviour with receptor knock-out mice. *Annals of Medicine* 2000; 32:519–529.
112. Yamada K, Wada E, Wada K. Male mice lacking the gastrin-releasing peptide receptor (GRP-R) display elevated preference for conspecific odors and increased social investigatory behaviors. *Brain Research* 2000; 870:20–26.
113. Yamaguchi K, Abe K, Kameya T, Adachi I, Taguchi S, Otsubo K, Yanaihara N. Production and molecular size heterogeneity of immunoreactive gastrin-releasing peptide in fetal and adult lungs and primary lung tumors. *Cancer Research* 1983; 46:3932–3939.

114. Zarbin MA, Kuhar MJ, O'Donohue TL, Wolf SS, Moody TW. Autoradiographic localization of (125I-Tyr4) bombesin-binding sites in rat brain. *Journal of Neuroscience* 1985; 5:429-437.
115. Zirlinger M, Anderson D. Molecular dissection of the amygdala and its relevance to autism. *Genes, Brain and Behavior* 2003; 2:282-294.
116. Zoeller RT, Lebacqz-Verheyden AM, Battey JF. Distribution of two distinct messenger ribonucleic acids encoding gastrin-releasing peptide in rat brain. *Peptides* 1989; 10:415-422.