

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA**

**Caroline Pieta Dias**

**Memantina reduz o dano oxidativo em regiões cerebrais e melhora  
a memória de reconhecimento de longa duração em ratos velhos**

**Orientadora: Profa. Dra. Nadja Schröder**

**Porto Alegre**

**2007**

## Resumo

Muitas doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer, Parkinson e Huntington são causadas por diferentes mecanismos, porém podem compartilhar uma etapa comum de dano neuronal ocasionado pela superestimulação dos receptores glutamatérgicos. Tem sido sugerido, que esta via pode estar envolvida no surgimento de déficits cognitivos associados ao envelhecimento normal. Estudos prévios realizados em nosso laboratório demonstraram que ratos velhos apresentam déficits de memória de reconhecimento. Portanto, o objetivo de presente estudo foi avaliar o efeito da memantina, um antagonista de baixa afinidade aos receptores NMDA, sobre os déficits de memória de reconhecimento induzidos pelo envelhecimento. Adicionalmente, parâmetros do dano oxidativo em regiões cerebrais envolvidas na formação da memória foram avaliados. Ratos Wistar machos com 24 meses de idade receberam diariamente injeções de solução salina ou memantina (20mg/Kg i.p) durante 21 dias. Os animais foram submetidos à tarefa de reconhecimento do objeto novo 1 semana após a última injeção. Os ratos tratados com memantina apresentaram índice normal de reconhecimento enquanto o grupo tratado com salina apresentou prejuízo de memória de longa duração (LTM). Os resultados mostraram que a memantina é capaz de reverter os déficits de memória de reconhecimento induzido pelo envelhecimento. Além disso, nós demonstramos que a memantina reduz o dano oxidativo das proteínas no córtex e hipocampo, duas importantes regiões envolvidas na formação da memória. Portanto, os presentes resultados foram de acordo com a hipótese de que os déficits cognitivos induzidos pelo envelhecimento estão relacionados ao dano oxidativo ocasionado pela superestimulação dos receptores NMDA.

**Palavras-chave:** envelhecimento, memória de reconhecimento, memantina, neuroproteção, excitotoxicidade, estresse oxidativo, carbonilação de proteínas, ratos.

## Abstract

Many neurodegenerative diseases, including Alzheimer's (AD), Parkinson's (PD) and Huntington's diseases (HD), are caused by different mechanisms but may share a final common pathway to neuronal injury as a result of the overstimulation of glutamate receptors. It has been suggested that this pathway can be involved in generation of cognitive deficits associated with normal aging. Previous studies performed in our laboratory have demonstrated that aged rats presented recognition memory deficits. The aim of the present study was to evaluate the effect of memantine, a low-affinity NMDA receptor antagonist, on age-induced recognition memory deficits. Additionally, parameters of oxidative damage in cerebral regions related to memory formation were evaluated. In order to that, male Wistar rats (24 months old) received daily injections of saline or memantine (20 mg/kg ip) during 21 days. The animals were submitted to a novel object recognition task 1 week after the last injection. Memantine-treated rats showed normal recognition memory while the saline group showed long-term recognition memory deficits. The results show that memantine is able to reverse age-induced recognition memory deficits. We also demonstrated that memantine reduced the oxidative damage to proteins in cortex and hippocampus, two important brain regions involved in memory formation. Thus, the present findings are in agreement with the hypothesis that, at least in part, age-induced cognitive deficits are related to oxidative damage promoted by NMDA receptors overactivation.

**Key-words:** aging, recognition memory, memantine, neuroprotection, excitotoxicity, oxidative stress, protein carbonyl, rat.

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>05</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>07</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
3.1	Objetivo Geral.....	14
3.2	Objetivos Específicos.....	14
	<b>ARTIGO EM INGLÊS.....</b>	<b>15</b>
	<b>ARTIGO EM PORTUGUÊS.....</b>	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>58</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>61</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente os idosos estão representando o segmento da população que vêm crescendo mais rapidamente, o que supõe um aumento da expectativa de vida e um aproveitamento maior do processo de envelhecimento.

Segundo Chaimowicz et al. (2000), no Brasil, em função das mudanças nas taxas de mortalidade e de fertilidade nas últimas décadas, estima-se que a população acima de 65 anos irá crescer de 2,7% em 1960 para aproximadamente 14% antes de 2050, um aumento três vezes mais rápido do que o observado nos países desenvolvidos. Devido ao envelhecimento populacional, a prevalência e a incidência de doenças neurodegenerativas, comuns em idosos, também têm aumentado no Brasil.

As doenças neurodegenerativas são desordens progressivas que afetam determinadas populações neuronais do sistema nervoso central, levando a morte neuronal e a ruptura de circuitos neurais. Muitas das doenças neurodegenerativas que se manifestam em idades avançadas envolvem déficits de memória. Esta corresponde à uma das mais importantes funções cognitivas do ser humano. De acordo com Freitas et al. (2002) a memória é a habilidade de armazenar informações e conhecimentos, sendo a base para o desenvolvimento da linguagem, do reconhecimento das pessoas e objetos, para sabermos quem somos e para termos consciência da continuidade de nossas vidas. Devido às conseqüências devastadoras da perda da memória durante o envelhecimento, grandes esforços clínicos e de pesquisa vêm ocorrendo para que possamos compreender e tentar reverter esses quadros patológicos.

Neste contexto, a indústria farmacêutica vem desenvolvendo tratamentos farmacológicos para minimizar ou até mesmo estagnar os efeitos do envelhecimento sobre o cérebro humano.

A memantina, uma droga aprovada recentemente para o tratamento da doença de Alzheimer foi caracterizada como um antagonista não competitivo de baixa afinidade ao receptor NMDA, que atua melhorando a transmissão dos sinais nervosos e a memória sem os efeitos colaterais que outros antagonistas NMDA podem causar (Creeley et al., 2006).

Portanto, o presente estudo buscou analisar os efeitos da memantina em ratos velhos sobre o estresse oxidativo em regiões cerebrais,

pois evidências indicam que o aumento dos radicais livres causa um dano na função celular contribuindo para o processo das doenças neurodegenerativas (Andersen, 2004; Friguet, 2006; Floyd e Hensley, 2002). Além disso, o estudo buscou avaliar os efeitos da droga sobre a memória de reconhecimento, que se caracteriza por uma forma de memória não espacial que pode ser alterada em indivíduos envelhecidos não-dementes, bem como em pacientes com doença de Alzheimer.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

De acordo com Freitas et al. (2002), nos países em desenvolvimento como o Brasil, a velhice ainda tem como ponto de referência o início da sétima década de vida (60 anos). Na verdade, limites como 60 e 65 nos servem pra determinar a idade de aposentadoria e na comparação entre populações, quando a questão é o envelhecimento.

Segundo Papaléo Netto (apud Freitas et al., 2002) o processo de envelhecimento ocorre de forma dinâmica e progressiva, no qual há modificações morfológicas, funcionais, bioquímicas e psicológicas que determinam perda da capacidade de adaptação do indivíduo ao meio ambiente, ocasionando maior vulnerabilidade e maior incidência de processos patológicos que terminam com a morte. Conforme Geis (2003) envelhecer significa adaptação a mudanças na estrutura e funcionamento do corpo humano por um lado, e mudanças no ambiente social por outro. Concebe-se então a velhice como um processo desfavorável e difícil de manejar.

Estas alterações ocorrem em tempos e formas diferentes em cada indivíduo. O pico máximo de nossa capacidade biológica de vida ocorre por volta dos 30 anos. Após esta fase vão ocorrendo diversas transformações em nosso organismo. Todos os organismos multicelulares vão sofrendo alterações com o tempo, havendo uma perda progressiva das capacidades fisiológicas. Como afirma Fletcher et al. (1996), apesar de todas as medidas fisiológicas declinarem com a idade, nem todas declinam com o mesmo ritmo.

Muitos são os fatores que contribuem para determinar como uma pessoa envelhece. O estilo de vida, a ocorrência de doenças crônicas ou agudas, acidentes, estresse emocional e condições ambientais desfavoráveis são fatores determinantes para acelerar o processo de envelhecimento. O declínio biológico normal no processo de envelhecimento, o aparecimento de doenças e as dificuldades funcionais sustentam a concepção da velhice "como um período de decadência inexorável" (Caldas, 1998). Finalmente parece que nada pode ser feito para impedir o envelhecimento e seu ritmo, e os efeitos variam entre os indivíduos.

O sistema nervoso central (SNC) é muito comprometido com o processo de envelhecimento, sendo o responsável pelas sensações, movimentos, funções

psíquicas e funções biológicas internas. De acordo com Freitas et al. (2002) o número de células nervosas decresce com o envelhecimento normal. Em algumas áreas, a perda celular é mínima, enquanto em outras a perda é pronunciada. Conforme Squire e Kandel (2003), com o envelhecimento existem alterações no encéfalo que afetam o lobo temporal medial e o córtex frontal, que podem ocorrer de forma independente, alterando de diferentes formas as funções cognitivas.

Segundo Freitas et al. (2002), uma freqüente consequência associada ao envelhecimento é a diminuição da plasticidade cerebral, a qual sugere que os neurônios maduros têm capacidade de desenvolver-se e formar novas sinapses. Com a formação de novos circuitos sinápticos aumenta-se a capacidade de aprender e adquirir novos conhecimentos, de lembrar novos fatos e a flexibilidade de desenvolver novas habilidades. Peters (2002) sugere que tais mudanças degenerativas conduzem ao declínio cognitivo porque causam alterações na velocidade de condução, tendo por resultado um rompimento do sincronismo normal nos circuitos neuronais. Em função disso, o desempenho cognitivo no idoso torna-se alterado.

De acordo com Kapczinski, Quevedo e Izquierdo (2000), os indivíduos quando expostos à novas experiências apresentam capacidade de modificação e adaptação para determinadas situações. O sistema nervoso desempenha um papel fundamental de percepção quando nos referimos a habilidade de aprender e recordar eventos. A aquisição de novas informações é denominada aprendizado, enquanto o armazenamento das informações aprendidas definimos como memória.

Em relação à estrutura cerebral, o neocórtex é o responsável pela função cognitiva fazendo ligação com as características instintivas e afetivas do sistema límbico (experiência, comportamento emocional e funções amnésicas). Com base em Sanvito (1991) é através do córtex cerebral, mais do que outras estruturas, que se adquire a capacidade para processar informações. Pode-se afirmar que o processo de envelhecimento parece não afetar todas as regiões do cérebro do mesmo modo. O córtex cerebral, por exemplo, é muito mais afetado pela perda de células nervosas com o passar dos anos, do que o tronco cerebral (Cohen, 1995). Conforme Squire e Kandel (2003), com o envelhecimento existem alterações no encéfalo que afetam o lobo temporal medial e o córtex frontal, que podem ocorrer de forma independente, alterando de diferentes formas as funções cognitivas.



Além disso, em algumas áreas a perda celular é mínima, enquanto em outras como no hipocampo a perda é pronunciada. De acordo com Persson et al. (2005), um estudo em relação ao volume hipocampal, demonstrou redução significativa nos idosos e um declínio da memória, podendo sugerir que a diminuição cognitiva está associada com diferenças na estrutura e função cerebral. Como o envelhecimento é associado com um declínio das funções fisiológicas incluindo funções cognitivas, podemos dizer então que o hipocampo está envolvido nos processos de aprendizagem e memória, não sendo surpreendente que um número de processos neurais nesta área do cérebro parecem ser particularmente vulneráveis ao envelhecimento (Serrano e Klann, 2004).

A função cognitiva mais amplamente estudada é a memória, principalmente porque serve de critério para o diagnóstico de síndromes demenciais, como a doença de Alzheimer (Siegler et al., 1999). De acordo com Albert (1994) a diminuição da memória é provavelmente a mais prevalente das alterações cognitivas nos idosos.

A memória é a habilidade de armazenar informações e conhecimentos. Ela é a base para o desenvolvimento da linguagem, do reconhecimento das pessoas e dos objetos, para sabermos quem somos e para termos consciência da continuidade de nossas vidas. Portanto, afirma-se de acordo com Freitas et al. (2002) que a memória corresponde a uma das mais importantes funções cognitivas do homem. Um sistema de memória é um conjunto de mecanismos comuns para o armazenamento da informação. Portanto, a representação na memória não é uma base suficiente para o pensamento. Segundo Posner (1980) devemos ser capazes de reorganizar a informação a fim de resolver problemas, desenvolver novas estruturas e interpretar o mundo que nos cerca.

O envelhecimento, mesmo na ausência de patologias graves, leva gradualmente a um declínio modesto, mas significativo, da memória, atualmente chamado de “comprometimento cognitivo leve” (Freitas et al., 2002). Essa diminuição da memória com o passar da idade, principalmente para fatos recentes, é denominada também de “amnésia benigna do idoso” (Leme, 2000). Com base em Magalhães e Sandberg (2005) as doenças neurodegenerativas e a demência representam os maiores problemas de saúde pública na população que envelhece.

A memória representa uma atividade altamente diferenciada no sistema nervoso, a qual permite ao organismo registrar e conservar os dados da experiência

e aprendizagem e a possibilidade de recuperar essas informações a qualquer momento.

A memória é influenciada por diversos mecanismos além dos fenômenos de plasticidade neural que devem servir como substrato básico para a aquisição e o armazenamento de informações. Pode-se acrescentar que os sistemas de modulação de memórias emocionais podem estar envolvidos em estratégias de reação de um indivíduo frente a situações de grande novidade, estresse ou medo (Kapczinski et al., 2000).

A memória de Reconhecimento é uma forma de memória não espacial que pode ser alterada em indivíduos envelhecidos não-dementes, bem como em pacientes com doença de Alzheimer. Os testes de memória de Reconhecimento têm sido utilizados em modelos animais para avaliar déficits cognitivos associados ao envelhecimento. Utilizando macacos envelhecidos, Shamy et al. (2005) comprovaram o declínio da memória de reconhecimento. Além disso, estudos anteriores realizados em nosso laboratório demonstraram que ratos entre 22 e 24 meses de idade apresentam um prejuízo significativo da memória de reconhecimento quando comparados a ratos adultos jovens (de Lima et al., 2005).

Existem muitos componentes no SNC que estão envolvidos nos processos de aprendizagem e memória. O glutamato, por exemplo, é responsável pela maior parte da neurotransmissão excitatória no SNC. Processos neuroquímicos envolvendo o glutamato estão relacionados à plasticidade sináptica, sendo considerado o principal neurotransmissor nos modelos de aprendizagem e memória. Os receptores do glutamato podem ser da família de receptores ionotrópicos: N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole-propiónico (AMPA) e kainato (KA) como da família de receptores metabotrópicos: ácido aminociclopentildicarboxílico (ACPD) e ácido L-2-amino-4-fosfonopropiónico (L-4P4) (Kapczinski et al., 2000).

É importante mencionar que a exposição de neurônios a altas concentrações de glutamato pode levar à morte da célula neuronal. Este evento é desencadeado pela atividade excessiva de receptores NMDA e pelo influxo de  $Ca^{2+}$  nos neurônios. Além disso, a neurotransmissão glutamatérgica anormal tem sido apontada como um mecanismo patológico em várias desordens como esquizofrenia, demência cerebral e doença de Alzheimer (Rammsayer, 2006).

Segundo Minkeviciene (2004) no cérebro dos mamíferos os receptores NMDA estão envolvidos em importantes funções fisiológicas como a plasticidade e a formação sináptica exercendo importante papel na memória, aprendizagem e a formação de circuitos neuronais durante o desenvolvimento. Muitas desordens no SNC com perdas neuronais são causadas por excitotoxicidade induzida pelo glutamato, o que pode ser tratado por antagonistas dos receptores NMDA.

Estudos apontam que o resultado da baixa regulação do transporte de glutamato glial (GLT-1) ocorre em pacientes com doença de Alzheimer defendendo a idéia que os níveis sinápticos de glutamato e da atividade dos receptores NMDA podem aumentar em indivíduos com esta doença. Sugere-se ainda que a superativação dos receptores NMDA e/ou os níveis elevados de glutamato na sinapse podem aumentar a neurotoxicidade e agir prejudicando a memória (Rammsayer, 2006). É importante acrescentar que uma das características da doença de Alzheimer é a deposição extracelular de placas  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) em algumas regiões do cérebro. Para tanto, diversas evidências sugerem que a toxicidade  $A\beta$  pode elevar os níveis de glutamato, aumentando assim, a atividade dos receptores NMDA. Com base em Tanovic e Alfaro (2006), o neurotransmissor excitatório glutamatérgico é importante no processo de aprendizagem e memória, os quais são atingidos severamente na doença de Parkinson e na doença de Alzheimer, o que está provavelmente associado com o aumento do peptídeo  $\beta$ -amilóide.

Além destas alterações o estresse oxidativo também tem papel importante no processo das doenças neurodegenerativas.

De acordo com Andersen (2004) o oxigênio é necessário para a vida, porém os produtos do seu metabolismo produzem os chamados radicais livres que são espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais são altamente tóxicas para as células.

Os radicais livres são definidos por um átomo ou molécula com um elétron desemparelhado. Existem vários radicais, mas o mais comum é formado pela redução de uma molécula de oxigênio para água e é tipicamente referido como uma espécie reativa de oxigênio (Markesbery et al. apud Mattson, 2001). É importante acrescentar que um grande número de estudos tem demonstrado que a excitotoxicidade induzida pela superestimulação de receptores NMDA está associada com a produção de radicais livres (Lipton and Rosenberg, 1994). A elevação dos níveis intracelulares de Cálcio pode ativar a fosfolipase A2 levando à

produção de ácido araquidônico, o qual é subseqüentemente metabolizado a uma variedade de produtos incluindo o radical superóxido, resultando em danos à membrana e morte celular (Smith-Swintosky and Mattson, 1994; Hoyer, 1995).

Os antioxidantes são definidos como substâncias presentes em pequenas quantidades comparadas com outros substratos oxidativos retardando significativamente ou inibindo a oxidação destes substratos. Segundo Markesbery et al. (apud Mattson, 2001) elas defendem o organismo dos radicais livres e mantém a homeostase, sendo que o mesmo desenvolve diversos sistemas antioxidantes reparando as enzimas e removendo as moléculas oxidadas. Entretanto, o cérebro não é enriquecido de defesas antioxidantes, sendo estas não completamente efetivas para prevenir as doenças oxidativas, principalmente com o envelhecimento do organismo. (Floyd e Hensley, 2002).

Portanto, os antagonistas de receptor NMDA podem minimizar ou bloquear a morte dos neurônios induzida pela ativação desses receptores e conseqüentemente da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo então, uma medida terapêutica considerada como neuroprotetora

Dentro desse contexto, a memantina é uma droga antagonista de baixa afinidade aos receptores glutamatérgicos NMDA, obstruindo parcialmente a neurotransmissão glutamatérgica no SNC (Guay, 2003). Segundo a literatura, ela possui propriedades neuroprotetoras, o que não inverte as doenças neurodegenerativas, mas seu efeito moderado se resume em proteger o cérebro dos níveis tóxicos do cálcio ( $Ca^{2+}$ ), permitindo uma sinalização normal entre os neurônios. Atualmente tem sido sugerido que a memantina promove o restabelecimento da sobrevivência e do funcionamento dos neurônios dopaminérgicos afetados na doença de Parkinson e Alzheimer (Marvanová et al., 2001).

De acordo com Guay (2003) o uso da memantina está associado com melhoras significativas nas escalas cognitivas, funcionais agindo também atrasando a progressão das demências. O perfil farmacológico da memantina em pacientes com doença de Alzheimer parece ser eficaz, tendo efeitos terapêuticos positivos também no tratamento da isquemia (Lapchak, 2006).

Estudos em humanos demonstraram que pacientes com doença de Alzheimer tratados com memantina demonstraram melhoras significativas comparados ao grupo placebo (Kirby et al., 2006). Bullock (2006) em consenso com

Reisberg et al. (2006) afirmam que muitas das melhorias foram vistas em atividades individuais da vida e do comportamento diário, além de taxas reduzidas da deterioração em medidas globais, cognitivas e funcionais. Dautzenberg et al. (2006) observou também efeitos benéficos nos sintomas cognitivos, na agitação e na agressividade.

Pesquisas recentes com modelos animais, demonstraram que a memantina melhora o desempenho na aprendizagem e na memória em ratos velhos (Minkeviciene et al., 2004). Segundo o autor, o tratamento com memantina melhora o prejuízo cognitivo em um modelo animal de doença de Alzheimer. Gao et al., (2006) observou efeitos neuroprotetores no cérebro de ratos após o tratamento com memantina, em um modelo de isquemia-hipóxia.

Por fim, são muitos os resultados positivos que relacionam o tratamento com memantina a melhorias na cognição, aprendizagem e memória. Com base nesses achados, torna-se importante verificar também o efeito desta droga sobre o estresse oxidativo cerebral, já que este é um dos fatores associados ao processo de neurodegeneração. Junto à isso, a análise da droga sobre a memória de reconhecimento, mantém-se sustentável para comprovar o total benefício da mesma, podendo assim, ajudar a minimizar os efeitos das doenças neurodegenerativas.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Analisar o efeito do tratamento crônico com memantina sobre a memória de reconhecimento e o estresse oxidativo em regiões cerebrais de ratos envelhecidos (24 meses de idade).

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Analisar o efeito do tratamento com memantina por 21 dias sobre a memória de reconhecimento do objeto novo em ratos velhos;
- Avaliar os efeitos do tratamento com memantina sobre a atividade no campo aberto em ratos velhos.
- Analisar o efeito do tratamento com memantina por 21 dias sobre a carbonilação de proteínas em regiões cerebrais obtidas de ratos velhos.

Memantine reduces oxidative damage in brain regions and  
enhances long-term recognition memory in aged rats

Caroline Pieta Dias<sup>1,2</sup>; Maria Noêmia Martins de Lima<sup>1,2</sup>; Juliana Presti Torres<sup>1,3</sup>;  
Arethuzia Dornelles<sup>1,3</sup>; Vanessa Athaide Garcia<sup>1</sup>; Felipe Siciliani Scalco<sup>1</sup>;  
Marcelo Rewsaat Guimarães<sup>1</sup>; Larissa Constantino<sup>4</sup>; Patricia Budni<sup>4</sup> ;  
Felipe Dal-Pizzol<sup>4</sup>; Nadja Schröder<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>*Neurobiology and Developmental Biology Laboratory, Faculty of Biosciences,  
Pontifical Catholic University, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil.*

<sup>2</sup>*Graduate Program in Biomedical Gerontology, Institute for Geriatrics and  
Gerontology, São Lucas Hospital, Pontifical Catholic University, 90619-900 Porto  
Alegre, RS, Brazil.*

<sup>3</sup>*Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biosciences,  
Pontifical Catholic University, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil.*

<sup>4</sup>*Physiopathology Laboratory, Department of Medicine, University of Southern Santa  
Catarina, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil*

*Corresponding author: Dr. Nadja Schroder, Department of Physiological Sciences,  
Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University, Av. Ipiranga, 6681 Prédio 12C,  
Sala 266, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33203545. Fax: +55 51  
33203612.*

*E-mail address: [nadja\\_s@terra.com.br](mailto:nadja_s@terra.com.br).*

## Abstract

Many neurodegenerative diseases, including Alzheimer's (AD), Parkinson's (PD) and Huntington's diseases (HD), are caused by different mechanisms but may share a final common pathway to neuronal injury as a result of the overstimulation of glutamate receptors. It has been suggested that this pathway can be involved in generation of cognitive deficits associated with normal aging. Previous studies performed in our laboratory have demonstrated that aged rats presented recognition memory deficits. The aim of the present study was to evaluate the effect of memantine, a low-affinity NMDA receptor antagonist, on age-induced recognition memory deficits. Additionally, parameters of oxidative damage in cerebral regions related to memory formation were evaluated. In order to that, male Wistar rats (24 months old) received daily injections of saline or memantine (20 mg/kg ip) during 21 days. The animals were submitted to a novel object recognition task 1 week after the last injection. Memantine-treated rats showed normal recognition memory while the saline group showed long-term recognition memory deficits. The results show that memantine is able to reverse age-induced recognition memory deficits. We also demonstrated that memantine reduced the oxidative damage to proteins in cortex and hippocampus, two important brain regions involved in memory formation. Thus, the present findings are in agreement with the hypothesis that, at least in part, age-induced cognitive deficits are related to oxidative damage promoted by NMDA receptors overactivation.

**Key-words:** aging, recognition memory, memantine, neuroprotection, excitotoxicity, oxidative stress, protein carbonyl, rat.



## 1 Introduction

Many neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease (AD) (Canzoniero and Snider, 2005; Rieder and Hoyer, 2006), Parkinson's disease (PD) (Beal, 1998; Vernon et al., 2005), Huntington's disease (HD) (Cowan and Raymond, 2006), human immunodeficiency virus (HIV)-associated dementia (Kaul and Lipton, 2006), multiple sclerosis (Scott et al., 2006), amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (van Damme et al., 2005) are caused by different mechanisms but may share a final common pathway to neuronal injury as a result of the overstimulation of glutamate receptors, especially of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) subtype. Acute disorders, such as stroke, central nervous system (CNS) trauma and epilepsy, also manifest a component of excitotoxicity. Moreover, it has been suggested that the sustained changes in the regulation of intracellular  $Ca^{2+}$  concentration in normal brain aging would affect the synaptic transduction, neurotransmitter release and signal transduction, causing the memory deficits observed in aged subjects that did not develop a pathological condition (Foster and Norris 1997; Toescu & Verkhratsky, 2004; Kelly et al., 2006). Hence, NMDA receptor antagonists could potentially be of therapeutic benefit in a number of chronic neurological disorders manifesting excessive NMDA receptor activities. However, given the critical role of NMDA receptors in learning and memory (Miyamoto, 2006), it may appear counterintuitive that an NMDA receptor antagonist could improve the symptomatology of neurodegenerative disorders associated with learning and memory deficits. Several NMDA receptor antagonists possessing high affinity for NMDA receptors [for instance, (+/-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP5) and (+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzocyclohepten-5,10-imine maleate (MK-801)] have been found to cause neurobehavioral adverse effects (Castellano et al., 2001). An alternative approach to avoid such side effects is to produce a partial blockade of the NMDA receptor. Memantine, a low-moderate affinity, uncompetitive NMDA receptor antagonist, was recently approved by the European Union and the U.S. Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of AD. It has been shown that memantine is able to improve performance in several pharmacological models of impaired learning and memory (Wenk et al., 1994; Zajackowski et al., 1996; Wenk et al., 1997; Minkeviciene et al., 2004; Yamada et al., 2005; Nakamura et al. 2006), in aged rats with impaired baseline memory function (Barnes et al., 1996), and in

patients with moderate to severe AD (Rammsayer, 2001; Reisberg et al., 2003; Tariot et al., 2004; Cummins et al., 2006).

In previous reports we have demonstrated that aged rats presented recognition memory deficits when compared with young subjects (de Lima et al., 2005a). Thus, the purpose of the present study was to evaluate the effect of memantine on age-related recognition memory deficits. In order to do that, we submitted aged male Wistar rats (24 months old) treated with memantine to a novel object recognition task. Additionally, parameters of oxidative stress in cerebral regions related to memory formation were evaluated.

Recognition memory can be tested in rodents using object recognition tasks that are based on spontaneous activity and the natural preference that rats display to explore a novel object more than a familiar one when the animal remembers previous exposure to familiar object. Advantages associated with this class of measure include the fact that performance does not depend on the retention of a rule, and is not based on usual positive or negative reinforcers, such as food deprivation or application of an electric shock (Ennaceur and Delacour, 1988; Dix and Aggleton, 1999; Mumby, 2001; Clark and Martin, 2005; Bertaina-Anglade et al., 2006).

## **2 Materials and Methods**

### *2.1 Animals*

Male Wistar rats were obtained from State Foundation for Health Science Research (FEPPS-RS, Porto Alegre, RS, Brazil). The animals were maintained in groups of three in a plastic cage with sawdust bedding in a room at temperature of  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  and a 12h light/dark cycle. The animals were supplied with standardized pellet food and tap water *ad libitum*. All behavioral experiments took place between 9:00 and 17:00. All experimental procedures were performed in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior (SBNeC) recommendations for animal care. These experimental procedures were approved by the Ethics Committee of the Pontifical Catholic University (CEP-996/04).

## *2.2 Drugs and pharmacological procedures*

Aged animals (23 months-old) received daily intraperitoneal (ip) injections of saline solution (NaCl 0.9%) or memantine (Apsen, SP, Brazil) at the dose of 20.0 mg/Kg in a 2.0 ml/Kg injection volume dissolved in saline solution for 21 days. Animals were trained in a novel object recognition task 1 week after the last administration of memantine. The dose of memantine was chosen on the basis of previous studies (Zajackowski et al., 1996; Wenk et al., 1997; Rao et al., 2001; Yamada et al., 2005; Cummings et al., 2006; Nakamura et al., 2006). Dinitrophenylhydrazine, trichloroacetic acid and thiobarbituric acid were purchased from Sigma, St. Louis, MO, USA.

## *2.3 Novel object recognition memory*

Twenty-four hours after open field exploration (see below), animals were trained and tested in a novel object recognition task as previously described (Schröder et al., 2003; de Lima et al., 2005a; 2005b; 2005c; 2005d; 2006). Training in the object recognition task took place in the same arena used for the open field, except that the arena floor was covered with sawdust during the recognition memory task training and test trials. The open field exploration was thus used as a context habituation trial for the recognition memory task. The object recognition test required that the rats recalled which of two plastic objects they had been previously familiarized with. Twenty-four hours after arena exploration, training was conducted by placing individual rats into the field, in which two identical objects (objects A1 and A2; Duplo Lego toys) were positioned in two adjacent corners, 9 cm from the walls. Animals were left to explore the objects until they had accumulated 30 s of total object exploration time or for a maximum of 20 min. In a short-term memory (STM) test given 1.5 h after training, the rats explored the open field for 5 minutes in the presence of one familiar (A) and one novel (B) object. All objects presented similar textures, colors, and sizes, but distinctive shapes. A recognition index calculated for each animal was expressed by the ratio  $T_B/(T_A+T_B)$  [ $T_A$ =time spent exploring the familiar object A;  $T_B$ = time spent exploring the novel object B]. Between trials the objects were washed with 10% ethanol solution. In a long-term memory (LTM) test given 24 h after training, the same rats explored the field for 5 minutes in the presence of familiar object A and a novel object C. Recognition memory was evaluated as for the short-term memory test. Exploration was defined as sniffing or

touching the object with the nose and/or forepaws. Sitting on the object was not considered exploration.

#### *2.4 Open field behavior*

In order to control for possible sensorimotor effects induced by memantine, behavior during exploration of an open field was evaluated 24 h after the last injection. The open field was a 40 X 45 cm arena surrounded by 50 cm high walls, made of plywood with a frontal glass wall. The floor of the arena was divided into 12 equal squares by black lines. Animals were placed in the rear left corner and left to explore the field freely for 5 min. Latency to start locomotion, line crossings, rearings and the number of fecal pellets produced were counted (de Lima et al., 2005a).

#### *2.5 Oxidative stress analysis*

After completion of behavioral procedures animals were killed by decapitation and the brain regions (cortex, hippocampus and striatum) from six rats randomly selected from each group were isolated and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for posterior analyses. All the results were normalized by the protein content (Lowry et al., 1951). The oxidative damage to proteins was assessed by determination of carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH) as previously described (Levine et al., 1990). Briefly, proteins were precipitated by addition of 20% trichloroacetic acid and redissolved in DNPH and the absorbance read at 370 nm.

#### *2.6 Statistical Analysis*

Behavioral data were analyzed as previously described (Schröder et al., 2003; de Lima et al., 2005a; 2005b; 2005c; 2005d; 2006). Data for recognition indexes are expressed as median [interquartile ranges]. Comparisons between groups were performed using Mann-Whitney *U*-tests. Comparisons of time (in seconds) spent exploring the familiar and novel objects in retention test trials within each individual group was performed by Wilcoxon test. Data for open field behavior are expressed as means  $\pm$  S.E. Data were analyzed by independent samples t-test. Biochemical data are expressed as means  $\pm$  S.D. Data were analyzed by independent samples t-test. In all comparisons,  $p \leq 0.05$  was considered to indicate statistical significance.

### 3 Results

#### 3.1. *Effects of memantine on age-related impairment of object recognition memory.*

Fig. 1 shows the effect of memantine on object recognition memory in aged rats. There was no significant difference between groups in the training trial (median [interquartile ranges] percentages of time exploring object A2 were 49.5 [44.5/56.1] in the saline-treated group, and 43.3 [33.8/53.4] in the group treated with memantine,  $p=0.315$ ) or in the STM retention trial (median [interquartile ranges] percentages of time exploring the novel object B were 70.2 [67.2/78.2] in the saline-treated group and 68.0 [65.0/75.0] in the group treated with memantine,  $p=0.536$ ). Statistical comparison of LTM recognition indexes has indicated a significant difference ( $p=0.003$ ) between the groups. Additionally, saline-treated aged rats showed no preference towards the novel object in the LTM retention test, as Wilcoxon test has indicated no significant difference between the time spent exploring the familiar and the novel object (median [interquartile ranges] time in seconds exploring object A was 5.16 [3.56/7.01] and object C was 7.88 [4.25/9.39] during LTM test,  $p=0.114$ ). However, rats treated with memantine showed a significant preference in exploring the novel object during the LTM retention trial (median [interquartile ranges] time in seconds exploring object A was 6.03 [5.78/8.39] and object C was 16.79 [14.22/18.93] during LTM test,  $p=0.018$ ). Taken together, these results indicate that memantine treatment reversed the age-related impairment in object recognition memory.

#### 3.2 *Open field behavior in aged rats treated with memantine*

Results for open field behavior in aged rats treated with saline or memantine are shown in Fig. 2. Memantine did not affect the number of crossings ( $p=0.252$ ), rearings ( $p=0.579$ ), latency to start locomotion ( $p=0.444$ ) or defecation ( $p=0.605$ ). These results indicate that the memantine-induced improvement of performance in the recognition memory task could not be attributed to alterations in sensorimotor functions such as locomotion, exploratory behavior, motivation, or anxiety.

### 3.3 Oxidative stress analyses in aged rats treated with memantine

Figure 3 shows the effect of memantine on the level of protein carbonylation, which was used as an index of protein damage. Memantine significantly reduced protein carbonyl content in the hippocampus ( $p=0.024$ ) and cortex ( $p=0.008$ ) of aged rats (Fig. 3A and B) without affecting striatal levels of protein carbonylation ( $p=0.461$ ; Fig. 3C).

## 4 Discussion

The present study has investigated the possibility that memantine therapy could attenuate age-related memory deficits. In previous reports we had demonstrated that aging induces long-term object recognition memory impairment in rats (de Lima et al., 2005a). The data shown here demonstrates for the first time that memantine was able to reverse age-induced recognition memory deficits in rats. In addition, memantine treatment decreases oxidative damage to proteins in specific brain areas that are involved in memory formation, such as cortex and hippocampus. Thus, the present findings support the hypothesis that, at least in part, age-associated cognitive deficits might be related to oxidative damage triggered by NMDA receptors overstimulation.

Controlled trials have demonstrated the safety and efficacy of memantine monotherapy for patients with moderate to severe AD (Winblad and Poritis, 1999; Reisberg et al., 2003; Peskind et al., 2006; Dautzenberg et al., 2006) and also in patients receiving a cholinesterase inhibitor treatment (Hartmann and Mobius 2003; Tariot et al., 2004; Cummings et al., 2006; Dantoine et al., 2006).

In animals, it was demonstrated that memantine improves spatial learning in a transgenic mouse model of AD and in rats that received injection of  $\beta$ -amyloid peptide into the hippocampus without affecting nonspecific behavioral parameters such as locomotion/exploratory activity (Minkeviciene et al., 2004; Nakamura et al., 2006, respectively). Moreover, memantine reversed cortical lesion-induced memory deficits in rats (Zajackowski et al., 1996), protected against neuroinflammation induced by lipopolysaccharide (LPS), and attenuated the spatial memory impairments produced by LPS (Rosi et al., 2006). These results indicate that under pathological conditions,

memantine might produce beneficial effects on cognitive functions. A study by Zoladz and coworkers (2006) has shown that pre-training administration of memantine enhanced long-term spatial memory retention in adult rats. Conflicting results were reported by Creeley et al, (2006) where memantine-treated rats showed long-term memory impairment in the hole board task.

Interestingly, when memantine was administered to healthy human subjects, it impaired recognition memory for objects, whereas performance on face recognition was not affected (Rammsayer, 2001). These findings support the notion that NMDA receptors antagonists could exert differential effects on memory functions.

In fact, we had already shown that MK-801 impaired both short- and long-term retention of object recognition memory when given either before or after training in healthy adult Wistar rats (de Lima et al., 2005d). In agreement with this view, Marvanova et al. (2004) have demonstrated that MK-801 and memantine induced different gene expression profiles into the rat brain. Although the exact mechanism involved on the differential effects induced by memantine has not been made clear yet, it seems that memantine is combined and released with the ion channel depending on electric potential in the same way as the magnesium ion (Chen and Lipton, 2006).

In the present study memantine-treated rats were submitted to the novel object recognition task. This task has been increasingly used in recent years as a model for the investigation of the neurobiological mechanisms of learning and memory. Whereas most studies investigating learning and memory in rodents use spatial and/or emotionally motivated behavioral tasks, the object recognition task provides a tool for assessing non-spatial, non-aversive memory sensitive to genetic and pharmacological manipulations as well as aging process (Rampon et al., 2000; Schroder et al., 2003; de Lima et al., 2005a; 2005b; 2005c; 2005d; 2006; Bertaina-Anglade et al., 2006). Thus, previous studies analysing the effects of memantine on memory-impaired rats are mainly focused on spatial memory tasks, such as Morris water maze and the hole-board task.

Analysis of open field behavior following memantine treatment has demonstrated that the dose of memantine used (20 mg/Kg) in the present study has not affected general activity, thus not affecting rats' ability to explore objects

The molecular mechanisms underlying the reversion of recognition memory deficits by memantine are unknown. However, the present results suggest that, at least in part, the mechanisms might be related to the inhibition of oxidative damage triggered by overstimulation of NMDA receptors. In the present study we found that memantine was able to reduce protein carbonylation in the cerebral cortex and the hippocampus without affecting striatal levels of protein carbonyls.

The imbalance between pro-oxidants and antioxidants resulting in oxidative stress associated with ageing has been extensively demonstrated (Castellani et al., 2006; Mancuso et al., 2007). Over the years a number of studies have consistently reported the oxidative damage in brain regions, especially the hippocampus of aged rats (Cini and Moretti, 1995; Nicolle et al., 2001; Abd El Mohsen et al., 2005). It has been proposed that oxidized protein accumulate, contributing to the aging process (Nabeshi et al., 2006; Friguet, 2006). Increasing evidence has suggest that oxidative stress is implicated in age-related cognitive decline, and antioxidants have been used to asses the role of oxidative damage in memory senescence (Martin and Grotewiel, 2006). Accordingly, a recent report has indicated that protein carbonyl levels are increased in aged Wistar rats and that antioxidant treatment attenuates cognitive deficits in senescent-accelerated OXYS rats (Kolosova et al., 2006). Supplementation with N-acetylcysteine has also proved to delay age-associated memory impairment in mice (Martinez et al., 2000). Mice receiving chronic systemic administration of two synthetic catalytic scavengers of reactive oxygen species, from 8 to 11 months presented an almost complete reversion of age-associated cognitive deficits and increase in oxidative stress in the brain (Liu et al., 2003). A recent study has indicated that pre-treatment with memantine combined with atropine significantly attenuated carbofuran-induced changes in levels of radical oxygen species (ROS) markers F(2)-isoprostanes, and F(4)-neuroprostanes, as well as the alterations in morphology of hippocampal neurons. Memantine and atropine pretreatment also protected rats from carbofuran-induced hypercholinergic behavioral activity, including seizures, suggesting that memantine, by preventing carbofuran-induced neuronal hyperactivity blocks pathways associated with oxidative damage in neurons (Gupta et al., 2006).

The present study supports the view that cognitive deficits associated with ageing might be related to oxidative stress triggered by NMDA receptors



overstimulation, and provides the first evidence that NMDA receptors antagonists might prevent age-related memory dysfunction in rats.

### **Acknowledgements**

This research was supported by CNPq-MCT grants 474663/2004-3 and 307265/2003-0 (to N.S.) C.P.D., M.N.M.L. and A.D. are recipients of CAPES-MEC fellowships. M.R.G. is recipient of PIBIC/CNPq fellowship.

### **Abbreviations**

AD, Alzheimer's disease; ALS, amyotrophic lateral sclerosis; AMPA,  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate; AP5, (+/-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid; CNS, central nervous system; DNPH, dinitrophenylhydrazine; FDA, U.S. Food and Drug Administration; FEPPS-RS, State Foundation for Health Science Research; HD, Huntington's disease; HIV, human immunodeficiency virus; ip, intraperitoneal; LTM, long-term memory; MK-801, (+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzocyclohepten-5,10-imine maleate; NMDA, N-methyl-D-aspartate; PD, Parkinson's disease; SBNeC, Brazilian Society for Neuroscience and Behavior; STM, short-term memory.

### **References**

Abd El Mohsen, M.M., Irvani, M.M., Spencer, J.P., Rose, S., Fahim, A.T., Motawi, T.M., Ismail, N.A., Jenner, P., 2005. Age-associated changes in protein oxidation and proteasome activities in rat brain: modulation by antioxidants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336(2), 386-91.

Barnes, C.A., Danysz, W., Parsons, C.G., 1996. Effects of the uncompetitive NMDA receptor antagonist memantine on hippocampal long-term potentiation, short-term

exploratory modulation and spatial memory in awake, freely moving rats. *Eur. J. Neurosci.* 8(3), 565-71.

Beal, M.F., 1998. Excitotoxicity and nitric oxide in Parkinson's disease pathogenesis. *Ann. Neurol.* 44(3 Suppl 1), S110-4.

Bertaina-Anglade, V., Enjuanes, E., Morillon, D., Drieu la Rochelle, C., 2006. The object recognition task in rats and mice: a simple and rapid model in safety pharmacology to detect amnesic properties of a new chemical entity. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 54(2), 99-105.

Canzoniero, L.M., Snider, B.J., 2005. Calcium in Alzheimer's disease pathogenesis: too much, too little or in the wrong place? *J. Alzheimers Dis.* 8(2), 147-54.

Castellani, R.J., Lee, H.G., Perry, G., Smith, M.A., 2006. Antioxidant protection and neurodegenerative disease: the role of amyloid-beta and tau. *Am. J. Alzheimers Dis. Other Demen.* 21(2), 126-30.

Castellano, C., Cestari, V., Ciamei, A., 2001. NMDA receptors and learning and memory processes. *Curr. Drug Targets.* 2(3), 273-83.

Cini, M., Moretti, A., 1995. Studies on lipid peroxidation and protein oxidation in the aging brain. *Neurobiol. Aging* 16(1), 53-7.

Chen, H.V., Lipton S.A., 2006. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J. Neurochem.* 97, 1611-26.

Clark, R.E., Martin, S.J., 2005. Interrogating rodents regarding their object and spatial memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15(5), 593-8.

Cowan, C.M., Raymond, L.A., 2006. Selective neuronal degeneration in Huntington's disease. *Curr. Top. Dev. Biol.* 75, 25-71.

Coyle, J.T., 2006. A brief overview of N-acetylaspartate and N-acetylaspartylglutamate. *Adv. Exp. Med. Biol.* 576, 1-6.

Creeley, C., Wozniak, D.F., Labruyere, J., Taylor, G.T., Olney, J.W., 2006. Low doses of memantine disrupt memory in adult rats. *J Neurosci.* 26(15), 3923-32.

- Cull-Candy, S., Brickley, S., Farrant, M., 2001. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11(3), 327-35.
- Cummings, J.L., Schneider, E., Tariot, P.N., Graham, S.M., Memantine MEM-MD-02 Study Group, 2006. Behavioral effects of memantine in Alzheimer disease patients receiving donepezil treatment. *Neurology* 67(1), 57-63.
- van Damme, P., Dewil, M., Robberecht, W., van Den Bosch, L., 2005. Excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener. Dis.* 2(3-4), 147-59.
- Dantoine, T., Auriacombe, S., Sarazin, M., Becker, H., Pere, J.J., Bourdeix, I., 2006. Rivastigmine monotherapy and combination therapy with memantine in patients with moderately severe Alzheimer's disease who failed to benefit from previous cholinesterase inhibitor treatment. *Int. J. Clin. Pract.* 60(1), 110-8.
- Dautzenberg, P.L., Wouters, C.J., Bootsma, J.E., 2006. Observations from a 14-week open-label trial with memantine suggest variable response on behavioral symptoms and cognition, depending on former treatment of AD. *Int. Psychogeriatr.* 18(1), 179-81.
- Dix, S.L., Aggleton, J.P., 1999. Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-location and object-context recognition. *Behav. Brain Res.* 99(2), 191-200.
- Ennaceur, A., Delacour, J., 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav. Brain Res.* 31(1), 47-59.
- Friguet B., 2006. Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress. *F. E. B. S. Lett.* 580, 2910-16.
- Foster, T.C., Norris, C.M., 1997. Age-associated changes in Ca<sup>2+</sup>-dependent processes: relation to hippocampal synaptic plasticity. *Hippocampus* 7(6), 602-12.
- Gerber, A.M., Vallano, M.L., 2006. Structural properties of the NMDA receptor and the design of neuroprotective therapies. *Mini Rev. Med. Chem.* 6(7), 805-15.

Gupta, R.C., Milatovic, S., Dettbarn, W.D., Aschner, M., Milatovic, D., 2006 Neuronal oxidative injury and dendritic damage induced by carbofuran: Protection by memantine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* [Epub ahead of print]

Hartmann, S., Mobius, H.J., 2003. Tolerability of memantine in combination with cholinesterase inhibitors in dementia therapy. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 18(2), 81-85.

Kaul, M., Lipton, S.A., 2006. Mechanisms of neuronal injury and death in HIV-1 associated dementia. *Curr. HIV Res.* 4(3), 307-18.

Kelly, K.M., Nadon, N.L., Morrison, J.H., Thibault, O., Barnes, C.A., Blalock, E.M., 2006. The neurobiology of aging. *Epilepsy Res.* 68 Suppl 1, S5-20.

Kolosova, N.G., Shcheglova, T.V., Sergeeva, S.V., Loskutova, L.V., 2006. Long-term antioxidant supplementation attenuates oxidative stress markers and cognitive deficits in senescent-accelerated OXYS rats. *Neurobiol. Aging* 27(9), 1289-97.

Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186, 464-478.

de Lima, M.N., Laranja, D.C., Caldana, F., Bromberg, E., Roesler, R., Schroder, N., 2005a. Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with l-deprenyl. *Exp. Gerontol.* 40(6), 506-11.

de Lima, M.N., Polydoro, M., Laranja, D.C., Bonatto, F., Bromberg, E., Moreira, J.C., Dal-Pizzol, F., Schroder, N., 2005b. Recognition memory impairment and brain oxidative stress induced by postnatal iron administration. *Eur. J. Neurosci.* 21(9), 2521-8.

de Lima, M.N., Laranja, D.C., Caldana, F., Graziotin, M.M., Garcia, V.A., Dal-Pizzol, F., Bromberg, E., Schroder, N., 2005c. Selegiline protects against recognition memory impairment induced by neonatal iron treatment. *Exp. Neurol.* 196(1), 177-83.

- de Lima, M.N., Laranja, D.C., Bromberg, E., Roesler, R., Schroder, N., 2005d. Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behav. Brain Res.* 156(1), 139-43.
- Lipton, S.A., 2006. Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5(2), 160-70.
- Lipton, S.A., Rosenberg, P.A., 1994. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N. Engl. J. Med.* 330(9), 613-22.
- Liu, R., Liu, I.Y., Bi, X., Thompson, R.F., Doctrow, S.R., Malfroy, B., Baudry, M., 2003. Reversal of age-related learning deficits and brain oxidative stress in mice with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 8526-31.
- Lowry, O.H., Rosebrough, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Mancuso, C., Scapagini, G., Curro, D., Giuffrida Stella, A.M., de Marco, C., Butterfield, D.A., Calabrese, V., 2007. Mitochondrial dysfunction, free radical generation and cellular stress response in neurodegenerative disorders. *Front. Biosci.* 12, 1107-23.
- Martin, I., Grotewiel, M.S., 2006. Oxidative damage and age-related functional declines. *Mech. Ageing Develop.* 127, 411-23.
- Martinez, M., Hernandez, A.I., Martinez, N., 2000. N-Acetylcysteine delays age-associated memory impairment in mice: role in synaptic mitochondria. *Brain Res.* 855, 100-6.
- Marvanova, M., Lakso, M., Wong, G., 2004. Identification of genes regulated by memantine and MK-801 in adult rat brain by cDNA microarray analysis. *Neuropsychopharmacology* 29(6), 1070-9.
- Minkeviciene, R., Banerjee, P., Tanila, H., 2004. Memantine improves spatial learning in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311(2), 677-82.

- Miyamoto, E., 2006. Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. *J. Pharmacol. Sci.* 100(5), 433-42.
- Mumby, D.G., 2001. Perspectives on object-recognition memory following hippocampal damage: lessons from studies in rats. *Behav. Brain Res.* 127(1-2), 159-81.
- Nabeshi, H., Oikawa, S., Inoue, S., Nishino, K., Kawanishi, S., 2006. Proteomic analysis for protein carbonyl as an indicator of oxidative damage in senescence-accelerated mice. *Free Radic. Res.* 40(11), 1173-81.
- Nakamura, S., Murayama, N., Noshita, T., Katsuragi, R., Ohno, T., 2006. Cognitive dysfunction induced by sequential injection of amyloid-beta and ibotenate into the bilateral hippocampus; protection by memantine and MK-801. *Eur. J. Pharmacol.* 548(1-3), 115-22.
- Nicolle, M.M., Gonzalez J., Sugaya, K., Baskerville, K.A., Bryan, D., Lund, K., Gallagher, M., McKinney, M., 2001. Signatures of hippocampal oxidative stress in aged spatial learning-impaired rodents. *Neuroscience* 107(3), 415-31.
- Peskind, E.R., Potkin, S.G., Pomara, N., Ott, B.R., Graham, S.M., Olin, J.T., McDonald, S., 2006. Memantine treatment in mild to moderate Alzheimer disease: a 24-week randomized, controlled trial. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* 14(8), 704-15.
- Rammsayer, T.H., 2001. Effects of pharmacologically induced changes in NMDA-receptor activity on long-term memory in humans. *Learn. Mem.* 8(1), 20-5.
- Rampon, C., Tang, Y.P., Goodhouse, J., Shimizu, E., Kyin, M., Tsien, J.Z., 2000. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat. Neurosci.* 3(3), 238-44.
- Rao, V.L., Dogan, A., Todd, K.G., Bowen, K.K., Dempsey, R.J., 2001. Neuroprotection by memantine, a non-competitive receptor antagonist after traumatic brain injury in rats. *Brain Res.* 991(1), 96-100.

Reisberg, B., Doody, R., Stoffler, A., Schmitt, F., Ferris, S., Mobius, H.J.; Memantine Study Group., 2003. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 348(14), 1333-41.

Riederer, P., Hoyer, S., 2006. From benefit to damage. Glutamate and advanced glycation end products in Alzheimer brain. *J. Neural. Transm.* 113(11), 1671-7.

Rosi, S., Vazdarjanova, A., Ramirez-Amaya, V., Worley, P.F., Barnes, C. A., Wenk, G.L., 2006. Memantine protects against LPS-induced neuroinflammation, restores behaviorally-induced gene expression and spatial learning in the rat. *Neuroscience* 142(4),1303-15.

Schroder, N., O'Dell, S.J., Marcjall, J.F., 2003. Neurotoxic methamphetamine regimen severely impairs recognition memory in rats. *Synapse* 49, 89-96.

Scott, G.S., Bowman, S.R., Smith, T., Flower, R.J., Bolton, C., 2006. Glutamate-stimulated peroxynitrite production in a brain-derived endothelial cell line is dependent on N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor activation. *Biochem. Pharmacol.* [in press]

Tariot, P.N., Farlow, M.R., Grossberg, G.T., Graham, S.M., McDonald, S., Gergel, I.; Memantine Study Group., 2004. Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial. *J. A. M. A.* 291(3), 17-24.

Toescu, E.C., Verkhratsky, A., 2004. Ca<sup>2+</sup> and mitochondria as substrates for deficits in synaptic plasticity in normal brain ageing. *J. Cell Mol. Med.* 8(2), 181-90.

Wenk, G.L., Zajackowski, W., Danysz, W., 1997. Neuroprotection of acetylcholinergic basal forebrain neurons by memantine and neurokinin B. *Behav. Brain Res.* 83(1-2), 129-33.

Wenk, G.L., Danysz, W., Mobley, S.L., 1994. Investigations of neurotoxicity and neuroprotection within the nucleus basalis of the rat. *Brain Res.* 655(1-2), 7-11.

Winblad, B., Poritis, N., 1999. Memantine in severe dementia: results of the 9M-Best Study (Benefit and efficacy in severely demented patients during treatment with memantine). *Int. J. Geriatr. Psychiatry.* 14(2), 135-46.

Vernon, A.C., Palmer, S., Datla, K.P., Zbarsky, V., Croucher, M.J., Dexter, D.T., 2005. Neuroprotective effects of metabotropic glutamate receptor ligands in a 6-hydroxydopamine rodent model of Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.* 22(7), 1799-806.

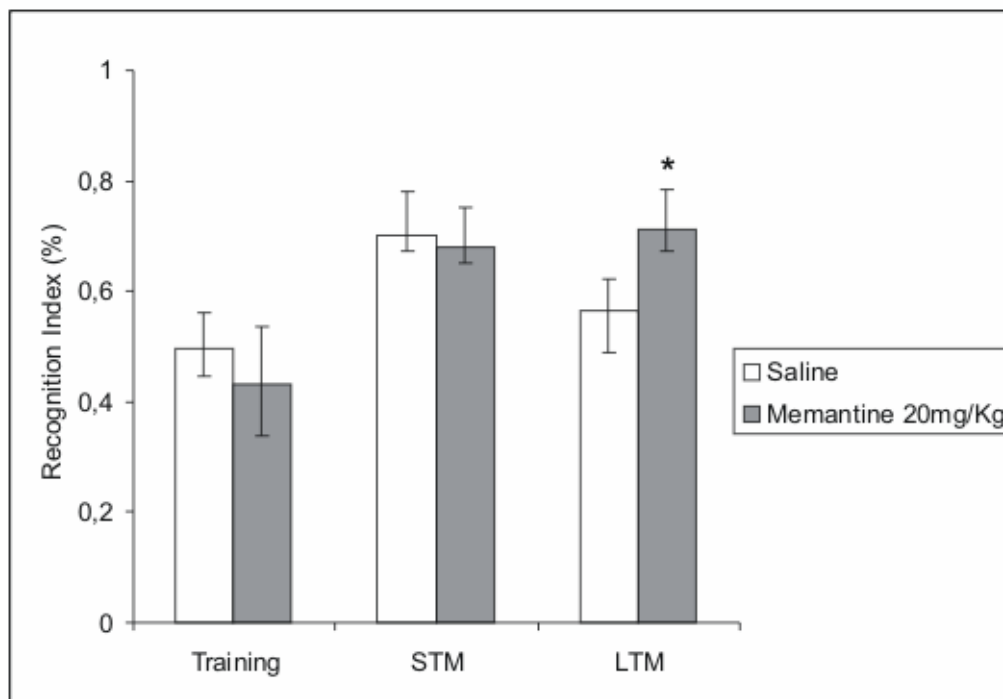
Yamada, K., Takayanagi, M., Kamei, H., Nagai, T., Dohniwa, M., Kobayashi, K., Yoshida, S., Ohhara, T., Takuma, K., Nabeshima, T., 2005. Effects of memantine and donepezil on amyloid beta-induced memory impairment in a delayed-matching to position task in rats. *Behav. Brain Res.* 162(2), 191-9.

Zajackowski, W., Quack, G., Danysz, W., 1996. Infusion of (+) -MK-801 and memantine --contrasting effects on radial maze learning in rats with entorhinal cortex lesion. *Eur. J. Pharmacol.* 296(3), 239-46.

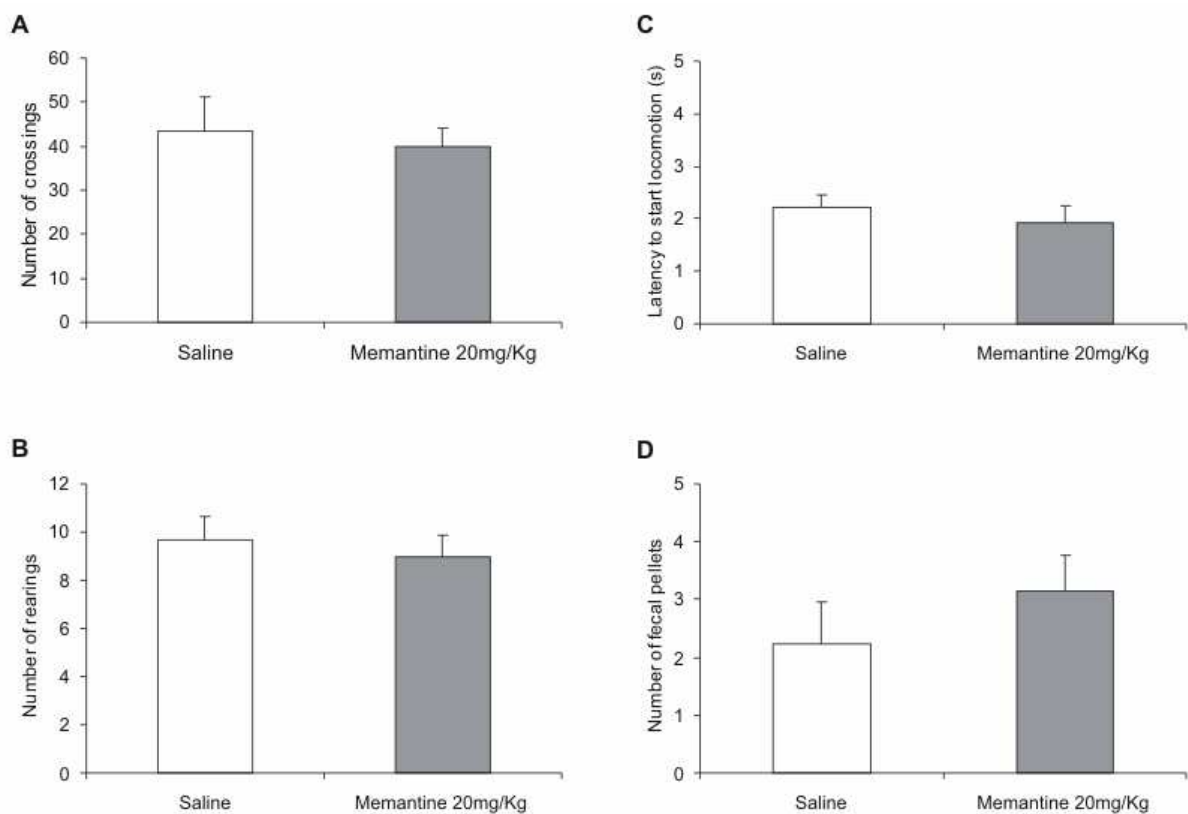
Zoladz, P.R., Campbell, A.M., Park, C.R., Schaefer, D., Danysz, W., Diamond, D.M., 2006. Enhancement of long-term spatial memory in adult rats by the noncompetitive NMDA receptor antagonists, memantine and neramexane. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 85(2),298-306.



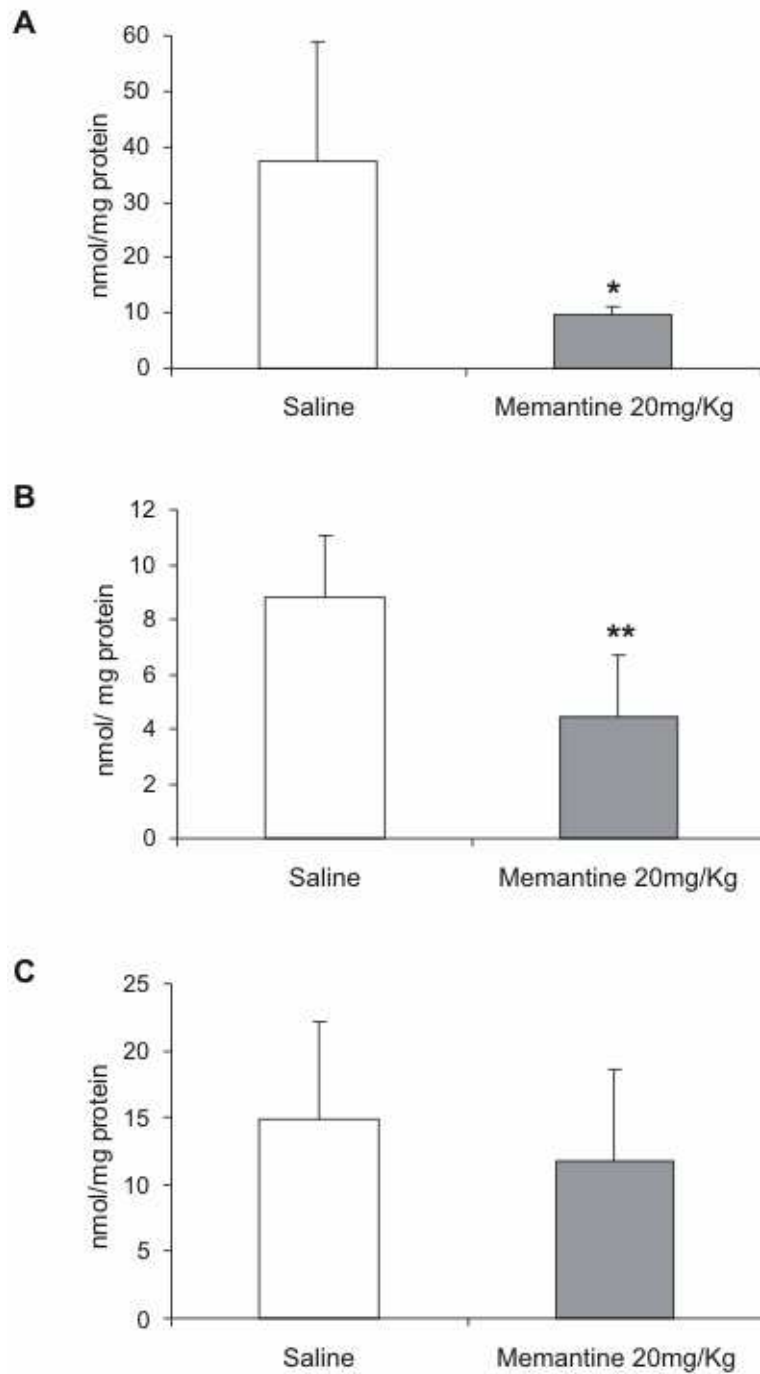
**Figure 1.** Effect of memantine on age-induced recognition memory deficits 1 week after the last injection. Short-term retention test was performed 1.5 h after training and long-term retention 24 h after training. Behavioral testing was carried out when animals were 24 months old. The proportion of the total exploration time that the animal spent investigating the novel object was the "Recognition Index" expressed by the ratio  $T_B/(T_A+T_B)$ ,  $T_A$  = time spent exploring the familiar object and  $T_B$  = time spent exploring the novel object. Data expressed as median [interquartile ranges],  $N = 10-7$  per group. Differences between saline- and memantine-treated groups are indicated: \*  $p < 0.05$ .



**Figure 2.** Open field behavior in aged rats treated with systemic injections of saline (NaCl 0.9%) or memantine (20 mg/Kg) for 21 days. Animals were left to explore the open field for 5 minutes 1 week after the last injection. Data are expressed as means  $\pm$  S.E. (A) Number of crossings; (B) number of rearings; (C) latency to start locomotion (s) and (D) number of fecal pellets.  $N=10-7$  animals per group. There were no significant differences between groups.



**Figure 3.** Protein carbonyl content in brain regions of aged rats following memantine treatment. Protein carbonyl content was measured in the (A) hippocampus; (B) cortex and (C) striatum of 6 rats of each group, as described in Material and Methods section. Values are expressed as means  $\pm$  S.D. Differences between saline and memantine-treated groups are indicated: \*\* $p < 0.01$ .



## **Memantina reduz o dano oxidativo em regiões cerebrais e melhora a memória de reconhecimento de longa duração em ratos velhos**

Caroline Pieta Dias<sup>1,2</sup>; Maria Noêmia Martins de Lima<sup>1,2</sup>; Juliana Presti Torres<sup>1,3</sup>;  
Arethuzza Dornelles<sup>1,3</sup>; Vanessa Athaide Garcia<sup>1</sup>; Felipe Siciliani Scalco<sup>1</sup>;  
Marcelo Rewsaat Guimarães<sup>1</sup>; Larissa Constantino<sup>4</sup>; Patricia Budni<sup>4</sup> ;  
Felipe Dal-Pizzol<sup>4</sup>; Nadja Schröder<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>*Laboratório de Biologia e Desenvolvimento do Sistema Nervoso, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brasil.*

<sup>2</sup>*Programa de Pós-graduação em Gerontologia Biomédica, Instituto de Geriatria e Gerontologia, Hospital São Lucas, Pontifícia Universidade Católica, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brasil.*

<sup>3</sup>*Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brasil.*

<sup>4</sup>*Laboratório de Fisiopatologia, Departamento de Medicina, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brasil.*

*Autor Correspondente: Dr. Nadja Schroder, Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica, Av. Ipiranga, 6681 Prédio 12C, Sala 266, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brasil. Tel.: +55 51 33203545.*

*Fax: +55 51 33203612.*

*E-mail: [nadja\\_s@terra.com.br](mailto:nadja_s@terra.com.br).*

## Resumo

Muitas doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer, Parkinson e Huntington são causadas por diferentes mecanismos porém podem compartilhar uma etapa comum de dano neuronal ocasionado pela superestimulação dos receptores glutamatérgicos. Tem sido sugerido, que esta via pode estar envolvida no surgimento de déficits cognitivos associados ao envelhecimento normal. Estudos prévios realizados em nosso laboratório demonstraram que ratos velhos apresentam déficits de memória de reconhecimento. Portanto, o objetivo de presente estudo foi avaliar o efeito da memantina, um antagonista de baixa afinidade aos receptores NMDA, sobre os déficits de memória de reconhecimento induzidos pelo envelhecimento. Adicionalmente, parâmetros do dano oxidativo em regiões cerebrais envolvidas na formação da memória foram avaliados. Ratos Wistar machos com 24 meses de idade receberam diariamente injeções de solução salina ou memantina (20mg/Kg i.p) durante 21 dias. Os animais foram submetidos à tarefa de reconhecimento do objeto novo 1 semana após a última injeção. Os ratos tratados com memantina apresentaram índice normal de reconhecimento enquanto o grupo tratado com salina apresentou prejuízo de memória de longa duração (LTM). Os resultados mostraram que a memantina é capaz de reverter os déficits de memória de reconhecimento induzido pelo envelhecimento. Além disso, nós demonstramos que a memantina reduz o dano oxidativo das proteínas no córtex e hipocampo, duas importantes regiões envolvidas na formação da memória. Portanto, os presentes resultados foram de acordo com a hipótese de que os déficits cognitivos induzidos pelo envelhecimento estão relacionados ao dano oxidativo ocasionado pela superestimulação dos receptores NMDA.

**Palavras-chave:** envelhecimento, memória de reconhecimento, memantina, neuroproteção, excitotoxicidade, estresse oxidativo, carbonilação de proteínas, ratos.

## 1 Introdução

Muitas doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer (AD) (Canzoniero and Snider, 2005; Rieder and Hoyer, 2006), doença de Parkinson (PD) (Beal, 1998; Vernon et al., 2005), doença de Huntington (HD) (Cowan and Raymond, 2006), demência associada ao vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Kaul and Lipton, 2006), esclerose múltipla (Scott et al., 2006), esclerose amiotrófica lateral (ALS) (van Damme et al., 2005) são causadas por diferentes mecanismos, porém podem compartilhar uma etapa comum de dano neuronal ocasionado pela superestimulação dos receptores glutamatérgicos, especialmente o subtipo N-metil-D-aspartate (NMDA). Eventos agudos tais como acidentes vasculares, traumatismos crânio-encefálicos e epilepsia, também são manifestadas por um componente excitotóxico. Além disso, tem sido sugerido que mudanças prolongadas na regulação da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular no envelhecimento cerebral normal poderia afetar pela transmissão sináptica, a liberação de neurotransmissores e a transdução de sinais, causando déficits de memória observados em sujeitos envelhecidos que não desenvolvem condições patológicas (Foster and Norris, 1997; Toescu e Verkratsky, 2004; Kelly et al., 2006). Portanto, os antagonistas dos receptores NMDA poderiam potencialmente apresentar benefícios terapêuticos de um grande número de doenças neurológicas crônicas manifestadas pela atividade excessiva destes receptores. Entretanto, dado o crítico papel dos receptores NMDA no aprendizado e na memória (Miyamoto, 2006), pode parecer contraditório que um antagonista de receptores NMDA possa melhorar a sintomatologia das doenças neurodegenerativas associadas com os déficits de aprendizagem e memória. Dados demonstram que vários antagonistas dos receptores NMDA de alta afinidade (por exemplo, (+/-) -2-amino-5-ácido fosfonopentanóico (AP5) e maleato de (+) -5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzocicloheptano-5,10-imino (MK-801) produzem efeitos neurocomportamentais adversos (Castellano et al., 2001). Uma alternativa para evitar esses efeitos, é produzir um bloqueio parcial dos receptores NMDA. A memantina, a qual possui afinidade baixa-moderada por estes receptores, sendo um antagonista não-competitivo dos mesmos, foi recentemente aprovada pela União Européia e pelos U.S Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento da doença de Alzheimer. Foi demonstrado que esta droga é capaz de melhorar o desempenho em diversos modelos farmacológicos de prejuízo de aprendizado e memória (Wenk et al., 1994;

Zajackowski et al., 1996; Wenk et al., 1997; Minkeviciene et al., 2004; Yamada et al., 2005; Nakamura et al., 2006), em ratos velhos com prejuízo de memória (Barnes et al., 1996) e pacientes com doença de Alzheimer severa à moderada (Rammsayer, 2001; Reisberg et al., 2003; Tariot et al., 2004; Cummins et al., 2006).

Em estudos prévios nós demonstramos que ratos velhos apresentam prejuízo de memória de reconhecimento quando comparados a ratos adultos jovens (de Lima et al., 2005a). Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da memantina sobre o déficit de memória de reconhecimento associado ao envelhecimento. Para tanto, ratos Wistar machos de 24 meses de idade tratados com memantina foram submetidos à tarefa de reconhecimento do objeto novo. Além disso, parâmetros de dano oxidativo em regiões cerebrais relacionadas à formação da memória foram avaliados.

A memória de reconhecimento pode ser testada em roedores utilizando-se tarefas de reconhecimento de objeto baseadas na atividade espontânea e na preferência natural que ratos apresentam de explorar um objeto novo mais do que um familiar, quando o animal lembra uma exposição prévia ao objeto familiar. As vantagens associadas a esta classe de medidas incluem o fato de que o desempenho não depende da retenção de uma regra e não é baseada em reforços positivos ou negativos, tais como privação alimentar ou aplicação de um choque elétrico (Ennaceur and Delacour, 1988; Dix and Aggleton, 1999; Mumby, 2001; Clark and Martin, 2005; Bertaina-Anglade et al., 2006).

## **2 Materiais e Métodos**

### *2.1 Animais*

Ratos Wistar machos foram obtidos da fundação Estadual de Pesquisa e Produção em Saúde (FEPPS-RS, Porto Alegre, RS, Brasil). Os animais foram mantidos em grupos de 3 ratos por caixa de moradia em ambiente climatizado com temperatura de  $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo alimentação comercial e água *ad libitum*. Os experimentos ocorreram entre 9:00 e 17:00. Os procedimentos foram realizados de acordo com NHI *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* e as recomendações para utilização de animais da

Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC). Este trabalho foi aprovado pelo comitê de Ética da Pontifícia Universidade Católica (cep 996/04).

## *2.2 Drogas e procedimentos farmacológicos*

Os animais envelhecidos (23 meses de idade) receberam diariamente injeções intraperitoneais (i.p) de solução salina (NaCl 0.9%) ou memantina (Apsen, SP, Brasil) na dose de 20.0 mg/Kg, dissolvido em solução salina, por 21 dias em volume da injeção 2.0 ml/Kg. Os animais foram treinados e o teste de reconhecimento do objeto novo 1 semana após a última administração de memantina. A dose de memantina foi escolhida baseada em estudos prévios (Zajackowski et al., 1996; Wenk et al., 1997; Rao et al., 2001; Yamada et al., 2005; Cummings et al., 2006; Nakamura et al., 2006). Dinitro-fenil-hidrazina, ácido tricloroacético e ácido tiobarbitúrico foram obtidos da Sigma, St. Louis, MO, USA.

## *2.3 Memória de reconhecimento do objeto novo*

Passadas 24 horas após a exploração no campo aberto (ver abaixo), os animais foram treinados e testados na tarefa de reconhecimento do objeto novo como previamente descrito (Schröder et al., 2003; de Lima et al., 2005a; 2005b; 2005c; 2005d; 2006). O treino na tarefa de reconhecimento do objeto foi feito na mesma caixa de campo aberto, com exceção do assoalho que foi coberto com serragem durante a tarefa de memória. A exploração no campo aberto foi utilizada como habituação ao contexto para a tarefa de memória de reconhecimento. O teste de reconhecimento do objeto requer que os ratos lembrem qual dos dois objetos plásticos que eles já foram previamente familiarizados. Ao decorrer 24 horas após a exploração, o treino foi realizado, colocando-se os animais individualmente para no campo com dois objetos idênticos (objetos A1 e A2; Duplo Lego Toys) posicionados nos dois cantos adjacentes a 9 cm da parede. Os animais tiveram que explorar os objetos até acumularem 30s do tempo total de exploração, sendo o tempo máximo de 20 min. No teste de memória de curta duração (STM), realizado 1.5 horas após o treino, os ratos exploraram o campo por 5 min na presença de um objeto familiar (A) e um objeto novo (B). Os objetos apresentaram texturas, cores e tamanho similares, porém diferentes formas. O índice de reconhecimento foi calculado para cada animal sendo expressado pela razão  $TB/(TA+TB)$  [TA= tempo gasto explorando o objeto familiar (A); TB= tempo gasto explorando o objeto novo (B)]. Entre as provas os



objetos foram lavados com 10% de solução de etanol. No teste de memória de longa duração (LTM), realizado 24 horas após o treino, os mesmos ratos exploraram novamente o campo por 5 min na presença de um objeto familiar (A) e de um objeto novo (C). A memória de reconhecimento foi avaliada da mesma forma que no teste de memória de curta duração. A exploração foi definida pelo farejar ou pelo contato do animal com o objeto através do nariz e/ou patas. Acomodar-se no objeto não foi considerada exploração.

#### *2.4 Atividade no campo aberto*

Para controlar a possibilidade de efeitos sensoriomotores induzidos pela memantina, o comportamento de exploração no campo aberto foi avaliado 24 horas após a última injeção. O campo aberto consiste em uma caixa de 40 x 45 cm com paredes de 50 cm de altura, feita de madeira com a face frontal de vidro. O assoalho da caixa foi dividido em 12 quadrantes iguais por linhas pretas. Os animais foram colocados no canto esquerdo da caixa onde puderam explorar livremente o campo por 5 min. Foram registrados a latência para iniciar a locomoção, o número de cruzamentos, o número de respostas de orientação e a quantidade de fezes produzidas (de Lima et al., 2005a).

#### *2.5 Análise do estresse oxidativo*

Após a conclusão dos procedimentos comportamentais, os animais foram sacrificados por decapitação e as regiões cerebrais (córtex, hipocampo e estriado) de 6 ratos selecionados aleatoriamente de cada grupo foram isoladas e armazenadas a 80°C para análise posterior. Todos os resultados foram normalizados com relação ao conteúdo das proteínas (Lowry et al., 1951). O dano oxidativo das proteínas foi estimado pela determinação de grupos carbonil baseados na reação com dinitrophenylhydrazine (DNPH) como previamente descrito (Levine et al., 1990). Resumidamente, as proteínas foram precipitadas pela adição de 20% de ácido tricloroacético e dissolvidas novamente em DNPH e então a absorbância é lida em 370 nm.

#### *2.6 Análise estatística*

Os dados comportamentais foram analisados como previamente descritos (Schröder et al., 2003; de Lima et al., 2005a; 2005b; 2005c; 2005d; 2006). Os dados

dos índices de reconhecimento foram expressos pela mediana [intervalos interquartis]. Comparações entre os grupos foram feitas utilizando o teste U de Mann-Whitney. Comparações do tempo (em segundos) gasto explorando o objeto familiar e o objeto novo nos testes de retenção dentro de cada grupo individual foi mensurado pelo teste de Wilcoxon. Dados do comportamento no campo aberto foram expressados pelas médias  $\pm$  E.P. (erro padrão) e foram analisados através do teste-T para amostras independentes. Os dados bioquímicos foram expressados pelas médias  $\pm$  D.P. (desvio padrão), analisados também pelo teste-T para amostras independentes. Em todas as comparações,  $p \leq 0,05$  foi considerado significativo estatisticamente.

### 3 Resultados

#### 3.1 Efeitos da memantina no prejuízo de memória de reconhecimento associado ao envelhecimento.

A Figura 1 mostra os efeitos da memantina sobre a memória de reconhecimento em ratos velhos. Não houve diferença significativa entre os grupos na sessão de treino (mediana [intervalos interquartis] da porcentagem do tempo de exploração do objeto A2 foi 49.5 [44.5/56.1] no grupo tratado com salina e 43.3 [33.8/53.4] no grupo tratado com memantina,  $p=0,315$ ) ou no teste de retenção de curta duração (STM) (mediana [intervalos interquartis] da porcentagem do tempo de exploração do objeto novo B foi 70.2 [67.2/78.2] no grupo tratado com salina e 68.0 [65.0/75.0] no grupo tratado com memantina,  $p=0,536$ ). A comparação estatística dos índices de reconhecimento na LTM foi significativamente diferente ( $p=0,003$ ) entre os grupos. Adicionalmente, os ratos velhos tratados com salina não apresentaram preferência para o objeto novo no teste de retenção de longa duração (LTM), assim como o teste de Wilcoxon não indicou diferença significativa entre o tempo gasto explorando o objeto familiar o e novo objeto (mediana [intervalos interquartis] do tempo em segundos explorando o objeto A foi 5.16 [3.56/7.01] e o objeto C foi 7.88 [4.25/9.39] durante o teste de LTM,  $p=0,114$ ). Entretanto, os ratos tratados com memantina apresentaram uma significativa preferência na exploração do objeto novo durante o teste de retenção de longa duração (LTM) (mediana

[intervalos interquartis] do tempo em segundos explorando o objeto A foi 6.03 [5.78/8.39] e do objeto novo C foi 16.79 [14.22/18.93] durante o teste de LTM,  $p=0,018$ ). Estes resultados indicam que o tratamento com memantina reverte o prejuízo na memória de reconhecimento relacionada ao envelhecimento.

### *3.2 Comportamento no campo aberto dos ratos velhos tratados com memantina.*

Os resultados do comportamento no campo aberto nos ratos velhos tratados com memantina são apresentados na Fig.2. A memantina não afetou o número de cruzamentos ( $p=0,252$ ), respostas de orientação ( $p=0,579$ ), latência para iniciar a locomoção ( $p=0,444$ ) ou a quantidade de fezes produzidas ( $p=0,605$ ). Estes resultados indicam que a melhora induzida pela memantina no desempenho do teste de memória de reconhecimento não pode ser atribuído a alterações na função sensorio-motora bem como na locomoção, comportamento exploratório, motivação ou ansiedade.

### *3.3 Análise de estresse oxidativo em ratos velhos tratados com memantina.*

A figura 3 mostra o efeito da memantina nos níveis da carbonilação de proteínas, o qual foi utilizado como um índice para o dano de proteínas. A memantina reduziu significativamente a carbonilação de proteínas encontradas no hipocampo ( $p=0,024$ ) e córtex ( $p=0,008$ ) de ratos velhos (fig. 3A e B) sem afetar os níveis de carbonilação de proteínas no estriado ( $p=0,461$ ; fig. 3C).

## **4 Discussão**

O presente estudo buscou investigar a possibilidade da terapia com memantina minimizar os déficits de memória relacionados ao envelhecimento. Em estudos prévios nós demonstramos que o envelhecimento induz a um prejuízo de memória de longa duração no reconhecimento do objeto em ratos (de Lima et al., 2005a). Os dados aqui apresentados demonstram pela primeira vez que a memantina foi capaz de reverter os déficits de memória de reconhecimento induzidos pelo envelhecimento em ratos. Adicionalmente, o tratamento com memantina diminuiu o dano oxidativo de proteínas em regiões cerebrais específicas envolvidas na formação da memória como o córtex e o hipocampo. Deste modo, o

presente resultado forneceu suporte à hipótese que os déficits cognitivos associados ao envelhecimento podem estar relacionados com o dano oxidativo desencadeado pela superestimulação dos receptores NMDA.

Ensaio controlados demonstraram a segurança e eficácia do tratamento com memantina em pacientes com doença de Alzheimer severa (Winblad and Poritis, 1999; Reisberg et al., 2003; Peskind et al., 2006; Dutzemberg et al., 2006) e também em pacientes que receberam tratamento com inibidor da colinesterase (Hartmann and Mobius, 2003; Tariot et al., 2004; Cummings et al., 2006; Dantoine et al., 2006).

Em animais foi demonstrado que a memantina melhora o aprendizado espacial em camundongos transgênicos com modelo de doença de Alzheimer e em ratos que receberam injeções do peptídeo  $\beta$ -amilóide no hipocampo sem afetar parâmetros de locomoção e atividade exploratória (Minkeviciene et al., 2004; Nakamura et al., 2006, respectivamente). Além disso, a memantina reverteu déficits de memória induzidos por uma lesão cortical em ratos (Zajackowski et al., 1996), protegeu contra a neuroinflamação induzida por lipopolisacarídeos (LPS), minimizando o prejuízo de memória espacial produzido também por LPS (Rosi et al., 2006). Esses resultados indicam que sob condições patológicas, a memantina pode produzir efeitos benéficos nas funções cognitivas. Um estudo realizado por Zoladz e colaboradores (2006) demonstrou que a memantina utilizada pré-treino aumentou a retenção de longa duração da memória espacial em ratos adultos. Resultados conflitantes foram apresentados por Creeley et al., (2006) onde ratos tratados com memantina demonstraram diminuição da memória de longa duração no teste "hole board".

Interessantemente, quando a memantina foi administrada a sujeitos humanos saudáveis, a memória de reconhecimento para objetos diminuiu enquanto o desempenho no reconhecimento de faces não foi afetado (Rammsayer, 2001). Estes resultados dão suporte a idéia de que os antagonistas dos receptores NMDA exercem diferentes efeitos nas funções da memória.

De fato, nós já demonstramos que o MK-801 diminuiu a retenção da memória de curta e longa duração no reconhecimento do objeto quando utilizado antes ou depois do treino em ratos Wistar adultos saudáveis (de Lima et al., 2005d). De acordo com esta visão, Marvanova et al. (2004) mostrou que o MK-801 e a memantina induzem diferentes expressões de genes no cérebro de ratos. Embora o mecanismo exato envolvido nos diferentes efeitos induzidos pela memantina não

está bem esclarecido, parece que a memantina é combinada e liberada com canais iônicos de maneira dependente do potencial elétrico, da mesma forma que o íon magnésio (Chen and Lipton, 2006).

No presente estudo os ratos tratados com memantina foram submetidos ao teste de reconhecimento do objeto novo. Este teste tem sido crescentemente usado atualmente como um modelo para a investigação de mecanismos neurobiológicos de aprendizagem e memória. Visto que muitos estudos investigando o aprendizado e a memória em roedores utilizam testes espaciais e/ou emocionais, o teste de reconhecimento do objeto estabelece uma ferramenta para avaliar alterações de memória não espacial e não aversiva, sensível a manipulações farmacológicas e genéticas e também no processo de envelhecimento (Rampon et al., 2000; Schröder et al., 2003; de Lima et al., 2005a; 2005b; 2005c; 2005d; 2006; Bertaina-Anglade et al., 2006). Deste modo, estudos prévios analisando os efeitos da memantina no prejuízo da memória são principalmente focados em testes de memória espacial como o Labirinto aquático de Morris e o teste "hole board".

Análises do comportamento no campo aberto após o tratamento com memantina demonstraram que a dose utilizada (20mg/Kg) neste estudo não afetou a atividade geral, portanto não afetou a habilidade dos ratos em explorar os objetos.

Os mecanismos moleculares fundamentais na reversão dos déficits de memória de reconhecimento pela memantina são desconhecidos. Entretanto, os resultados do estudo sugerem que os mecanismos possuem forte relação com a inibição do dano oxidativo desencadeado pela atividade excessiva dos receptores NMDA. No presente estudo nós provamos que a memantina tem a capacidade de reduzir a carbonilação de proteínas no córtex cerebral e no hipocampo sem afetar os níveis no estriado.

O desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes resultando no estresse oxidativo associado com o envelhecimento tem sido amplamente demonstrado (Castellani et al., 2006; Mancuso et al., 2007). Ao longo dos anos, inúmeros estudos descrevem consistentemente o dano oxidativo em regiões cerebrais, especialmente no hipocampo de ratos velhos (Cini and Moretti, 1995; Nicolle et al., 2001; Abd El Mohsen et al., 2005). É proposto que o acúmulo de proteínas oxidadas contribuem no processo de envelhecimento (Nabeshi et al., 2006; Friguet, 2006). Crescentes evidências sugerem que o estresse oxidativo esteja envolvido no declínio cognitivo

relacionado ao envelhecimento e antioxidantes têm sido usados para verificar o papel do dano oxidativo sobre a memória na senescência (Martin and Grotewiel, 2006). Em concordância, um recente estudo indicou que os níveis de proteínas carboniladas aumentam em ratos Wistar velhos e o tratamento antioxidante atenua os déficits cognitivos em ratos OXYS com senescência acelerada (Kolossova et al., 2006). A suplementação com N-acetilcisteína também tem comprovado o retardo do prejuízo de memória associado ao envelhecimento em macacos (Martinez et al., 2000). Macacos receberam administração sistêmica crônica de dois catalíticos sintéticos *scavengers* de espécies reativas de oxigênio de 8 a 11 meses e apresentaram quase completa reversão dos déficits cognitivos associados ao envelhecimento e diminuíram o estresse oxidativo cerebral (Liu et al., 2003). Um outro estudo recente indicou que o pré-tratamento com memantina combinado com atropina minimiza significativamente as alterações nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzidas por carbofuran, assim como alterações na morfologia dos neurônios do hipocampo. A memantina e a atropina como pré-tratamento também protegem os ratos da atividade hipercolinérgica induzida por carbofuran, incluindo convulsões (Gupta et al., 2006).

O presente estudo sustenta a idéia que os déficits cognitivos associados ao envelhecimento podem estar relacionados ao estresse oxidativo ocasionado pela superativação dos receptores NMDA e estabelece a evidência que os antagonistas destes receptores previnem as disfunções de memória relacionadas ao envelhecimento em ratos.

### **Agradecimentos**

Este estudo teve suporte financeiro do CNPq-MCT, concessão 474663/2004-3 e 307265/2003-0 (para N.S) C.P.D, M.N.M.L e A.D são beneficiários de bolsas da CAPES-MEC. M.R.G é beneficiário de bolsa PIBIC/CNPq.

## Abreviaturas

AD, doença de Alzheimer; ALS, esclerose amiotrófica lateral; AMPA,  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato; APS, (+/-)-2-amino-5-ácido fosfonopentanóico; CNS, sistema nervoso central; DNPH, dinitrophenylhydrazine; FDA, U.S Administração de Alimentação e Drogas; FEPPS-RS, Fundação Estadual de Saúde, Ciência e Pesquisa; HD, doença de Huntington; HIV, vírus da imunodeficiência humana; i.p, intraperitoneal; LTM, memória de longa duração; MK-801, (+)-5-metil-10,11-dihidro-5h-dibenzocicloheptano-5,10-imina; NMDA, N-metil-D-aspartate; PD, doença de Parkinson; SBNeC, Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento; STM, memória de curta duração.

## Referências

- Abd El Mohsen, M.M., Irvani, M.M., Spencer, J.P., Rose, S., Fahim, A.T., Motawi, T.M., Ismail, N.A., Jenner, P., 2005. Age-associated changes in protein oxidation and proteasome activities in rat brain: modulation by antioxidants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336(2), 386-91.
- Barnes, C.A., Danysz, W., Parsons, C.G., 1996. Effects of the uncompetitive NMDA receptor antagonist memantine on hippocampal long-term potentiation, short-term exploratory modulation and spatial memory in awake, freely moving rats. *Eur. J. Neurosci.* 8(3), 565-71.
- Beal, M.F., 1998. Excitotoxicity and nitric oxide in Parkinson's disease pathogenesis. *Ann. Neurol.* 44(3 Suppl 1), S110-4.
- Bertaina-Anglade, V., Enjuanes, E., Morillon, D., Drieu la Rochelle, C., 2006. The object recognition task in rats and mice: a simple and rapid model in safety pharmacology to detect amnesic properties of a new chemical entity. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 54(2), 99-105.
- Canzoniero, L.M., Snider, B.J., 2005. Calcium in Alzheimer's disease pathogenesis: too much, too little or in the wrong place? *J. Alzheimers Dis.* 8(2), 147-54.

- Castellani, R.J., Lee, H.G., Perry, G., Smith, M.A., 2006. Antioxidant protection and neurodegenerative disease: the role of amyloid-beta and tau. *Am. J. Alzheimers Dis. Other Demen.* 21(2), 126-30.
- Castellano, C., Cestari, V., Ciamei, A., 2001. NMDA receptors and learning and memory processes. *Curr. Drug Targets.* 2(3), 273-83.
- Cini, M., Moretti, A., 1995. Studies on lipid peroxidation and protein oxidation in the aging brain. *Neurobiol. Aging* 16(1), 53-7.
- Chen, H.V., Lipton S.A., 2006. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J. Neurochem.* 97, 1611-26.
- Clark, R.E., Martin, S.J., 2005. Interrogating rodents regarding their object and spatial memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15(5), 593-8.
- Cowan, C.M., Raymond, L.A., 2006. Selective neuronal degeneration in Huntington's disease. *Curr. Top. Dev. Biol.* 75, 25-71.
- Coyle, J.T., 2006. A brief overview of N-acetylaspartate and N-acetylaspartylglutamate. *Adv. Exp. Med. Biol.* 576, 1-6.
- Creeley, C., Wozniak, D.F., Labruyere, J., Taylor, G.T., Olney, J.W., 2006. Low doses of memantine disrupt memory in adult rats. *J Neurosci.* 26(15), 3923-32.
- Cull-Candy, S., Brickley, S., Farrant, M., 2001. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11(3), 327-35.
- Cummings, J.L., Schneider, E., Tariot, P.N., Graham, S.M., Memantine MEM-MD-02 Study Group, 2006. Behavioral effects of memantine in Alzheimer disease patients receiving donepezil treatment. *Neurology* 67(1), 57-63.
- van Damme, P., Dewil, M., Robberecht, W., van Den Bosch, L., 2005. Excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener. Dis.* 2(3-4), 147-59.
- Dantoine, T., Auriacombe, S., Sarazin, M., Becker, H., Pere, J.J., Bourdeix, I., 2006. Rivastigmine monotherapy and combination therapy with memantine in patients with



moderately severe Alzheimer's disease who failed to benefit from previous cholinesterase inhibitor treatment. *Int. J. Clin. Pract.* 60(1), 110-8.

Dautzenberg, P.L., Wouters, C.J., Bootsma, J.E., 2006. Observations from a 14-week open-label trial with memantine suggest variable response on behavioral symptoms and cognition, depending on former treatment of AD. *Int. Psychogeriatr.* 18(1), 179-81.

Dix, S.L., Aggleton, J.P., 1999. Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-location and object-context recognition. *Behav. Brain Res.* 99(2), 191-200.

Ennaceur, A., Delacour, J., 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav. Brain Res.* 31(1), 47-59.

Friguet B., 2006. Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress. *F. E. B. S. Lett.* 580, 2910-16.

Foster, T.C., Norris, C.M., 1997. Age-associated changes in Ca(2+)-dependent processes: relation to hippocampal synaptic plasticity. *Hippocampus* 7(6), 602-12.

Gerber, A.M., Vallano, M.L., 2006. Structural properties of the NMDA receptor and the design of neuroprotective therapies. *Mini Rev. Med. Chem.* 6(7), 805-15.

Gupta, R.C., Milatovic, S., Dettbarn, W.D., Aschner, M., Milatovic, D., 2006 Neuronal oxidative injury and dendritic damage induced by carbofuran: Protection by memantine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* [Epub ahead of print]

Hartmann, S., Mobius, H.J., 2003. Tolerability of memantine in combination with cholinesterase inhibitors in dementia therapy. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 18(2), 81-85.

Kaul, M., Lipton, S.A., 2006. Mechanisms of neuronal injury and death in HIV-1 associated dementia. *Curr. HIV Res.* 4(3), 307-18.

Kelly, K.M., Nadon, N.L., Morrison, J.H., Thibault, O., Barnes, C.A., Blalock, E.M., 2006. The neurobiology of aging. *Epilepsy Res.* 68 Suppl 1, S5-20.

- Kolosova, N.G., Shcheglova, T.V., Sergeeva, S.V., Loskutova, L.V., 2006. Long-term antioxidant supplementation attenuates oxidative stress markers and cognitive deficits in senescent-accelerated OXYS rats. *Neurobiol. Aging* 27(9), 1289-97.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186, 464-478.
- de Lima, M.N., Laranja, D.C., Caldana, F., Bromberg, E., Roesler, R., Schroder, N., 2005a. Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with l-deprenyl. *Exp. Gerontol.* 40(6), 506-11.
- de Lima, M.N., Polydoro, M., Laranja, D.C., Bonatto, F., Bromberg, E., Moreira, J.C., Dal-Pizzol, F., Schroder, N., 2005b. Recognition memory impairment and brain oxidative stress induced by postnatal iron administration. *Eur. J. Neurosci.* 21(9), 2521-8.
- de Lima, M.N., Laranja, D.C., Caldana, F., Graziotin, M.M., Garcia, V.A., Dal-Pizzol, F., Bromberg, E., Schroder, N., 2005c. Selegiline protects against recognition memory impairment induced by neonatal iron treatment. *Exp. Neurol.* 196(1), 177-83.
- de Lima, M.N., Laranja, D.C., Bromberg, E., Roesler, R., Schroder, N., 2005d. Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behav. Brain Res.* 156(1), 139-43.
- Lipton, S.A., 2006. Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5(2), 160-70.
- Lipton, S.A., Rosenberg, P.A., 1994. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N. Engl. J. Med.* 330(9), 613-22.
- Liu, R., Liu, I.Y., Bi, X., Thompson, R.F., Doctrow, S.R., Malfroy, B., Baudry, M., 2003. Reversal of age-related learning deficits and brain oxidative stress in mice with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 8526-31.

Lowry, O.H., Rosebrough, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Mancuso, C., Scapagini, G., Curro, D., Giuffrida Stella, A.M., de Marco, C., Butterfield, D.A., Calabrese, V., 2007. Mitochondrial dysfunction, free radical generation and cellular stress response in neurodegenerative disorders. *Front. Biosci.* 12, 1107-23.

Martin, I., Grotewiel, M.S., 2006. Oxidative damage and age-related functional declines. *Mech. Ageing Develop.* 127, 411-23.

Martinez, M., Hernandez, A.I., Martinez, N., 2000. N-Acetylcysteine delays age-associated memory impairment in mice: role in synaptic mitochondria. *Brain Res.* 855, 100-6.

Marvanova, M., Lakso, M., Wong, G., 2004. Identification of genes regulated by memantine and MK-801 in adult rat brain by cDNA microarray analysis. *Neuropsychopharmacology* 29(6), 1070-9.

Minkeviciene, R., Banerjee, P., Tanila, H., 2004. Memantine improves spatial learning in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311(2), 677-82.

Miyamoto, E., 2006. Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. *J. Pharmacol. Sci.* 100(5), 433-42.

Mumby, D.G., 2001. Perspectives on object-recognition memory following hippocampal damage: lessons from studies in rats. *Behav. Brain Res.* 127(1-2), 159-81.

Nabeshi, H., Oikawa, S., Inoue, S., Nishino, K., Kawanishi, S., 2006. Proteomic analysis for protein carbonyl as an indicator of oxidative damage in senescence-accelerated mice. *Free Radic. Res.* 40(11), 1173-81.

Nakamura, S., Murayama, N., Noshita, T., Katsuragi, R., Ohno, T., 2006. Cognitive dysfunction induced by sequential injection of amyloid-beta and ibotenate into the

bilateral hippocampus; protection by memantine and MK-801. *Eur. J. Pharmacol.* 548(1-3), 115-22.

Nicolle, M.M., Gonzalez J., Sugaya, K., Baskerville, K.A., Bryan, D., Lund, K., Gallagher, M., McKinney, M., 2001. Signatures of hippocampal oxidative stress in aged spatial learning-impaired rodents. *Neuroscience* 107(3), 415-31.

Peskind, E.R., Potkin, S.G., Pomara, N., Ott, B.R., Graham, S.M., Olin, J.T., McDonald, S., 2006. Memantine treatment in mild to moderate Alzheimer disease: a 24-week randomized, controlled trial. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* 14(8), 704-15.

Rammsayer, T.H., 2001. Effects of pharmacologically induced changes in NMDA-receptor activity on long-term memory in humans. *Learn. Mem.* 8(1), 20-5.

Rampon, C., Tang, Y.P., Goodhouse, J., Shimizu, E., Kiyin, M., Tsien, J.Z., 2000. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat. Neurosci.* 3(3), 238-44.

Rao, V.L., Dogan, A., Todd, K.G., Bowen, K.K., Dempsey, R.J., 2001. Neuroprotection by memantine, a non-competitive receptor antagonist after traumatic brain injury in rats. *Brain Res.* 991(1), 96-100.

Reisberg, B., Doody, R., Stoffler, A., Schmitt, F., Ferris, S., Mobius, H.J.; Memantine Study Group., 2003. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 348(14), 1333-41.

Riederer, P., Hoyer, S., 2006. From benefit to damage. Glutamate and advanced glycation end products in Alzheimer brain. *J. Neural. Transm.* 113(11), 1671-7.

Rosi, S., Vazdarjanova, A., Ramirez-Amaya, V., Worley, P.F., Barnes, C. A., Wenk, G.L., 2006. Memantine protects against LPS-induced neuroinflammation, restores behaviorally-induced gene expression and spatial learning in the rat. *Neuroscience* 142(4),1303-15.

Schroder, N., O'Dell, S.J., Marcjall, J.F., 2003. Neurotoxic methamphetamine regimen severely impairs recognition memory in rats. *Synapse* 49, 89-96.

Scott, G.S., Bowman, S.R., Smith, T., Flower, R.J., Bolton, C., 2006. Glutamate-stimulated peroxynitrite production in a brain-derived endothelial cell line is dependent on N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor activation. *Biochem. Pharmacol.* [in press].

Tariot, P.N., Farlow, M.R., Grossberg, G.T., Graham, S.M., McDonald, S., Gergel, I.; Memantine Study Group., 2004. Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial. *J. A. M. A.* 291(3), 317-24.

Toescu, E.C., Verkhratsky, A., 2004. Ca<sup>2+</sup> and mitochondria as substrates for deficits in synaptic plasticity in normal brain ageing. *J. Cell Mol. Med.* 8(2), 181-90.

Wenk, G.L., Zajackowski, W., Danysz, W., 1997. Neuroprotection of acetylcholinergic basal forebrain neurons by memantine and neurokinin B. *Behav. Brain Res.* 83(1-2), 129-33.

Wenk, G.L., Danysz, W., Mobley, S.L., 1994. Investigations of neurotoxicity and neuroprotection within the nucleus basalis of the rat. *Brain Res.* 655(1-2), 7-11.

Winblad, B., Poritis, N., 1999. Memantine in severe dementia: results of the 9M-Best Study (Benefit and efficacy in severely demented patients during treatment with memantine). *Int. J. Geriatr. Psychiatry.* 14(2), 135-46.

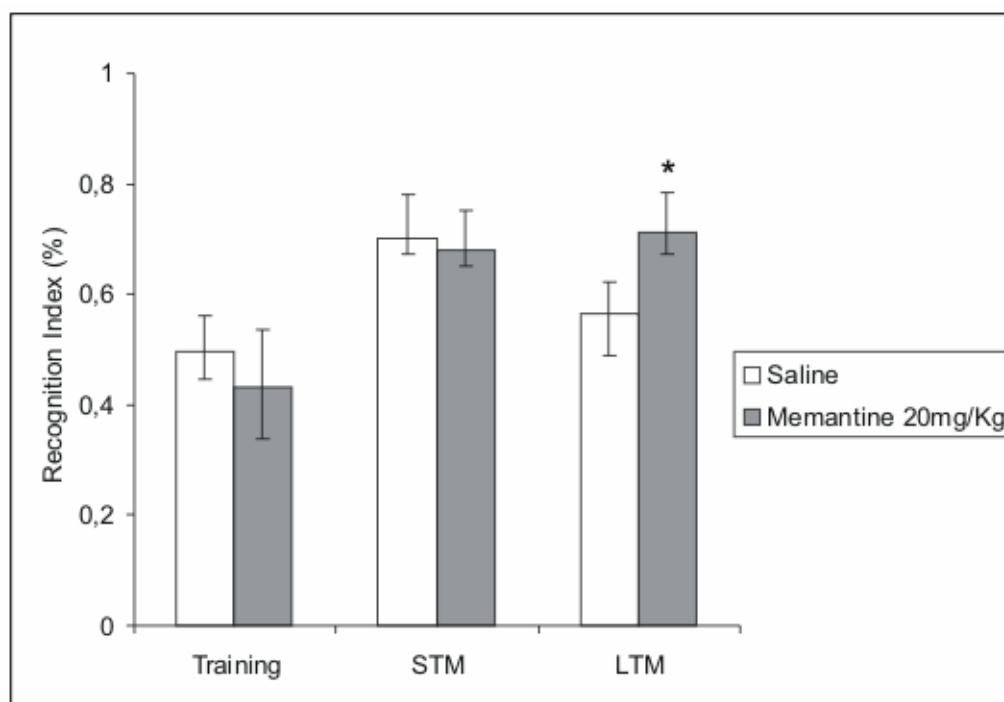
Vernon, A.C., Palmer, S., Datla, K.P., Zbarsky, V., Croucher, M.J., Dexter, D.T., 2005. Neuroprotective effects of metabotropic glutamate receptor ligands in a 6-hydroxydopamine rodent model of Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.* 22(7), 1799-806.

Yamada, K., Takayanagi, M., Kamei, H., Nagai, T., Dohniwa, M., Kobayashi, K., Yoshida, S., Ohhara, T., Takuma, K., Nabeshima, T., 2005. Effects of memantine and donepezil on amyloid beta-induced memory impairment in a delayed-matching to position task in rats. *Behav. Brain Res.* 162(2), 191-9.

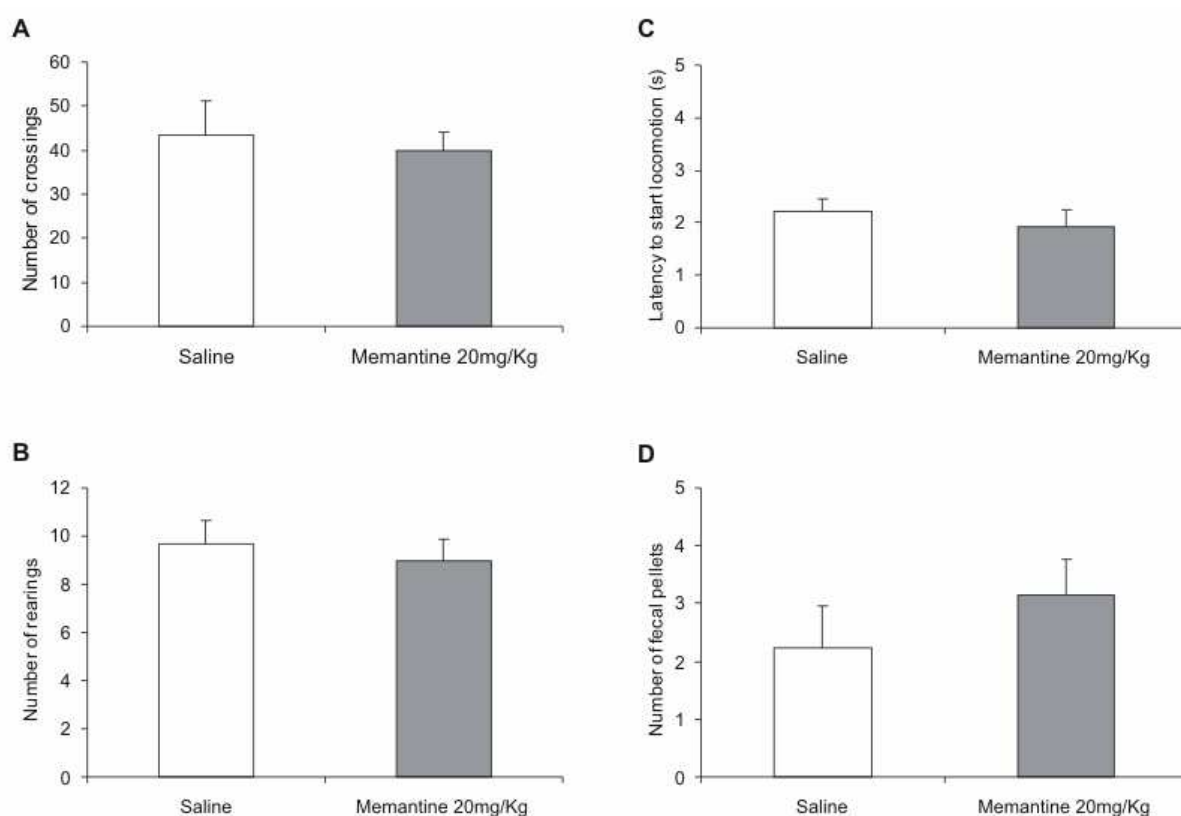
Zajackowski, W., Quack, G., Danysz, W., 1996. Infusion of (+) -MK-801 and memantine --contrasting effects on radial maze learning in rats with entorhinal cortex lesion. *Eur. J. Pharmacol.* 296(3), 239-46.

Zoladz, P.R., Campbell, A.M., Park, C.R., Schaefer, D., Danysz, W., Diamond, D.M., 2006. Enhancement of long-term spatial memory in adult rats by the noncompetitive NMDA receptor antagonists, memantine and neramexane. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 85(2),298-306.

**Figura 1.** Efeitos da memantina sobre os déficits de memória de reconhecimento induzidos pelo envelhecimento 1 semana após a última injeção. O teste de retenção de memória de curta duração foi realizado 1.5 h após o treino e o teste de retenção de longa duração 24 h após o treino. Os testes comportamentais ocorreram quando os animais tinham 24 meses de idade. A proporção entre o tempo total de exploração e o tempo gasto pelo animal explorando o objeto novo foi o “Índice de Reconhecimento” expresso pela razão  $TB/(TA+TB)$ , TA= tempo gasto de exploração do objeto familiar e TB= tempo gasto de exploração do objeto novo. Os dados são expressos pelas medianas [intervalos interquartis], N= 10-7 por grupo. Diferenças entre os grupos tratados com salina e memantina são indicadas: \*  $p < 0.05$ .

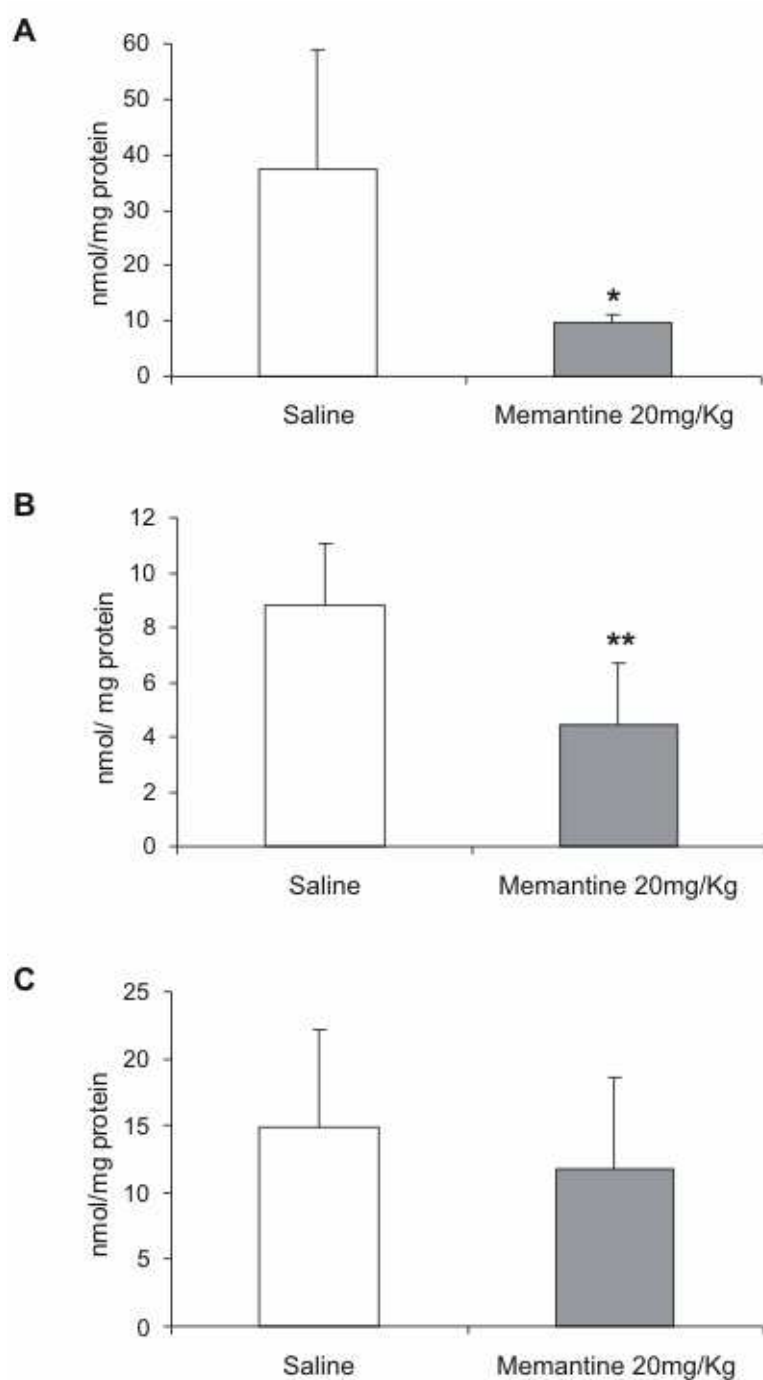


**Figura 2.** Comportamento no campo aberto em ratos tratados com injeções sistêmicas de salina (NaCl 0.9%) ou memantina (20 mg/Kg) por 21 dias. Os animais tiveram que explorar o campo aberto por 5 minutos 1 semana após a última injeção. Os dados foram expressados pelas médias  $\pm$  S.E. (A) Número de cruzamentos; (B) número de respostas de orientação; (C) latência para iniciar a locomoção (s) e (D) quantidade de fezes produzidas.  $N= 10-7$  animais por grupo. Não houve diferença significativa entre os grupos.





**Figura 3.** Conteúdo de de proteínas carboniladas em regiões cerebrais de ratos velhos tratados com memantina. O conteúdo de proteínas carboniladas foi avaliado no (A) hipocampo, (B) Córtex e (C) estriado de 6 ratos de cada grupo como descrito no item Materiais e Métodos. Valores são expressos pelas médias  $\pm$  S.D. Diferenças entre os grupos tratados com salina e memantina são indicadas:  $**p < 0.01$ .



#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo buscou investigar a possibilidade da terapia com memantina minimizar os déficits de memória relacionados ao envelhecimento. Em estudos prévios nós demonstramos que o envelhecimento induz a um prejuízo de memória de longa duração no reconhecimento do objeto em ratos (de Lima et al., 2005a). Os dados aqui apresentados demonstram pela primeira vez que a memantina foi capaz de reverter os déficits de memória de reconhecimento induzidos pelo envelhecimento em ratos. Adicionalmente, o tratamento com memantina diminuiu o dano oxidativo de proteínas em regiões cerebrais específicas envolvidas na formação da memória como o córtex e o hipocampo. Deste modo, o presente resultado forneceu suporte à hipótese que os déficits cognitivos associados ao envelhecimento podem estar relacionados com o dano oxidativo desencadeado pela superestimulação dos receptores NMDA.

Ensaio controlados demonstraram a segurança e eficácia do tratamento com memantina em pacientes com doença de Alzheimer severa (Winblad and Poritis, 1999; Reisberg et al., 2003; Peskind et al., 2006; Dutzemberg et al., 2006) e também em pacientes que receberam um tratamento com inibidor da colinesterase (Hartmann and Mobius, 2003; Tariot et al., 2004; Cummings et al., 2006; Dantoine et al., 2006).

Em animais foi demonstrado que a memantina aumenta o aprendizado espacial em camundongos transgênicos com modelo de doença de Alzheimer e em ratos que receberam injeções do peptídeo  $\beta$ -amilóide no hipocampo sem afetar parâmetros de locomoção e atividade exploratória (Minkeviciene et al., 2004; Nakamura et al., 2006, respectivamente). Além disso, a memantina reverteu déficits de memória induzidos por uma lesão cortical em ratos (Zajaczkowski et al., 1996), protegeu contra a neuroinflamação induzida por lipopolisacarídeos (LPS), minimizando o prejuízo de memória espacial produzido também por LPS (Rosi et al., 2006). Esses resultados indicam que sob condições patológicas com a memantina podendo produzir efeitos benéficos nas funções cognitivas. Um estudo realizado por Zoladz e colaboradores (2006) demonstrou que a memantina utilizada pré-treino aumentou a retenção de longa duração da memória espacial em ratos adultos. Resultados conflitantes foram apresentados por Creeley et al., (2006) onde ratos

tratados com memantina demonstraram diminuição da memória de longa duração no teste “hole board”.

Interessantemente, quando a memantina foi administrada a sujeitos humanos saudáveis, a memória de reconhecimento para objetos diminuiu enquanto o desempenho no reconhecimento de faces não foi afetado (Rammsayer, 2001). Estes resultados dão suporte a idéia de que os antagonistas dos receptores NMDA exercem diferentes efeitos nas funções da memória.

De fato, nós já demonstramos que o MK-801 diminuiu a retenção da memória de curta e longa duração no reconhecimento do objeto quando utilizado antes ou depois do treino em ratos Wistar adultos saudáveis (de Lima et al., 2005d). De acordo com esta visão, Marvanova et al. (2004) mostrou que o MK-801 e a memantina induzem diferentes expressões de genes no cérebro de ratos. Embora o mecanismo exato envolvido nos diferentes efeitos induzidos pela memantina não está bem esclarecido, parece que a memantina é combinada e liberada com canais iônicos de maneira dependente do potencial elétrico da mesma forma que íon magnésio (Chen and Lipton, 2006).

No presente estudo os ratos tratados com memantina foram submetidos ao teste de reconhecimento do objeto novo. Este teste tem sido crescentemente usado atualmente como um modelo para a investigação de mecanismos neurobiológicos de aprendizagem e memória. Visto que muitos estudos investigando o aprendizado e a memória em roedores utilizam testes espaciais e/ou emocionais, o teste de reconhecimento do objeto estabelece uma ferramenta para avaliar alterações de memória não espacial e não aversiva, sensível a manipulações farmacológicas e genéticas e também no processo de envelhecimento (Rampon et al., 2000; Schröder et al., 2003; de Lima et al., 2005a; 2005b; 2005c; 2005d; 2006; Bertaina-Anglade et al., 2006). Deste modo, estudos prévios analisando os efeitos da memantina no prejuízo da memória são principalmente focados em testes de memória espacial como o Labirinto aquático de Morris e o teste “hole board”..

Análises comportamento no campo aberto após o tratamento com memantina demonstraram que a dose utilizada (20mg/Kg) neste estudo não afetou a atividade geral, portanto não afetou a habilidade dos ratos em explorarem os objetos.

Os mecanismos moleculares fundamentais na reversão dos déficits de memória de reconhecimento pela memantina são desconhecidos. Entretanto, os resultados do estudo sugerem que os mecanismos possuem forte relação com a

inibição do dano oxidativo desencadeado pela atividade excessiva dos receptores NMDA. No presente estudo nós provamos que a memantina tem a capacidade de reduzir a carbonilação de proteínas no córtex cerebral e no hipocampo sem afetar os níveis no estriado.

O desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes resultando no estresse oxidativo associado com o envelhecimento tem sido amplamente demonstrado (Castellani et al., 2006; Mancuso et al., 2007). Ao longo dos anos, inúmeros estudos descrevem consistentemente sobre o dano oxidativo em regiões cerebrais, especialmente no hipocampo de ratos velhos (Cini and Moretti, 1995; Nicolle et al., 2001; Abd El Mohsen et al., 2005). É proposto que o acúmulo de proteínas oxidadas contribuem no processo de envelhecimento (Nabeshi et al., 2006; Friguet, 2006). Crescentes evidências sugerem que o estresse oxidativo esteja envolvido declínio cognitivo relacionado ao envelhecimento e antioxidantes têm sido usados para verificar o papel do dano oxidativo sobre a memória na senescência (Martin and Grotewiel, 2006). Em concordância, um recente estudo indicou que os níveis de proteínas carboniladas aumentam em ratos Wistar velhos e o tratamento antioxidante atenua os déficits cognitivos em ratos OXYS com senescência acelerada (Kolosova et al., 2006). A suplementação com N-acetilcisteína também tem comprovado o retardo do prejuízo de memória associado ao envelhecimento em macacos (Martinez et al., 2000). Macacos receberam administração sistêmica crônica de dois catalíticos sintéticos *scavengers* de espécies reativas de oxigênio de 8 a 11 meses e apresentaram quase completa reversão dos déficits cognitivos associados ao envelhecimento e diminuíram o estresse oxidativo cerebral (Liu et al., 2003). Um outro estudo recente indicou que o pré-tratamento com memantina combinado com atropina minimiza alterações nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzidas por carbofuran, assim como alterações na morfologia dos neurônios do hipocampo. A memantina e a atropina como pré-tratamento também protegem os ratos da atividade hipercolinérgica induzida por carbofuran, incluindo convulsões (Gupta et al., 2006).

O presente estudo sustenta a idéia que os déficits cognitivos associados ao envelhecimento podem estar relacionados ao estresse oxidativo ocasionado pela superativação dos receptores NMDA e estabelece a evidência que os antagonistas destes receptores previnem as disfunções de memória relacionadas ao envelhecimento em ratos.

## REFERÊNCIAS

Abd El Mohsen, M.M., Iravani, M.M., Spencer, J.P., Rose, S., Fahim, A.T., Motawi, T.M., Ismail, N.A., Jenner, P., 2005. Age-associated changes in protein oxidation and proteasome activities in rat brain: modulation by antioxidants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336(2), 386-91.

Albert, M.S. *Cognition and aging in principles of geriatric medicine and gerontology.* International Edition, 1994.

Andersen, J.K. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nature*, July 2004.

Bertaina-Anglade, V., Enjuanes, E., Morillon, D., Drieu la Rochelle, C., 2006. The object recognition task in rats and mice: a simple and rapid model in safety pharmacology to detect amnesic properties of a new chemical entity. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 54(2), 99-105.

Bullock, R., 2006. Efficacy and safety of memantine in moderate-to-severe Alzheimer disease: the evidence to date. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 20, 23-9.

Caldas, C. P. *A saúde do idoso: a arte de cuidar.* Rio de Janeiro: Ed. Uerj, 1998.

Castellani, R.J., Lee, H.G., Perry, G., Smith, M.A., 2006. Antioxidant protection and neurodegenerative disease: the role of amyloid-beta and tau. *Am. J. Alzheimers Dis. Other Demen.* 21(2), 126-30.

Cini, M., Moretti, A., 1995. Studies on lipid peroxidation and protein oxidation in the aging brain. *Neurobiol. Aging* 16(1), 53-7.

Chaimowicz, F.; Ferreira T.M.; Miguel, D.F.A., 2000. Use of psychoactive drugs and related falls among older people living in a community in Brazil. *Rev Saude Publica.* 34, 631-635.

Chen, H.V., Lipton S.A., 2006. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J. Neurochem.* 97, 1611-26.

Cohen, G.D. *O cérebro no envelhecimento humano*. São Paulo: Andrei Editora, 1995.

Creeley, C., Wozniak, D.F., Labruyere, J., Taylor, G.T., Olney, J.W., 2006. Low doses of memantine disrupt memory in adult rats. *J Neurosci.* 26(15), 3923-32.

Cummings, J.L., Schneider, E., Tariot, P.N., Graham, S.M., Memantine MEM-MD-02 Study Group, 2006. Behavioral effects of memantine in Alzheimer disease patients receiving donepezil treatment. *Neurology* 67(1), 57-63.

Dantoine, T., Auriacombe, S., Sarazin, M., Becker, H., Pere, J.J., Bourdeix, I., 2006. Rivastigmine monotherapy and combination therapy with memantine in patients with moderately severe Alzheimer's disease who failed to benefit from previous cholinesterase inhibitor treatment. *Int. J. Clin. Pract.* 60(1), 110-8.

Dautzenberg, P.L., Wouters, C.J., Bootsma, J.E., 2006. Observations from a 14-week open-label trial with memantine suggest variable response on behavioral symptoms and cognition, depending on former treatment of AD. *Int. Psychogeriatr.* 18(1), 179-81.

Esterbauer, H; Cheeseman, K.H., 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 186, 407-421.

Fletcher, R.H. et al. *Clinical Epidemiology: The Essentials*. 3 ed Baltimore: Williams & Wilkins;1996.

Floyd, A.R; Hensley, K., 2002. Oxidative stress in brain aging implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Aging.* 23, 795-807.

Freitas, E. V. et al. *Tratado de Geriatria e Gerontologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

Friguet B., 2006. Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress. *F. E. B. S. Lett.* 580, 2910-16.

Gao, Y; Chen, H.J; Qian, L.H; Chen, G.Y., 2006. Long-term effects of memantine therapy on neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* 8, 38-40.

Geis, P. P. *Atividade física e saúde na terceira idade: teoria e prática.* Porto Alegre: Artmed, 2003.

Guay, D.R., 2003. Drug forecast: memantine, prototype of a new approach to treatment of dementia. *Consult Pharm.* 18, 6225-34.

Gupta, R.C., Milatovic, S., Dettbarn, W.D., Aschner, M., Milatovic. D., 2006 Neuronal oxidative injury and dendritic damage induced by carbofuran: Protection by memantine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* [Epub ahead of print].

Hartmann, S., Mobius, H.J., 2003. Tolerability of memantine in combination with cholinesterase inhibitors in dementia therapy. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 18(2), 81-85.

Hoyer S., 1995. Age-related changes in cerebral oxidative metabolism: Implications for drug therapy. *Drugs Aging.* 6(3), 210 – 218.

Kapczinski, F.; Quevedo, J.; Izquierdo, I. *Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos.* Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.

Kirby, J; Green, C; Loveman, E. et al., 2006. A systematic review of the clinical and cost-effectiveness of memantine in patients with moderately severe to severe Alzheimer's disease. *Drugs Aging.* 23, 227-40.

Kirk, R. *Experimental Design: Procedures for the Behavioural Sciences.* Belmont, CA: Books/Cole, 1995.

Lapchak, P.A., 2006. Memantine, an uncompetitive low affinity NMDA open-channel antagonist improves clinical rating scores in a multiple infarct embolic stroke model in rabbits. *Brain Res.* 1088, 141-7.

Leme, L.E.G. *O envelhecimento: conhecer e enfrentar.* São Paulo: Contexto, 2000.

Levine, R.L; Garland, D; Oliver, C.N. et al., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186, 464-478.

de Lima, M.N., Laranja, D.C., Caldana, F., Bromberg, E., Roesler, R., Schroder, N., 2005a. Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with l-deprenyl. *Exp. Gerontol.* 40(6), 506-11.

de Lima, M.N., Polydoro, M., Laranja, D.C., Bonatto, F., Bromberg, E., Moreira, J.C., Dal-Pizzol, F., Schroder, N., 2005b. Recognition memory impairment and brain oxidative stress induced by postnatal iron administration. *Eur. J. Neurosci.* 21(9), 2521-8.

de Lima, M.N., Laranja, D.C., Caldana, F., Graziotin, M.M., Garcia, V.A., Dal-Pizzol, F., Bromberg, E., Schroder, N., 2005c. Selegiline protects against recognition memory impairment induced by neonatal iron treatment. *Exp. Neurol.* 196(1), 177-83.

de Lima, M.N., Laranja, D.C., Bromberg, E., Roesler, R., Schroder, N., 2005d. Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behav. Brain Res.* 156(1), 139-43.

Lipton SA, Rosenberg PA., 1994. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med.* 330(9), 613-622.

Liu, R., Liu, I.Y., Bi, X., Thompson, R.F., Doctrow, S.R., Malfroy, B., Baudry, M., 2003. Reversal of age-related learning deficits and brain oxidative stress in mice with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 8526-31.

de Luca, R.R. Manual para técnicos de bioterismo. São Paulo: FINEP; 1996.

Magalhães, J.P.; Sandberg, A., 2005. Cognitive aging as an extension of brain development: A model linking learning, brain plasticity, and neurodegeneration. *Mechanisms of ageing and development.* 12, 1026-33.

Mancuso, C., Scapagini, G., Curro, D., Giuffrida Stella, A.M., de Marco, C., Butterfield, D.A., Calabrese, V., 2007. Mitochondrial dysfunction, free radical generation and cellular stress response in neurodegenerative disorders. *Front. Biosci.* 12, 1107-23.



Markesbery, W.R; Montine, T,J; Lovell, M.A. Oxidative alterations in neurodegenerative diseases. In: Mark P. Mattson. Pathogenesis of neurodegenerative disorders. São Paulo: Humana Press, 21-41, 2001.

Martin, I., Grotewiel, M.S., 2006. Oxidative damage and age-related functional declines. *Mech. Ageing Develop.* 127, 411-23.

Martinez, M., Hernandez, A.I., Martinez, N., 2000. N-Acetylcysteine delays age-associated memory impairment in mice: role in synaptic mitochondria. *Brain Res.* 855, 100-6.

Marvanová, M; Lakso, M; Pirhonen, J. et al., 2001. The neuroprotective agent memantine induces brain-derived neurotrophic factor and trkB receptor expression in rat brain. *Molecular and cellular neuroscience.* 18, 247-258.

Marvanova, M., Lakso, M., Wong, G., 2004. Identification of genes regulated by memantine and MK-801 in adult rat brain by cDNA microarray analysis. *Neuropsychopharmacology* 29(6), 1070-9.

Minkeviciene, R., Banerjee, P., Tanila, H., 2004. Memantine improves spatial learning in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311(2), 677-82.

Mumby, D.G., 2001. Perspectives on object-recognition memory following hippocampal damage: lessons from studies in rats. *Beh. Brain Res.* 127, 159-181.

Nabeshi, H., Oikawa, S., Inoue, S., Nishino, K., Kawanishi, S., 2006. Proteomic analysis for protein carbonyl as an indicator of oxidative damage in senescence-accelerated mice. *Free Radic. Res.* 40(11), 1173-81.

Nakamura, S., Murayama, N., Noshita, T., Katsuragi, R., Ohno, T., 2006. Cognitive dysfunction induced by sequential injection of amyloid-beta and ibotenate into the bilateral hippocampus; protection by memantine and MK-801. *Eur. J. Pharmacol.* 548(1-3), 115-22.

Nicolle, M.M., Gonzalez J., Sugaya, K., Baskerville, K.A., Bryan, D., Lund, K., Gallagher, M., McKinney, M., 2001. Signatures of hippocampal oxidative stress in aged spatial learning-impaired rodents. *Neuroscience* 107(3), 415-31.

Persson, J., Nyberg, L., Lind, J. et al., 2005. Genetic influences on oxidative stress and their association with normal cognitive ageing. *Neurosci. Lett.* 30, 116-20.

Peskind, E.R., Potkin, S.G., Pomara, N., Ott, B.R., Graham, S.M., Olin, J.T., McDonald, S., 2006. Memantine treatment in mild to moderate Alzheimer disease: a 24-week randomized, controlled trial. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* 14(8), 704-15.

Peters, A., 2002. The effects of normal aging on myelin and nerve fibers: a review. *J. Neurocytol.* 31, 581-93.

Posner, M.I. *Cognição*. Rio de Janeiro: Interamericana, 1980.

Rammsayer, T.H., 2001. Effects of pharmacologically induced changes in NMDA-receptor activity on long-term memory in humans. *Learn. Mem.* 8(1), 20-5.

Rampon, C., Tang, Y.P., Goodhouse, J., Shimizu, E., Kyin, M., Tsien, J.Z., 2000. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat. Neurosci.* 3(3), 238-44.

Reisberg, B., Doody, R., Stoffler, A., Schmitt, F., Ferris, S., Mobius, H.J.; Memantine Study Group., 2003. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 348(14), 1333-41.

Reisberg, B; Doody, R; Stoffler, A. et al., 2006. A 24-week open-label extension study of memantine in moderate to severe Alzheimer disease. *Arch.Neurol.* 63, 49-54.

Rosi, S., Vazdarjanova, A., Ramirez-Amaya, V., Worley, P.F., Barnes, C. A., Wenk, G.L., 2006. Memantine protects against LPS-induced neuroinflammation, restores behaviorally-induced gene expression and spatial learning in the rat. *Neuroscience* 142(4),1303-15.

Sanvito, W.L. *O cérebro e suas vertentes*. São Paulo: Roca, 1991.

Schröder, N.; Fredriksson, A.; Vianna, M.R. et al., 2001. Memory deficits in adult rats following postnatal iron administration. *Behavioural Brain Res.* 124, 77-85.

Schröder, N., O'Dell, S.J., Marcjall, J.F., 2003. Neurotoxic methamphetamine regimen severely impairs recognition memory in rats. *Synapse* 49, 89-96.

Serrano, F., Klann, E., 2004. Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. *Ageing Res. Rev.* 3, 431-43.

Shamy, J.L.; Buonocore, M.H.; Makaron, L.M. et al., 2005. Hippocampal volume is preserved and fails to predict recognition memory impairment in aged rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Neurobiol Aging.* 27,1405-15.

Siegler, I.C., Poow, L.W., Maddew, D.J., Welsh, K.A. Aspectos psicológicos do envelhecimento normal. In: Busse, E.W., Blazer, D.G. *Psiquiatria Geriátrica*. Porto Alegre: Artes Médicas, 120-140, 1999.

Smith-Swintosky VL, Mattson MP., 1994. Glutamate, beta-amyloid precursor proteins, and calcium-mediated neurofibrillary degeneration. *J Neural Transm Suppl.* 44, 29-45.

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

Tanovic, A.; Alfaro, V., 2006. Glutamate-related excitotoxicity neuroprotection with memantine, an uncompetitive antagonist of NMDA-glutamate receptor, in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Rev. Neurology.* 42, 607-16.

Tariot, P.N., Farlow, M.R., Grossberg, G.T., Graham, S.M., McDonald, S., Gergel, I.; Memantine Study Group., 2004. Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial. *J. A. M. A.* 291(3), 317-24.

Winblad, B., Poritis, N., 1999. Memantine in severe dementia: results of the 9M-Best Study (Benefit and efficacy in severely demented patients during treatment with memantine). *Int. J. Geriatr. Psychiatry.* 14(2), 135-46.

Zajaczkowski, W., Quack, G., Danysz, W., 1996. Infusion of (+) -MK-801 and memantine --contrasting effects on radial maze learning in rats with entorhinal cortex lesion. *Eur. J. Pharmacol.* 296(3), 239-46.

Zoladz, P.R., Campbell, A.M., Park, C.R., Schaefer, D., Danysz, W., Diamond, D.M., 2006. Enhancement of long-term spatial memory in adult rats by the noncompetitive NMDA receptor antagonists, memantine and neramexane. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 85(2),298-306.