

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

**INTERAÇÃO FUNCIONAL ENTRE O RECEPTOR DO PEPTÍDEO
LIBERADOR DE GASTRINA (GRPR) E O FATOR DE CRESCIMENTO
DE FIBROBLASTO BÁSICO (bFGF) NA FORMAÇÃO DA MEMÓRIA NO
HIPOCAMPO DORSAL**

THALES PREISSLER

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Porto Alegre
2008

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

**INTERAÇÃO FUNCIONAL ENTRE O RECEPTOR DO PEPTÍDEO
LIBERADOR DE GASTRINA (GRPR) E O FATOR DE CRESCIMENTO
DE FIBROBLASTO BÁSICO (bFGF) NA FORMAÇÃO DA MEMÓRIA NO
HIPOCAMPO DORSAL**

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

THALES PREISSLER

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Porto Alegre
2008

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação South American Office for Anticancer Drug Development e pela empresa Zentaris (Frankfurt, Alemanha).

"A sorte favorece unicamente os que têm o espírito preparado." Louis Pasteur (1822-1895)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael Roesler, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado e por ter acreditado em mim. Agradeço também a Universidade Federal do Rio Grande do Sul por possuir um curso de tão elevado prestígio e com professores tão qualificados. E não poderia deixar de mencionar meus colegas de laboratório (de todos eles). São muitos seus nomes que eu precisaria de muitas páginas para citá-los um por um. Gostaria expressar minha imensa gratidão a todos vocês, tanto da biofísica, quanto do hospital clínicas. Apoio que sempre pude contar a qualquer hora. Tenho certeza que essas amizades formarão elos duradouros. Sem esquecer de mencionar a ajuda sempre cordial e atenciosa da nossa querida Silvia e do Luciano, sempre dispostos a solucionar nossos problemas.

Aos meus mestres da jornada da graduação, em especial Moisés Evandro Bauer.

Aos meus grandes amigos de longa data: Daniel, Menguer, Pinheiro, Sagebin.

Aos meus pais, familiares e grandes amigos...

Meu sincero: Muito Obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	VI
LISTA DE FIGURAS	VIII
RESUMO E ABSTRACT.....	IX
Resumo	IX
Abstract	XI
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Bases Neurobiológicas da Memória	12
1.2 Bombesina, seus Receptores e Memória.....	17
1.3 Fator de Crescimento de Fibroblasto Básico e Seus Receptores	22
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Objetivos específicos	27
3 Capítulo 1	
3.1 Artigo	28
4 DISCUSSÃO	35
5 CONCLUSÃO	40
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

BB: (*bombesin*): bombesina

EI: esquivas inibitórias

EGF: (*endothelial growth factor*): fator de crescimento endotelial

ERK (*extracellular signal-regulated protein kinase*): proteína cinase regulada por sinal extracelular

CREB (*cAMP response element binding protein*):

GHRH (*Growth hormone releasing hormone*) Hormônio liberador do hormônio do crescimento

GRP (*gastrin-releasing peptide*): peptídeo liberador de gastrina

GRPR (*gastrin-releasing peptide receptor*): receptor peptídico liberador de gastrina

Gq: proteína pertencente à família das proteínas G

IA: (*Inhibitory avoidance*): esquivas inibitórias

IGF-II: (*insulin-like growth factor-II*) fator de crescimento similar à insulina-II

LTM: (*long-term-memory*): memória de longa duração

MAPK: (*mitogen-activated protein kinase*): proteína cinase ativada por mitógeno

NMB: (*neuromedin B*): neuromedina B

NMBR: (*neuromedin B receptor*): receptor neuromedina B

NMDA: N-metil-D-aspartato

mRNA: (*messenger ribonucleic acid*) ácido nucléico mensageiro

PKA (*protein kinase A*): proteína cinase A

PKC (*protein kinase C*): proteína cinase C

PLC (*phospholipase C*): fosfolipase C

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

STM (*short-term-memory*): memória de curta duração

VEGF-A – (*vascular endothelial growth factor A*) Fator de crescimento vascular endotelial A

LISTA DE FIGURAS

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

Figura 2. Diagrama esquemático para o mecanismo de sinalização que medeia as ações do GRPR sobre a consolidação da memória no hipocampo.

Figura 3. Estrutura tridimensional da porção extracelular do complexo composto de 2 FGF-1/FGFR-2 heterodímeros, conectados pela heparina.

Figura 4. Estrutura do receptor do fator de crescimento de fibroblasto.

Figura 5. Vias de sinalização do FGF.

RESUMO E ABSTRACT

Resumo:

O peptídeo liberador da gastrina (*GRP*), pertencente à família dos peptídeos semelhantes à bombesina, e seus receptores (GRPR) estão presentes em todo o sistema nervoso central, em particular em áreas límbicas cerebrais como o hipocampo e a amígdala, as quais estão envolvidas de forma importante na regulação emocional, na função cognitiva e, possivelmente, em transtornos neuropsiquiátricos e neurodegenerativos.

Crescentes evidências indicam que o receptor do peptídeo liberador de gastrina (GRPR) está envolvido na regulação da plasticidade sináptica e formação da memória no hipocampo e em outras áreas cerebrais. Entretanto, o mecanismo molecular do efeito prejudicial da memória do antagonismo do GRPR não está claro.

O fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF/FGF-2), é um peptídeo que possui efeitos estimulatórios na proliferação, diferenciação e motilidade de diferentes tipos celulares. Em neurônios atua como um fator neurotrófico que estimula a sobrevivência neuronal e neurogênese. Evidências de interações entre o bFGF e o GRPR foram dadas por estudos que mostraram que antagonistas do GRPR inibiam a expressão do bFGF em tumores.

Neste trabalho mostramos que o fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF/FGF-2) recupera o prejuízo da memória induzida pelo antagonismo do GRPR no hipocampo dorsal de ratos. O antagonista [D-Tpi6, Leu13 psi(CH₂NH)-Leu14] bombesin (6–14) (RC-3095) na dose de 1.0 µg prejudica, enquanto o bFGF na dose de 0,25 µg aumenta a retenção da esQUIVA inibitória (um tipo de tarefa de condicionamento aversivo) quando infundidos imediatamente após o treino, na área CA1 do hipocampo dorsal em ratos machos. A coinfusão com uma dose sem efeito de bFGF bloqueou o efeito amnésico do RC-3095. Estes achados sugerem que o efeito prejudicial dos antagonistas

do GRPR devem ser parcialmente mediados pela inibição da função e/ou expressão do bFGF neuronal e pela diminuição da ativação das cascatas de proteína cinases intracelulares associadas com a sinalização do bFGF.

RESUMO E ABSTRACT

Abstract:

Gastrin-releasing peptide (GRP), a bombesin-like peptide, and its receptor, GRP receptor (GRPR) are found throughout the central nervous system (CNS), including limbic areas such as the hippocampus and amygdala, which are significantly involved in emotional responses, cognitive function, and, possibly, neurodegenerative and neuropsychiatric disorders.

Increasing evidence indicates that the gastrin releasing peptide receptor (GRPR) is implicated in regulating synaptic plasticity and memory formation in the hippocampus and other brain areas. However, the molecular mechanisms underlying the memory-impairing effects of GRPR antagonism have remained unclear.

bFGF is a polypeptide displaying stimulatory actions on proliferation, differentiation and motility of different cell types. In neurons, bFGF acts as neurotrophic factor that stimulates neuronal survival, and neurogenesis. Evidence of functional interactions between bFGF and the GRPR was provided by studies showing that GRPR antagonists inhibit the expression of bFGF in tumours.

Here we report that basic fibroblast growth factor (bFGF/FGF-2) rescues the memory impairment induced by GRPR antagonism in the rat dorsal hippocampus. The GRPR antagonist [D-Tpi6, Leu13 psi(CH₂NH)-Leu14] bombesin (6–14) (RC-3095) at 1.0g impaired, whereas bFGF at 0.25g enhanced, 24 h retention of inhibitory avoidance (IA) when infused immediately after training into the CA1 hippocampal area in male rats. Coinfusion with an otherwise ineffective dose of bFGF blocked the memory-impairing effect of RC-3095. These findings suggest that the memory-impairing effects of GRPR antagonists might be partially mediated by an inhibition in the function and/or expression of neuronal bFGF or diminished activation of intracellular protein kinase pathways associated with bFGF signaling.

1.1 Bases neurobiológicas da memória

Memória é a aquisição, formação, conservação e evocação de informações (Izquierdo, 2004) e proporciona aos seres vivos diversas aptidões, desde um simples reflexo condicionado até a lembrança de episódios pessoais, bem como o uso de regras para a antecipação de um evento, sendo um processo onde uma simples experiência de aprendizado pode dar início a um processo de diferentes durações e específicas respostas biológicas (Quevedo *et al.*,2004). A retenção das memórias é avaliada através de sua expressão, a expressão do traço mnemônico é iniciada freqüentemente pelo estímulo condicionado (Cammarota *et al.*,2004).

Para o processo de consolidação de memória é necessária síntese de proteínas. Em geral um neurônio recebe informação através da membrana soma-dendrítica e a transmite por meio de sinais ao longo do axônio. O acoplamento dos neurônios entre si e de neurônios com outras células alvo faz-se por meio de um sistema de transformação da atividade elétrica em um fenômeno químico e vice-versa. Estes acoplamentos são chamados sinapses. A transmissão nestas sinapses é essencialmente um fenômeno químico, o que as distingue de outras formas de comunicação inter-neuronal, muito mais raras, em que a transmissão é diretamente elétrica. No aparelho sináptico dessas

sinapses químicas podemos distinguir três componentes principais: 1) o botão pré-sináptico em que se encontram as vesículas sinápticas que contêm as moléculas dos neurotransmissores químicos e, em geral, o sistema enzimático responsável pelas suas sínteses e, em alguns casos, pela sua reabsorção; 2) a fenda sináptica, em que se dá a difusão das moléculas dos neurotransmissores, e 3) a membrana pós-sináptica, que contém as moléculas dos receptores com os quais os neurotransmissores se ligam e os canais iônicos, cuja condutividade pode ser alterada por este processo de acoplamento.

Em uma sinapse química, a informação é transmitida da porção pré-sináptica à célula pós-sináptica pelo neurotransmissor sintetizado no interior do axônio e armazenado nas vesículas pré-sinápticas. O estímulo nervoso conduzido pelo axônio provoca exocitose dessas vesículas na fenda sináptica e o neurotransmissor se liga aos receptores situados no neurônio pós-sináptico, promovendo a despolarização ou hiperpolarização da membrana celular.

No processo de formação de memórias, uma cascata de reações é desencadeada, iniciando pela liberação de glutamato na fenda sináptica. Existem três famílias de receptores glutamatérgicos, duas de receptores ionotrópicos (que estão diretamente acoplados), um canal da membrana (por onde passam íons de carga positiva) e um grupo de receptores metabotrópicos que atuam através de uma proteína G.

Os receptores ionotrópicos medeiam a transmissão glutamatérgica rápida (em milissegundos) no sistema nervoso central e estão associados com um canal de íons Na^+ e Ca^{++} . Os receptores ionotrópicos do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) têm o NMDA como agonista. Estes receptores estão ligados aos canais de Ca^{++} e Na^+ que podem ser ativados rapidamente (10ms), mas estão submetidos a um bloqueio pelos íons Mg^{2+} , o qual depende da voltagem da membrana. Assim, os canais estão fechados quando a membrana está hiperpolarizada e podem ser abertos quando a membrana é despolarizada e o receptor é ativado pelo ligante natural, o glutamato.

Os receptores metabotrópicos são essencialmente moduladores da transmissão sináptica de forma relativamente prolongada (100ms) e estão associados a proteínas G, agindo através de sinalização intracelular. Alguns dos seus mecanismos efetores consistem em um aumento da atividade de fosfolipases, da atividade dos receptores AMPA e NMDA e dos canais de K^+ e Cl^- . Estes receptores podem também situar-se pré-sinápticamente e deste modo podem modular a liberação de glutamato e do amino-ácido inibitório ácido gama-aminobutírico (GABA) dos botões sinápticos.

De acordo com a função e o conteúdo, as memórias podem ser classificadas em declarativas, que registram fatos ou eventos, ou proceduais, que registram capacidades ou habilidades. As memórias

declarativas ainda podem ser episódicas, referentes a eventos aos quais assistimos ou dos quais participamos, ou semânticas, as de conhecimentos gerais.

Ambos os tipos de memórias podem ser divididas em explícitas (são conscientemente adquiridas e evocadas) e implícitas (são adquiridas gradativamente e uma vez estabelecidas, são evocadas de maneira inconsciente) (Izquierdo, 2002). Outro tipo de memória que deve ser mencionado é a memória de trabalho, muitas vezes erroneamente confundida com a memória de curta duração. Trata-se de uma memória que dura o suficiente para que possamos processar uma informação do momento, dura de poucos segundos até no máximo 1-3 minutos, não produzindo arquivos, e é processada fundamentalmente pelo córtex pré-frontal (Izquierdo, 2002)

De acordo com o tempo, durante o qual são armazenadas, as memórias podem ser memórias de curta duração (“*short-term-memory – STM*”) e de longa duração (“*long-term memory – LTM*”). As STM são aquelas retidas dentro de alguns segundos até algumas horas após o aprendizado e as LTM são aquelas cuja consolidação é demorada e persistem por dias, anos, ou mesmo uma vida inteira (Izquierdo *et al.*, 1999; Bianchin *et al.*, 1999)

As memórias declarativas de longa duração, nas primeiras horas que são adquiridas, são lábeis e suscetíveis à interferência por

numerosos fatores (McGough, 2000). Estudos utilizando tratamentos farmacológicos específicos capazes de cancelar a formação da STM sem afetar a LTM para a tarefa de esquiva inibitória demonstraram que memórias de curta e longa duração são processadas em paralelo, compartilhando estruturas cerebrais e mecanismos celulares, porém de maneira independente (Izquierdo *et al.*, 1999).

1.2 Bombesina, seus receptores e memória

A bombesina (BB) ocorre naturalmente na forma de um tetradecapeptídeo originalmente isolado da pele do anfíbio *Bombina bombina*. O primeiro peptídeo semelhante à bombesina em mamíferos foi o peptídeo liberador de gastrina (*gastrin releasing peptide*, GRP), isolado a partir de tecido gastrointestinal expressado tanto nos tecidos cerebrais como em outros tecidos. Existe também um modelo de decapeptídeo, a neuromedina B (NMB), isolado a partir do hipotálamo, sendo expressado em tecidos cerebral e gastrointestinal (Krane *et al.*, 1988); porém, o GRP é mais amplamente expresso em relação a NMB em cérebro de rato (H. Ohki-Hamazaki *et al.*, 2005).

O GPR regula várias funções neuroendócrinas em mamíferos, como proliferação e diferenciação celular, crescimento tumoral, respostas ao estresse e memória. Ele e seus receptores estão amplamente distribuídos no cérebro de mamíferos – particularmente em áreas límbicas cerebrais como hipocampo e amígdala – e estão envolvidos em diversas funções cerebrais como regulação do apetite, saciedade, aversão, ansiedade, bem como processos de aprendizado e memória (Flood e Morley, 1988; McCoy and Avery, 1990; Morley *et al.*, 1992; Williams e Mc Gaugh, 1994; Wada *et al.*, 1998; Santo-Yamada *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2002; Roesler *et al.*, 2006a). Segundo Shumyatsky *et al.* (2002), o GRP é liberado

juntamente com o glutamato pelos neurônios glutamatérgicos e age ligando-se aos receptores de GRP (GRPRs) nos sítios pós-sinápticos.

O GRPR (também conhecido como receptor BB2) é um membro dos receptores de peptídios similares a BB da subfamília de receptores acoplados a proteína G. Sua estrutura primária e arranjo na membrana são mostrados na figura 1.

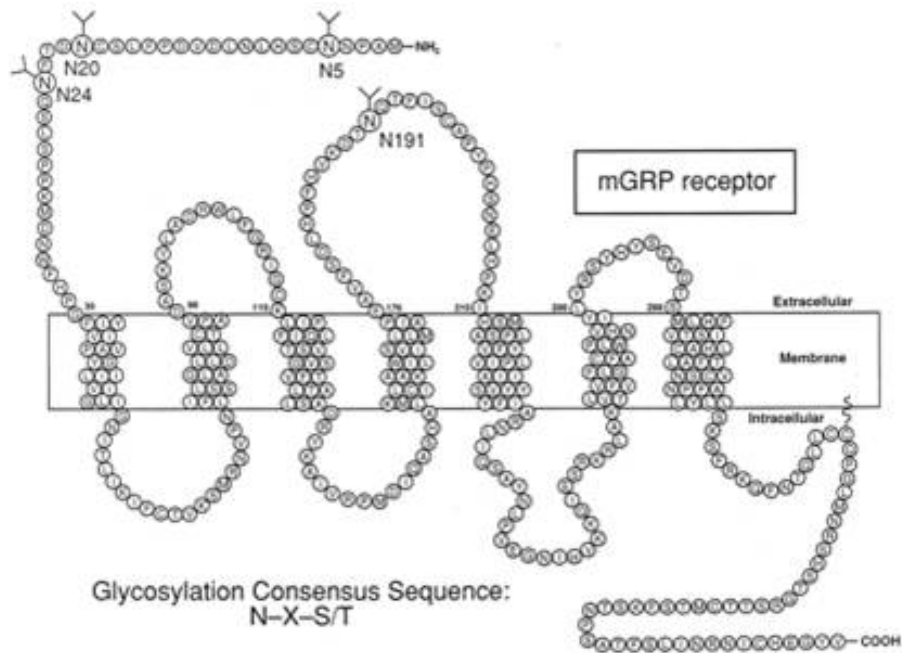


Figura 1. Sequência de aminoácidos de mGRPR e disposição transmembrana (Benya *et al.*, 2000).

O hipocampo e a amígdala estão envolvidos de forma importante na regulação emocional, na função cognitiva e em transtornos neuropsiquiátricos e neurodegenerativos (Moody e Merali 2004).

Há estudos sugerindo o envolvimento de GRP ou seus receptores na patofisiologia de transtornos neuropsiquiátricos e neurodegenerativos

como ansiedade (Moody e Merali, 2004), esquizofrenia (Olincy *et al.*, 1999), autismo (Ishikawa-Brush *et al.*, 1997), doença de Alzheimer (Ito *et al.*, 1994) e doença de Parkinson (Bissette *et al.*, 1985). Apesar disso, esse sistema tem sido relativamente pouco estudado quanto a seu papel na função cerebral, e não são conhecidos os mecanismos celulares envolvidos na transdução de sinal ativada por GRPR no sistema nervoso.

A ativação do GRPR em células tumorais e neuroendócrinas envolvem as cascatas de sinalização principalmente da via das proteínas quinases C (PKC) e a via das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK/ERK). A secreção de cromogranina-A mediada por GRPR em células neuroendócrinas é bloqueada por inibidores de fosfolipase C (PLC), PKC e MAPK (Hellmich *et al.*, 1999). Nosso grupo também obteve resultados que sugerem que a modulação da memória pelo GRPR no hipocampo, requer PKC e MAPK (Roesler *et al.*, 2006b) (Figura 1).

Em fibroblastos foi descrito que o GRPR regula a via MAPK/ERK, através de um complexo mecanismo que depende do nível de expressão do GRPR e de seu agonista (Chen *et al.*, 2001). Estudos indicam que, em neurônios, as vias da PKC e MAPK estão envolvidas na resposta intracelular à ativação do GRPR na membrana neuronal, já que os efeitos do GRP são bloqueados por inibidores da PLC no hipocampo (Lee *et al.*, 1999).

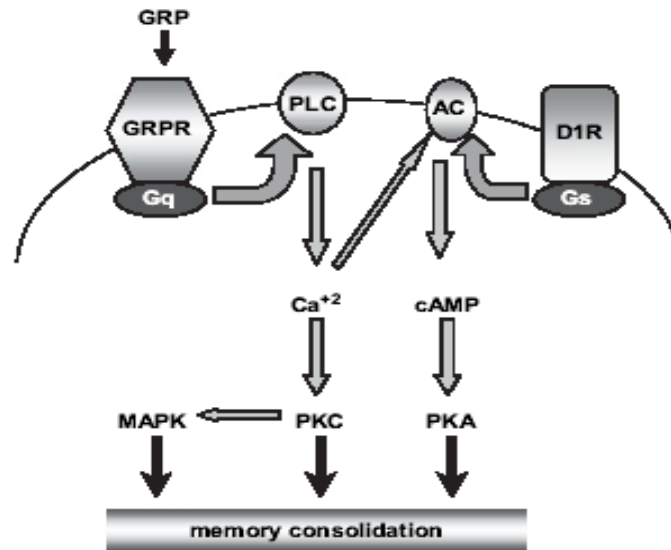


Figura 2. Diagrama esquemático para o mecanismo de sinalização que medeia as ações do GRPR sobre a consolidação da memória no hipocampo. O GRP liberado na fenda sináptica se liga ao GRPR acoplado a proteína G no sítio pós-sináptico. A ativação de GRPR induz aumento no Ca²⁺ intracelular e ativa a via da PKC/PKC, que por sua vez ativa MAPK (Roesler *et al.*, 2006b).

Utilizando como ferramenta farmacológica um antagonista específico de GRPRs, desenvolvido como droga experimental antitumoral, o (D-Tpi6, Leu13 psi[CH₂NH]-Leu14) bombesin (6-14), (RC-3095), foi demonstrado que a ativação desses receptores é necessária para a plasticidade sináptica e formação da memória emocional (Roesler *et al.*, 2003a; 2004b; 2004c) e que o hipocampo dorsal e a amígdala basolateral são duas áreas cerebrais envolvidas de forma crítica na mediação da ação de GRPRs na memória (Roesler *et al.*, 2003a; 2004c). A administração sistêmica ou intracerebral de agonista destes receptores melhoram a retenção da memória em modelos animais. Já seu antagonista, o RC-3095, é capaz de prejudicar a formação da memória para a esquivas inibitória (*Inhibitory avoidance*, IA), um tipo de tarefa de condicionamento aversivo, quando é injetado sistemicamente ou

infundido na área CA1 do hipocampo dorsal ou na amígdala basolateral em ratos. É capaz também de inibir a indução de estereotipia por apomorfina em camundongos, um modelo animal de psicose, sugerindo de forma preliminar a possibilidade de que possua atividade antipsicótica (Meller *et al.*, 2004).

Embora o GRPR em áreas límbicas cerebrais constitua um sistema neuromodulatório importante de regulação do processamento da memória e da emoção, o prejuízo na formação da memória causado pela administração de seu antagonista, RC-3095, não está bem esclarecido. É possível que este fenômeno ocorra por alterar a função e/ou expressão do fator de crescimento de fibroblasto básico neural.

1.3 Fator de crescimento de fibroblasto básico e seus receptores

O fator de crescimento de fibroblasto básico (*basic Fibroblast growth factor*, bFGF, também chamado de FGF-2) é um polipeptídeo que demonstra efeitos estimulatórios na proliferação, diferenciação e motilidade de uma grande variedade de tipos celulares, inclusive em células tumorais, sendo um fator de grande importância para a angiogênese (formação de novos vasos) em tumores malignos e tecidos normais (Moroni *et al*, 2005; Marie *et al*, 2002; Yoshimura *et al*, 2001; Gospodarowicz, 1976). O bFGF foi o primeiro de sua família a ser isolado e clonado em 1986 (Abraham *et al*, 1986a, 1986b).

Atualmente 24 isoformas de FGF são conhecidas, e estas ligam-se a cinco receptores de FGF (FGFR1-5) (Fischer *et al*, 2003).

Os FGFRs são proteínas de transmembrana com atividade tirosina quinase (Coumoul e Deng, 2003), e suas ligações com o FGF dependem da presença de proteoglicanos com heparan sulfato (como a heparina) para formarem um complexo com duas moléculas de FGF (Figura 3). Esse complexo de FGFs e proteoglicano liga-se a dois FGFRs que, ao se dimerizarem, autofosforilam-se em seus domínios intracelulares (Plotnikov *et al*, 1999; Maison *et al*, 1994; Yayon *et al*, 1991; Keating *et al*, 1998).

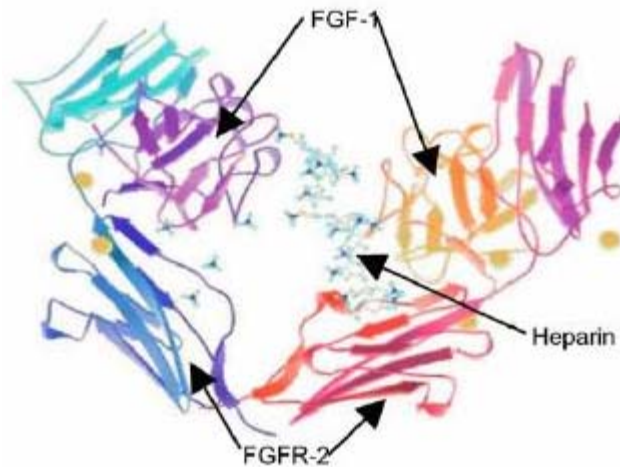


Figura 3. Estrutura tridimensional da porção extracelular do complexo composto de 2 FGF-1/FGFR-2 heterodímeros, conectados pela heparina (Pellegrini *et al.*, 2000).

A estrutura dos FGFRs consiste em 3 domínios extracelulares semelhantes a imunoglobulinas (Ig), classificados como (IgI, IgII e IgIII), um domínio transmembrânico e um domínio citoplasmático (que possui atividade tirosina quinase) (Stauber *et al*, 2000) (Figura 4).

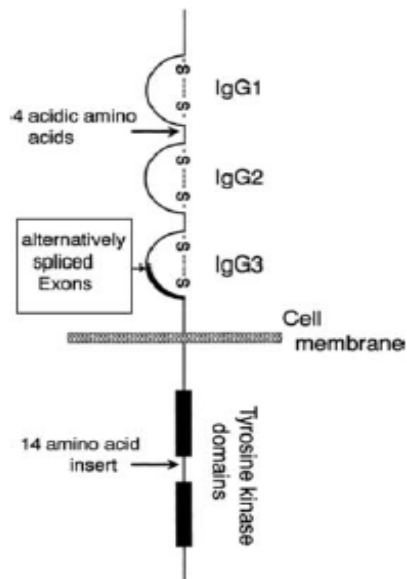


Figura 4. Estrutura do receptor do fator de crescimento de fibroblasto. Os receptores consistem em 3 domínios extracelulares Ig-like, um domínio transmembrana e dois domínios intracelulares tirosina cinases. Um domínio ácido de 4 aminoácidos é importante para a ligação da heparina e então dimerizar o receptor (Bieger e Unsicker., 1996).

Em neurônios, o bFGF atua como um fator neurotrófico que estimula a proliferação e diferenciação de neurônios, a sobrevivência neuronal, neurogênese, ajuda na recuperação de lesões teciduais ou isquemia, atua como protetor em epilepsia e isquemia e na memória por facilitar o potencial de longa duração (*Long-term potentiation*, LTP - que tem por finalidade submeter uma via neuronal por curto período de tempo a uma corrente elétrica de alta frequência, alterando a eficiência das sinapses) (Ghosh *et al.*, 1995; Temple *et al.*, 1995; Vicario-Abejon *et al.*, 1995; Abe *et al.*, 2001; Yoshimura *et al.*, 2001). A administração intracerebroventricular de bFGF facilita a indução de potencial de longa duração (LTP) no hipocampo de ratos (Ishiyama *et al.*, 1991; Abe *et al.*, 2002), e nosso grupo já mostrou que a infusão de bFGF na área CA1 do hipocampo dorsal aumenta a retenção de memória de ratos na tarefa de esquivas inibitória (Walz *et al.*, 2005) e a diminuição de sua expressão ou função está relacionada com déficit de formação da memória de longa duração (Long term memory - LTM) (Zhoa *et al.*, 2007).

Alguns estudos relataram a existência de uma relação entre o bFGF e o GRPR. Nestas pesquisas com tumores humanos de próstata e mama foi observado que a administração de antagonistas do GRPR, como o RC-3095, foi capaz de diminuir os volumes dos tumores e a expressão de fatores angiogênicos e seus mRNA, dentre eles o bFGF (Bajo *et al.*, 2004; Stangelberger *et al.*, 2005).

Além disso, os efeitos neurotróficos do bFGF estão, pelo menos, parcialmente mediados pela cascata proteína quinase C (PKC) e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK)/proteína quinase regulada por sinalização extracelular (ERK) (Abe *et al.*, 2001; Abe *et al.*, 1001; Abe *et al.*, 2000; Numakawa *et al.*, 2002; Reuss *et al.*, 2003), que têm sido propostos como sendo fundamentais para os efeitos modulatórios do GRPR na consolidação da memória. Outra via ativada pela ligação do bFGF ao seu receptor é a via da SNT-1/FRS2 (Figura 5). Esta é uma via alternativa independente de tirosina, envolvendo a proteína SNT-1, que conecta o FGFR à cascata da Ras/MAPK. (Wang *et al.*, 1996; Kauhara, 1997; Ong *et al.*, 2000).

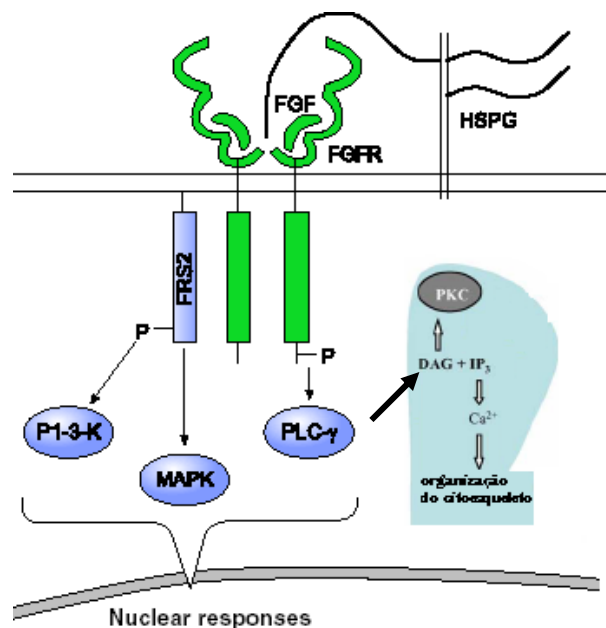


Figura 5. Vias de sinalização do FGF. FGF, FGFR e heparan sulfato formam um complexo ternário, resultando na dimerização e transfosforilação de FGFR. Aumentando a atividade tirosina quinase do FGFR. Isto ativa três cascatas principais: PI-3-K, MAPK e PKC). (Adaptado de Partanen., 2007).

Aqui examinamos se o bFGF pode reverter o déficit de memória da esQUIVA inibitória induzido pela administração do antagonista de GRPR, o RC-3095, na área CA1 do hipocampo dorsal de ratos.

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é avaliar se existe alguma possível interação na sinalização intracelular entre o receptor do peptídeo liberador de gastrina e o fator de crescimento de fibroblasto básico (BFGF), localizados no hipocampo de ratos, na formação de memória aversiva.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1

Avaliar os efeitos sobre a consolidação da memória de diferentes doses de BFGF e de RC-3095 (antagonista de GRPR) na área CA1 do hipocampo dorsal de ratos.

2.2.2

Avaliar se a microinfusão de uma dose sem efeito de bFGF é capaz de prevenir o efeito causado pela administração de GRPR na área CA1 do hipocampo dorsal em ratos.

**Basic Fibroblast Growth Factor Prevents the Memory Impairment
Induced by Gastrin-Releasing Peptide Receptor Antagonism in Area
CA1 of the Rat Hippocampus**

Neurochemical Research (2007) 32:1381–1386

Basic Fibroblast Growth Factor Prevents the Memory Impairment Induced by Gastrin-Releasing Peptide Receptor Antagonism in Area CA1 of the Rat Hippocampus

Thales Preissler · Tatiana Luft · Flávio Kapczinski ·
João Quevedo · Gilberto Schwartsmann ·
Rafael Roesler

Accepted: 22 February 2007 / Published online: 4 April 2007
© Springer Science+Business Media, LLC 2007

Abstract Increasing evidence indicates that the gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) is implicated in regulating synaptic plasticity and memory formation in the hippocampus and other brain areas. However, the molecular mechanisms underlying the memory-impairing effects of GRPR antagonism have remained unclear. Here we report that basic fibroblast growth factor (bFGF/FGF-2) rescues the memory impairment induced by GRPR antag-

onism in the rat dorsal hippocampus. The GRPR antagonist [D-Tpi⁶, Leu¹³ psi(CH₂NH)-Leu¹⁴] bombesin (6–14) (RC-3095) at 1.0 µg impaired, whereas bFGF at 0.25 µg enhanced, 24 h retention of inhibitory avoidance (IA) when infused immediately after training into the CA1 hippocampal area in male rats. Coinfusion with an otherwise ineffective dose of bFGF blocked the memory-impairing effect of RC-3095. These findings suggest that the memory-impairing effects of GRPR antagonists might be partially mediated by an inhibition in the function and/or expression of neuronal bFGF or diminished activation of intracellular protein kinase pathways associated with bFGF signaling.

T. Preissler · R. Roesler (✉)
Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Cellular and Molecular Neuropharmacology Research Group, Federal University of Rio Grande do Sul, 90046-900 Porto Alegre, RS, Brazil
e-mail: rroesler@terra.com.br

T. Luft
Department of Biochemistry, Institute for Basic Health Sciences, Graduate Program in Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

F. Kapczinski
Bipolar Disorders Program, Academic Hospital Research Center, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

J. Quevedo
Department of Medicine, Laboratory of Neurosciences, University of Southern Santa Catarina, 88806-000 Criciuma, SC, Brazil

G. Schwartsmann
Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

G. Schwartsmann · R. Roesler
Cancer Research Laboratory, Academic Hospital Research Center, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

Keywords Gastrin-releasing peptide receptor · Basic fibroblast growth factor · RC-3095 · Hippocampus · Memory consolidation

Introduction

The gastrin-releasing peptide receptor (GRPR, also known as BB2 receptor) is a member of the bombesin (BB)-like peptide receptor subfamily of G-protein coupled receptors. Activation of GRPR by the amphibian peptide BB or its mammalian counterpart, gastrin-releasing peptide (GRP), affects a range of cellular and neuroendocrine functions, including cell proliferation and differentiation, cancer growth, feeding behavior, and stress responses (for recent reviews, see [1–4]). GRPR selective antagonists such as [D-Tpi⁶, Leu¹³ psi(CH₂NH)-Leu¹⁴] bombesin (6–14) (RC-3095) have been developed and put forward as experimental anticancer drugs [5–7].

Increasing evidence indicates that, within the brain, the GRPR is implicated in regulating synaptic plasticity and

memory formation. Systemic or intracerebral administration of GRPR agonists can improve memory retention in rodent models [8–10]. Conversely, we have previously shown that RC-3095 can impair formation of memory for inhibitory avoidance (IA), a single-trial type of aversive conditioning, when injected systemically or infused into either the CA1 area of the dorsal hippocampus or the basolateral amygdala in rats [11–15].

The molecular mechanisms underlying the memory-impairing effects of GRPR antagonism are poorly understood. One possibility is that GRPR antagonists affect the function and/or expression of neuronal basic fibroblast growth factor (bFGF, also known as FGF-2). bFGF is a polypeptide displaying stimulatory actions on proliferation, differentiation and motility of different cell types [16–18]. In neurons, bFGF acts as neurotrophic factor that stimulates neuronal survival, neurite growth, and neurogenesis [19–23]. In addition, intracerebroventricular administration of bFGF facilitates induction of long-term potentiation in the rat hippocampus [24, 25], and we have previously shown that infusion of bFGF into the dorsal hippocampus enhances retention of memory for IA in rats [26]. Evidence of functional interactions between bFGF and the GRPR was provided by studies showing that GRPR antagonists inhibit the expression of bFGF in tumours [27, 28]. Moreover, the neurotrophic effects of bFGF are at least partially mediated by the protein kinase C and mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) signaling pathways [22, 29–32], which have been proposed to underlie the modulatory actions of GRPR on memory consolidation [10]. Here we examined whether bFGF can rescue the IA memory deficit induced by administration of the GRPR antagonist RC-3095 to the rat dorsal hippocampus.

Materials and methods

Animals

Adult male Wistar rats (240–310 g at time of surgery) from the State Health Research Foundation (FEPPS-RS) were housed five to a cage in a temperature-controlled colony room with food and water available *ad libitum*, and maintained on a 12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 AM). Behavioral procedures were conducted during the light phase of the cycle between 9:00 and 17:00. All experimental procedures were performed in accordance with the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication No. 80-23 revised 1996). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Surgery

Animals were implanted under thionembutal anesthesia (30 mg/kg, ip) with bilateral 9.0 mm guide cannulae (Small Parts, Miami Lakes, FL, USA) aimed 1.0 mm above the CA1 area of the dorsal hippocampus as described in previous studies [10, 11, 14, 15, 26]. Coordinates (anteroposterior, –4.3 mm from bregma, mediolateral, ± 3.0 mm from bregma, ventral, –1.4 mm from dura) were obtained from the atlas of Paxinos and Watson [33]. Animals were allowed to recover for at least 7 days after surgery.

Behavioral training

We used IA conditioning as an established model of aversively motivated memory dependent on the dorsal hippocampus [34, 35]. In IA training, animals learn to associate a location in the training apparatus with an aversive stimulus (footshock). The IA behavioral training and retention test procedures were described in previous reports [10–15, 26]. The IA apparatus was a 50 × 25 × 25 cm acrylic box (Albarsch, Porto Alegre, Brazil) whose floor consisted of parallel caliber stainless steel bars (1 mm diameter) spaced 1 cm apart. A 7 cm wide, 2.5 cm high platform was placed on the floor of the box against the left wall. On the training trial, rats were placed on the platform and their latency to step down on the grid with all four paws was measured with an automated time recording device connected to the shock generator and the training chamber. Upon stepping down on the grid, rats received a 0.4 mA, 2.0 s footshock and were removed from the apparatus immediately after the footshock. A retention test trial was carried out 24 h after training. The retention test trial was procedurally identical to training, except that no footshock was presented. Step-down latencies on the retention test trial (maximum 180 s) were used as a measure of IA retention.

Drugs and infusion procedures

Intrahippocampal infusion procedures have been described elsewhere [10, 11, 14, 15, 26]. Briefly, at the time of infusion, an infusion needle was fitted into the guide cannula. The tip of the infusion needle protruded 1.0 mm beyond the guide cannula and was aimed at the CA1 area of the dorsal hippocampus. Drugs were infused during a 30-s period. After the infusion of drug or vehicle, the infusion needle was left in place for an additional minute to allow diffusion of the drug away from the needle tip. Immediately after IA training, rats were given a bilateral 0.5 μ l-infusion of vehicle (VEH, 2% dimethylsulfoxide (DMSO) in saline (SAL, 0.9% NaCl), RC-3095 (0.2, 1.0, or 5.0 μ g; Zentaris GmbH, Frankfurt, Germany), bFGF (0.01,

0.05, or 0.25 μg ; Sigma–Aldrich, São Paulo, SP, Brazil), or RC-3095 (1.0 μg) combined with bFGF (0.05 μg). Drug doses were chosen on the basis of previous studies [11, 14, 15, 26]. Drug solutions were prepared freshly before each experiment. The number of animals in each treatment group was 9–12.

Histology

Forty-eight to 72 h after behavioral testing, the animals were killed by decapitation and their brains were removed, stored in 5% formalin for at least 72 h and verified for infusion site placements in the dorsal hippocampus as described in previous reports [10, 11, 14, 15, 26]. Only data from rats with correct cannula placements (124 animals) were included in the final analysis (Fig. 1).

Statistics

Data are shown as mean \pm SEM retention test latencies to step-down (s). Comparisons of training and retention test step-down latencies among groups were performed using Kruskal–Wallis analysis of variance followed by Mann–Whitney *U* tests, two-tailed, when necessary [10–15, 26]. In all comparisons, $P < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.



Fig. 1 Drawing of the plane A -4.3 mm of the atlas of Paxinos and Watson [33] showing the area (hatched) where the infusion sites considered to be correct were placed

Results

Posttraining infusion of the GRPR antagonist RC-3095 into area CA1 of the dorsal hippocampus impairs IA memory retention

The first experiment examined the effects of posttraining intrahippocampal infusion of different doses of RC-3095 on 24 h retention of IA. There was no significant difference among groups in training trial latencies ($df = 3$, $H = 1.39$, $P = 0.71$; overall mean \pm SEM training trial step-down latency (s) was 9.1 ± 0.7). Results for retention test latencies are shown in Fig. 2. Kruskal–Wallis analysis of variance showed a significant difference among groups in the 24 h memory retention test ($df = 3$, $H = 22.78$, $P < 0.001$). Further analysis using Mann–Whitney *U* tests showed that infusion of RC-3095 at 1.0 μg impaired retention ($P < 0.001$ compared to VEH-treated controls), whereas the doses of 0.2 and 5.0 μg did not affect retention ($P = 0.38$ for the comparison between the group treated with RC-3095 at 0.2 μg and VEH-treated controls; $P = 0.31$ for the comparison between the group treated with RC-3095 at 5.0 μg and VEH-treated controls). These results replicate findings from previous studies [11, 14, 15] showing that posttraining intrahippocampal infusion of RC-3095 at 1.0 μg impair 24 h retention of memory for IA training.

Posttraining infusion of bFGF into area CA1 of the dorsal hippocampus enhances IA memory retention

The second experiment examined the effects of posttraining intrahippocampal infusion of different doses of bFGF

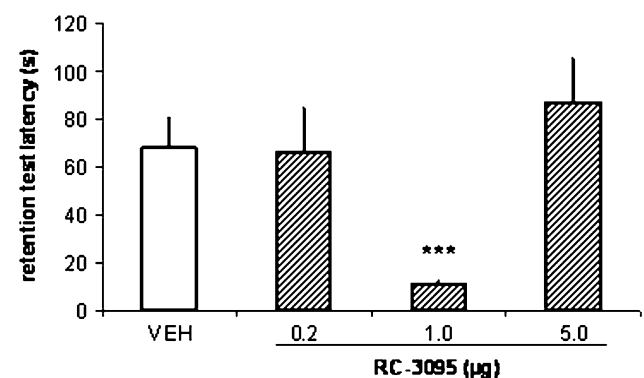


Fig. 2 Posttraining infusion of a gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) antagonist into the dorsal hippocampus impairs 24 h retention of inhibitory avoidance (IA) in rats. Data are mean \pm SEM 24 h retention step-down latencies (s) of rats given bilateral 0.5 μl infusions of vehicle (VEH) or RC-3095 (0.2, 1.0 or 5.0 μg) into the CA1 area of the dorsal hippocampus immediately after IA training. $N = 9$ –12 animals per group; *** $P < 0.001$ compared to the VEH-treated group

on 24 h retention of IA. There was no significant difference among groups in training trial latencies ($df = 3$, $H = 1.68$, $P = 0.64$; overall mean \pm SEM training trial step-down latency (s) was 8.4 ± 0.6). Results for retention test latencies are shown in Fig. 3. Kruskal–Wallis analysis of variance showed a significant difference among groups in the 24 h memory retention test ($df = 3$, $H = 10.30$, $P < 0.05$). Mann–Whitney U tests revealed that infusion of bFGF at $0.25 \mu\text{g}$ enhanced IA retention ($P < 0.01$ compared to VEH-treated controls), whereas the doses of 0.01 and $0.05 \mu\text{g}$ did not affect retention ($P = 1.00$ for the comparison between the group treated with bFGF at $0.01 \mu\text{g}$ and VEH-treated controls; $P = 0.23$ for the comparison between the group treated with bFGF at $0.05 \mu\text{g}$ and VEH-treated controls). The results indicate that posttraining intrahippocampal infusion of bFGF enhances 24 h retention of IA memory.

bFGF blocks the IA memory impairment induced by GRPR antagonism in the dorsal hippocampus

The third experiment examined the effects of posttraining intrahippocampal infusion of RC-3095 combined with bFGF on 24 h retention of IA. There was no significant difference among groups in training trial latencies ($df = 3$, $H = 1.96$, $P = 0.58$; overall mean \pm SEM training trial step-down latency (s) was 9.4 ± 0.7). Results for retention test latencies are shown in Fig. 4. Kruskal–Wallis analysis of variance showed a significant difference among groups in the 24 h memory retention test ($df = 3$, $H = 19.43$, $P < 0.001$). Posttraining infusion of RC-3095 alone at the dose of $1.0 \mu\text{g}$ significantly impaired IA retention (Mann–Whitney U test, $P < 0.001$ compared to VEH-treated

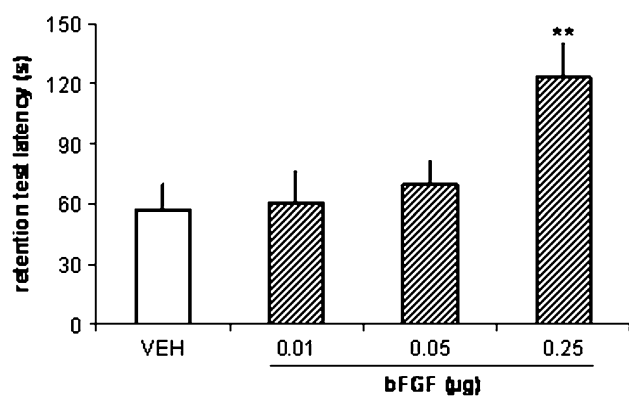


Fig. 3 Posttraining infusion of basic fibroblast growth factor (bFGF) into the dorsal hippocampus enhances 24 h retention of inhibitory avoidance (IA) in rats. Data are mean \pm SEM 24 h retention step-down latencies (s) of rats given bilateral $0.5 \mu\text{l}$ -infusions of vehicle (VEH) or bFGF (0.01 , 0.05 or $0.25 \mu\text{g}$) into the CA1 area of the dorsal hippocampus immediately after IA training. $N = 9$ – 12 animals per group; ** $P < 0.01$ compared to the VEH-treated group

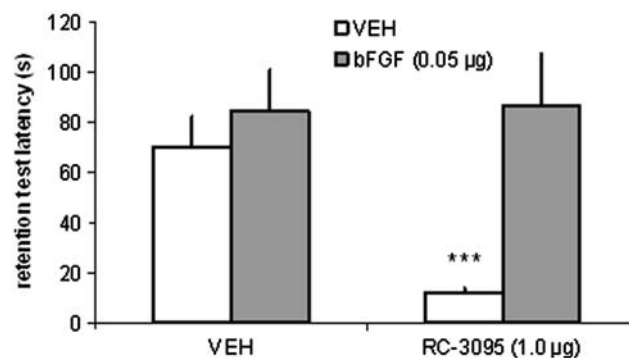


Fig. 4 Basic fibroblast growth factor (bFGF) blocks the impairment of inhibitory avoidance (IA) retention induced by GRPR antagonism in the rat dorsal hippocampus. Data are mean \pm SEM 24 h retention step-down latencies (s) of rats given bilateral $0.5 \mu\text{l}$ -infusions of vehicle (VEH), RC-3095 ($1.0 \mu\text{g}$), bFGF ($0.05 \mu\text{g}$), or RC-3095 ($1.0 \mu\text{g}$) combined with bFGF ($0.05 \mu\text{g}$) into the CA1 area of the dorsal hippocampus immediately after IA training. $N = 9$ – 12 animals per group; *** $P < 0.001$ compared to the VEH-treated group

controls). Although posttraining infusion of bFGF alone at the dose of $0.05 \mu\text{g}$ did not affect retention (Mann–Whitney U test, $P = 0.49$ compared to VEH-treated controls), bFGF coinfused with RC-3095 blocked the RC-3095-induced memory impairment in the hippocampus (Mann–Whitney U test, $P = 0.86$ compared to VEH-treated controls).

Discussion

This study confirms our previous finding that posttraining infusion of the GRPR antagonist RC-3095 into area CA1 of the rat dorsal hippocampus impairs retention of memory for IA training. Replicating a previous study [11], the impairing effect of RC-3095 was induced by an intermediate dose ($1.0 \mu\text{g}$), whereas lower ($0.2 \mu\text{g}$) and higher ($5.0 \mu\text{g}$) doses did not affect retention. This dose–response pattern for the memory-impairing effect of intrahippocampal infusions of RC-3095 and the possible underlying mechanisms have been discussed elsewhere [11, 15]. We also showed that posttraining intrahippocampal infusion of bFGF dose-dependently enhanced IA memory retention. This finding is consistent with our previous report that infusion of bFGF into the rat dorsal hippocampus enhances 24 h retention of IA without affecting short-term retention measured 1.5 h after training [26]. Most importantly, we found that coinfusion of an otherwise ineffective dose of bFGF blocked the RC-3095-induced memory impairment. The use of posttraining infusions rules out the possibility that the effects were due to drug-induced alterations in attentional, motivational, motor, or sensory-perceptual mechanisms at training.

We have previously shown that systemic, intrahippocampal, or intraamygdala administration of RC-3095 impairs IA retention in rats, indicating that the GRPR is importantly involved in regulating formation of aversively-motivated memory [11–15]. In addition, infusion of RC-3095 into the CA1 hippocampal area blocks extinction of IA conditioning [36]. Moreover, the view that GRPR modulates aversive memory is supported by genetic evidence indicating that GRPR-deficient mice show enhanced fear-motivated conditioning and synaptic plasticity in the amygdala [37], as well as by the recent finding that intracortical and intraamygdala infusions of GRP or a GRPR antagonist affect expression of contextual and cued fear conditioning in rats [38]. However, the molecular mechanisms mediating the amnesic effects of GRPR blockade have remained unclear.

Evidence suggesting that the effects of RC-3095 and other GRPR antagonists might be mediated by inhibition of bFGF expression was first provided by studies using experimental cancer models [27, 28]. For instance, systemic administration of RC-3095 to nude mice bearing orthotopic xenografts of MDA-MB-435 human breast cancers inhibits tumour growth and decreases the expression of mRNA and protein levels of bFGF in the tumours [27]. Since in neurons bFGF acts as a neurotrophin promoting neurogenesis, neuritogenesis and synaptic plasticity [17, 19–26], it is possible that RC-3095 administration to the hippocampus inhibits bFGF expression, leading to impaired synaptic plasticity and memory formation. Another possibility is that intrahippocampal administration of bFGF compensates for the inhibition of protein kinase pathways produced by GRPR antagonism, thus preventing the RC-3095-induced memory deficit. This possibility is supported by evidence that cell signaling triggered by activation of GRPR and bFGF involve similar protein kinase pathways [10, 29–31]. Thus, memory modulation by the GRPR in the hippocampus is likely to involve activation of the PKC, MAPK/ERK and protein kinase A (PKA) pathways downstream of GRPR activation [10], and neuronal bFGF is thought to mediate its effects by activating receptor tyrosine kinases, which in turn lead to activation of the PKC and MAPK/ERK signaling pathways [22, 29–32]. Further experiments using pharmacological and biochemical approaches to investigate these possibilities are warranted.

bFGF has been shown to attenuate cognitive dysfunction in other rodent models of amnesia [39, 40] and was proposed as a potentially useful therapeutic agent for the treatment of brain disorders [22, 41, 42]. Thus our finding that bFGF rescues RC-3095-induced amnesia has clinical implications, because it suggests that bFGF should be further investigated as a potential cognitive enhancer.

In conclusion, the results of the present study suggest that the GRPR and bFGF signaling systems might interact in regulating memory consolidation in the hippocampus. The memory-impairing effects of GRPR blockade might involve an inhibition of bFGF expression and/or diminished activation of intracellular protein kinase pathways associated with bFGF signaling.

Acknowledgments This research was supported by CNPq Grants 306413/2003-5 and 474700/2004-6 to R.R. and the South American Office for Anticancer Drug Development. RC-3095 was a gift from Zentaris GmbH (Frankfurt, Germany).

References

- Moody TW, Merali Z (2004) Bombesin-like peptides and associated receptors within the brain: distribution and behavioral implications. *Peptides* 25:511–520
- Ohki-Hamazaki H, Iwabuchi M, Maekawa F (2005) Development and function of bombesin-like peptides and their receptors. *Int J Dev Biol* 49:293–300
- Patel O, Shulkes A, Baldwin GS (2006) Gastrin-releasing peptide and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1766:23–41
- Roesler R, Henriques JAP, Schwartzmann G (2006) Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for psychiatric and neurological disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5:197–204
- Radulovic S, Cai RZ, Serfozo P, Groot K, Redding TW, Pinski J, Schally AV (1991) Biological effects and receptor binding affinities of new pseudonapeptide bombesin/GRP receptor antagonists with N-terminal D-Trp or D-Tpi. *Int J Pept Protein Res* 38:593–600
- Szepeshazi K, Schally AV, Halmos G, Lamharzi N, Groot K, Horvath JE (1997) A single in vivo administration of bombesin antagonist RC-3095 reduces the levels and mRNA expression of epidermal growth factor receptors in MXT mouse mammary cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:10913–10918
- Schally AV, Szepeshazi K, Nagy A, Comaru-Schally AM, Halmos G (2004) New approaches to therapy of cancers of the stomach, colon and pancreas based on peptide analogs. *Cell Mol Life Sci* 61:1042–1068
- Flood JF, Morley JE (1988) Effects of bombesin and gastrin-releasing peptide on memory processing. *Brain Res* 460:314–322
- Williams CL, McGaugh JL (1994) Enhancement of memory processing in an inhibitory avoidance and radial maze task by post-training infusion of bombesin into the nucleus tractus solitarius. *Brain Res* 654:251–256
- Roesler R, Luft T, Oliveira SH, Farias CB, Almeida VR, Quevedo J, Dal Pizzol F, Schroder N, Izquierdo I, Schwartzmann G (2006) Molecular mechanisms mediating gastrin-releasing peptide receptor modulation of memory consolidation in the hippocampus. *Neuropharmacology* 51:350–357
- Roesler R, Meller CA, Kopschina MI, Souza DO, Henriques JA, Schwartzmann G (2003) Intrahippocampal infusion of the bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 impairs inhibitory avoidance retention. *Peptides* 24:1069–1074
- Roesler R, Kopschina MI, Rosa RM, Henriques JA, Souza DO, Schwartzmann G (2004) RC-3095, a bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist, impairs aversive but not recognition memory in rats. *Eur J Pharmacol* 486:35–41
- Roesler R, Lessa D, Venturella R, Vianna MR, Luft T, Henriques JA, Izquierdo I, Schwartzmann G (2004) Bombesin/gastrin-

- releasing peptide receptors in the basolateral amygdala regulate memory consolidation. *Eur J Neurosci* 19:1041–1045
14. Venturella R, Lessa D, Luft T, Roozendaal B, Schwartzmann G, Roesler R (2005) Dexamethasone reverses the memory impairment induced by antagonism of hippocampal gastrin-releasing peptide receptors. *Peptides* 26:821–825
 15. Dantas AS, Luft T, Henriques JA, Schwartzmann G, Roesler R (2006) Opposite effects of low and high doses of the gastrin-releasing peptide receptor antagonist RC-3095 on memory consolidation in the hippocampus: possible involvement of the GABAergic system. *Peptides* 27:2307–2312
 16. Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigerer L (1986) Fibroblast growth factor. *Mol Cell Endocrinol* 46:187–204
 17. Gimenez-Gallego G, Cuevas P (1994) Fibroblast growth factors, proteins with a broad spectrum of biological activities. *Neurol Res* 16:313–316
 18. Grose R, Dickson C (2005) Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:179–186
 19. Ghosh A, Greenberg ME (1995) Distinct roles for bFGF and NT-3 in the regulation of cortical neurogenesis. *Neuron* 15:89–103
 20. Temple S, Qian X (1995) bFGF, neurotrophins, and the control of cortical neurogenesis. *Neuron* 15:249–252
 21. Vicario-Abejon C, Johe KK, Hazel TG, Collazo D, McKay RD (1995) Functions of basic fibroblast growth factor and neurotrophins in the differentiation of hippocampal neurons. *Neuron* 15:105–114
 22. Abe K, Saito H (2001) Effects of basic fibroblast growth factor on central nervous system functions. *Pharmacol Res* 43:307–312
 23. Yoshimura S, Takagi Y, Harada J, Teramoto T, Thomas SS, Waerber C, Bakowska JC, Breakefield XO, Moskowitz MA (2001) FGF-2 regulation of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:5874–5879
 24. Ishiyama J, Saito H, Abe K (1991) Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor promote the generation of long-term potentiation in the dentate gyrus of anaesthetized rats. *Neurosci Res* 12:403–411
 25. Abe K, Ishiyama J, Saito H (1992) Effects of epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor on generation of long-term potentiation in the dentate gyrus of fimbria-fornix-lesioned rats. *Brain Res* 593:335–338
 26. Walz R, Roesler R, Reinke A, Martins MR, Quevedo J, Izquierdo I (2005) Short- and long-term memory are differentially modulated by hippocampal nerve growth factor and fibroblast growth factor. *Neurochem Res* 30:185–190
 27. Bajo AM, Schally AV, Groot K, Szepeshazi K (2004) Bombesin antagonists inhibit proangiogenic factors in human experimental breast cancers. *Br J Cancer* 90:245–252
 28. Stangelberger A, Schally AV, Varga JL, Hammann BD, Groot K, Halmos G, Cai RZ, Zarandi M (2005) Antagonists of growth hormone releasing hormone (GHRH) and of bombesin/gastrin releasing peptide (BN/GRP) suppress the expression of VEGF, bFGF, and receptors of the EGF/HER family in PC-3 and DU-145 human androgen-independent prostate cancers. *Prostate* 64:303–315
 29. Abe K, Iri Y, Takayanagi M, Saito H (1991) Involvement of protein kinase activation in neurotrophic effects of basic fibroblast growth factor in cultured brain neurons. *Jpn J Pharmacol* 56:563–566
 30. Abe K, Saito H (2000) Neurotrophic effect of basic fibroblast growth factor is mediated by the p42/p44 mitogen-activated protein kinase cascade in cultured rat cortical neurons. *Dev Brain Res* 122:81–85
 31. Numakawa T, Yokomaku D, Kiyosue K, Adachi N, Matsumoto T, Numakawa Y, Taguchi T, Hatanaka H, Yamada M (2002) Basic fibroblast growth factor evokes a rapid glutamate release through activation of the MAPK pathway in cultured cortical neurons. *J Biol Chem* 277:28861–28869
 32. Reuss B, von Bohlen und Halbach O (2003) Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system. *Cell Tissue Res* 313:139–157
 33. Paxinos G, Watson C (1997) The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego
 34. Izquierdo I, Medina JH (1997) Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 68:285–316
 35. Taubenfeld SM, Wiig KA, Bear MF, Alberini CM (1999) A molecular correlate of memory and amnesia in the hippocampus. *Nat Neurosci* 2:309–310
 36. Luft T, Flores DG, Vianna MR, Schwartzmann G, Roesler R, Izquierdo I (2006) A role for hippocampal gastrin-releasing peptide receptors in extinction of aversive memory. *Neuroreport* 17:935–939
 37. Shumyatsky GP, Tsvetkov E, Malleret G, Vronskaya S, Hatton M, Hampton L, Battey JF, Dulac C, Kandel ER, Bolshakov EY (2002) Identification of a signaling network in lateral nucleus of amygdala important for inhibiting memory specifically related to learned fear. *Cell* 111:905–918
 38. Mountney C, Sillberg V, Kent P, Anisman H, Merali Z (2006) The role of gastrin-releasing peptide on conditioned fear: differential cortical and amygdaloid responses in the rat. *Psychopharmacology* 189:287–296
 39. Ishihara A, Saito H, Nishiyama N (1992) Basic fibroblast growth factor ameliorates learning deficits in basal forebrain-lesioned mice. *Jpn J Pharmacol* 59:7–13
 40. McDermott KL, Raghupathi R, Fernandez SC, Saatman KE, Protter AA, Finklestein SP, Sinson G, Smith DH, McIntosh TK (1997) Delayed administration of basic fibroblast growth factor (bFGF) attenuates cognitive dysfunction following parasagittal fluid percussion brain injury in the rat. *J Neurotrauma* 14:191–200
 41. Takayama H, Ray J, Raymon HK, Baird A, Hogg J, Fisher LJ, Gage FH (1995) Basic fibroblast growth factor increases dopaminergic graft survival and function in a rat model of Parkinson's disease. *Nat Med* 1:53–58
 42. Ay H, Ay I, Koroshetz W, Finklestein SP (1999) Potential usefulness of basic fibroblast growth factor as a treatment for stroke. *Cerebrovasc Dis* 9:131–135

Os resultados confirmaram alguns achados anteriores de que a infusão pós-treino do RC-3095 na área CA1 do hipocampo dorsal em ratos prejudica a retenção da memória na tarefa da IA. Como no estudo anterior o efeito prejudicial ocorreu com a dose de 1.0ug do RC-3095, enquanto as doses de 0.2ug e 5.0ug não afetaram significativamente a formação de memória. Este efeito controverso entre altas e baixas doses de RC-3095 infundidas no hipocampo pode ser devido ao fato do GRPR ser expressado tanto em neurônios GABAérgicos inibitórios, assim como em neurônios glutamatérgicos excitatórios, e em neurônios que liberem outros neurotransmissores. Assim, diferentes doses dos agonistas do GRPR podem induzir diferentes repostas em transmissões excitatórias e inibitórias, estimulando ou inibindo a plasticidade sináptica e a memória. Da mesma forma altas doses do antagonista do GRPR, RC-3095, pode melhorar a consolidação da memória na esQUIVA inibitória (Dantas *et al*, 2006). Foi mostrado também que infusão intrahipocampal pós-treino de bFGF aumenta de forma dose-dependente a retenção da memória na IA. Este dado é também consistente com um trabalho anterior que demonstrou que o bFGF administrado no hipocampo logo após o treino melhorou a retenção da memória de longa duração – 24

horas após o treino - (LTM) sem alterar a memória de curta duração -1,5 horas após o treino - (STM) (Walz *et al*, 2005). O achado mais considerável é que a coinfusão de uma dose de bFGF desprovida de efeito bloqueou o prejuízo induzido pelo RC-3095 na memória.

O uso de infusões após o treino exclui a possibilidade que os efeitos fossem devidas a alterações induzidas pela droga na atenção, motivação, motricidade ou mecanismos sensoriais e da percepção na fase do treino.

Anteriormente também havíamos mostrado que administração sistêmica, intrahipocampal e intraamígdala de RC-3095 prejudica a retenção de memória em ratos, indicando que o GRPR está envolvido de forma importante na formação de memória aversiva (Dantas *et al*, 2006; Roesler *et al*, 2003). Este indício também é sustentado por experiências genéticas, onde camundongos deficientes de GRPR mostraram um condicionamento ao medo e plasticidade sináptica na amígdala aumentados (Shumyastsky *et al*, 2002). E achados recentes mostraram que infusões intracorticais ou intraamígdala de GRP ou agonistas de GRPR afetam a expressão do condicionamento.

Infusões de RC-3095 na área CA1 do hipocampo bloqueiam a extinção do condicionamento da esQUIVA inibitória (Luft *et al.*, 2006).

Evidências em estudos com modelos experimentais de câncer, mostram que os efeitos do RC-3095 e de outros antagonistas do GRPR podem estar mediados pela inibição da função ou expressão de bFGF (Bajo *et al.*, 2004; Stangelberger *et al.*, 2005). Num primeiro estudo, em que antagonistas do GRPR (RC-3095 e RC-3940-II) foram administrados por 6 semanas em camundongos inoculados com linhagem câncer de mama humano MDA-MB-435, foi observado a inibição do crescimento do tumor entre 44 e 53%. Esta diminuição do volume tumoral foi relacionada com a diminuição da expressão dos mRNA de alguns fatores angiogênicos como o bFGF, IGF-II e VEGF-A dos tumores (Bajo *et al.*, 2004). Em outro estudo, camundongos inoculados com tumores PC-3 e DU-145 independentes de andrógeno, foram tratados com antagonistas do GRPR e do hormônio liberador do hormônio de crescimento (GHRH). Os animais tratados somente com os antagonistas do GRPR (RC-3940-II e RC-3940-Et) ou combinados com antagonistas do GHRH (MZ-J-7-118 e RC-J-29-18) diminuíram significativamente o volume dos tumores PC-3 and DU-145 tumors, os níveis de bFGF, capacidade de ligação dos receptores de EGF, e seus níveis de mRNA (Stangelberger *et al.*, 2005).

Em neurônios o bFGF atua na neurogênese, estimulando a plasticidade sináptica e conseqüente retenção da memória

Como já mencionado anteriormente, no cérebro, o bFGF atua de forma estimulatória no desenvolvimento, diferenciação e na plasticidade

sináptica (formação de novas conexões interneuronais) (Gimenez-Gallego *et al.*, 1994; Ghosh *et al.*, 1995; Temple *et al.*, 1995; Vicario-Abejon *et al.*, 1995; Abe *et al.*, 2001; Yoshimura *et al.*, 2001). Assim a administração intrahipocampal do RC-3095 pode reduzir os níveis de bFGF, diminuindo a plasticidade sináptica e conseqüentemente, prejudicando a formação da memória no animal.

Outra hipótese seria de que a administração de bFGF pudesse compensar a inibição de cascatas de proteína cinases, causadas pelo bloqueio do GRPR, evitando o déficit na memória causado pelo RC-3095.

A ativação dos receptores de GRP e de bFGF, envolvem vias similares de cascatas de proteína cinases (Roesler *et al.*, 2006b; Abe *et al.*, 1991, 2000; Numakawa, 2002). A modulação da memória no hipocampo pelo GRPR envolve a ativação das vias de transdução de sinal mediadas por proteína cinase C (protein kinase C, PKC), pela proteína cinase ativada por mitógeno (mitogen-activated protein kinase, MAPK), e pela da via da adenilato ciclase/AMPC/proteína cinase A (protein kinase A, PKA) (Roesler *et al.*, 2006b).

Já o bFGF ao ativar seus receptores tirosina cinases, desencadeia a ativação das cascatas das PKC, MAPK/ERK e da SNT-1/FRS2. (Abe *et al.*, 2001; Abe *et al.*, 1991, 2000; Numakawa *et al.*, 2002; Reuss *et al.*, 2003).

A interação existente entre o GRPR e o bFGF poderia ser na via das PKC e MAPK/ERK, que são vias comuns na sinalização intracelular, decorrentes da ativação destes receptores.

A PKC é uma família de serina-treonina cinase e regula um amplo espectro de funções celulares e está implicadas em diversas doenças (Olive e Messing, 2004, Parker e Murray- Rust, 2004).

Os componentes da cascata MAPK são abundantemente expressos em neurônios pós-mitóticos e a MAPK está localizada nos dendritos bem como no corpo celular neuronal, mas não nos terminais sinápticos. Vale lembrar que estudos confirmam que a ativação da MAPK tem um importante papel na LTP na área CA1 do hipocampo (Walz *et al*, 1999).

V. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostram que existe uma relação entre as sinalizações intracelulares do GRPR e do bFGF que devem interagir na consolidação da memória aversiva no hipocampo. Os dados sugerem também que os efeitos do déficit da memória causada pelo bloqueio do GRPR, pelo RC-3095, possivelmente envolvem a inibição da função ou expressão do bFGF, diminuindo assim a ativação das cascatas de proteínas cinases (PKC e MAPK/ERK) que estão associadas com a sinalização de bFGF.

Mais estudos deveriam ser realizados para comprovar a interação entre o GRPR e o bFGF, tanto em animais quanto em culturas celulares.

Como o bFGF demonstra ter efeitos potencialmente melhoradores da cognição, incluindo a memória, deveria ser mais estudado para possível uso clínico no tratamento de distúrbios de cognição e demências.

VI. BIBLIOGRAFIA

Abe K, Iri Y, Takayanagi M, Saito H (1991) Involvement of protein kinase activation in neurotrophic effects of basic fibroblast growth factor in cultured brain neurons. *Jpn J Pharmacol* 56:563–566

Abe K, Ishiyama J, Saito H (1992) Effects of epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor on generation of longterm potentiation in the dentate gyrus of fimbria-fornix-lesioned rats. *Brain Res* 593:335–338

Abe K, Saito H (2000) Neurotrophic effect of basic fibroblast growth factor is mediated by the p42/p44 mitogen-activated protein kinase cascade in cultured rat cortical neurons. *Dev Brain Res* 122:81–85

Abe K, Saito H (2001) Effects of basic fibroblast growth factor on central nervous system functions. *Pharmacol Res* 43:307–312

Abraham JA, Mergia A, Whang JL, Tumolo A, Friedman J, Hjerrild KA, Gospodarowicz D, Fiddes JC. (1986). Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. *Science*. 1986a 1;233(4763):545-8.

Abraham JA, Whang JL, Tumolo A, Mergia A, Fiddes JC. (1986). Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence, genomic organization, and expression in mammalian cells. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1986b;51 Pt 1:657-68

Ay H, Ay I, Koroshetz W, Finklestein SP (1999) Potential usefulness of basic fibroblast growth factor as a treatment for stroke. Cerebrovasc Dis 9:131-135

Bajo AM, Schally AV, Groot K, Szepeshazi K (2004) Bombesin antagonists inhibit proangiogenic factors in human experimental breast cancers. Br J Cancer 90:245-252

Bianchin M, Mello e Souza T, Medina JH, Izquierdo I. (1999) The amygdala is involved in the modulation of long-term memory, but not in working or short-term memory. Neurobiol Learn Mem. 71(2):127-31.

Bieger S, Unsicker K (1996) Functions of fibroblast growth factors (FGFs) in the nervous system. In: Bell C (ed) Chemical factors in neural growth, degeneration and repair. Elsevier Science BV

Cammarota M, Barros DM, Vianna MR, Bevilaqua LR, Coitinho A, Szapiro G, Izquierdo LA, Medina JH, Izquierdo I. (2004) The transition from memory retrieval to extinction. *An Acad Bras Cienc.* 76(3):573-82.

Coumoul X, Deng CX. Roles of FGF receptors in mammalian development and congenital diseases. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2003;69(4):286-304.

Dantas AS, Luft T, Henriques JA, Schwartzmann G, Roesler R (2006) Opposite effects of low and high doses of the gastrinreleasing peptide receptor antagonist RC-3095 on memory consolidation in the hippocampus: possible involvement of the GABAergic system. *Peptides* 27:2307–2312

Fischer S, Draper BW, Neumann CJ. (2003) The zebrafish fgf24 mutant identifies an additional level of Fgf signaling involved in vertebrate forelimb initiation. *Development.* 130(15):3515-24.

Flood JF, Morley JE (1988) Effects of bombesin and gastrinreleasing peptide on memory processing. *Brain Res* 460:314–322

- Ghosh A, Greenberg ME (1995) Distinct roles for bFGF and NT-3 in the regulation of cortical neurogenesis. *Neuron* 15:89–103
- Gimenez-Gallego G, Cuevas P (1994) Fibroblast growth factors, proteins with a broad spectrum of biological activities. *Neurol Res* 16:313–316
- Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigerer L (1986) Fibroblast growth factor. *Mol Cell Endocrinol* 46:187–204
- Gospodarowicz D (1976). Humoral control of cell proliferation: the role of fibroblast growth factor in regeneration, angiogenesis, wound healing, and neoplastic growth. *Prog Clin Biol Res.* ;9:1-19.
- Grose R, Dickson C (2005) Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:179–186
- Ishiyama J, Saito H, Abe K (1991) Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor promote the generation of longterm potentiation in the dentate gyrus of anaesthetized rats. *Neurosci Res* 12:403–411

Ishihara A, Saito H, Nishiyama N (1992) Basic fibroblast growth factor ameliorates learning deficits in basal forebrain-lesioned mice. *Jpn J Pharmacol* 59:7-13

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

Izquierdo I, Medina JH, Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM. (1999) Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res.* 103(1):1-11.

Izquierdo LA, Barros DM, Vianna MR, Coitinho A, deDavid e Silva T, Choi H, Moletta B, Medina JH, Izquierdo I. (2002) Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. *Cell Mol Neurobiol.* 22(3):269-87.

Izquierdo I, Cammarota M, Medina JH, Bevilaqua LR. (2004). Pharmacological findings on the biochemical bases of memory processes: a general view. *Neural Plast.* 11(3-4):159-89.

Krane, I.M., Naylor, S.L., Helin-Davis, D., Chin, W.W. and Spindel, E.R. (1988). Molecular cloning of cDNAs encoding the human Bombesin-

like peptide neuromedin B. Chromosomal localization and comparison to cDNAs encoding its amphibian homolog ranatensin. *J Biol Chem.* 15;263(26):13317-23.

Luft T, Flores DG, Vianna MR, Schwartsmann G, Roesler R, Izquierdo I (2006) A role for hippocampal gastrin-releasing peptide receptors in extinction of aversive memory. *Neuroreport* 17:935–939

Marie PJ, Debiais F, Haÿ E. Regulation of human cranial osteoblast phenotype by FGF-2, FGFR-2 and BMP-2 signaling. (2002) *Histol Histopathol.* 17(3):877-85.

Marco Guerrini,¹; Milos Hricovini,¹; Giangiacomo Torri, (2007) Interaction of Heparins with Fibroblast Growth Factors: Conformational. *Current Pharmaceutical Design*, Volume 13, 2007, 2045-2056(12).

McDermott KL, Raghupathi R, Fernandez SC, Saatman KE, Protter AA, Finklestein SP, Sinson G, Smith DH, McIntosh TK (1997) Delayed administration of basic fibroblast growth factor (bFGF) attenuates cognitive dysfunction following parasagittal fluid percussion brain injury in the rat. *J Neurotrauma* 14:191–200

McGaugh, J.L. (2000) Memory - a century of consolidation. *Science*, 287,248-251.

Meller CA, Henriques JA, Schwartsmann G, Roesler R. (2004) The bombesin/gastrin releasing peptide receptor antagonist RC-3095 blocks apomorphine but not MK-801-induced stereotypy in mice. *Peptides*. 25(4):585-8.

Moody TW, Merali Z (2004) Bombesin-like peptides and associated receptors within the brain: distribution and behavioral implications. *Peptides* 25:511–520

Moroni E, Ronca R, Rusnati M. (2005) Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. Presta M, Dell'Era P, Mitola S. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005; 16(2):159-78.

Mountney C, Sillberg V, Kent P, Anisman H, Merali Z (2006) The role of gastrin-releasing peptide on conditioned fear: differential cortical and amygdaloid responses in the rat. *Psychopharmacology* 189:287–296

Numakawa T, Yokomaku D, Kiyosue K, Adachi N, Matsumoto T, Numakawa Y, Taguchi T, Hatanaka H, Yamada M (2002) Basic fibroblast growth factor evokes a rapid glutamate release through

activation of the MAPK pathway in cultured cortical neurons. *J Biol Chem* 277:28861–28869

Ohki-Hamazaki H, Iwabuchi M, Maekawa F (2005) Development and function of bombesin-like peptides and their receptors. *Int J Dev Biol* 49:293–300

Partanen J, (2007) FGF signalling pathways in development of the midbrain and anterior hindbrain. *J Neurochem* 101, 1185–1193

Patel O, Shulkes A, Baldwin GS (2006) Gastrin-releasing peptide and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1766:23–41

Paxinos G, Watson C (1997) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, San Diego

Perkins LA, Cain LD (1995) Basic fibroblast growth factor (bFGF) increases the survival of embryonic and postnatal basal forebrain cholinergic neurons in primary culture. *Int J Dev Neurosci* 13:51–61.

Plotnikov AN, Schlessinger J, Hubbard SR, Mohammadi M. (1999). Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell*. 1999 3; 98(5):641-50.

Quevedo, J., Vianna, M.R., Martins, M.R., Barichello, T., Medina, J.H., Roesler, R., Izquierdo, I. (2004) Protein synthesis, PKA, and MAP kinase are differentially involved in short- and long-term memory in rats. *Behavioural Brain Research*, 154,339-343.

Radulovic S, Cai RZ, Serfozo P, Groot K, Redding TW, Pinski J, Schally AV (1991) Biological effects and receptor binding affinities of new pseudononapeptide bombesin/GRP receptor antagonists with N-terminal D-Trp or D-Tpi. *Int J Pept Protein Res* 38:593–600

Reuss B, von Bohlen und Halbach O (2003) Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system. *Cell Tissue Res* 313:139–157

Roesler R, Henriques JAP, Schwartsmann G (2006a) Gastrin releasing peptide receptor as a molecular target for psychiatric and neurological disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5:197–204

Roesler R, Luft T, Oliveira SH, Farias CB, Almeida VR, Quevedo J, Dal Pizzol F, Schroder N, Izquierdo I, Schwartsmann G (2006b) Molecular mechanisms mediating gastrin-releasing peptide receptor modulation

of memory consolidation in the hippocampus. *Neuropharmacology* 51:350–357

Roesler R, Meller CA, Kopschina MI, Souza DO, Henriques JA, Schwartzmann G (2003a) Intrahippocampal infusion of the bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 impairs inhibitory avoidance retention. *Peptides* 24:1069–1074

Roesler R, Kopschina MI, Rosa RM, Henriques JA, Souza DO, Schwartzmann G (2004b) RC-3095, a bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist, impairs aversive but not recognition memory in rats. *Eur J Pharmacol* 486:35–41

Roesler R, Lessa D, Venturella R, Vianna MR, Luft T, Henriques JA, Izquierdo I, Schwartzmann G (2004c) Bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in the basolateral amygdala regulate memory consolidation. *Eur J Neurosci* 19:1041–1045

Schally AV, Szepeshazi K, Nagy A, Comaru-Schally AM, Halmos G (2004) New approaches to therapy of cancers of the stomach, colon and pancreas based on peptide analogs. *Cell Mol Life Sci* 61:1042–1068

Shumyatsky GP, Tsvetkov E, Malleret G, Vronskaya S, Hatton M, Hampton L, Battey JF, Dulac C, Kandel ER, Bolshakov EY (2002) Identification of a signaling network in lateral nucleus of amygdala important for inhibiting memory specifically related to learned fear. *Cell* 111:905–918

Stangelberger A, Schally AV, Varga JL, Hammann BD, Groot K, Halmos G, Cai RZ, Zarandi M (2005) Antagonists of growth hormone releasing hormone (GHRH) and of bombesin/gastrin releasing peptide (BN/GRP) suppress the expression of VEGF, bFGF, and receptors of the EGF/HER family in PC-3 and DU-145 human androgen-independent prostate cancers. *Prostate* 64:303–315.

Stauber DJ, DiGabriele AD, Hendrickson WA. (2000). Structural interactions of fibroblast growth factor receptor with its ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 4;97(1):49-54.

Szepeshazi K, Schally AV, Halmos G, Lamharzi N, Groot K, Horvath JE (1997) A single in vivo administration of bombesin antagonist RC-3095 reduces the levels and mRNA expression of epidermal growth factor receptors in MXT mouse mammary cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:10913–10918

- Taubenfeld SM, Wiig KA, Bear MF, Alberini CM (1999) A molecular correlate of memory and amnesia in the hippocampus. *Nat Neurosci* 2:309–310
- Takayama H, Ray J, Raymon HK, Baird A, Hogg J, Fisher LJ, Gage FH (1995) Basic fibroblast growth factor increases dopaminergic graft survival and function in a rat model of Parkinson's disease. *Nat Med* 1:53–58
- Temple S, Qian X (1995) bFGF, neurotrophins, and the control of cortical neurogenesis. *Neuron* 15:249–252.
- Venturella R, Lessa D, Luft T, Roozendaal B, Schwartzmann G, Roesler R (2005) Dexamethasone reverses the memory impairment induced by antagonism of hippocampal gastrin-releasing peptide receptors. *Peptides* 26:821–825
- Vianna MR, Barros DM, Silva T, Choi H, Madche C, Rodrigues C, Medina JH, Izquierdo I. (2000). Pharmacological demonstration of the differential involvement of protein kinase C isoforms in short- and long-term memory formation and retrieval of one-trial avoidance in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2000;150(1):77-84.

Vicario-Abejon C, Johe KK, Hazel TG, Collazo D, McKay RD (1995)
Functions of basic fibroblast growth factor and neurotrophins in the
differentiation of hippocampal neurons. *Neuron* 15:105–114

Walz R, Roesler R, Reinke A, Martins MR, Quevedo J, Izquierdo I (2005)
Short- and long-term memory are differentially modulated by
hippocampal nerve growth factor and fibroblast growth factor.
Neurochem Res 30:185–190

Williams CL, McGaugh JL (1994) Enhancement of memory processing in
an inhibitory avoidance and radial maze task by post-training
infusion of bombesin into the nucleus tractus solitarius. *Brain Res*
654:251–256

Yoshimura S, Takagi Y, Harada J, Teramoto T, Thomas SS, Waeber C,
Bakowska JC, Breakefield XO, Moskowitz MA (2001) FGF-2 regulation
of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury. *Proc Natl
Acad Sci USA* 98:5874–5879

Zhao M, Li D, Shimazu K, Zhou YX, Lu B, Deng CX. (2007) Fibroblast
growth factor receptor-1 is required for long-term potentiation,
memory consolidation, and neurogenesis. *Biol Psychiatry*. 2007 Sep
1;62(5):381-90.