

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM AGMATINA SOBRE AS
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS
VERIFICADAS EM UM MODELO EXPERIMENTAL DA
DOENÇA DE PARKINSON EM CAMUNDONGOS**

FILIPE CARVALHO MATHEUS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Rui Daniel Schröder Prediger

**Florianópolis
2011**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

M427e Matheus, Filipe Carvalho

Efeitos do tratamento com agmatina sobre as alterações comportamentais e neuroquímicas verificadas em um modelo experimental da doença de Parkinson em camundongos [dissertação] / Filipe Carvalho Matheus ; orientador, Rui Daniel Schröder Prediger. - Florianópolis, SC, 2011.
99 p.: il., graf., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Parkinson, Doença de - Terapêutica - Pesquisa. 3. Agmatina - Efeito fisiológico - Pesquisa. 4. Camundongo. I. Prediger, Rui Daniel Schröder. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

“Efeitos do tratamento com agmatina sobre as alterações comportamentais e neuroquímicas verificadas em um modelo experimental da Doença de Parkinson em camundongos”

POR

FILIPE CARVALHO MATHEUS

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

Rui Daniel L. Schröder

**Rui Daniel Schröder Prediger
Presidente (FMC/UFSC)**

Elaine Aparecida Del Bel

**Elaine Aparecida Del Bel
(FORP/USP)**

Leandro José Bertoglio

**Leandro José Bertoglio
(FMC/UFSC)**

Prof. Dr. Antônio de Rêdua Caróbrez

**Prof. Dr. Antônio de Rêdua Caróbrez
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia/UFSC**

Florianópolis, 04 de fevereiro de 2011.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Rui Daniel Schröder Prediger, pela oportunidade de realizar esse trabalho sob sua dedicada orientação e pela amizade durante o convívio em seu laboratório.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia que contribuíram com seus ensinamentos para a minha formação científica.

Aos professores Dr^a. Elaine Aparecida Del Bel, Dr. Leandro José Bertoglio e Dr. Antônio de Pádua Carobrez pela colaboração na avaliação e no aprimoramento deste trabalho.

Ao professor Dr. Adair Roberto Soares dos Santos (CFS, UFSC) pela doação inicial do sulfato de agmatina, permitindo o começo desse estudo.

A professora Dr^a. Carla Inês Tasca (BQA, UFSC) pela excelente receptividade em seu laboratório para a realização de alguns experimentos que compõem este trabalho.

Ao professor Dr. Juliano Ferreira (BQA, UFSM) pela colaboração na realização dos experimentos de inibição das enzimas MAO-A e MAO-B.

Ao aluno de doutorado Adalberto Castro (PPG-BQA, CCB, UFSC) pelo auxílio nos experimentos de captação de glutamato e pela estimada amizade.

Aos amigos do Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas (LEXDON, FMC, UFSC) Aderbal, Andressa, Camila, Daniel, Eduardo, George, Julia, Juliana, Maria, Paulo, Prim, Robson, Samantha, Sandro e Vanessa, pela amizade e agradável convivência durante estes dois anos.

Aos amigos do departamento Evelyn, Lucas, Ana Paula, Cris Stern, Cris Mochny, Thaíze e Sanmara, pela amizade em todos os momentos e por se tornarem minha segunda família.

Aos meus amigos dos tempos de faculdade que mesmo a distância sempre estiveram presentes e me apoiando.

Aos funcionários do departamento e demais colegas da pós-graduação.

Aos meus amados pais, Ismael e Iolanda Matheus, meu querido irmão, Diogo e toda a minha família, pelo carinho através de telefonemas, emails e nas minhas raras visitas a Minas Gerais.

A todas as pessoas que de alguma maneira colaboraram na execução deste trabalho.

Ao CNPq pelo suporte financeiro e bolsa concedida durante o período de realização do presente estudo.

“A cada dia, a vida nos testa. Ela exige das nossas qualidades o melhor, e dos nossos defeitos a mudança”(*Lidiele Moura*)

RESUMO

A agmatina é uma substância endógena que possui características neuromoduladoras. Estudos recentes têm indicado efeitos neuroprotetores para esta poliamina em modelos experimentais de isquemia, estresse e de doenças neurodegenerativas. O presente estudo teve como objetivo investigar o potencial protetor do tratamento sistêmico com agmatina (30 mg/kg, i.p.) durante 5 dias consecutivos sobre as alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas pela administração intranasal (i.n.) de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP, 1 mg/narina) em camundongos C57BL/6 envelhecidos (15 meses de idade), um modelo experimental da doença de Parkinson desenvolvido em nosso laboratório. O tratamento com agmatina foi capaz de aumentar em 40% a taxa de sobrevivência dos animais infundidos com MPTP. Nos testes comportamentais realizados durante um período de 21 dias após a administração i.n. do MPTP, o tratamento com agmatina preveniu o desenvolvimento de prejuízos cognitivos e motores avaliados, respectivamente, nos testes de reconhecimento social e campo aberto, além de reduzir os prejuízos no Escore Neurológico de Severidade (ENS) que avalia o estado neurológico geral dos animais. De maneira importante, os resultados do presente estudo demonstram que a agmatina não inibe a atividade da enzima monoamino oxidase B (MAO-B) e, portanto, não interfere diretamente na etapa limitante da metabolização do MPTP a MPP⁺ (metabólito ativo do MPTP). No entanto, a agmatina não foi capaz de prevenir a diminuição da captação hipocampal de glutamato induzida pelo tratamento i.n. com MPTP. Em conjunto, esses resultados sugerem que o tratamento repetido com agmatina é capaz de prevenir, ao menos em parte, os efeitos comportamentais e neuroquímicos induzidos pela administração i.n. de MPTP em camundongos envelhecidos.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, Agmatina, MPTP intranasal, Camundongos C57BL/6.

ABSTRACT

Agmatine is an endogenous substance that has been characterized as a neuromodulator. Recent studies have shown neuroprotective effects for such polyamine in experimental models of ischemia, stress and neurodegenerative diseases. The aim of this study was to investigate the potential neuroprotective effects of the systemic treatment with agmatine (30 mg/kg, i.p.) during 5 consecutive days on the behavioral and neurochemical changes induced by the intranasal (i.n.) infusion of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP, 1 mg/nostril) in C57BL/6 aged mice (15 months old), an experimental model of Parkinson's disease developed in our laboratory. The treatment with agmatine was able to increase by 40% the survival rate of the animals infused with MPTP. In the behavioral tests conducted over a period of 21 days after the administration of MPTP, the treatment with agmatine prevented the development of cognitive and motor impairments assessed, respectively, in the social recognition and open field tests as well as it reduced the deficits at the Neurological Severity Score (NSS), which assesses the general neurological status of the animals. Importantly, the results of this study demonstrate that agmatine does not inhibit the enzyme monoamine oxidase B (MAO-B) and therefore does not interfere directly in the limiting step in the metabolism of MPTP to MPP⁺ (the active metabolite of MPTP). However, agmatine treatment was not able to prevent the decrease of hippocampal glutamate uptake induced by i.n. MPTP administration. Altogether, these results suggest that the repeated treatment with agmatine prevent, at least in part, the behavioral and neurochemical alterations induced i.n. MPTP administration in aged mice.

Key-words: Parkinson's disease, Agmatine, Intranasal MPTP, C57BL/6 mice.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Exposição à toxinas ambientais e sua implicação no desenvolvimento dos prejuízos na função dos neurônios dopaminérgico.....	28
FIGURA 2.	Alterações neuropatológicas da doença de Parkinson	29
FIGURA 3.	Tratamento farmacológico atual para a doença de Parkinson	32
FIGURA 4.	Vias de síntese e degradação da agmatina	38
FIGURA 5.	Mecanismos de ação responsáveis pela disfunção neuronal nas células dopaminérgicas produzida por neurotoxinas	43
FIGURA 6.	Esquema do procedimento utilizado para a administração intranasal de MPTP em camundongos.....	51
FIGURA 7.	Esquema dos procedimentos realizados durante o protocolo experimental	52
FIGURA 8.	Aparato utilizado na avaliação do Escore Neurológico de Severidade	55
FIGURA 9.	Efeito do pré-tratamento com agmatina sobre o peso (gramas) dos animais	59
FIGURA 10.	Efeito do pré-tratamento com agmatina e da administração i.n. de MPTP sobre a porcentagem de sobrevivência dos animais	60
FIGURA 11.	Efeito do pré-tratamento com agmatina e da administração i.n. de MPTP sobre a atividade locomotora dos animais avaliada na caixa de locomoção	62
FIGURA 12.	Influência do pré-tratamento com agmatina e da administração i.n. de MPTP sobre a memória social	

	de camundongos	63
FIGURA 13.	Ação do pré-tratamento com agmatina e da administração i.n. de MPTP sobre o Escore Neurológico de Severidade de camundongos	64
FIGURA 14.	Influência do pré-tratamento com agmatina e da administração i.n. de MPTP sobre a atividade motora de camundongos avaliada no campo aberto	66
FIGURA 15.	Avaliação do efeito da agmatina e da administração i.n. do MPTP sobre a captação de glutamato em fatias hipocampais.....	67
FIGURA 16.	Efeito da agmatina sobre a atividade <i>in vitro</i> das enzimas monoamino oxidases A e B.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Parâmetros avaliados no Escore Neurológico de Severidade (ENS).....	55
------------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AMPA	- Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico
Ca ⁺²	- Íon cálcio
DA	- Doença de Alzheimer
DAT	- Transportador de dopamina
DP	- Doença de Parkinson
ENS	- Escore Neurológico de Severidade
EPM	- Erro Padrão da Média
ERO`S	- Espécies Reativas de Oxigênio
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
i.n.	- Intranasal
i.p.	- Intraperitoneal
L-dopa	- Levodopa
LPS	- Lipopolissacarídeo
MAO-A	- Monoamino Oxidase A
MAO-B	- Monoamino Oxidase B
Mg ⁺²	- íon magnésio
MPTP	- 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MPP ⁺	- 1-metil-4-fenilpiridina
NMDA	- N-metil-D-aspartato
NO	- Óxido nítrico (do inglês <i>nitric oxide</i>)
NOS	- Óxido nítrico sintase (do inglês <i>nitric oxide synthase</i>)
eNOS	- Óxido nítrico sintase endotelial (do inglês <i>endothelial nitric oxide synthase</i>)
iNOS	- Óxido nítrico sintase induzível (do inglês <i>inducible nitric oxide synthase</i>)
nNOS	- Óxido nítrico sintase neuronal (do inglês <i>neuronal nitric oxide synthase</i>)
A β 25-35	- Peptídeo beta-amilóide 23-35
6-OHDA	- 6-hidroxidopamina
RDI	- Razão de duração de investigação
SNC	- Sistema nervoso central

SNpc	- Substância negra parte compacta
TCE	- Traumatismo crânio encefálico
TNF- α	- Fator de necrose tumoral alfa
VMAT	- Transportador vesicular de monoaminas

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 DOENÇA DE PARKINSON	25
1.2 EPIDEMIOLOGIA E ETIOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON.....	26
1.3 NEUROATOLOGIA, VIAS AFETADAS E MARCADORES DA DOENÇA DE PARKINSON	28
1.4 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO ATUAL DA DOENÇA DE PARKINSON E SUAS LIMITAÇÕES	30
1.5 O ENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS GLUTAMATÉRGICO E NITRÉRGICO NA DOENÇA DE PARKINSON	33
1.6 AGMATINA OU SERIA SISTEMA AGMATINÉRGICO?	37
1.7 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA O ESTUDO DA DOENÇA DE PARKINSON – ÊNFASE NO MODELO DA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE MPTP EM ROEDORES	40
1.7.1 Modelo da administração de MPTP	43
1.7.1.1 Modelo da administração intranasal de MPTP....	44
2 OBJETIVOS	47
2.1 OBJETIVO GERAL	47
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
3 MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	49
3.2 ANIMAIS.....	49
3.3 DROGAS	50
3.4 TRATAMENTOS	50
3.5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	51
3.6 ANÁLISE DA PORCENTAM DE SOBREVIDA	51

3.7 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	53
3.7.1 Teste da caixa de locomoção.....	53
3.7.2 Teste do reconhecimento social.....	53
3.7.3 Avaliação do Escore Neurológico de Severidade.....	54
3.7.4 Teste do campo aberto.....	56
3.8 ENSAIO <i>EX VIVO</i>	56
3.8.1 Avaliação do efeito da agmatina e da administração i.n. de MPTP na captação hipocampal de glutamato.....	56
3.9 ENSAIO <i>IN VITRO</i>	57
3.9.1 Avaliação do efeito da agmatina na atividade das enzimas MAO-A e MAO-B	57
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
4 RESULTADOS.....	59
4.1 EFEITO DO TRATAMENTO COM AGMATINA SOBRE O PESO DOS ANIMAIS.....	59
4.2 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM AGMATINA E DA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE MPTP SOBRE A PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA DOS ANIMAIS.....	60
4.3 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM AGMATINA E DA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE MPTP SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA DOS ANIMAIS AVALIADA NA CAIXA DE LOCOMOÇÃO	61
4.4 INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM AGMATINA E DA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE MPTP SOBRE A MEMÓRIA SOCIAL DE CAMUNDONGOS	63
4.5 AÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO COM AGMATINA E DA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE MPTP SOBRE O ESCORE NEUROLÓGICO DE SEVERIDADE DE CAMUNDONGOS.....	64

4.6 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM AGMATINA E DO TRATAMENTO INTRANASAL COM MPTP NA ATIVIDADE MOTORA EM CAMUNDONGOS AVALIADA NO CAMPO ABERTO.....	65
4.7 EFEITO DA AGMATINA E DA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DO MPTP NA CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO EM FATIAS HIPOCAMPAIS.....	67
4.8 EFEITO DA AGMATINA SOBRE A ATIVIDADE <i>IN VITRO</i> DAS ENZIMAS MONOAMINO OXIDASES A E B.....	67
5 DISCUSSÃO.....	69
6 CONCLUSÃO	79
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

Segundo projeções do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) de 2000 e revisadas em 2008, no Brasil no ano de 2050 a expectativa de vida da população deve atingir o patamar de 81,29 anos. Somado a isso, a diminuição da fecundidade e da mortalidade, revela um incremento no envelhecimento populacional, refletindo a transição demográfica que vem ocorrendo nas últimas décadas, ou seja, a taxa de crescimento da população jovem está diminuindo em relação a da população idosa, que aumenta consideravelmente sua proporção.

O envelhecimento é um processo natural que possui uma série de eventos e mecanismos relacionados à sua progressão. O discernimento entre o envelhecimento normal e o patológico ainda é um ponto crítico para o melhor entendimento acerca de ambos os processos. Características iniciais de processos patológicos relacionados com a idade são semelhantes a eventos inerentes ao envelhecimento fisiológico (ROSENZWEIG; BARNES, 2003).

Durante o processo de envelhecimento, o cérebro começa a apresentar tanto alterações estruturais quanto neurofisiológicas que estão associadas a graus variados de comprometimentos funcionais (como por exemplo, cognitivos e motores). A integração global das funções cerebrais é menos eficaz no cérebro em envelhecimento, refletindo uma menor ativação coordenada das diferentes regiões cerebrais, acarretando, dentre outras conseqüências, diminuição do desempenho cognitivo e motor e também comprometimento da reorganização neural na tentativa de restabelecer o seu funcionamento (BISHOP; LU; YANKNER, 2010).

Os primeiros estudos para determinar os efeitos do envelhecimento sobre as funções cognitivas dos indivíduos eram realizados através de testes neuropsicológicos que avaliavam diferentes tipos de memória, atenção e também velocidade no processamento de informações (CRAIK, 1990). Atualmente, além dos testes neuropsicológicos, são utilizados métodos de neuroimagem, podendo ser citados a ressonância magnética, tensor de difusão e anisotropia fracionada, a espectroscopia por ressonância magnética e a tomografia por emissão de pósitrons. Essas técnicas permitem a observação de que o envelhecimento acarreta: diminuição do volume da substância cinzenta em algumas regiões encefálicas como córtex pré-frontal, estriado e hipocampo, diminuição da integridade das fibras nervosas por

perda da mielina ou por mineralização, alterações metabólicas relacionadas com a integridade neuronal e mudanças nos níveis de receptores, transportadores e dos próprios neurotransmissores (MATTAY et al., 2008).

A alteração estrutural das fibras mielinizadas que conectam neurônios em regiões corticais é um evento comumente relacionado com o avanço da idade (ANDREWS-HANNA et al., 2007). É importante ressaltar que no envelhecimento fisiológico, no qual a perda de função é acompanhada por uma perda neuronal mínima, as mudanças no funcionamento das sinapses são prevalentes, alterando a conectividade e a integração nas regiões corticais (BISHOP; LU; YANKNER, 2010).

A ocorrência e o agravamento de prejuízos cognitivos durante o envelhecimento variam de acordo com cada indivíduo e também estão relacionados com a hereditariedade. Estima-se que 50% do comprometimento cognitivo esteja relacionado com fatores genéticos (MATTAY et al., 2008).

As funções mitocondriais parecem estar reduzidas nos neurônios durante o processo de envelhecimento. Trabalhos apontam para uma menor expressão de genes envolvidos com o metabolismo energético mitocondrial em indivíduos com prejuízos cognitivos. Aliado a isso, observa-se que genes relacionados com vias envolvidas no estresse oxidativo apresentam expressão aumentada no processo do envelhecimento (BISHOP; LU; YANKNER, 2010).

A diminuição da expressão de alguns genes relacionados com o controle da neurotransmissão GABAérgica tem sido relacionada com o avanço da idade. Neste sentido, ocorreria um desequilíbrio entre a inibição gabaérgica e a estimulação neuronal realizada pelo glutamato nas regiões afetadas. Esse quadro poderia predispor o córtex pré-frontal, por exemplo, a uma super-estimulação glutamatérgica inicial que com o passar do tempo geraria um processo de excitotoxicidade e deixaria a região em questão mais susceptível a processos neurodegenerativos. Assim, o componente genético também é importante para o surgimento das características relacionadas com o envelhecimento, sendo um conjunto de inúmeros genes responsáveis por esses processos (LOERCH et al., 2008).

Os conhecimentos adquiridos pelas ciências médicas e biológicas não só contribuíram de maneira significativa para aumentar a expectativa de vida, mas também para melhorar a qualidade desta. O fato de estarmos vivendo mais nos depara com um desafio, o aumento

da prevalência das patologias associadas ao envelhecimento. Dentre essas “doenças da idade”, se encontram os dois principais distúrbios neurodegenerativos: a Doença de Parkinson (DP) e a Doença de Alzheimer (DA) (ROSENZWEIG; BARNES, 2003).

1.1 DOENÇA DE PARKINSON

Desde 1817, quando foi descrita por James Parkinson, a DP vem sendo classicamente caracterizada como uma patologia relacionada com prejuízos da função motora. Atualmente a DP é diagnosticada clinicamente devido ao aparecimento dos sintomas cardinais motores (tremores de repouso, rigidez e bradicinesia) (PADOVANI et al., 2006). Entretanto, quando os sintomas motores tornam-se evidentes, cerca de 60% dos neurônios dopaminérgicos da substância negra parte compacta (SNpc) encontram-se degenerados e 80% da dopamina estriatal depletada, refletindo um processo neurodegenerativo bastante avançado e irreversível (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

Por outro lado, o conhecimento acerca dessa enfermidade tem aumentado muito nos últimos anos e nos dias atuais já se conhecem outras disfunções e sintomas que acometem os pacientes em estágios mais precoces ao aparecimento dos sintomas motores. Um grupo de patologistas alemães coordenados por Braak e colaboradores (2003) mudaram a visão tradicional sobre o decurso temporal da DP através da introdução de seis estágios que incluem desde sintomas olfatórios iniciais, passando por sintomas cognitivos (como perdas de memórias operacionais) e emocionais (como depressão) até as alterações motoras. Essa hipótese compreende ainda os processos patológicos subjacentes a cada estágio (CHAUDHURI; HEALY; SCHAPIRA, 2006). Esses sintomas iniciais da DP são extremamente importantes para o desenvolvimento de testes que permitam o seu diagnóstico mais precoce, permitindo que as abordagens terapêuticas sejam iniciadas com um menor comprometimento dos neurônios dopaminérgicos (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; OWEN, 2004; CHAUDHURI; HEALY; SCHAPIRA, 2006; MAETZLER; LIEPELT; BERG, 2009; PREDIGER et al., 2010).

1.2 EPIDEMIOLOGIA E ETIOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON

A epidemiologia da DP varia de acordo com a expectativa de vida da população de cada país, podendo dessa maneira interferir com sua prevalência. A DP é um dos distúrbios neurodegenerativos mais comuns afetando aproximadamente 1% da população acima dos 60 anos de idade, sendo que essa proporção aumenta com o avanço da idade (DE LAU; BRETELER, 2006). Nos Estados Unidos da América, em torno de 500.000 pessoas possuem a DP e cerca de 50.000 casos novos são reportados todos os anos (LANDRIGAN et al., 2005). Segundo o IBGE (2000), existem aproximadamente 220 mil parkinsonianos no Brasil, sendo que 2% dos brasileiros acima dos 60 anos são acometidos por este distúrbio.

Embora a etiologia primária da DP permaneça desconhecida, o envelhecimento representa o principal fator de risco para o seu surgimento. Além do envelhecimento, outros fatores de risco que podem aumentar a incidência desta patologia são: histórico familiar e exposição a agentes ambientais (POSTUMA; MONTPLAISIR, 2009). Teorias apontam para o somatório desses fatores, ou seja, fatores genéticos e ambientais estariam interagindo para culminar com o surgimento da DP (KENNEDY et al., 2003; MEREDITH; SONSALLA; CHESSELET, 2008).

Um estudo com 20.000 gêmeos apontou um efeito importante dos fatores genéticos para o desenvolvimento da DP, sendo que este ocorreu antes dos 50 anos de idade. Cerca de 10% dos casos de DP são de origem genética, porém estes são considerados uma categoria distinta de síndrome parkinsoniana, uma vez que apresentam algumas características distintas dos casos esporádicos da DP (também chamados de idiopáticos), tais como início precoce, distonia e ocorrência precoce de demência (DE LAU; BRETELER, 2006).

Acredita-se que o desenvolvimento da DP idiopática seja o resultado de interações complexas entre fatores genéticos e ambientais. Muitos estudos têm sugerido genes candidatos para essa interação, que estão relacionados com o metabolismo da dopamina, funções mitocondriais e detoxificação. Polimorfismos também estão relacionados com o aumento da susceptibilidade dos organismos aos agentes ambientais. Por exemplo, polimorfismos no DNA mitocondrial

possivelmente poderiam alterar a vulnerabilidade para o desenvolvimento da doença (DE LAU; BRETELER, 2006) .

Como já mencionado, a exposição a agentes ambientais constituiu-se a outra vertente teórica que estaria relacionada com o maior risco (aproximadamente 90% dos casos) do desenvolvimento da DP. Em 1983, observou-se que usuários de heroína contaminada com 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) começaram a desenvolver sintomas característicos da DP (LANGSTON et al., 1983). Em seguida houve a constatação de que o MPTP era capaz de matar seletivamente os neurônios dopaminérgicos da SNpc (LANGSTON et al., 1984). Esse foi o ponto inicial para teorizar sobre a possibilidade de toxinas ambientais estarem relacionadas com o desenvolvimento da DP. Outras substâncias também estão possivelmente envolvidas, dentre elas os pesticidas (paraquate, rotenona e manebe) e os metais (ferro, manganês, cobre, alumínio ou zinco) (DI MONTE; LAVASANI; MANNING-BOG, 2002; CICCETTI; DROUIN-OUELLET; GROSS, 2009). Além disso, a exposição a estes fatores ambientais pode ser ocupacional ou aleatória (DE LAU; BRETELER, 2006) .

A exposição às toxinas ambientais durante o desenvolvimento do indivíduo ou mesmo durante a idade adulta poderia tardiamente afetar a função neuronal e ocasionar o aparecimento da DP. Neste sentido, esse contato inicial geraria danos a longo prazo que trariam como consequência uma perda neuronal crítica. Essa degeneração produziria, anos depois, um prejuízo diretamente relacionado com o avançar da idade. Dessa maneira o número de neurônios seria diminuído precocemente em regiões críticas, como a SNpc, para níveis inferiores ao necessário para sustentar a função normal em face do desgaste neuronal associado com o avançar da idade. Esse quadro geraria o aparecimento dos sintomas motores da DP (Figura 1) (LANDRIGAN et al., 2005).

Uma derivação das teorias citadas anteriormente seria a de que toxinas endógenas iniciariam a neurodegeneração. Essas substâncias, provenientes de alterações no metabolismo originadas por exposição a fatores ambientais ou diferenças herdadas nas vias do metabolismo, estariam relacionadas com o surgimento da DP (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

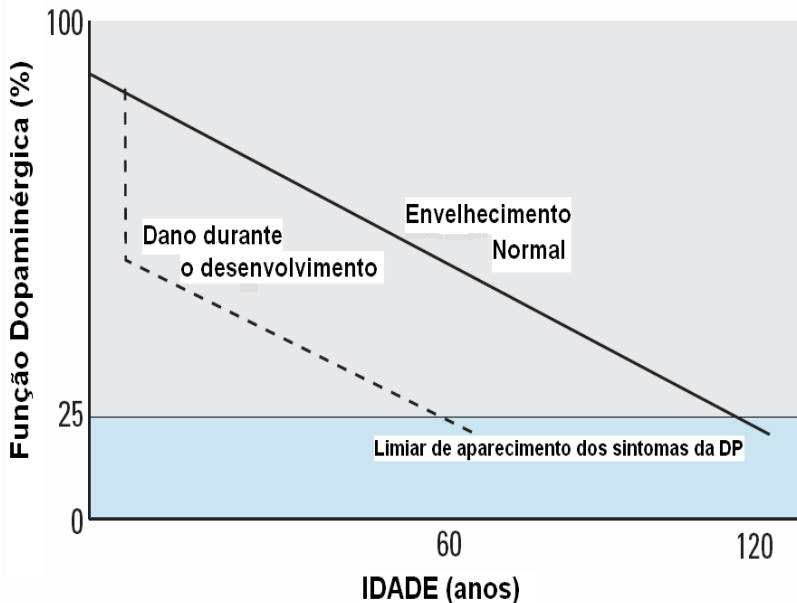


Figura 1: Exposição à toxinas ambientais e sua implicação no desenvolvimento dos prejuízos na função dos neurônios dopaminérgicos. Os efeitos não são imediatamente percebidos, porém anos mais tarde ocorre o surgimento dos sintomas motores da doença de Parkinson, modificado de (LANDRIGAN et al., 2005).

1.3 NEUROPATOLOGIA, VIAS AFETADAS E MARCADORES DA DOENÇA DE PARKINSON

As principais características neuropatológicas da DP são: a perda de neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal, e em nível intracelular a presença dos corpos de Lewy, que são inclusões formadas predominantemente pela proteína alfa-sinucleína, além de ubiquitina, parquina e neurofilamentos. Apesar dos corpos de Lewy não serem um marcador específico da DP, são encontrados tanto nas formas idiopática quanto genética da doença (Figura 2) (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; CICHETTI; DROUIN-OUELLET; GROSS, 2009).

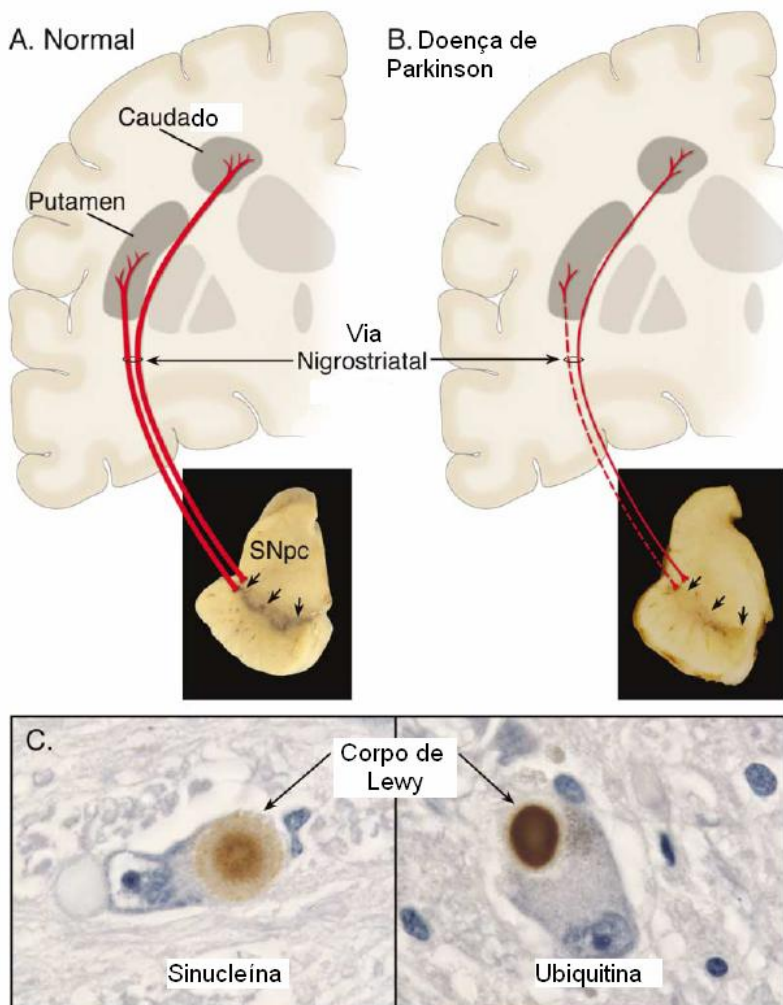


Figura 2: Neuropatologia da doença de Parkinson (DP). Representação da via nigrostriatal a) normal e b) acometida pela DP. c) Imunohistoquímica evidenciando presença de corpos de Lewy através da marcação para sinucleína e ubiquitina na substância negra parte compacta, modificado de (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

Em contraste ao observado no envelhecimento normal, essa perda neuronal se concentra nas porções ventrolateral e caudal da SNpc

(DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Além da referida neurodegeneração dopaminérgica, outros sistemas de neurotransmissão estão também acometidos em pacientes parkinsonianos, sendo que esta disfunção estaria associada aos sintomas não motores da DP. Como exemplos, podem ser citados neurônios noradrenérgicos (*locus coeruleus*), neurônios serotoninérgicos (núcleos da Rafe) e neurônios colinérgicos (núcleo basal de Meynert, núcleo motor dorsal do vago), no córtex cerebral (cingulado e entorrinal), bulbo olfatório e sistema nervoso autônomo. A degeneração hipocampal, juntamente com a degeneração colinérgica em regiões corticais, parece ser responsável pela ocorrência do quadro de demência nos pacientes parkinsonianos mais idosos (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

Estudos realizados com modelos experimentais utilizando neurotoxinas ou animais transgênicos com alterações nos genes envolvidos nas formas genéticas da DP têm apontado para dois eventos principais que poderiam estar relacionados com a patogênese da DP. Uma hipótese postula que proteínas alteradas (como a alfa-sinucleína) se agregariam e se depositariam nas células nervosas, sendo um componente essencial para a morte destes neurônios dopaminérgicos da SNpc. A outra vertente aponta para uma modificação no potencial energético mitocondrial, culminando com estresse oxidativo. Esses processos não são excludentes, podendo um interagir com o outro. Um dos focos dos estudos atuais é verificar os possíveis pontos de interação entre eles e estabelecer uma sequência de acontecimentos que seriam responsáveis pela neurodegeneração verificada na DP (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

1.4 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO ATUAL DA DOENÇA DE PARKINSON E SUAS LIMITAÇÕES

Os tratamentos farmacológicos utilizados atualmente na DP têm como objetivo principal restaurar a atividade dopaminérgica no sistema nervoso central (SNC) que se encontra reduzida, através da administração de precursores de dopamina (ex: levodopa), agonistas dopaminérgicos (ex: bromocriptina), inibidores das enzimas catecol-O-metiltransferase e monoamino oxidase B que impedem a degradação de dopamina (ex: entacapone e selegilina, respectivamente) e drogas que aumentam a liberação de dopamina e inibam sua recaptação, como a

amantadina (GIROUX, 2007), como pode ser visualizado na Figura 3. Apesar de não serem medicamentos que atuam diretamente sobre o sistema dopaminérgico, os antagonistas colinérgicos (como o biperideno) ajudam a restaurar seu equilíbrio com o auxílio da acetilcolina (GIROUX, 2007).

Apesar de seu uso ser muito bem sucedido na terapia antiparkinsoniana, há algumas ressalvas para a utilização da levodopa (L-dopa). Após a administração da L-dopa, grande parte desta é descarboxilada por enzimas presentes na mucosa intestinal e em outros locais periféricos, e apenas cerca de 1% da droga chega inalterada ao seu local de ação, o SNC (KIM et al., 2009). Por esse motivo, o tratamento farmacológico empregado na terapia antiparkinsoniana geralmente utiliza a associação da L-dopa com outros medicamentos, como a carbidopa ou a benserazida, que têm como função inibir a degradação periférica da L-dopa realizada pela enzima dopa descarboxilase, reduzindo a dose de L-dopa necessária para atingir a concentração terapêutica adequada no SNC (RODRIGUES; CAMPOS, 2006).

A administração da L-dopa está associada a um grande número de efeitos indesejáveis, como náuseas, vômitos e arritmia cardíaca, causados pela degradação periférica, o que causa flutuações na sua biodisponibilidade. Além disso, efeitos muito importantes observados em longo prazo são o surgimento de discinesias (movimentos involuntários de contração) e flutuações motoras do tipo “liga e desliga”. A indução de discinesias pode ser mais debilitante que a doença em si e faz com que muitos pacientes abandonem o tratamento com este fármaco (MENZAGHI et al., 1997). As flutuações motoras inicialmente ocorrem ao final do efeito da dose. No entanto, com o passar do tempo, essas flutuações podem ocorrer sem uma previsão, gerando os estados liga e desliga (GIROUX, 2007).

Os agonistas dopaminérgicos usados como monoterapia tratam eficazmente os sintomas motores, além de retardarem o aparecimento das complicações motoras. Estudos clínicos já evidenciaram que o uso precoce dessa classe de medicamentos pode reduzir ou retardar as complicações motoras observadas com o uso da L-dopa (RASCOL et al., 2000; THE PARKINSON’S STUDY GROUP, 2004). Dessa forma os agonistas dopaminérgicos podem ser considerados um tratamento

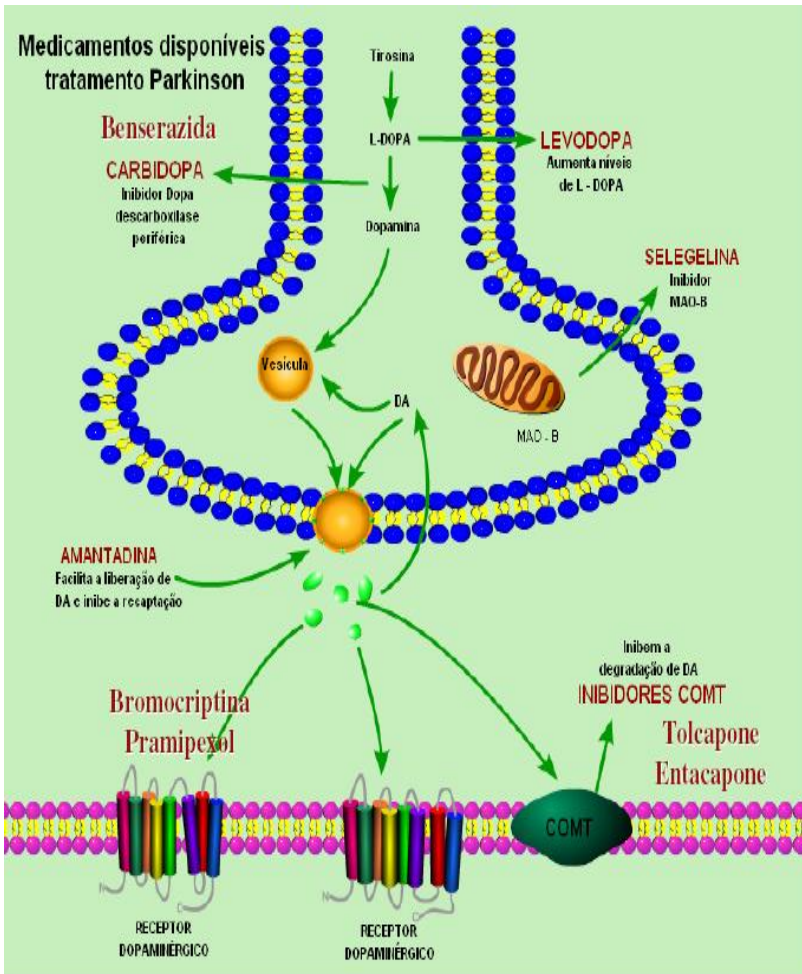


Figura 3: Tratamento farmacológico atual para a doença de Parkinson, retirado de AGUIAR JR; PREDIGER, 2010

inicial eficaz. A amantadina é a única droga disponível que melhora os sintomas motores e ainda reduz a severidade das discinesias. No entanto, o mecanismo de ação exato pelo qual a amantadina melhora os

sintomas da DP ainda não foi completamente elucidado, além desta possuir um grande número de efeitos colaterais (ex: perda da libido, tonturas, confusão mental, etc) (METMAN et al., 1999).

É importante ser destacado que embora relevantes, esses medicamentos representam uma alternativa meramente paliativa à DP, uma vez que atuam restabelecendo temporariamente a função dopaminérgica no SNC, sem apresentarem, todavia, uma ação neuroprotetora comprovada sobre o processo neurodegenerativo que continua a progredir. Por esta razão, a medicação disponível atualmente para o tratamento da DP apresenta uma eficácia relativa e temporária, além de estar associada a um grande número de efeitos colaterais (GIROUX, 2007). Nesse sentido, é evidente o crescente interesse de pesquisadores e das indústrias farmacêuticas para a descoberta de novos alvos terapêuticos e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de medicamentos novos e mais eficazes para o tratamento desta patologia.

1.5 O ENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS GLUTAMATÉRGICO E NITRÉRGICO NA DOENÇA DE PARKINSON

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC de mamíferos. Comparando com outros transmissores, o glutamato apresenta os maiores níveis no SNC. Esse neurotransmissor atua sobre receptores ionotrópicos N-metil-D-aspartato (NMDA), kainato e ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e receptores acoplados à proteína G (metabotrópicos) que são diferenciados em 7 ou mais sub-tipos (SHELDON; ROBINSON, 2007).

Esses receptores estão presentes em diferentes tipos celulares do SNC como em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos e em diferentes localizações (HAYDON; CARMIGNOTO, 2006). Sua localização na pré-sinapse está relacionada com regulação da liberação de glutamato (ENGELMAN; MACDERMOTT, 2004). A retirada desse neurotransmissor da fenda sináptica, além da inibição de sua liberação, constituem os principais mecanismos de modulação de suas ações, sendo a captação de glutamato realizada por transportadores dependentes de sódio, localizados em astrócitos e nos neurônios pós-sinápticos (SHELDON; ROBINSON, 2007). Assim, é um sistema que normalmente funciona mantendo níveis adequados de glutamato para realizar uma ativação tônica dos seus receptores pós-sinápticos.

Por outro lado, uma excessiva ativação desse sistema de neurotransmissão pode gerar o processo de excitotoxicidade direta e como consequência a morte neuronal, devido às elevadas concentrações intracelulares de cálcio (CHOI, 1992). O processo de excitotoxicidade indireta é caracterizado por alterações na polaridade da membrana celular devido a mudanças em funções energéticas mitocondriais, culminando com a retirada do íon magnésio (Mg^{2+}) dos receptores NMDA, aumentando assim a sensibilidade e, conseqüentemente, a vulnerabilidade neuronal ao glutamato. Esse processo estaria mais envolvido nas doenças neurodegenerativas visto que os possíveis eventos que as iniciam estão relacionados a prejuízos das funções mitocondriais que são conhecidos, por exemplo, na DP (ALBIN; GREENAMYRE, 1992).

Estudos em modelos experimentais da DP e observações neuropatológicas em pacientes parkinsonianos têm demonstrado que a desnervação dopaminérgica resulta em alterações nas sinapses estriatais (INGHAM et al., 1993; ANGLADE et al., 1996; MESHUL, et al., 1999). Após esse quadro de desnervação, as aferências corticoestriatais glutamatérgicas realizam conexões assimétricas com os neurônios estriatais (INGHAM et al., 1998). Estes achados estão de acordo com uma hiperatividade das aferências corticoestriatais glutamatérgicas. Alguns estudos em modelos animais mostraram aumento das concentrações extracelulares de glutamato estriatal após a desnervação dopaminérgica (MESHUL, et al., 1999; JONKERS et al., 2002).

Nos pacientes portadores da DP, os neurônios glutamatérgicos do núcleo subtalâmico que se projetam para a substância negra, apresentam um aumento nos seus padrões de ativação. Além disso, existem evidências experimentais de que ocorre uma diminuição da captação de glutamato e dessa maneira aumenta-se a ativação dos receptores glutamatérgicos, elevando seu potencial tóxico (HASSANI; MOUROUX; FÉGER, 1996; BENAZZOUZ et al., 2002).

Em diversos modelos utilizando-se neurotoxinas como 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) e 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) observam-se prejuízos da homeostase do sistema glutamatérgico, seja pela inibição da sua captação ou pelo aumento da sua liberação (YANG et al., 2005; MEREDITH et al., 2009). Outro fator que reforça o envolvimento da toxicidade glutamatérgica no etiopatologia da DP, é que substâncias que bloqueiam os receptores glutamatérgicos ou que aumentam a captação de glutamato mostram

características neuroprotetoras nos respectivos modelos (SHELDON; ROBINSON, 2007) .

Outro neurotransmissor que estaria envolvido com a DP é o óxido nítrico (NO). O NO é uma molécula lipossolúvel e gasosa, sintetizado a partir da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Existem três isoformas de NOS: a neuronal, a endotelial e a induzível. No SNC, a isoforma constitutiva da enzima que sintetiza o NO é a neuronal (nNOS ou tipo I) (GARTHWAITE, J.; BOULTON, 1995). A isoforma do tipo II ou induzível (iNOS) embora não seja expressa constitutivamente na maioria das regiões encefálicas, quando ativada produz NO por um período maior (e conseqüentemente maior quantidade de NO é formado) do que as isoformas constitutivas, caracterizando seu envolvimento em processos patológicos. A isoforma III ou endotelial (eNOS) é expressa em sua maioria constitutivamente nas células endoteliais e apresenta o menor tempo de ação (NATHAN; XIE, 1994).

O NO atua como um neurotransmissor atípico sendo sintetizado na pós-sinapse e agindo tanto pré- quanto pós-sinápticamente (GARTHWAITE, 2008). O NO tem sido funcionalmente relacionado com a neurotransmissão colinérgica, dopaminérgica e glutamatérgica. Um estudo anterior já observou que a enzima nNOS está presente em diversas regiões cerebrais incluindo as áreas envolvidas na DP, como estriado, núcleo subtalâmico e área tegmentar ventral (VINCENT; KIMURA, 1992) .

Fisiologicamente, o NO também está envolvido com o controle da função motora através da modulação e da integração da informação processada pelos núcleos da base (WEST; GALLOWAY; GRACE, 2002; WEST; GRACE, 2004). O NO facilita a neurotransmissão dopaminérgica tanto fásica quanto tonicamente em animais sadios (WEST; GALLOWAY; GRACE, 2002). Porém, diversos estudos vêm demonstrando que o NO pode estar envolvido em mecanismos relacionados com a morte neuronal dopaminérgica (DI MATTEO et al., 2006; GOMES; RAISMAN-VOZARI; DEL BEL, 2008). De maneira importante, foi também demonstrado que o NO está relacionado com o surgimento de discinesias em ratos tratados cronicamente com L-dopa (PADOVAN-NETO et al., 2009).

Diferentes linhas de pesquisa têm implicado tanto as espécies reativas de oxigênio (EROs) quanto o NO nos processos relacionados a neurodegeneração. A entrada de cálcio através dos receptores NMDA promove a ativação da enzima nNOS pela ligação à calmodulina, que é um co-fator desta enzima. Desta forma, a excessiva ativação dos

receptores NMDA leva a um aumento na produção de NO que pode reagir com superóxido e formar peroxinitrito, que é uma espécie altamente reativa promovendo a nitração da tirosina e produção de radicais hidroxila e consequente ativação de vias apoptóticas (KORNHUBNER; WELLER, 1997). Dessa maneira, a ação desses agentes pode estar implicada na morte neuronal verificada na DP (YOKOYAMA et al., 2008).

Estudos *pós-mortem* revelaram uma superexpressão de nNOS no cérebro de pacientes parkinsonianos (EVE et al., 1998). Aliado a isso, ocorre à formação de peroxinitrito enfatizando um possível efeito do NO na fisiopatologia da DP, pois levaria a neurodegeneração dos neurônios dopaminérgicos e o aparecimento dos sintomas parkinsonianos (GATTO et al., 2000).

Tanto a manipulação genética quanto estudos farmacológicos têm apontado para a influência do NO nos processos relacionados à neurodegeneração. A deleção genética das enzimas nNOS e iNOS mostrou ser protetora contra a neurodegeneração dopaminérgica em camundongos submetidos ao modelo da administração sistêmica de MPTP (PRZEDBORSKI et al., 1996; LIBERATORE et al., 1999). As células gliais contribuem através de diversos mecanismos para a toxicidade observada após a administração do MPTP, incluindo a formação de radicais livres e danos causados pela indução da iNOS. Além disso, tem sido sugerido que a ativação microglial na SNpc, a qual é acompanhada pelo aumento da expressão de iNOS, possui efeito na patogênese da DP (HIRSCH et al., 1998; MCNAUGHT; JENNER, 1999).

Neste sentido, o tratamento com 7-nitroindazol, um inibidor da enzima nNOS, causou uma proteção dose-dependente contra a depleção estriatal de dopamina induzida pelo MPTP em camundongos (SCHULZ et al., 1995). Outros estudos já evidenciaram que o tratamento com MPTP pode aumentar a expressão de RNA mensageiro (RNAm) para a nNOS no estriado e na substância negra e que a administração de 7-nitroindazol é capaz de reduzir tais aumentos, além de prevenir a morte de neurônios dopaminérgicos (CHALIMONIUK et al., 2006). Porém, um estudo mais recente demonstrou que o 7-nitroindazol também possui uma ação inibitória sobre a atividade da enzima MAO-B, reduzindo a conversão do MPTP para sua forma tóxica MPP⁺ (HERRAIZ; ARÁN; GUILLÉN, 2009), sendo este um dos possíveis mecanismos para a proteção causada por esta droga.

Diante do exposto acima, parece ser incontestável o envolvimento dos sistemas glutamatérgico e nitrérgico nos mecanismos subjacentes à DP. No entanto, é necessária a realização de estudos adicionais para a elucidação do real papel do glutamato e do NO nos modelos experimentais da DP e na doença propriamente dita. Diante deste contexto, surge o interesse sobre a agmatina como potencial agente neuroprotetor na DP.

1.6 AGMATINA OU SERIA SISTEMA AGMATINÉRGICO?

A agmatina é uma poliamina endógena que foi inicialmente descrita em bactérias e plantas (TABOR; TABOR, 1984). Com o avançar das pesquisas, Raasch e colaboradores (1995) demonstraram a presença da agmatina em mamíferos (RAASCH et al., 1995a) e, posteriormente, também foi identificada em seres humanos (REIS; REGUNATHAN, 2000). Em mamíferos, a agmatina já foi detectada no SNC, intestino, rins, estômago, vasos sanguíneos, pulmão, fígado e coração (RASCH et al., 1995b; a; FENG; HALARIS; PILETZ, 1997; RAASCH et al., 2001). No SNC, a agmatina está presente no córtex cerebral, no hipocampo, no corpo amigdalóide, no hipotálamo e no estriado (REIS; REGUNATHAN, 2000).

Como pode ser observado na Figura 4, a enzima arginina descarboxilase converte por descarboxilação a L-arginina em agmatina, sendo esta uma amina catiônica. A agmatina pode ser degradada através da enzima diamino oxidase, formando ácido guanido butanóico, ou através da ação da enzima agmatinase, gerando outras poliaminas como putrescina, espermidina e espermina, além de uréia como subproduto (REIS; REGUNATHAN, 2000; HALARIS; PILETZ, 1997).

No SNC, a concentração de agmatina é semelhante a dos neurotransmissores clássicos e sua síntese pode ocorrer tanto em neurônios quanto em astrócitos (RAASCH et al., 1995b; a; OTAKE et al, 1998; REIS; REGUNATHAN, 2000). Foi demonstrada recentemente a presença da enzima de degradação, agmatinase, no hipotálamo e no hipocampo tanto em células gliais quanto em neurônios, entretanto, esta não foi detectada no córtex cerebral de ratos (MELLA et al., 2010).

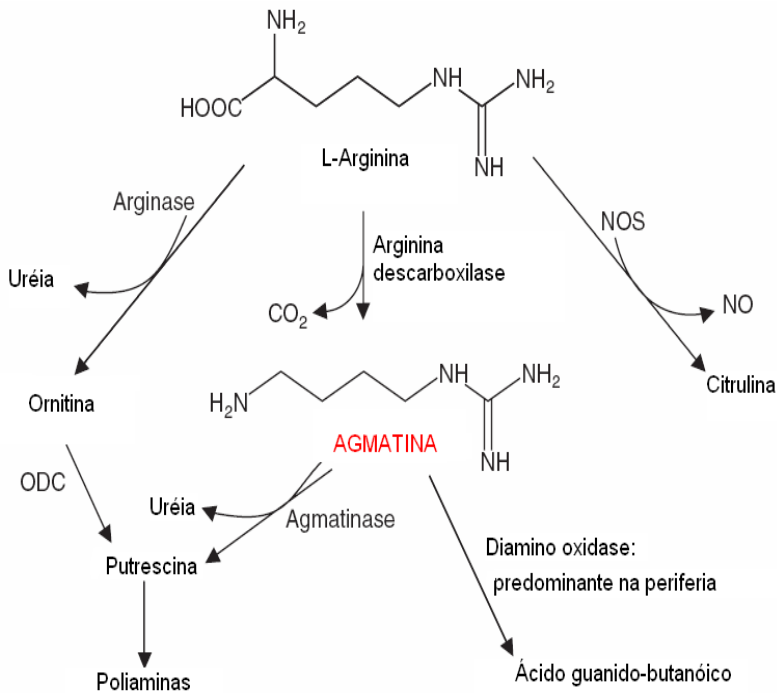


Figura 4: Vias de síntese e degradação da agmatina, modificado de (HALARIS; PILETZ, 1997).

Após ser sintetizada, a agmatina é armazenada em vesículas sinápticas. Através do processo de exocitose é liberada e evidências apontam para um sistema de transporte específico para a agmatina, que permitiria sua entrada nas células (MOLDERINGS et al., 2003; GORACKE-POSTLE et al., 2006). Desta forma, todas essas características de: localização, vias de síntese e degradação e os componentes de armazenamento e liberação constituem o chamado sistema agmatinérgico (RAASCH et al., 1995a; SASTRE et al., 1996; OTAKE et al., 1998). Entretanto, é necessária cautela uma vez que ainda não foram identificados receptores específicos para essa poliamina, sendo por esta razão mais correto considerá-la um neuromodulador, ao invés de neurotransmissor (REIS; REGUNATHAN, 2000).

A agmatina liga-se com afinidade moderada a receptores nicotínicos para acetilcolina, α 2-adrenérgicos e receptores imidazólicos. Além disso, ela atua como antagonista dos receptores NMDA para o glutamato e inibe as isoformas I e II da NOS no encéfalo. Esta amina liga-se também com baixa afinidade em receptores do tipo α 1- e β -adrenérgicos, 5-HT3-serotoninérgicos e D2-dopaminérgicos, κ -opiídeos e receptores A1-adenosinérgicos (GALEA et al., 1996; REIS; YANG; MILNER, 1998; YANG; REIS, 1999; REIS; REGUNATHAN, 2000; RAASCH et al., 2001; WIESINGER, 2001; BERKELS et al., 2004)

Algumas funções relevantes da agmatina a nível de SNC têm sido descritas na literatura. A agmatina facilita a memória no modelo da esQUIVA inibitória em ratos (ARTENI et al., 2002). Apresenta propriedade ansiolítica, uma vez que a sua administração oral em roedores (ratos e camundongos) exerceu um efeito do tipo-ansiolítico quando estes foram avaliados em quatro testes comportamentais distintos (labirinto em cruz elevado, teste de transição claro-escuro, teste do conflito de beber de Vogel e teste de interação social) (LAVINSKY; ARTENI; NETTO, 2003; GONG et al., 2006). Além disso, a agmatina apresenta propriedades anticonvulsivantes em um modelo de convulsão induzida por eletrochoque (BENCE et al., 2003; SU et al., 2004), sendo que este efeito parece ser mediado pelo antagonismo de receptores NMDA (SU et al., 2004). Outros estudos mostram ainda que a agmatina possui ação protetora contra a convulsão induzida por pentilenotetrazol (DEMEHRI et al., 2003; FENG; LEBLANC; REGUNATHAN, 2005), um efeito mediado pela diminuição da liberação de glutamato (DEMEHRI et al., 2003; FENG; LEBLANC; REGUNATHAN, 2005).

Estudos realizados na Universidade Federal de Santa Catarina têm demonstrado que a agmatina produz efeito antinociceptivo em modelos animais de dor induzida pela administração de ácido acético, glutamato, capsaicina e formalina, e este efeito parece ser mediado por uma interação com os sistemas opiídeo, serotoninérgico, nitrérgico, bem como interação com α 2-adrenoceptores e receptores imidazólicos II (SANTOS et al., 2005). A agmatina também produz um efeito antidepressivo nos modelos do nado forçado e suspensão pela cauda, que representam dois modelos comportamentais muito utilizados como preditivos para ação antidepressiva de fármacos (ZOMKOWSKI et al., 2002) .

De maneira importante, diferentes linhas de evidência apontam para um papel neuroprotetor da agmatina. Esta protege culturas de células de hipocampo contra a excitotoxicidade induzida pelo glutamato (OLMOS et al., 1999; WANG et al., 2006), contra a privação de glicose

e oxigênio (KIM et al, 2004), além de promover proteção em um modelo in vivo de traumatismo crânio-encefálico (TCE) em ratos (GILAD; GILAD, 2000). Em diversos modelos animais de isquemia focal, global e isquemia da medula espinhal, a agmatina promoveu redução de infartos isquêmicos, proteção contra a perda de neurônios hipocâmpais e aceleração da recuperação do comprometimento locomotor (GILAD et al, 1996; OLMOS et al., 1999; GILAD; GILAD, 2000). Em outros trabalhos, a agmatina promoveu neuroproteção por inibir a apoptose induzida por fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em cultura de células de glânglio de retina de ratos (HONG et al, 2007). Um estudo verificou que a agmatina previne alteração morfológica cerebral causada pelo tratamento com glicocorticóides em ratos (ZHU et al, 2007).

Trabalhos mais recentes têm demonstrado uma estreita relação entre a agmatina e diferentes funções mitocondriais, regulando o consumo de oxigênio, síntese de ATP (NISSIM et al, 2008) e as alterações de potencial elétrico na membrana mitocondrial (BATTAGLIA et al, 2007). Também já foi evidenciado que a agmatina exerce efeitos antioxidantes e de proteção mitocondrial frente a danos gerados pelo íon cálcio (Ca²⁺) (ARNDT et al., 2009; BATTAGLIA et al., 2010). Essas características conferem uma proteção celular e uma determinada resistência aos mecanismos de apoptose (ARNDT et al., 2009). Diante do exposto acima, fica evidente o interesse sobre a investigação do papel da agmatina nas doenças neurodegenerativas e seu caráter neuroprotetor.

1.7 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA O ESTUDO DA DOENÇA DE PARKINSON – ÊNFASE NO MODELO DA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE MPTP EM ROEDORES

Na tentativa de entender melhor quais são os mecanismos subjacentes ao processo neurodegenerativo e, dessa maneira, possibilitar o descobrimento de novos alvos terapêuticos, é de extrema importância o desenvolvimento e utilização de modelos experimentais representativos para o estudo da DP. Os modelos devem replicar características presentes na doença e apresentar uma progressão crônica o mais semelhante possível ao quadro clínico (TERZIOGLU; GALTER, 2008). Com essas ferramentas também é possível pesquisar

novas substâncias capazes de atuarem nos diferentes estágios da DP, retardando-a, prevenindo-a e até mesmo curando-a.

O desenvolvimento natural da DP não é verificado nos animais de uma maneira geral, com exceção de parkinsonismo leve em primatas não humanos idosos (TERZIOGLU; GALTER, 2008). Inicialmente, os estudos eram realizados em primatas não humanos, porém devido ao elevado custo de manutenção e questões éticas surgiu a necessidade de se utilizar diferentes espécies para o estudo desta patologia (TERZIOGLU; GALTER, 2008). Os modelos experimentais de DP se dividem basicamente em dois grandes grupos, os modelos baseados na aplicação de toxinas e os modelos com manipulação genética (para revisão ver MEREDITH; SONSALLA; CHESSELET, 2008).

Não existe um consenso na literatura sobre qual o modelo mimetizaria melhor a natureza progressiva da DP e se os modelos experimentais atuais seriam capazes de diferenciar as características pré-clínicas (por exemplo os sintomas olfatórios, cognitivos e emocionais) e clínicas (sintomas motores) da doença. Os modelos experimentais mais utilizados nas últimas décadas para o estudo da DP em animais de laboratório são os relacionados com a administração de diferentes toxinas: 6-OHDA, MPTP, rotenona, paraquate, lipopolissacarídeo (LPS) ou metais pesados (MEREDITH; SONSALLA; CHESSELET, 2008).

A maioria das toxinas é utilizada para induzir a degeneração dopaminérgica. Por inibirem o complexo I mitocondrial, as toxinas aumentam a produção de EROs através de seus efeitos sobre a mitocôndria, como pode ser visualizado de maneira simplificada na Figura 5. Os EROs em excesso ativam vias apoptóticas que conduzem à morte neuronal. A especificidade para os neurônios dopaminérgicos é dependente da maior ou menor captação preferencial pelos transportadores de dopamina (BEAL, 2001; MEREDITH; SONSALLA; CHESSELET, 2008).

Como já descrito anteriormente, embora a maioria dos casos da DP seja idiopática, diversas mutações genéticas que levam a forma familiar da doença têm sido descobertas recentemente, levando a novas abordagens para o estudo dos mecanismos da DP. Devido ao aumento do conhecimento a respeito de possíveis genes envolvidos com a DP, atualmente cresce cada vez mais a utilização de animais geneticamente modificados para o estudo desta doença. As manipulações genéticas são realizadas em sua grande maioria em camundongos, anulando-se totalmente um gene (animal nocaute), incluindo-se uma cópia extra do gene ou gerando mutações em genes localizados em diferentes *loci* (TERZIOGLU; GALTER, 2008).

Os animais nocautes são desenvolvidos com o intuito de “silenciar” genes importantes para o desenvolvimento e manutenção dos neurônios dopaminérgicos. Esses camundongos exibem perda gradual dos neurônios dopaminérgicos, reproduzindo alguns sintomas motores clássicos da DP, porém não replicam completamente os sintomas extranigrais da doença (SHERER et al, 2003; HWANG et al., 2005; SONNIER et al., 2007). Camundongos modificados geneticamente para o transportador de dopamina (DAT) ou para o transportador vesicular de monoaminas (VMAT), não apresentam alterações comportamentais relacionadas com funções sensoriais que são observadas nos pacientes portadores da DP (para revisão ver TAYLOR; GREENE; MILLER, 2010).

Nos animais geneticamente modificados, os prejuízos olfatórios podem aparecer dependendo do teste que está sendo utilizado e também da idade dos animais (TAYLOR; GREENE; MILLER, 2010). Alterações na emocionalidade dos animais que sofreram algum tipo de manipulação genética também podem ser observadas. Utilizando o labirinto em cruz elevado, se verifica comportamento do tipo ansiogênico, por exemplo, nos animais deficientes para VMAT. Esses mesmos animais, quando avaliados no teste do nado forçado e no teste da suspensão pela cauda, apresentam comportamento do tipo depressivo (TAYLOR; GREENE; MILLER, 2010). Prejuízos das funções cognitivas podem ser observados em camundongos nocautes para o gene da parquína quando avaliados no labirinto radial e no labirinto aquático de Morris (TAYLOR; GREENE; MILLER, 2010). Dessa maneira, podem ser observados alguns prejuízos não motores que também estão relacionados com os estágios mais iniciais da DP. A deleção e a superexpressão de genes relacionados com as formas familiares da DP também representam abordagens utilizadas em modelos experimentais (CHESSELET, 2008).

Estudos mais recentes têm enfatizado a utilização de modelos experimentais em que as alterações (comportamentais e bioquímicas) ocorrem um processo lento e progressivo, mimetizando melhor a DP humana. Estes modelos podem ser úteis para definir processos precoces e tardios associados à degeneração neuronal e avaliar estratégias de neuroproteção em ambas as fases.

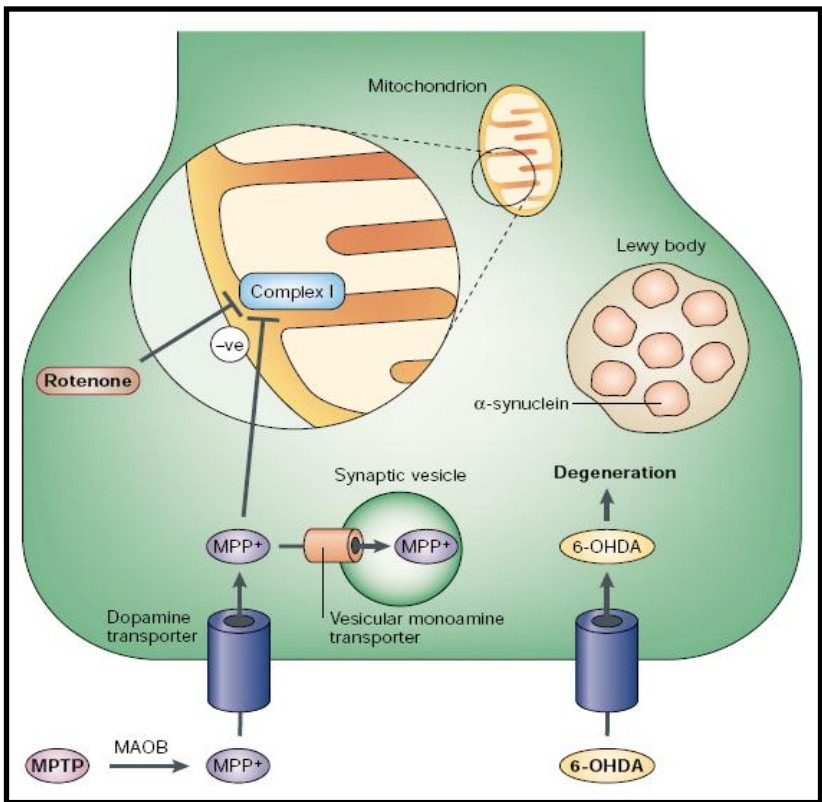


Figura 5: Mecanismos de ação responsáveis pela disfunção neuronal nas células dopaminérgicas produzida por neurotoxinas, retirado de (BEAL, 2001).

1.7.1 Modelo da administração de MPTP

Como descrito anteriormente, as características da DP podem ser mimetizadas, em maior ou menor escala, em animais de laboratório através da administração de diferentes compostos, como o MPTP (MEREDITH; SONSALLA; CHESSELET, 2008; TERZIOGLU; GALTER, 2008).

No início da década de 80, o MPTP foi identificado como contaminante presente na heroína, sendo responsável por alguns casos de parkinsonismo em usuários desta droga (LANGSTON et al., 1983). Os efeitos do MPTP são dependentes da espécie estudada, sendo que em

primatas (homens, macacos e babuínos) o MPTP induz sintomas e alterações neuroquímicas praticamente indistinguíveis da DP idiopática (LANGSTON et al., 1983; KOPIN; MARKEY, 1988). Já roedores (ratos e camundongos) parecem ser menos sensíveis à neurotoxicidade induzida pelo MPTP quando comparados aos primatas, além de não apresentarem toda a sintomatologia característica da DP. Em camundongos, os efeitos da administração sistêmica do MPTP são dependentes do regime de tratamento, da linhagem estudada, do gênero e da idade dos animais (SEDELIS et al, 2000; SCHMIDT; FERGER, 2001)

Assim como o observado na DP, a neurodegeneração induzida pelo MPTP parece envolver o processo de estresse oxidativo, sendo que camundongos transgênicos que apresentam expressão aumentada das enzimas Cu/Zn-superóxido dismutase e Mn-superóxido dismutase são mais resistentes aos danos oxidativos induzidos pelo MPTP (PRZEDBORSKI et al., 1992). Em contrapartida, os efeitos neurotóxicos do MPTP são exacerbados em camundongos que apresentam deficiência destas enzimas. Além disso, tem sido demonstrado que o tratamento com diferentes antioxidantes, como a vitamina E, β -caroteno e ácido ascórbico, é capaz de atenuar a neurotoxicidade induzida pelo MPTP em camundongos (PERRY et al, 1985).

1.7.1.1 Modelo da administração intranasal de MPTP

Como mencionado anteriormente, tem sido demonstrado o envolvimento de fatores ambientais na etiologia da DP. Neste sentido, tem sido hipotetizado que uma das portas de entrada no organismo das toxinas ambientais seria a cavidade nasal (“teoria da vetorização olfatória”) (DOTY, 2008). Dessa maneira, o modelo da administração i.n. de MPTP desenvolvido em nosso laboratório (PREDIGER et al., 2006; PREDIGER et al., 2009; PREDIGER et al., 2010) visa justamente reproduzir tanto a via de contato entre o organismo humano e as toxinas, quanto as características de toxicidade do MPTP com o avanço do processo neurodegenerativo e sintomas da DP, de acordo com a proposta de Braak e colaboradores (2003).

O modelo de administração de MPTP pela via i.n. parece reproduzir as características observadas durante as fases iniciais da DP (PREDIGER et al., 2006; PREDIGER et al., 2009; PREDIGER et al.,

2010). De acordo com a hipótese de Braak et al. (2003) e reproduzindo o quadro clínico da DP, ratos e camundongos submetidos a administração i.n. de MPTP apresentaram uma disfunção precoce na discriminação olfatória, reconhecimento social e memórias de procedimento e operacional no labirinto aquático de Morris (PREDIGER et al., 2006; PREDIGER et al., 2010). Além disso, a infusão i.n. de MPTP, tanto em ratos Wistar quanto em camundongos C57BL/6, causou significativa redução nos níveis da enzima tirosina hidroxilase no bulbo olfatório, no estriado e na substância negra, além de reduzir as concentrações de dopamina em algumas áreas cerebrais como bulbo olfatório, estriado e córtex pré-frontal, evidenciando neurodegeneração nas referidas regiões (PREDIGER et al., 2010).

Deve ser destacados que os prejuízos da função motora observados após a administração i.n. de MPTP variam de acordo com a espécie em estudo. Estudos prévios realizados em nosso laboratório demonstraram que ratos Wistar adultos jovens (3 meses de idade) apresentaram comprometimento da função motora quando avaliados no teste do campo aberto e caixa de atividade somente após duas a três semanas da administração i.n. de MPTP (PREDIGUER et al., 2006; MOREIRA et al., 2010). Em contraste, este efeito não foi verificado em camundongos adultos jovens (5 meses de idade) da linhagem C57BL/6 quando avaliados nas mesmas condições experimentais (PREDIGER et al., 2010).

Em adição, deve ser ressaltado que a via i.n. representa um método confiável e útil para a administração de medicamentos e toxinas com o intuito de atingir o SNC (DHURIA; HANSON; FREY, 2010). Vários são os mecanismos responsáveis por este transporte da via i.n. para o SNC, como nervos, vasos sanguíneos, fluido cefalorraquidiano e o sistema linfático. Esses componentes contornam os obstáculos impostos pela barreira hematoencefálica, para revisão recente ver (DHURIA; HANSON; FREY, 2010).

Considerando as informações descritas anteriormente, o presente estudo teve o intuito de investigar os efeitos do pré-tratamento com agmatina sobre as alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas pela administração i.n. de MPTP em camundongos envelhecidos. A agmatina foi escolhida por se tratar de uma substância endógena que apresenta alterações em sua concentração em ratos envelhecidos (LIU et al., 2008c) e que possui alguns efeitos protetores descritos contra diferentes modelos de dano ao SNC (DEMEHRI et al., 2003; KIM et al., 2004; ARICIOGLU; REGUNATHAN, 2005; Li et al., 2006). Aliado a isso, devem ser ressaltados os mecanismos de ação

dessa substância relacionados com sua ação mitocondrial, inibição da excitotoxicidade glutamatérgica e das isoformas I e II da NOS (FENG; PILETZ; LEBLANC, 2002; FENG; LEBLANC; REGUNATHAN, 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do pré-tratamento com agmatina sobre as alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas pelo tratamento i.n. com MPTP em camundongos envelhecidos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar os efeitos do pré-tratamento com agmatina no parâmetro ponderal dos animais;

Avaliar os efeitos do pré-tratamento com agmatina na porcentagem de sobrevivência dos animais após o tratamento i.n. com MPTP;

Avaliar os efeitos do pré-tratamento com agmatina nos prejuízos locomotores induzidos pela administração i.n. de MPTP através dos testes de caixa de locomoção e campo aberto;

Avaliar os efeitos do pré-tratamento com agmatina nos prejuízos cognitivos induzidos pela administração i.n. de MPTP avaliados no teste de reconhecimento social;

Investigar os efeitos do pré-tratamento com agmatina nos prejuízos neurológicos induzidos pela administração i.n. de MPTP através da utilização da escala de medida do Escore Neurológico de Severidade;

Investigar os efeitos do pré-tratamento com agmatina e da administração i.n. de MPTP na captação de glutamato em fatias hipocâmpais;

Investigar os efeitos da agmatina sobre a atividade *in vitro* das enzimas monoamino oxidase A e B .

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente trabalho foi realizado sob aprovação do comitê de ética para o uso de animais da Universidade Federal de Santa Catarina (PP00358/2009). O número de animais utilizado em cada experimento foi o mínimo necessário para a obtenção de resultados confiáveis com análises estatísticas adequadas.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, com 15 meses de idade e peso entre 25 e 35 gramas. Esses animais foram escolhidos por serem mais sensíveis a neurotoxicidade induzida pelo MPTP (SEDELIS et al., 2000; OOKUBO et al., 2009). Estudos têm mostrado que camundongos fêmeas nessa idade não possuem ciclo estral e apresentam baixos níveis de estradiol e progesterona, garantindo uma baixa variabilidade hormonal (FELICIO; NELSON; FINCH, 1984) que poderia interferir nos testes comportamentais (FELICIO; NELSON; FINCH, 1984; NELSON et al., 1995). Outro fator que motivou a utilização de fêmeas nessa idade é que em mulheres, a idade de início do aparecimento da DP se correlaciona com o fim da vida fértil, sendo que mulheres submetidas à ooforectomia antes da menopausa apresentam maiores chances de desenvolver a DP (ROCCA et al., 2008).

Os animais foram adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB-UNICAMP) com três meses de idade. Durante todo o período necessário até atingirem a idade para utilização nos experimentos (15 meses), os animais permaneceram no biotério do Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas (LEXDON) (BIO039), sendo que estes foram alojados em gaiolas plásticas (36 x 30 x 15 cm comprimento x largura x altura), cada uma contendo 15 camundongos. Durante todo o período (exceto durante a realização dos testes comportamentais), os animais tiveram livre acesso à água e comida. A temperatura ambiente manteve-se controlada em 23 ± 1 °C e ciclo de luz claro escuro de 12 h, com início às 7:00 h da manhã.

3.3 DROGAS

Foram utilizadas as seguintes drogas no presente estudo:

- Sulfato de agmatina (Sigma Chemical Co, USA);
- 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP HCl) (Sigma Chemical Co, USA);
- Salina (NaCl 0,9%, Sigma Chemical Co, USA), usado como veículo para dissolver a agmatina e o MPTP.

As doses utilizadas de agmatina e MPTP foram baseadas em estudos prévios da literatura, respectivamente (GADOTTI et al., 2006; PREDIGER et al., 2010).

3.4 TRATAMENTOS

O sulfato de agmatina foi administrado uma vez ao dia durante 5 dias consecutivos pela via intraperitoneal (i.p.) na dose de 30 mg/kg, na tentativa de estabelecer um pré-tratamento protetor perante a subsequente toxicidade induzida pela administração i.n. de MPTP. Durante esse período de tratamento com agmatina, o peso dos animais foi aferido para a verificação de possíveis efeitos da agmatina na motivação alimentar dos animais. No quinto dia, 1 h após a última administração de agmatina, os animais foram submetidos à administração i.n. da pró-neurotoxina MPTP (1 mg/narina), de acordo com o procedimento descrito por (DLUZEN; KEFALAS, 1996) e modificado em nosso laboratório (PREDIGER et al., 2010).

Os animais foram levemente anestesiados com isoflurano a 0,96% (0,75 CAM; Abbot Laboratórios do Brasil Ltda, RJ, Brasil) utilizando um sistema vaporizador (SurgiVet Inc., WI, EUA) e um pedaço de 7 mm de tubo PE-10 foi inserido pelas narinas. O tubo foi conectado a uma bomba peristáltica programada para realizar uma infusão de 12,5 µl/min, como pode ser observado na Figura 6. O MPTP foi dissolvido em NaCl 0,9% na concentração de 20 mg/ml, após o qual foi infundido durante 4 min (1 mg/narina). A solução controle consistiu de salina administrada pela via i.n.. Após um intervalo de 1 min para os animais recuperarem a função respiratória normal esse procedimento foi repetido com infusão através da narina contralateral.

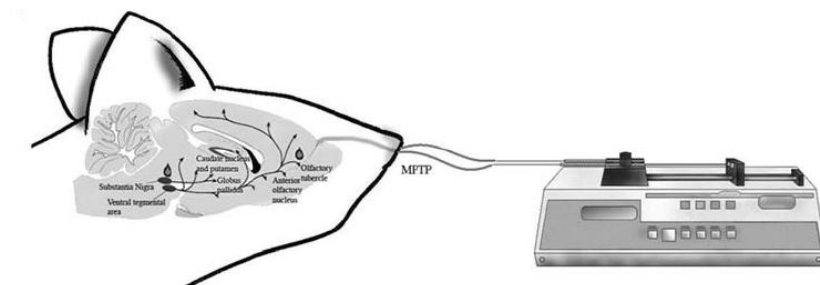


Figura 6: Esquema do procedimento utilizado para a administração i.n. de MPTP (1 mg/narina) em camundongos (PREDIGER et al., 2010).

3.5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Após a administração i.n. do MPTP, os animais foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais para avaliação de suas funções motoras, cognitivas e neurológica, e ao final de 21 dias estes foram sacrificados para a realização de experimentos neuroquímicos, como pode ser visualizado na Figura 7.

3.6 ANÁLISE DA PORCENTAM DE SOBREVIDA

Durante todo o protocolo experimental a porcentagem de sobrevivida dos animais foi avaliada. Nos cinco dias de pré-tratamento com agmatina nenhum óbito foi verificado nos grupos experimentais. Após o tratamento i.n. com MPTP, o acompanhamento do número de mortes foi realizado até o vigésimo primeiro dia, para posterior montagem da curva de sobrevivida (FERNANDES et al., 2009).

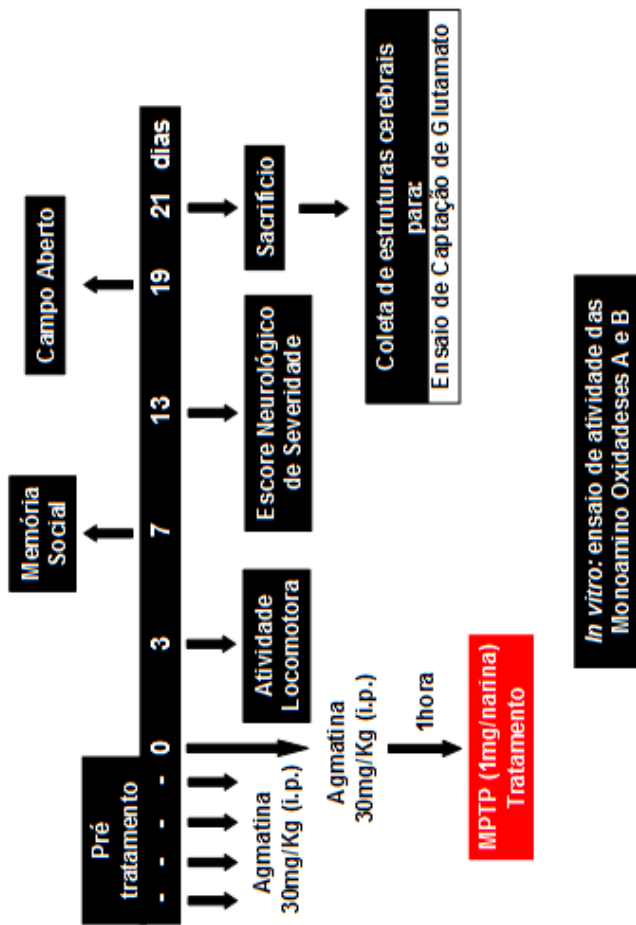


Figura 7: Esquema dos procedimentos realizados durante o protocolo experimental.

3.7 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.7.1 Teste da caixa de locomoção

A atividade locomotora dos animais foi medida por um sistema automatizado de monitoramento de vídeo, três dias após a administração i.n. de MPTP. A caixa era feita de plástico preto ($25 \times 25 \times 15$ cm, iluminação de 12 lux). Uma câmera foi posicionada em cima da caixa, sendo conectada a um gravador de DVD para gravar a locomoção dos animais. Os vídeos foram analisados no software ANY Maze (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) para determinar a atividade locomotora, que foi expressa como a distância total percorrida (m) e, como a velocidade média (m/s) durante um período de cinco minutos (HICKEY et al., 2008).

3.7.2 Teste do reconhecimento social

A memória social de curto prazo foi avaliada sete dias após a administração i.n. de MPTP através do teste de reconhecimento social descrita por (DANTZER et al., 1987) e padronizada previamente em nosso laboratório (PREDIGER *et al.*, 2004; PREDIGER et al., 2005a; PREDIGER et al., 2005b; XIKOTA et al., 2008; PREDIGER et al., 2010). O teste foi realizado pelo mesmo avaliador em uma sala de observação aonde os animais foram habituados por pelo menos 1 h antes do início do teste. Camundongos jovens (um mês de idade) da linhagem C57BL/6 foram mantidos em grupos de 10 por gaiola e serviram como estímulos sociais para os camundongos adultos. Os animais jovens foram isolados em gaiolas durante 20 minutos antes do início do experimento. A tarefa de reconhecimento social consiste em duas apresentações sucessivas (5 minutos cada), separadas por um curto período de tempo, onde o camundongo jovem foi colocado na gaiola do camundongo idoso e o tempo gasto pelos idosos em investigar o jovem foi gravado. No final da primeira apresentação, o jovem foi removido e mantido em uma gaiola individual durante o período de intervalo e re-exposto ao camundongo adulto após 30 min. O intervalo de 30 min entre as duas apresentações do mesmo jovem foi utilizado para demonstrar possíveis prejuízos na memória social induzidos pelo MPTP, uma vez que normalmente roedores adultos são capazes de reconhecerem animais

jovens familiares após este curto espaço de tempo (DANTZER et al., 1987). Os resultados foram expressos pela Razão de Duração da Investigação (RDI) (Prediger et al. 2004). O RDI consiste na razão entre o tempo de investigação (em s) gasto durante a segunda exposição e o tempo de investigação (em s) gasto durante a primeira exposição do animal jovem. Valores de RDI próximos de um (01) são sugestivos de prejuízos nesse tipo de memória, pois indicam que os tempos de investigação durante as duas apresentações foram semelhantes. Já valores de RDI abaixo de um (01) sugerem que o camundongo idoso foi capaz de reconhecer o jovem, apresentando uma redução no tempo de investigação durante a segunda apresentação do jovem familiar.

3.7.3 Avaliação do Escore Neurológico de Severidade

Treze dias após a administração i.n. de MPTP, os camundongos foram submetidos ao Escore Neurológico de Severidade (ENS) que pode ser visualizado na Figura 8. Este consiste em uma escala composta de tarefas projetada para medir o estado neurológico geral de roedores, como descrito anteriormente (FLIERL et al., 2009) e padronizado recentemente em nosso laboratório (SCHWARZBOLD et al., 2010). Os animais foram avaliados no ENS através dos parâmetros apresentados na Tabela 1. Se o camundongo apresentou falha em algum desses parâmetros, o valor de um (01) foi adicionado ao escore total. Valores mais altos no ENS indicam um maior comprometimento neurológico do animal (SCHWARZBOLD et al., 2010).

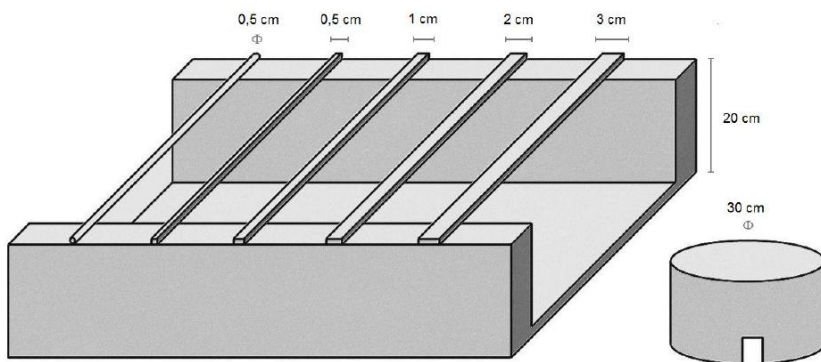


Figura 8: Equipamento utilizado para avaliação do Escore Neurológico de Severidade de camundongos (Schwarzbold et al., 2010).

Tabela 1: Parâmetros avaliados no Escore Neurológico de Severidade (ENS)

1. Presença de paresia
2. Inabilidade em andar em linha reta
3. Perda do comportamento exploratório
4. Falha em sair do círculo (até 3 min)
5. Inabilidade em andar na trave de 3 cm (até 2 min)
6. Inabilidade em andar na trave de 2 cm (até 2 min)
7. Inabilidade em andar na trave de 1 cm (até 2 min)
8. Inabilidade em se equilibrar na trave 0,7 cm (até 10 s)
9. Inabilidade em se equilibrar na trave redonda (até 10 s, 3 tentativas)
10. Perda do reflexo de sobressalto

3.7.4 Teste do campo aberto

Dezenove dias após a administração i.n. de MPTP, a atividade locomotora dos animais foi novamente avaliada, desta vez através da utilização do teste do campo aberto de acordo com a metodologia descrita anteriormente (PREDIGER et al., 2008). Os camundongos foram colocados no centro de uma arena de acrílico (50 x 50 cm, paredes transparentes, piso preto dividida em 9 quadrantes de tamanho igual demarcados por linhas brancas, iluminação de 12 lux) e podiam explorá-la livremente durante 5 min. O número total de quadrantes cruzados e atos de levantar foram registrados como índices de locomoção e atividade exploratória, respectivamente.

3.8 ENSAIO *EX VIVO*

3.8.1 Avaliação do efeito da agmatina e da administração i.n. de MPTP na captação hipocampal de glutamato

Preparação e incubação das fatias hipocampais

Após os vinte e um dias de avaliação comportamental, os animais foram mortos por decapitação e o hipocampo foi rapidamente removido e mantido em tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRB = NaCl 122 mM; KCl 3 mM; CaCl₂ 1,3 mM; MgSO₄ 1,2 mM; KH₂PO₄ 0,4 mM; NaHCO₃ 25 mM; D-glicose 10 mM) gelado e gaseificado com carbogênio (95% O₂ - 5% CO₂) para atingir o pH 7,4. As fatias (0,4 mm de espessura) foram obtidas utilizando-se um fatiador de tecidos McIlwain e pré-incubadas em tampão KRB por 30 min a 37°C, sendo gaseificadas com carbogênio. Fatias controle foram incubadas por 1 hora no tampão KRB e gaseificadas com carbogênio.

Avaliação da captação de glutamato em fatias hipocampais

A captação de glutamato foi realizada conforme metodologia previamente descrita (FRIZZO et al., 2002). As fatias de hipocampo foram pré-incubadas por 15 minutos a 35°C, em solução salina balanceada de Hanks (HBSS = CaCl₂ 1,29 mM, NaCl 136,9 mM, KCl 5,36 mM, MgSO₄ 0,65 mM, Na₂HPO₄ 0,27 mM, KH₂PO₄ 1,1 mM, D-glicose 2 mM e Hepes 5 mM). A captação iniciou-se com a adição de

100 μM de glutamato, permanecendo por 7 minutos. A incubação foi terminada com a retirada do meio de captação e as fatias foram lavadas duas vezes com 1 ml de HBSS gelado. Em seguida, 300 μl de uma solução de NaOH 0,1 N/SDS 0,01% foram adicionados para solubilização das fatias. Após completa solubilização, os lisados foram utilizados para determinação do conteúdo intracelular de glutamato fluorimetricamente. A captação de glutamato foi corrigida para a união não-específica em ensaios realizados na ausência de íons sódio.

3.9 ENSAIO *IN VITRO*

3.9.1 Avaliação do efeito da agmatina na atividade das enzimas MAO-A e MAO-B

A agmatina foi testada quanto ao seu potencial inibitório *in vitro* sobre as atividades das enzimas MAO-A e de MAO-B mitocondrial em homogenatos de cérebro total de camundongos C57BL/6 fêmeas com 15 meses de idade pelo método fluorimétrico usando como substrato cinuramina, como descrito anteriormente (MATSUMOTO et al., 1985; SANT' ANNA et al., 2009). Os ensaios foram realizados em duplicata em um volume final de 500 μl contendo 0,25 mg de proteína e incubados a 37°C por 30 min. Atividades das isoformas A e B foram isoladas farmacologicamente incorporando 250 nM de selegilina (inibidor seletivo da MAO-B) ou 250 nM de clorgiline (inibidor selectivo da MAO-A) na reação. A mistura de reação (contendo frações mitocondriais, agmatina e inibidores) foi incubada a 37°C por 5 min e a reação foi iniciada pela adição de 50 μl de cinuramina (90 mM para MAO-A e 60 mM para a MAO-B). A agmatina foi testada em um intervalo de concentração de 0,01-1000 mM. Os resultados foram expressos em porcentagem de controle (tubo sem agmatina).

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas dos resultados obtidos nos testes das atividades locomotoras, memória social e captação de glutamato foram realizadas por análise de variância (ANOVA) fatorial de duas vias. A análise do peso dos animais foi realizada por ANOVA de duas vias com medidas repetidas. Posteriormente, esse conjunto de resultados teve os grupos comparados entre si empregando-se o teste post-hoc de Newman-Keuls. A análise estatística das curvas de sobrevida foi realizada com o teste de Mantel-Cox (log-rank). Posteriormente, os grupos foram comparados entre si empregando-se o teste post-hoc de Gehan-Breslow-Wilcoxon. A análise estatística da atividade das enzimas MAO-A e MAO-B foi realizada pelo Test “t” de Student. O Escore Neurológico de Severidade foi analisado estatisticamente pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Posteriormente, os grupos foram comparados entre si empregando-se o teste post-hoc de Dunn’s. A probabilidade aceita como indicativo da existência de diferença estatisticamente significativa foi de $P < 0,05$. As análises estatísticas foram efetuadas utilizando-se o pacote estatístico GraphPadPrism 5.

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DO TRATAMENTO COM AGMATINA SOBRE O PESO DOS ANIMAIS

A Figura 9 mostra o efeito da administração repetida de agmatina (30 mg/kg, i.p.) sobre o peso dos animais durante os cinco dias de tratamento. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não revelou alterações significativas no peso dos animais durante os cinco dias de tratamento [$F(4, 240)=1,66, P=0,16$]. Portanto, o presente tratamento com a agmatina não alterou significativamente o peso dos animais.

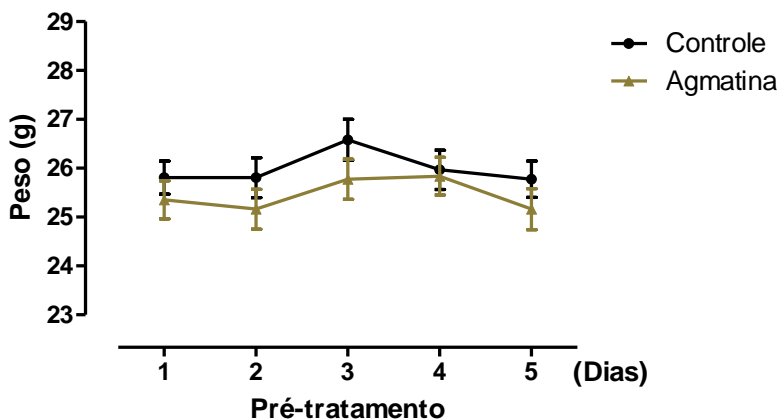


Figura 9: Efeito da administração repetida de agmatina (30 mg/kg, i.p.) ou solução controle durante 5 dias consecutivos no peso (em g) dos animais. As linhas representam o peso dos animais (média±E.P.M.) no decorrer dos cinco dias de tratamento.

4.2 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM AGMATINA E DA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE MPTP SOBRE A PORCENTAGEM DE SOBREVIDA DOS ANIMAIS

O número de óbitos foi registrado durante os 26 dias de protocolo experimental (5 dias de tratamento com agmatina somados aos 21 dias de avaliação comportamental). Nos 5 dias iniciais não foram observados eventos de morte em nenhum dos grupos experimentais (dados não mostrados). Durante os 21 dias subsequentes à administração i.n. do MPTP, ocorreram óbitos nos diferentes grupos que foram registrados para posterior montagem das curvas de sobrevida, que podem ser observadas na Figura 10.

A porcentagem de sobrevida foi menor no grupo controle/MPTP quando comparada aos demais grupos [Log-rank Mantel-Cox test ($P < 0,05$) seguido por Gehan-Breslow-Wilcoxon Test]. Realizando-se a análise estatística ponto a ponto percebe-se que o tratamento com MPTP reduz de maneira significativa a porcentagem de sobrevivência quando comparado aos grupos que não foram infundidos com MPTP. Esse perfil ocorre após o 1º dia da administração i.n. de MPTP e se mantém até o 13º dia, [Log-rank Mantel-Cox test ($P < 0,05$) seguido por Gehan-Breslow-Wilcoxon Test]. Após o 14º dia, verifica-se um efeito protetor da agmatina perante a administração i.n. de MPTP, evidenciado por uma maior porcentagem de sobrevida do grupo agmatina/MPTP quando comparado ao grupo controle/MPTP [Log-rank Mantel-Cox test ($P < 0,05$) seguido por Gehan-Breslow-Wilcoxon Test].

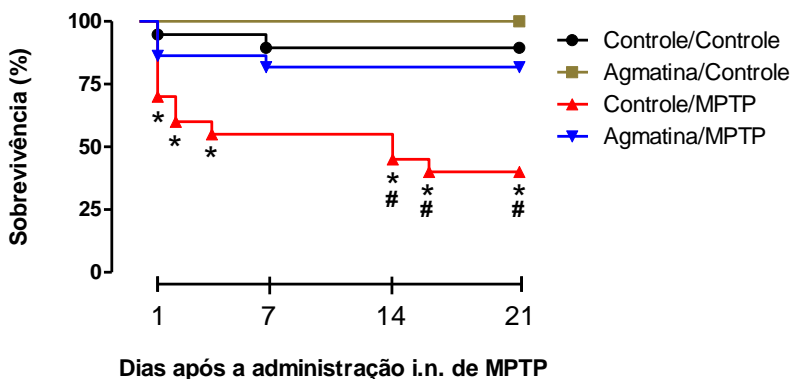


Figura 10: Efeito do pré-tratamento com agmatina (30 mg/kg, i.p.) e do tratamento i.n. com MPTP (1 mg/narina) na porcentagem de sobrevivência dos animais. As linhas representam a porcentagem de sobrevivência dos animais no transcorrer dos vinte e um dias após a administração de MPTP intranasal. * $P < 0,05$ comparado à porcentagem de sobrevivência dos grupos controle. # $P < 0,05$ comparado à porcentagem de sobrevivência do grupo agmatina/MPTP (Teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon).

4.3 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM AGMATINA E DA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE MPTP SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA DOS ANIMAIS AVALIADA NA CAIXA DE LOCOMOÇÃO

Três dias após a administração i.n. de MPTP (1 mg/narina) foi avaliada a atividade locomotora dos animais na caixa de locomoção. Como pode ser observado na Figura 11, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nos parâmetros de distância total [$F(1, 33)=0,28, P=0,60$] e velocidade média [$F(1, 33)=0,28, P=0,60$] entre os diferentes grupos experimentais, avaliados por ANOVA fatorial de duas vias.

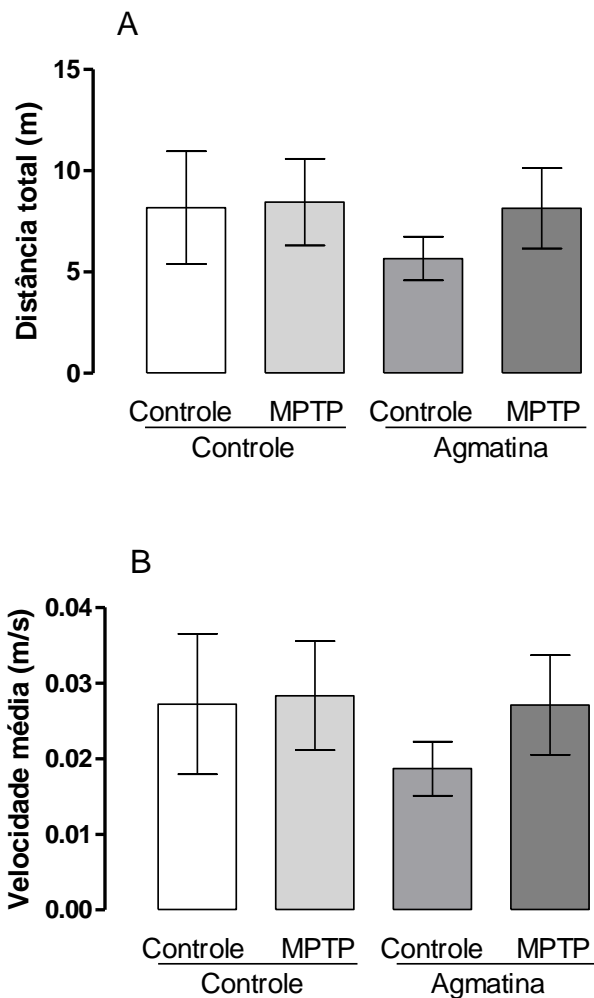


Figura 11: Efeito do pré-tratamento com agmatina (30 mg/kg, i.p.) e do tratamento i.n. com MPTP (1 mg/narina) na atividade locomotora dos camundongos avaliada na caixa de locomoção. As barras verticais representam (média±E.P.M) (a) distância percorrida e (b) velocidade média durante uma avaliação de cinco minutos.

4.4 INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM AGMATINA E DA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE MPTP SOBRE A MEMÓRIA SOCIAL DE CAMUNDONGOS

A Figura 12 ilustra o efeito do pré-tratamento com agmatina (30 mg/kg) e do tratamento i.n. com MPTP (1 mg/narina) sobre o desempenho dos animais no teste do reconhecimento social. A ANOVA fatorial de duas vias indicou que o tratamento com MPTP prejudicou a capacidade de reconhecimento dos camundongos adultos, indicado por um aumento no RDI que ficou mais próximo de 01, sendo estatisticamente diferente quando comparado ao grupo controle [$F(1, 29)=20,72, P<0,05$]. O pré-tratamento com agmatina promoveu uma redução significativa no RDI dos animais infundidos com MPTP [$F(1, 29)=10,32, P<0,05$], sugerindo uma proteção contra os prejuízos na memória social induzidos pelo MPTP (Figura 12).

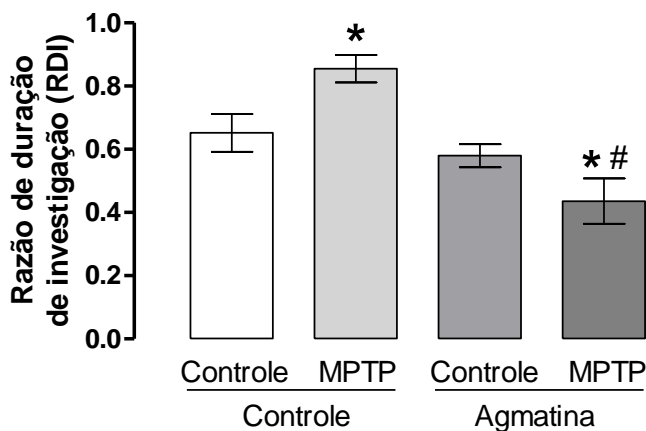


Figura 12: Influência do pré-tratamento com agmatina (30 mg/kg, i.p.) e do tratamento i.n. com MPTP (1 mg/narina) sobre a memória social dos camundongos. Razão de duração de investigação (RDI). As barras verticais representam (média±E.P.M). RDI (a razão entre o tempo de investigação na segunda exposição e o tempo de investigação na primeira exposição). * $P<0,05$ comparado ao grupo controle/controle. # $P<0,05$ comparado ao grupo controle/MPTP (Teste de Newman-Keuls).

4.5 AÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO COM AGMATINA E DA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE MPTP SOBRE O ESCORE NEUROLÓGICO DE SEVERIDADE DE CAMUNDONGOS

Quando submetidos ao ENS, os camundongos do grupo controle/MPTP evidenciaram prejuízos neurológicos gerais por apresentarem uma maior pontuação na escala quando comparado ao grupo controle/controle, como pode ser observado na Figura 13 [Kruskal-Wallis test ($P < 0,05$), *post hoc* Dunn`s]. O pré-tratamento com agmatina mostrou-se eficaz em proteger os animais do aparecimento de tais prejuízos induzidos pelo MPTP, pois apresentaram o mesmo nível de escore quando comparado ao grupo controle/controle e significativamente inferior quando comparado ao grupo controle/MPTP [Kruskal-Wallis test ($P > 0,05$), *post hoc* Dunn`s].

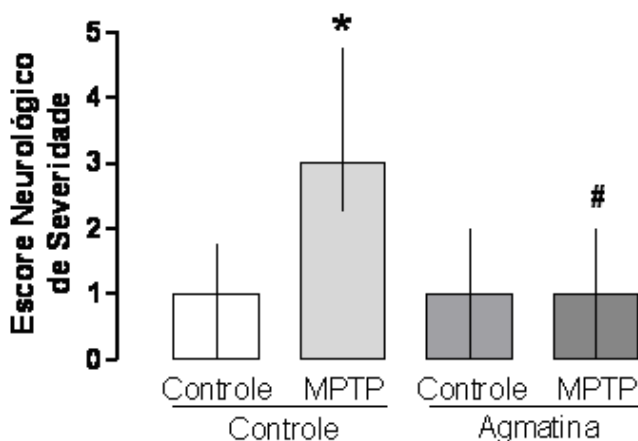


Figura 13: Ação do pré-tratamento com agmatina (30 mg/kg, i.p.) e do tratamento i.n. com MPTP (1 mg/narina) no Escore Neurológico de Severidade em camundongos. Os dados estão representados por mediana e intervalo interquartil. Um maior escore indica um maior comprometimento neurológico, até o máximo de 10 pontos. * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle/controle. # $P < 0,05$ comparado ao grupo controle/MPTP (Teste de Dunn`s).

4.6 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM AGMATINA E DO TRATAMENTO INTRANASAL COM MPTP NA ATIVIDADE MOTORA EM CAMUNDONGOS AVALIADA NO CAMPO ABERTO

O tratamento com MPTP pela via i.n. gerou uma redução significativa no número de cruzamentos [$F(1, 41)=5,86, P<0,05$] quando comparado ao grupo controle 19 dias após sua infusão, porém não ocorreu a interação com o pré-tratamento agmatina [$F(1, 41)=1,26, P=0,27$] (Figura 14A). Em relação ao número de levantamentos, o tratamento com MPTP também promoveu uma redução significativa nesse parâmetro [$F(1, 41)=6,70, P<0,05$], sendo que o pré-tratamento com agmatina foi capaz de prevenir esta redução no número de levantamentos induzido pela administração i.n. de MPTP [$F(1, 41)=4,23, P<0,05$] (Figura 14B).

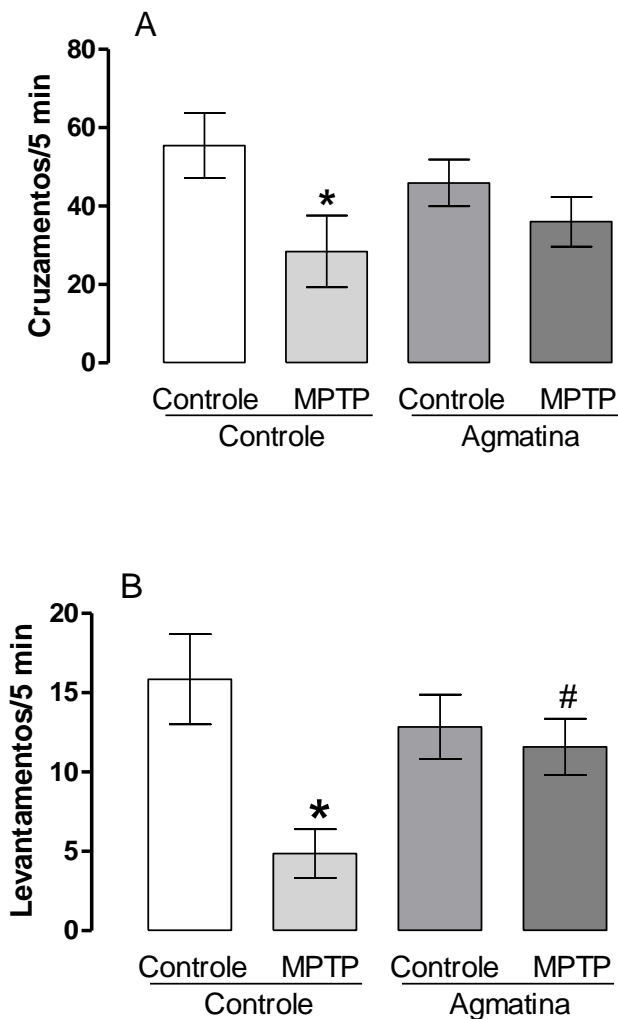


Figura 14: Influência do pré-tratamento com agmatina (30 mg/kg, i.p.) e do tratamento i.n. com MPTP (1 mg/narina) na atividade motora avaliada no teste do campo aberto. Os dados estão representados por média \pm E.P.M. (a) cruzamentos e (b) levantadas durante uma avaliação de cinco minutos. * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle/controle.

$P < 0,05$ comparado ao grupo controle/MPTP (Teste de Newman-Keuls).

4.7 EFEITO DA AGMATINA E DA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DO MPTP NA CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO EM FATIAS HIPOCAMPAIS

Como ilustrado na Figura 15, o tratamento i.n. com MPTP diminuiu a captação de glutamato em fatias hipocampais vinte e um dias após sua administração quando comparado ao grupo controle [$F(1,14) = 5,16$, $P < 0,05$]. No entanto, não ocorreu interação entre o pré-tratamento com agmatina e o tratamento com MPTP [$F(1,14) = 2,62$, $P = 0,70$].

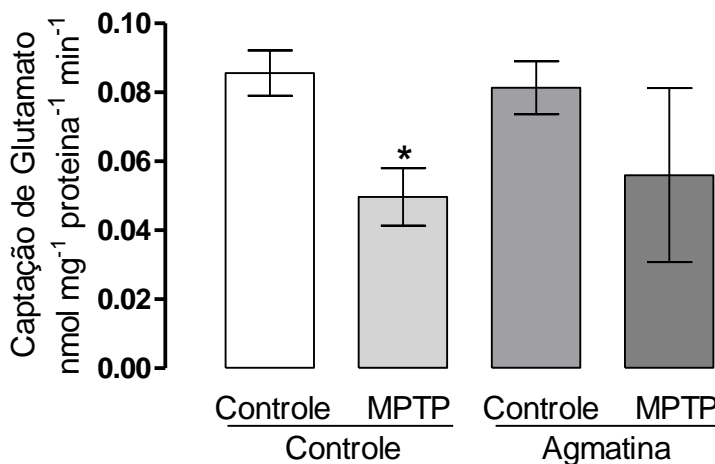


Figura 15: Influência do pré-tratamento com agmatina (30 mg/kg, i.p.) e do tratamento i.n. com MPTP (1 mg/narina) na captação de glutamato em fatias hipocampais de camundongos C57BL6 fêmeas com 15 meses de idade. Os dados estão representados pela média \pm E.P.M. * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle/controle.

4.8 EFEITO DA AGMATINA SOBRE A ATIVIDADE *IN VITRO* DAS ENZIMAS MONOAMINO OXIDASES A E B

Como pode ser observado na Figura 16, a agmatina não inibiu em nenhuma concentração testada, a atividade das enzimas monoamino

oxidase A [$t=1,30$; $P = 0,25$; Teste “t” de Student] e monoamino oxidase B [$t=0,96$; $P = 0,38$; Teste “t” de Student], quando comparadas ao grupo controle. Dessa maneira a agmatina não interfere com a metabolização do MPTP a MPP^+ .

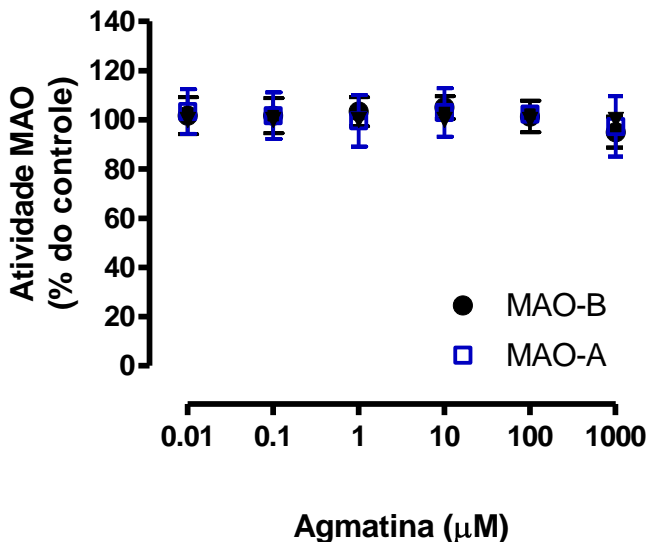


Figura 16: Efeito da agmatina (0,01 – 1000 μM) sobre a atividade das enzimas monoamino oxidases A e B *in vitro*. Os dados estão representados por porcentagem de atividade comparada ao grupo controle e foram obtidos a partir de experimentos em duplicata.

5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo confirmam achados prévios do nosso grupo (PREDIGER et al., 2010) demonstrando que a administração i.n. de MPTP promove alterações da memória operacional em camundongos. Além disso, os presentes resultados indicam pela primeira vez uma maior susceptibilidade de camundongos envelhecidos (15 meses de idade) fêmeas aos prejuízos motores induzidos pela administração i.n. de MPTP. De maior destaque, o presente estudo sugere de maneira inédita o efeito protetor do tratamento repetido com agmatina sobre os prejuízos cognitivos, motores e neurológicos induzidos pela administração i.n. de MPTP em camundongos.

No presente estudo, foi demonstrado que a agmatina possui duas características importantes que devem ser ressaltadas. A primeira é que a agmatina não interfere com a cinética de metabolização do MPTP, uma vez que não inibiu a atividade das enzimas monoamino oxidases A e B, permitindo dessa maneira que o MPTP seja convertido no seu metabólito ativo MPP^+ e exerça sua neurotoxicidade esperada. A segunda é que a agmatina previne de modo eficiente a morte dos animais, aumentando a porcentagem de sobrevivência, além de não interferir com o peso dos mesmos durante o período de tratamento.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que o tratamento repetido durante 5 dias com agmatina por via i.p. não gerou alterações no peso nos animais, sugerindo um padrão normal de ingestão alimentar. Além disso, trabalhos prévios da literatura demonstraram que o tratamento repetido com agmatina (uma vez ao dia durante 7 dias), através de cânula guia implantada no terceiro ventrículo não gerou prejuízos na atividade locomotora dos animais (KOTAGALE et al., 2010; LIU et al., 2008a).

Os sistemas de neurotransmissão dopaminérgico e glutamatérgico estão amplamente distribuídos em diversas regiões encefálicas como córtex, sistema límbico e núcleos da base, nos quais atuam de maneira integrada para realizar funções na motivação e no processamento de informações associativas (KELLEY, et al., 2003). Acredita-se que a atividade neural coordenada entre esses dois sistemas seja realizada principalmente através dos receptores D1 para dopamina e NMDA para glutamato. Esses receptores estão relacionados a eventos como transdução de sinal e transcrição gênica que conduzem a alterações de

longa duração na expressão de genes, plasticidade sináptica e, conseqüentemente, a comportamentos relacionados com os sistemas citados (KELLEY, et al., 2003).

Trabalhos anteriores já investigaram se o bloqueio dos receptores NMDA causaria algum tipo de prejuízo no aprendizado instrumental alimentar. Nestas pesquisas, experimentos foram realizados para investigar o comportamento alimentar dos animais e sua atividade locomotora, uma estratégia para validar os resultados do aprendizado. A administração de AP-5 (antagonista do receptor NMDA para glutamato) no núcleo central da amígdala gerou prejuízos nos padrões de ingestão alimentar e também na atividade locomotora, apesar de outros trabalhos não evidenciarem tais características em diferentes regiões cerebrais, apenas mostrando prejuízo no aprendizado instrumental (GALLAGHER; SCHOENBAUM, 1999; ABEL; LATTAL, 2001).

Desta maneira, a neurotransmissão envolvida com o comportamento de ingestão alimentar, bem como a atividade locomotora dos animais, parece não estar diretamente afetada devido ao tratamento repetido com a agmatina. Portanto, a agmatina parece apresentar uma ação moduladora prevalente, não evidenciando prejuízos comportamentais *per se*. Essa característica moduladora já foi confirmada em diferentes estudos. No labirinto aquático de Morris, a agmatina gerou benefícios na memória espacial de trabalho e não interferiu com a memória espacial de referência (LIU; BERGIN, 2009). Os níveis endógenos de agmatina mostraram-se aumentados no hipocampo de ratos submetidos a esse mesmo teste, sugerindo uma relevância da liberação desta substância nesse tipo de aprendizado espacial. De maneira importante, nos animais submetidos somente a tarefa de nadar tal aumento não foi verificado (LIU et al., 2008b). Outro trabalho observou um efeito facilitador da agmatina na consolidação no teste da esQUIVA inibitória do tipo step-down quando administrada imediatamente após a sessão de condicionamento, porém, não foi observado o mesmo efeito na aquisição da memória, isto é, quando administrada uma hora antes da sessão de treino (ARTENI et al., 2002).

Outros efeitos benéficos da agmatina já foram evidenciados em trabalhos que avaliaram suas ações em parâmetros de emocionalidade. Em testes utilizados para a avaliação de propriedades ansiolíticas de substâncias, a agmatina mostrou esse caráter no labirinto em cruz elevado, na caixa claro escuro, no teste de conflito de Voegel e na interação social (LAVINSKY; ARTENI; NETTO, 2003; GONG et al.,

2006). Quando avaliada sua propriedade antidepressiva, a agmatina mostrou-se efetiva tanto no teste de suspensão pela cauda quanto no teste do nado forçado (GONG et al., 2003). Além disso, no teste do nado forçado, a agmatina foi capaz de potencializar o efeito de antidepressivos clássicos como a fluoxetina e a paroxetina (KRASS et al., 2008). De maneira importante, substâncias que aumentam os níveis endógenos de agmatina como a L-arginina, o inibidor de ornitina descarboxilase entre outros, apresentaram o mesmo efeito no referido teste (TAKSANDE et al., 2009).

Através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa um grupo de pesquisadores neozelandeses quantificou os níveis de agmatina em diversas regiões cerebrais. Tal estudo evidenciou diminuição dos níveis de agmatina na região CA1 do hipocampo e no córtex pré-frontal de ratos idosos (LIU et al., 2008c). No entanto, este mesmo estudo verificou aumento dos níveis de agmatina no giro denteado, nos córtices entorrinal, perirrinal e temporal dos ratos envelhecidos (Liu et al., 2008c)

Por se tratar de uma substância endógena com características moduladoras e que o envelhecimento altera suas concentrações em diferentes regiões cerebrais buscou-se avaliar os efeitos do tratamento repetido com agmatina em um modelo experimental da DP aplicado em animais envelhecidos. De maneira interessante, embora o envelhecimento represente o principal fator de risco para o desenvolvimento da DP, poucos estudos utilizando modelos experimentais da DP têm sido conduzidos em animais envelhecidos, sendo esta uma importante limitação dos estudos pré-clínicos na DP.

O pré-tratamento com agmatina foi realizado na tentativa de observar os efeitos moduladores e protetores no modelo de administração i.n. de MPTP em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com 15 meses de idade. Conforme já descrito anteriormente, a toxicidade do MPTP aumenta com o envelhecimento, bem como já foi evidenciado que camundongos fêmeas são mais sensíveis a toxicidade induzida pelo MPTP (ANTZOULATOS et al., 2010; DESOLE et al., 1993; OVADIA; ZHANG; GASH, 1995). Entretanto, deve ser mencionado que existem resultados contraditórios na literatura mostrando uma maior sensibilidade de camundongos machos à toxicidade induzida pelo MPTP (SEDELIS et al., 2000). Outro ponto importante que pode contribuir para o aumento da toxicidade do MPTP, é que a expressão da enzima MAO-B encontra-se aumentada em diversas regiões cerebrais incluindo núcleos da rafe, lócus coeruleus e núcleo paraventricular do tálamo em roedores idosos (SAURA;

RICHARDS; MAHY, 1994), possivelmente elevando a biotransformação central do MPTP, gerando uma maior taxa de MPP⁺ circulante no SNC.

Devido a sua alta lipossolubilidade, o MPTP se difunde rapidamente pelas barreiras celulares sendo convertido a sua forma tóxica MPP⁺ principalmente em astrócitos através da ação da enzima MAO-B. O MPP⁺ é uma toxina que possui uma toxicocinética rápida e eficaz, sendo que em ratos a mesma pode atingir sua concentração cerebral máxima 90 minutos após administração sistêmica (JACKSON-LEWIS; PRZEDBORSKI, 2007). De acordo com resultados prévios da literatura (GILAD et al., 2005), no presente estudo confirmou-se que a agmatina não interfere com a cinética de biotransformação do MPTP, permitindo que este seja convertido em MPP⁺ e exerça a sua esperada toxicidade sobre neurônios dopaminérgicos.

No presente estudo, verificou-se que o pré-tratamento com agmatina foi capaz de prevenir a redução na porcentagem de sobrevivência dos animais tratados com MPTP. A análise da porcentagem de sobrevivência mostra também que o pré-tratamento com agmatina não foi capaz de prevenir a toxicidade aguda induzida pelo MPTP. Os efeitos tóxicos verificados nos momentos iniciais após a administração do MPTP parecem estar relacionados com ações periféricas da toxina sobre o sistema cardiovascular e na indução de hipotermia (FREYALDENHOVEN; ALI.; HART, 1995). De maneira importante, tem sido demonstrado que mesmo após a administração pela via i.n., uma parcela da droga é deglutida pelos animais sendo distribuída periféricamente (DHURIA; HANSON; FREY II, 2010). Dessa maneira, uma liberação excessiva de noradrenalina seria gerada por ação do MPTP/MPP⁺, seguida de sua depleção nos terminais nervosos simpáticos (FULLER *et al.*, 1984; LUTHMAN; JONSSON, 1986). A liberação excessiva de noradrenalina gera um quadro de superestimulação cardíaca, promovendo também uma vasoconstrição generalizada, culminando com um colapso cardiovascular. Estudos prévios em órgão isolado demonstraram que a agmatina não foi capaz de interferir com a ação da noradrenalina (GONZALEZ et al., 1996; ÖZYAZGAN et al., 2003). Além disso, a agmatina não exibiu efeitos *per se* na temperatura retal de roedores. Pelo contrário, em quadros de hipertermia induzida por lipopolissacarídeo (LPS), apresentou ações de reduzir a temperatura por inibir a produção de nitritos e a morte neuronal induzida pelo LPS (ABE; ABE; SAITO, 2000; ARICIOGLU;

REGUNATHAN,, 2005; RAWLS; AMIN; ZISK, 2007). De acordo com a literatura e com os dados de sobrevivência do estudo atual, a agmatina parece não atuar na toxicidade periférica aguda do MPTP.

O efeito da agmatina em diminuir a mortalidade induzida pelo tratamento com MPTP foi verificado somente após 14 dias da administração i.n. desta toxina, evidenciando ação protetora em algum alvo que possua efeitos relacionados com a toxicidade desencadeada pelo MPP⁺ a longo prazo. Ao término dos 26 dias do protocolo experimental, o grupo agmatina/MPTP apresentou 81% de sobrevida, o que é significativamente maior do que 40% do grupo controle/MPTP.

Tanto o MPP⁺ quanto o pesticida rotenona possuem como mecanismo desencadeador de toxicidade a inibição irreversível do complexo I mitocondrial. Essa ação gera efeitos de desestabilizar as funções mitocondriais levando a produção de radicais livres, ativação de vias apoptóticas entre outros mecanismos já citados (BEAL, 2001). Um trabalho recente utilizando a rotenona demonstrou que a agmatina pode atuar nestes parâmetros e desta maneira reduzir a sua neurotoxicidade (CONDELLO et al., 2010). Nesse mesmo estudo, quando testada em cultura de células SH-SY5Y, a agmatina foi capaz de prevenir parcialmente alterações no potencial de membrana mitocondrial, formação de radicais livres, ativação de vias apoptóticas e aumentou a viabilidade celular induzidas pela rotenona (CONDELLO et al., 2010). Desta forma, no presente estudo a agmatina pode ter atuado na manutenção das funções mitocondriais perante a toxicidade do MPTP/MPP⁺ e retardar os prejuízos comportamentais observados, além de aumentar a porcentagem de sobrevida dos animais. Entretanto experimentos adicionais são necessários para confirmar esta hipótese que até o momento é meramente especulativa.

Diversos trabalhos têm investigado os mecanismos bioquímicos envolvidos com a toxicidade induzida pelo MPTP (PERRY et al., 1985; PRZEDBORSKI et al., 1992; FRANCO et al., 2007). Neste sentido, o envolvimento dos sistemas glutamatérgico e nitrérgico vem sendo caracterizado nesse modelo experimental de DP. Estudos em cultura de células já evidenciaram o componente glutamatérgico na toxicidade induzida pelo MPTP através de prejuízos na captação de glutamato em astrócitos (HAZELL et al., 1997; DI MONTE; TOKAR; LANGSTON, 1999). Além disso, pesquisas avaliando o estresse oxidativo gerado pelo MPTP demonstram que a toxina estaria agindo através da disfunção de transportadores glutamatérgicos e ativação da nNOS (AOYAMA et al., 2008).

Um estudo recente verificou alterações na sinalização glutamatérgica que estariam contribuindo para a degeneração dopaminérgica na SNpc de camundongos após a administração sistêmica de MPTP (MEREDITH et al., 2009). Pesquisas realizadas através da administração de memantina, um antagonista dos receptores NMDA para glutamato, demonstraram que a mesma possui efeitos antiparkinsonianos em animais de laboratório e que em um teste clínico mostrou-se bastante eficaz para os pacientes portadores de demência com Corpos de Lewy (FREDRIKSSON et al., 2001; AARSLAND et al., 2009).

A agmatina evidenciou também efeito anticonvulsivante em uma série de trabalhos, tanto em convulsões induzidas por pentilenotetrazol e glutamato (FENG; LEBLANC; REGUNATHAN, 2005) quanto por eletrochoque (SU et al., 2004). Esses trabalhos sugerem que esses efeitos anticonvulsivantes sejam mediados por inibição da nNOS e ativação dos receptores α 2-adrenérgicos (DEMEHRI et al., 2003). Uma característica importante é que a agmatina reduz as concentrações extracelulares de glutamato após as convulsões induzidas por pentilenotetrazol, sendo possivelmente um importante mecanismo para essa proteção contra as crises convulsivas, além de aumentar as propriedades anticonvulsivantes do valproato e do fenobarbital (LUSZCZKI et al., 2008; LUSZCZKI et al., 2009).

Dessa maneira, emerge a possibilidade de que a agmatina poderia também agir através do antagonismo dos receptores NMDA e da inibição das isoformas I e II da NOS para gerar seus efeitos de proteção observados no modelo da DP utilizado no presente estudo. Alguns trabalhos já evidenciaram que neurotoxinas utilizadas em modelos experimentais de DP, incluindo o MPTP, são capazes de alterar o funcionamento do sistema glutamatérgico em cultura de células e na substância negra de camundongos C57BL/6 (YANG et al., 2005; MEREDITH et al., 2009). Porém os resultados atuais demonstram pela primeira vez que o MPTP em um ensaio *ex vivo* consegue diminuir a captação de glutamato 21 dias após sua administração. Dessa maneira, reforça-se a idéia do envolvimento do sistema glutamatérgico na progressão dos efeitos observados no modelo de DP em questão. A diminuição da captação de glutamato revela alteração de um mecanismo importante para a retirada do glutamato da fenda sináptica (FRIZZO et al., 2002). Assim teoricamente uma elevada concentração de glutamato permaneceria por um maior período de tempo exercendo suas ações,

podendo induzir um quadro de excitotoxicidade, como já mencionado anteriormente (CHOI, 1992). Um possível comprometimento das funções hipocampais dos camundongos idosos, poderia ser gerado pela administração i.n. de MPTP. No entanto experimentos adicionais são necessários para a verificação desses prejuízos durante os 21 dias após administração i.n. de MPTP. Com essa estratégia seria possível realizar a correlação entre esse parâmetro neuroquímico e os comprometimentos comportamentais que foram observados ao longo do protocolo experimental. Entretanto, de maneira inesperada, a agmatina não foi capaz de prevenir a diminuição da captação de glutamato em fatias hipocampais de camundongos idosos gerada pela administração i.n. de MPTP. Portanto, embora a excitotoxicidade glutamatérgica pareça contribuir para a toxicidade induzida pela administração i.n. de MPTP, este parece não representar o mecanismo principal pelo qual a agmatina exerce seu efeito protetor no presente modelo. Entretanto, estudos adicionais avaliando os efeitos da agmatina e do tratamento i.n. de MPTP sobre a recaptção de glutamato em outros tempos e em outras áreas cerebrais de camundongos bem como sobre a expressão dos transportadores de glutamato estão em andamento em nosso laboratório e poderão contribuir com esta discussão.

A análise do componente cognitivo foi realizada 7 dias após a administração i.n. de MPTP, utilizando-se o teste de reconhecimento social, previamente padronizado em nosso laboratório (PREDIGER et al., 2010). Este teste é utilizado para a verificação da memória olfatória de curta duração, sendo que drogas ou procedimentos que reconhecidamente interferem com os processos de aprendizado e memória, promovem alterações significativas neste teste (PERIO et al., 1989; PREDIGER et al. 2004, 2005). Já foi demonstrada a importância da dopamina para o processamento da memória olfatória, visto o aumento de sua liberação durante o aprendizado olfatório (COOPERSMITH et al., 1991). Aliado a isso, o tratamento com antagonistas dos receptores dopaminérgicos (PREDIGER et al., 2004) ou substâncias que prejudicam a neurotransmissão dopaminérgica como a reserpina (PREDIGER et al., 2005) ou o MPTP (MOREIRA et al., 2010; PREDIGER et al., 2010), induzem um prejuízo da memória social de curta duração.

De acordo com os resultados obtidos anteriormente (PREDIGER et al., 2010) camundongos tratados com MPTP pela via i.n. apresentaram prejuízos no reconhecimento social, evidenciado por um tempo de investigação semelhante nas duas exposições do mesmo animal jovem, sendo observado um RDI próximo a um (01). Os

resultados obtidos no presente estudo evidenciam uma característica protetora importante da agmatina sobre a função cognitiva dos camunongos infundidos com MPTP, uma vez que o grupo agmatina/MPTP não apresentou prejuízo na memória olfatória de curta-duração. Corroborando estes resultados, a característica protetora da agmatina em testes cognitivos também já foi evidenciada em um estudo prévio utilizando o peptídeo beta-amilóide 23-35 (A β 25-35) em camundongos, um modelo experimental da doença de Alzheimer. Nesse trabalho, a agmatina foi capaz de prevenir os prejuízos gerados pelo peptídeo A β 25-35 em camundongos na memória espacial de trabalho no labirinto aquático de Morris, no teste de reconhecimento de objeto e também na memória de referência no labirinto radial (BERGIN; LIU, 2010).

O Escore Neurológico de Severidade (ENS) foi utilizado para avaliar o estado neurológico geral dos animais 13 dias após a administração de MPTP pela via i.n.. Como já descrito, o ENS é composto de uma série de tarefas que avaliam tanto a atividade locomotora e equilíbrio quanto a agilidade dos animais (SCHWARZBOLD et al., 2010). A presente escala foi recentemente padronizada em nosso laboratório para a avaliação neurológica de animais submetidos a um modelo experimental de traumatismo crânio encefálico (TCE) (SCHWARZBOLD et al., 2010).

Os resultados do presente trabalho demonstram que os animais submetidos à administração i.n. de MPTP apresentam um prejuízo significativo na execução das tarefas do ENS e que o pré-tratamento com agmatina foi capaz de prevenir tais alterações. Como possível mecanismo para esse efeito, sugere-se que através do antagonismo dos receptores NMDA e da inibição da nNOS e da iNOS, a agmatina esteja impedindo que o glutamato e o NO, gerados pela administração do MPTP, exerçam seus efeitos neurotóxicos. De acordo com esta hipótese, já foi demonstrado que a agmatina gerou efeito protetor quando administrada imediatamente após um modelo experimental de TCE, inibindo o aumento de glutamato e NO no hipocampo dos animais submetidos ao trauma (KUO et al., 2007).

Como descrito na introdução, os efeitos da administração i.n. de MPTP sobre a atividade locomotora de roedores variam de acordo com a espécie utilizada (PREDIGER et al., 2006; MOREIRA et al., 2010; PREDIGER et al., 2010). No presente estudo, a atividade locomotora foi

avaliada em diferentes tempos e em diferentes testes, para evitar o descrito efeito de habituação (WALSH; CUMMINS, 1976).

Neste momento deve ser ressaltado que os sintomas motores não são observados nos estágios iniciais da DP, sendo que estes somente aparecem com o avanço da doença quanto aproximadamente 60-70% dos neurônios dopaminérgicos da SNpc encontram-se degenerados (CHAUDHURI; HEALY; SCHAPIRA, 2006). Consistente com estas observações clínicas, três dias após a administração i.n. do MPTP não foi verificado nenhum comprometimento da função motora dos animais quando estes foram avaliados na caixa de locomoção, o que está de acordo com resultados prévios do nosso grupo. Tanto ratos quanto camundongos, quando infundidos com MPTP pela via i.n. não apresentam tais déficits nos estágios iniciais do protocolo experimental (PREDIGER et al., 2006; PREDIGER et al., 2010).

Treze dias após a infusão i.n. de MPTP, os prejuízos locomotores começaram a aparecer em camundongos envelhecidos, como foi evidenciado pelo ENS. De maneira importante, o pré-tratamento com agmatina foi capaz de prevenir os déficits gerados pelo MPTP e aferidos nessa escala.

No teste do campo aberto, que foi realizado 19 dias após a administração i.n. do MPTP, não foi evidenciado efeito protetor da agmatina quando se avalia o número de cruzamentos. Entretanto, quando se avalia a atividade exploratória do animal através do número de levantamentos, a agmatina foi capaz de gerar um efeito protetor nesse parâmetro. No presente protocolo experimental, o prejuízo da função locomotora foi sendo evidenciado com o passar do tempo após a administração do MPTP pela via i.n., caracterizando um prejuízo tardio. Tal resultado não foi observado pelo nosso grupo em camundongos adultos jovens (5 meses de idade) infundidos com MPTP pela via i.n. (PREDIGER et al., 2010). Assim, os camundongos com 15 meses de idade parecem apresentar uma maior sensibilidade aos efeitos da toxina. Um trabalho realizado com macacos observou que conforme a idade dos animais aumentava, a administração de uma dose menor de MPTP era necessária para gerar os mesmos prejuízos motores (OVADIA; ZHANG; GASH et al., 1995). Outros trabalhos já evidenciaram que a administração do MPTP em animais idosos gera uma maior depleção de dopamina e um aumento da formação de radicais livres quando comparado a animais jovens (ALI et al., 1994; TSAI; TSAI; TAI, 1994). Dessa maneira, parece que o fator idade é também importante para o surgimento de prejuízos motores no modelo da administração i.n. de MPTP. Os resultados reproduziram o agravamento da função locomotora, que

é observado na clínica nos pacientes portadores da DP, ou seja, conforme a doença progride os sintomas motores vão aparecendo e se agravando (MAETZLER; LIEPELT; BERG, 2009).

Um estudo prévio mostrou que a depleção dopaminérgica gerada pela administração de MPTP é maior e mais prolongada no estriado de camundongos velhos do que de animais jovens (JONIEC et al., 2009). Nesse mesmo estudo foi observada uma maior expressão de iNOS no estriado de animais idosos, principalmente 14 e 21 dias após a administração de MPTP. Estes resultados prévios da literatura podem ajudar a explicar o aparecimento dos prejuízos motores observados no presente protocolo utilizando camundongos envelhecidos. Uma progressão da expressão da enzima iNOS produziria quantidades tóxicas de NO com o passar do tempo, contribuindo para a geração e manutenção de radicais livres e conseqüentemente a permanência do quadro de estresse oxidativo, culminando coma degeneração dopaminérgica.

Outros trabalhos já demonstraram o caráter progressivo e crônico dos prejuízos gerados nas vias dopaminérgicas após a administração do MPTP pela via i.n. (PREDIGER et al., 2006; MOREIRA et al., 2010; PREDIGER et al., 2010) . Levando em consideração o que já foi exposto, supõe-se que o efeito da agmatina sobre a toxicidade do MPTP possa até certo ponto retardar ou impedir que os prejuízos de tais funções apareçam comportamentalmente. Por outro lado, os resultados obtidos tanto no campo aberto quando no ensaio da captação de glutamato 21 dias após a administração i.n. sugerem que devido a esse caráter degenerativo progressivo do modelo experimental em questão, conforme a lesão progrida o efeito benéfico da agmatina vai sendo perdido.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que a agmatina é capaz de retardar os prejuízos comportamentais iniciais e intermediários causados pela administração i.n. de MPTP, além de aumentar a porcentagem de sobrevivência dos animais e não interferir com seu padrão ponderal. Dessa maneira, podemos concluir que a agmatina possui efeitos protetores no modelo experimental da DP em questão. Entretanto, deve ser ressaltado que com o passar do tempo, tais efeitos se tornam subjugados a toxicidade crônica e progressiva do MPTP, sendo necessário, portanto a avaliação da eficácia de um tratamento crônico com agmatina durante todo o período do protocolo experimental.

O presente estudo reforça que o modelo da administração i.n. do MPTP é uma ferramenta útil para a investigação de prejuízos pré-motores relacionados com a DP. No entanto, os resultados atuais sugerem que dependendo da idade dos animais, pode se tornar um modelo também útil para o estudo de prejuízos motores, além dos déficits precoces.

Esse estudo contribui para atentarmos sobre os efeitos protetores da agmatina perante um modelo experimental de DP *in vivo*. Dessa maneira, se torna uma substância interessante para trabalhos futuros que elucidem os mecanismos pelos quais esta promove seus efeitos protetores, bem como sua avaliação em outros modelos experimentais da DP.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARSLAND, D., C., et al. Memantine in patients with Parkinson's disease dementia or dementia with Lewy bodies: a double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. **Lancet Neurol.** v. 8, n. 7, p.613-8. 2009.

ABE, K.; ABE, Y.; SAITO, H. Agmatine suppresses nitric oxide production in microglia. **Brain Res.** v. 872, n. 1-2, p.141-8. 2000.

ABEL, T.; LATTAL, K. M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. **Curr Opin Neurobiol.** v. 11, n. 2, p.180-7. 2001.

AGUIAR JR, A. S.; PREDIGER, R. D. Brain in Movement: The Role of Physical Exercise in Parkinson's Disease. In: LIEBERMAN, D. C.. **Aerobic Exercise and Athletic Performance: Types, Duration and Health Benefits.** 1 ed. New York. New Science. p 85-120. 2010.

ALBIN, R. L.; GREENAMYRE, J. T. Alternative excitotoxic hypotheses. **Neurology**, v. 42, n. 4, p.733-8. 1992.

ALI, S. F., et al. MPTP-induced oxidative stress and neurotoxicity are age-dependent: evidence from measures of reactive oxygen species and striatal dopamine levels. **Synapse**, v. 18, n. 1, p.27-34. 1994.

ANDREWS-HANNA, J. R., et al. Disruption of large-scale brain systems in advanced aging. **Neuron**, v. 56, n. 5, p.924-35. 2007.

ANGLADE, P. A., et al. Synaptic plasticity in the caudate nucleus of patients with Parkinson's disease. **Neurodegeneration**, v. 5, n. 2, p.121-8. 1996.

ANTZOULATOS, E., et al. Sex differences in motor behavior in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 95, n. 4, p.466-72.

AOYAMA, K., N., et al. Oxidative stress on EAAC1 is involved in MPTP-induced glutathione depletion and motor dysfunction. **Eur J Neurosci**, v. 27, n. 1, p.20-30. 2008.

- ARICIOGLU, F.; REGUNATHAN, S. Agmatine attenuates stress- and lipopolysaccharide-induced fever in rats. **Physiol Behav**, v. 85, n. 3, p.370-5. 2005.
- ARNDT, M. A., et al. The arginine metabolite agmatine protects mitochondrial function and confers resistance to cellular apoptosis. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 296, n. 6, p.1411-9. 2009.
- ARTENI, N. S., et al. Agmatine facilitates memory of an inhibitory avoidance task in adult rats. **Neurobiol Learn Mem**, v. 78, n. 2, p.465-9. 2002.
- BATTAGLIA, V., et al. Different behavior of agmatine in liver mitochondria: inducer of oxidative stress or scavenger of reactive oxygen species? **Biochim Biophys Acta**, v. 1768, n. 5, p.1147-53. 2007.
- _____. Agmatine prevents the Ca(2+)-dependent induction of permeability transition in rat brain mitochondria. **Amino Acids**, v. 38, n. 2, p.431-7. 2010.
- BEAL, M. F. Experimental models of Parkinson's disease. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, n. 5, p.325-34. 2001.
- BENAZZOZ, A. S., et al. Intraoperative microrecordings of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 17, Suppl 3, p.S145-9. 2002.
- BENCE, A. K., et al. An in vivo evaluation of the antiseizure activity and acute neurotoxicity of agmatine. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 74, n. 3, p.771-5. 2003.
- BERGIN, D. H.; LIU, P. Agmatine protects against β -Amyloid25-35 induced memory impairments in the rat. **Neuroscience**. v. 169, n. 2, p. 146-53. 2010.
- BERKELS, R., et al. Agmatine signaling: odds and threads. **Cardiovasc Drug Rev**, v. 22, n. 1, p.7-16. 2004.

BISHOP, N. A.; LU, T.; YANKNER, B. A.. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. **Nature**, v. 464, n. 7288, p.529-35, 2010.

BRAAK, H., et al., Idiopathic Parkinson`s disease: possibles routes by which vulnerable neuronal types be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. **J Neural Transm.** v. 110, n. 5, p.517-36. 2003.

CHALIMONIUK, M., et al. Alterations of the expression and activity of midbrain nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinsonism in mice. **Neuroscience**, v. 141, n. 2, p.1033-46. 2006.

CHAUDHURI, K. R.; HEALY, D. G.; SCHAPIRA, A. H. V. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. **Lancet Neurol**, v. 5, n. 3, p.235-45. 2006.

CHESSELET, M. F. In vivo alpha-synuclein overexpression in rodents: a useful model of Parkinson's disease? **Exp Neurol**, v. 209, n. 1, p.22-7. 2008.

CHOI, D. W. Excitotoxic cell death. **J Neurobiol**, v. 23, n. 9, p.1261-76. 1992.

CHOLERIS, E., et al. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 25, n. 3, p.235-60. 2001.

CICCHETTI, F.; DROUIN-OUELLET, J.; GROSS, R. E. Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? **Trends Pharmacol Sci**, v. 30, n. 9, p.475-83. 2009.

CONDELLO, S., et al. Agmatine effects on mitochondrial membrane potential and NF-kappaB activation protect against rotenone-induced cell damage in human neuronal-like SH-SY5Y cells. **J Neurochem.** v. 116, p. 67-75. 2010.

COOPERSMITH, R., et al. Extracellular dopamine increases in the neonatal olfactory bulb during odor preference training. **Brain Res**, v. 564, n. 1, p.149-53. 1991.

CRAIK, F. I. Changes in memory with normal aging: a functional view. **Adv Neurol**, v. 51, p.201-5, 1990.

DANTZER, R., et al. Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 91, n. 3, p.363-8. 1987.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, v. 39, n. 6, p.889-909. 2003.

DE LAU, L. M.; BRETELER, E. M. M. Epidemiology of Parkinson's disease. **Lancet Neurol**, v. 5, n. 6, p.525-35. 2006.

DEMEHRI, S., H., et al. Agmatine exerts anticonvulsant effect in mice: modulation by alpha 2-adrenoceptors and nitric oxide. **Neuropharmacology**, v. 45, n. 4, p.534-42. 2003.

DESOLE, M. S., et al. Effects of ageing on 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) neurotoxic effects on striatum and brainstem in the rat. **Neurosci Lett**, v. 159, n. 1-2, p.143-6. 1993.

DHURIA, S. V.; HANSON, L. R.; FREY II, W. H. Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. **J Pharm Sci**, v. 99, n. 4, p.1654-73. 2010.

DI MATTEO, V. A., et al. 7-nitroindazole protects striatal dopaminergic neurons against MPP+-induced degeneration: an in vivo microdialysis study. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1089, p.462-71. 2006.

DI MONTE, D. A.; TOKAR, I.; LANGSTON, J. W. Impaired glutamate clearance as a consequence of energy failure caused by MPP(+) in astrocytic cultures. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 158, n. 3, p.296-302. 1999.

_____. **Environmental factors in Parkinson's disease**. **Neurotoxicology**, v. 23, n. 4-5, p.487-502. 2002.

DLUZEN, D. E.; KEFALAS, G. The effects of intranasal infusion of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) upon

catecholamine concentrations within olfactory bulbs and corpus striatum of male mice. **Brain Res**, v. 741, n. 1-2, p.215-9. 1996.

DOTY, R. L. The olfactory vector hypothesis of neurodegenerative disease: is it viable? **Ann Neurol**. v. 63, n. 1, p.7-15. 2008.

ENGELMAN, H. S.; MACDERMOTT, A. B. Presynaptic ionotropic receptors and control of transmitter release. **Nat Rev Neurosci**, v. 5, n. 2, p.135-45. 2004.

EVE, D. J., et al. Basal ganglia neuronal nitric oxide synthase mRNA expression in Parkinson's disease. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 63, n. 1, p.62-71. 1998.

FELICIO, L. S.; NELSON, J. F.; FINCH, C. E. Longitudinal studies of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: II. Cessation of cyclicity and the duration of persistent vaginal cornification. **Biol Reprod**, v. 31, n. 3, p.446-53. 1984.

FENG, Y.; HALARIS, A. E.; PILETZ, J. E. Determination of agmatine in brain and plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl**, v. 691, n. 2, p.277-86. 1997.

FENG, Y., et al. Agmatine suppresses nitric oxide production and attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. **Pediatr Res**, v. 52, n. 4, p.606-11. 2002.

_____. Agmatine reduces extracellular glutamate during pentylenetetrazole-induced seizures in rat brain: a potential mechanism for the anticonvulsive effects. **Neurosci Lett**, v. 390, n. 3, p.129-33. 2005.

FERNANDES, D., et al. Late, but not early, inhibition of soluble guanylate cyclase decreases mortality in a rat sepsis model. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 328, n. 3, p.991-9. 2009.

FLIERL, M. A., et al. Mouse closed head injury model induced by a weight-drop device. **Nat Protoc**, v. 4, n. 9, p.1328-37. 2009.

FRANCO, J., et al. Antioxidant responses and lipid peroxidation following intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in rats: increased susceptibility of olfactory bulb. **Life Sci**, v. 80, n. 20, p.1906-14. 2007.

FREDRIKSSON, A., W., et al. Co-administration of memantine and amantadine with sub/suprathreshold doses of L-Dopa restores motor behaviour of MPTP-treated mice. **J Neural Transm**, v. 108, n. 2, p.167-87. 2001.

FREYALDENHOVEN, T. E.; ALI, S. F.; HART, R. W. MPTP- and MPP(+)-induced effects on body temperature exhibit age- and strain-dependence in mice. **Brain Res**, v. 688, n. 1-2, p.161-70. 1995.

FRIZZO, M. E., et al. Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions. **Cell Mol Neurobiol**. v. 22, n. 3, p. 353-63. 2002.

FULLER, R. W., et al. Depletion of cardiac norepinephrine in rats and mice by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). **Biochem Pharmacol**, v. 33, n. 19, p.2957-60. 1984.

GADOTTI, V. M., et al. Contribution of spinal glutamatergic receptors to the antinociception caused by agmatine in mice. **Brain Res**, v. 1093, n. 1, p.116-22. 2006.

GALEA, E., et al. Inhibition of mammalian nitric oxide synthases by agmatine, an endogenous polyamine formed by decarboxylation of arginine. **Biochem J**, v. 316, p.247-9. 1996.

GALLAGHER, M.; SCHOENBAUM, G. Functions of the amygdala and related forebrain areas in attention and cognition. **Ann N Y Acad Sci**, v. 877, p.397-411. 1999.

GARTHWAITE, J.; BOULTON, C. L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. **Annu Rev Physiol**, v. 57, p.683-706. 1995.

_____. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. **Eur J Neurosci**, v. 27, n. 11, p.2783-802. 2008.

GATTO, E. M., et al. Overexpression of neutrophil neuronal nitric oxide synthase in Parkinson's disease. **Nitric Oxide**, v. 4, n. 5, p.534-9. 2000.

GILAD, G. M. Arginine and ornithine decarboxylation in rodent brain: coincidental changes during development and after ischemia. **Neurosci Lett**, v. 216, n. 1, p.33-6. 1996.

_____. Accelerated functional recovery and neuroprotection by agmatine after spinal cord ischemia in rats. **Neurosci Lett**, v. 296, n. 2-3, p.97-100. 2000.

_____. Neurochemical evidence for agmatine modulation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) neurotoxicity. **Neurochem Res**, v. 30, n. 6-7, p.713-9. 2005.

GIROUX, M. L. Parkinson disease: Managing a complex, progressive disease at all stages. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**. v. 74, n. 5, p.313-328. 2007.

GOMES, M. Z.; RAISMAN-VOZARI, R.; DEL BEL, E. A. A nitric oxide synthase inhibitor decreases 6-hydroxydopamine effects on tyrosine hydroxylase and neuronal nitric oxide synthase in the rat nigrostriatal pathway. **Brain Res**, v. 1203, p.160-9. 2008.

GONG, Z. H. et al. Anxiolytic effect of agmatine in rats and mice. **Eur J Pharmacol**, v. 550, n. 1-3, p.112-6. 2006.

GONZALEZ, C., S. et al. Agmatine, an endogenous modulator of noradrenergic neurotransmission in the rat tail artery. **Br J Pharmacol**, v. 119, n. 4, p.677-84. 1996.

GORACKE-POSTLE, C. J. et al. Release of tritiated agmatine from spinal synaptosomes. **Neuroreport**, v. 17, n. 1, p.13-7. 2006.

HALARIS, A.; PLIETZ, J. Agmatine : metabolic pathway and spectrum of activity in brain. **CNS Drugs**, v. 21, n. 11, p.885-900. 2007.

HASSANI, O. K.; MOUROUX, M.; FÉGER, J. Increased subthalamic neuronal activity after nigral dopaminergic lesion independent of

disinhibition via the globus pallidus. **Neuroscience**, v. 72, n. 1, p.105-15. 1996.

HAYDON, P. G.; CARMIGNOTO, G. Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. **Physiol Rev**, v. 86, n. 3, p.1009-31. 2006.

HAZELL, A. S., et al. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) decreases glutamate uptake in cultured astrocytes. **J Neurochem**, v. 68, n. 5, p.2216-9. 1997.

HERRAIZ, T.; ARÁN, V. J.; GUILLÉN, H. Nitroindazole compounds inhibit the oxidative activation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) neurotoxin to neurotoxic pyridinium cations by human monoamine oxidase (MAO). **Free Radic Res**, v. 43, n. 10, p.975-84. 2009.

HICKEY, M. A., et al. Extensive early motor and non-motor behavioral deficits are followed by striatal neuronal loss in knock-in Huntington's disease mice. **Neuroscience**, v. 157, n. 1, p.280-95. 2008.

HIRSCH, E. C. et al. Glial cells and inflammation in Parkinson's disease: a role in neurodegeneration? **Ann Neurol**, v. 44, n. 3 Suppl 1, p.S115-20. 1998.

HONG, S., et al. Agmatine protects retinal ganglion cells from hypoxia-induced apoptosis in transformed rat retinal ganglion cell line. **BMC Neurosci**, v. 8, p. 81. 2007.

HWANG, D. Y., et al. 3,4-dihydroxyphenylalanine reverses the motor deficits in Pitx3-deficient aphakia mice: behavioral characterization of a novel genetic model of Parkinson's disease. **J Neurosci**, v. 25, n. 8, p.2132-7. 2005.

INGHAM, C. A., et al. Plasticity of synapses in the rat neostriatum after unilateral lesion of the nigrostriatal dopaminergic pathway. **J Neurosci**, v. 18, n. 12, p.4732-43. 1998.

INGHAM, C. A., et al. Morphological changes in the rat neostriatum after unilateral 6-hydroxydopamine injections into the nigrostriatal pathway. **Exp Brain Res**, v. 93, n. 1, p.17-27. 1993.

JACKSON-LEWIS, V.; PRZEDBORSKI, S. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Nat Protoc**, v. 2, n. 1, p.141-51. 2007.

JONIEC, I., A., et al. Age- and sex-differences in the nitric oxide synthase expression and dopamine concentration in the murine model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. **Brain Res**, v. 1261, p.7-19. 2009.

JONKERS, N., et al. MK801 suppresses the L-DOPA-induced increase of glutamate in striatum of hemi-Parkinson rats. **Brain Res**, v. 926, n. 1-2, p.149-55. 2002.

KELLEY, A. E., et al. Glutamate-mediated plasticity in corticostriatal networks: role in adaptive motor learning. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1003, p.159-68. 2003.

KENNEDY, J. L. et al. The genetics of adult-onset neuropsychiatric disease: complexities and conundra? **Science**, v. 302, n. 5646, p.822-6. 2003.

KIM, J. H, et al. Agmatine reduces infarct area in a mouse model of transient focal cerebral ischemia and protects cultured neurons from ischemia-like injury. **Exp Neurol**, v. 189, n. 1, p.122-30. 2004.

KOPIN, I. J.; MARKEY, S. P. MPTP toxicity: implications for research in Parkinson's disease. **Annu Rev Neurosci**, v. 11, p.81-96. 1988.

KORNHUBNER, J.; WELLER, M. Psychotogenicity and N-methyl-D-aspartate Receptor Antagonism: Implications for Neuroprotective Pharmacotherapy. **Society of Biological Psychiatric**. v. 41, p.135-144. 1997.

KOTAGALE, N. R., et al. Repeated agmatine treatment attenuates nicotine sensitization in mice: modulation by alpha2-adrenoceptors. **Behav Brain Res**, v. 213, n. 2, p.161-74.

KRASS, M., et al. Antidepressant-like effect of agmatine is not mediated by serotonin. **Behav Brain Res**, v. 188, n. 2, p.324-8. 2008.

KUO, J. R., et al. Resuscitation from experimental traumatic brain injury by agmatine therapy. **Resuscitation**, v. 75, n. 3, p.506-14. 2007.

LANDRIGAN, P. J., B et al. Early environmental origins of neurodegenerative disease in later life. **Environ Health Perspect**, v. 113, n. 9, p.1230-3. 2005.

LANGSTON, J. W et al. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. **Science**, v. 219, n. 4587, p.979-80. 1983.

_____. Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey. **Brain Res**, v. 292, n. 2, p.390-4. 1984.

LAVINSKY, D.; ARTENI, N. S.; NETTO, C. A. Agmatine induces anxiolysis in the elevated plus maze task in adult rats. **Behav Brain Res**, v. 141, n. 1, p.19-24. 2003.

LI, Y. F., et al. Antidepressant-like effect of agmatine and its possible mechanism. **Eur J Pharmacol**, v. 469, n. 1-3, p.81-8. 2003.

_____. Agmatine increases proliferation of cultured hippocampal progenitor cells and hippocampal neurogenesis in chronically stressed mice. **Acta Pharmacol Sin**, v. 27, n.11, p.1395-400. 2006.

LIBERATORE, G. T., V. et al. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. **Nat Med**, v. 5, n. 12, p.1403-9. 1999.

LIU, P., M. et al. Behavioral effects of intracerebroventricular microinfusion of agmatine in adult rats. **Behav Neurosci**, v. 122, n. 3, p.557-69. 2008a.

_____. Spatial learning results in elevated agmatine levels in the rat brain. **Hippocampus**, v. 18, n. 11, p.1094-8. 2008b.

_____. Effects of aging on agmatine levels in memory-associated brain structures. **Hippocampus**, v. 18, n. 9, p.853-6. 2008c.

_____. Differential effects of i.c.v. microinfusion of agmatine on spatial working and reference memory in the rat. **Neuroscience**, v. 159, n. 3, p.951-61. 2009.

LOERCH, P. M. et al. Evolution of the aging brain transcriptome and synaptic regulation. **PLoS One**, v. 3, n. 10, p.e3329. 2008.

LUSZCZKI, J. J., et al. Influence of agmatine on the protective action of numerous antiepileptic drugs against pentetrazole-induced seizures in mice. **Pharmacol Rep**, v. 61, n. 2, p.252-60. 2009.

_____. Agmatine enhances the anticonvulsant action of phenobarbital and valproate in the mouse maximal electroshock seizure model. **J Neural Transm**, v. 115, n. 11, p.1485-94. 2008.

LUTHMAN, J.; JONSSON, G. Effects of the parkinsonism-inducing neurotoxin MPTP and its metabolite MPP⁺ on sympathetic adrenergic nerves in mouse iris and atrium. **Med Biol**, v. 64, n. 2-3, p.95-102. 1986.

MAETZLER, W.; LIEPELT, I.; BERG, D. Progression of Parkinson's disease in the clinical phase: potential markers. **Lancet Neurol**, v. 8, n. 12, p.1158-71. 2009.

MATSUMOTO, T., et al. A sensitive fluorometric assay for serum monoamine oxidase with kynuramine as substrate. **Clin Biochem**, v. 18, n. 2, p.126-9. 1985.

MATTAY, V. S. et al. Neurobiology of cognitive aging: insights from imaging genetics. **Biol Psychol**, v. 79, n. 1, p.9-22, 2008.

MCNAUGHT, K. S.; JENNER, P. Altered glial function causes neuronal death and increases neuronal susceptibility to 1-methyl-4-phenylpyridinium- and 6-hydroxydopamine-induced toxicity in

astrocytic/ventral mesencephalic co-cultures. **J Neurochem**, v. 73, n. 6, p.2469-76. 1999.

MELLA, C., F., et al. Expression and localization of an agmatinase-like protein in the rat brain. **Histochem Cell Biol**, v. 134, n. 2, p.137-44. 2010.

MENZAGHI, F et al. Interactions between a Novel Cholinergic Ion Channel Agonist, SIB-1765F and L-DOPA in the Reserpine Model of Parkinson's Disease in Rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 280, n. 1, p.393–401, 1997.

MEREDITH, G. E.; SONSALLA, P. K.; CHESSELET, M. F. **Animal models of Parkinson's disease progression**. *Acta Neuropathol*, v. 115, n. 4, p.385-98. 2008.

MEREDITH, G. E., et al. Impaired glutamate homeostasis and programmed cell death in a chronic MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Exp Neurol**, v. 219, n. 1, p.334-40. 2009.

MESHUL, C. K, et al. Time-dependent changes in striatal glutamate synapses following a 6-hydroxydopamine lesion. **Neuroscience**, v. 88, n. 1, p.1-16. 1999.

METMAN L, et al. Amantadine for levodopa induced dyskinesia: a 1-year follow-up study. **Arch Neurol**. v. 56. p.1383–1386. 1999.

MOLDERINGS, G. J. et al. Identification and pharmacological characterization of a specific agmatine transport system in human tumor cell lines. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1009, p.75-81. 2003.

MOREIRA, E. L., et al. Proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* Baill confers neuroprotection in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine rat model of Parkinson's disease. **J Neural Transm**, v. 117, n. 12, p. 1337-51. 2010.

NATHAN, C.; XIE, Q. W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. **J Biol Chem**, v. 269, n. 19, p.13725-8. 1994.

NELSON, J. F., et al. Neuroendocrine involvement in aging: evidence from studies of reproductive aging and caloric restriction. **Neurobiol Aging**, v. 16, n. 5, p.837-43; discussion 855-6. 1995.

NISSIM, I., et al. 3-isobutylmethylxanthine inhibits hepatic urea synthesis: protection by agmatine. **J Biol Chem**, v. 283, n. 22, p.15063-71. 2008.

OBRENOVITCH, T. P.; URENJAK, J. Is high extracellular glutamate the key to excitotoxicity in traumatic brain injury? **J Neurotrauma**, v. 14, n. 10, p.677-98. 1997.

OLMOS, G., et al. Protection by imidazoline drugs and agmatine of glutamate-induced neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells through blockade of NMDA receptor. **Br J Pharmacol**, v. 127, n. 6, p.1317-26. 1999.

OOKUBO, M., H., et al. Gender differences on MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) neurotoxicity in C57BL/6 mice. **Mol Cell Endocrinol**, v. 311, n.1-2, p.62-8. 2009.

OTAKE, K., et al. Regional localization of agmatine in the rat brain: an immunocytochemical study. **Brain Res**, v. 787, n. 1, p.1-14. 1998.

OVADIA, A.; ZHANG, Z; GASH, D. M. Increased susceptibility to MPTP toxicity in middle-aged rhesus monkeys. **Neurobiol Aging**, v. 16, n. 6, p.931-7. 1995.

OWEN, A. M. Cognitive dysfunction in Parkinson's disease: the role of frontostriatal circuitry. **Neuroscientist**, v. 10, n. 6, p.525-37. 2004.

ÖZYAZGAN, S., et al. The effect of agmatine on the vascular reactivity in streptozotocin-diabetic rats. **Pharmacol Res**, v. 48, n. 2, p.133-8. 2003.

PADOVAN-NETO, F. E. et al. Nitric oxide synthase inhibition attenuates L-DOPA-induced dyskinesias in a rodent model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 159, n. 3, p.927-35. 2009.

PADOVANI, A., C. et al. Parkinson's disease and dementia. **Neurol Sci**, v. 27, Suppl 1, p.S40-43. 2006.

PERIO, A., et al. Specific modulation of social memory in rats by cholinomimetic and nootropic drugs, by benzodiazepine inverse agonists, but not by psychostimulants. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 97, n. 2, p.262-8. 1989.

PERRY, T. L., et al. Partial protection from the dopaminergic neurotoxin N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by four different antioxidants in the mouse. **Neurosci Lett**, v. 60, n. 2, p.109-14. 1985.

POSTUMA, R. B.; MONTPLAISIR, J. Predicting Parkinson's disease - why, when, and how? **Parkinsonism Relat Disord**, v. 15, Suppl 3, p.S105-9. 2009.

PREDIGER, R. D., et al. Facilitation of short-term social memory by ethanol in rats is mediated by dopaminergic receptors. **Behav Brain Res**, v. 153, n. 1, p.149-57. 2004.

_____. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. **Neurobiol Aging**, v. 26, n. 6, p.957-64. 2005a.

PREDIGER, R. D., et al. Antagonistic interaction between adenosine A2A and dopamine D2 receptors modulates the social recognition memory in reserpine-treated rats. **Behav Pharmacol**, v. 16, n. 4, p.209-18. 2005b.

_____. Blockade of adenosine A2A receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. **Behav Brain Res**, v. 159, n. 2, p.197-205. 2005c.

_____. The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. **Exp Neurol**, v. 202, n. 2, p.391-403. 2006.

_____. Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. **J Ethnopharmacol**, v. 120, n. 3, p.465-73. 2008.

_____. Risk is in the air: an intranasal MPTP (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine) rat model of Parkinson's disease. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1170, p.629-36. 2009.

_____. Single Intranasal Administration of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine in C57BL/6 Mice Models Early Preclinical Phase of Parkinson's Disease. **Neurotox Res**, v. 17, n. 2, p.114-29. 2010.

PRZEDBORSKI, S., et al. Transgenic mice with increased Cu/Zn-superoxide dismutase activity are resistant to N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. **J Neurosci**, v. 12, n. 5, p.1658-67. 1992.

_____. Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 10, p.4565-71. 1996.

RAASCH, W., et al. Agmatine is widely and unequally distributed in rat organs. **Ann N Y Acad Sci**, v. 763, p.330-4. 1995a.

_____. Agmatine, the bacterial amine, is widely distributed in mammalian tissues. **Life Sci**, v.56, n.26, p.2319-30. 1995b.

_____. Biological significance of agmatine, an endogenous ligand at imidazoline binding sites. **Br J Pharmacol**, v. 133, n. 6, p.755-80. 2001.

RASCOL, O et al. A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. **N Engl J Med**, v. 342, p.1484-1491. 2000.

RAWLS, S. M.; AMIN, A.; ZISK, J..Agmatine blocks morphine-evoked hyperthermia in rats. **Brain Res**, v. 1147, p.89-94. 2007.

REIS, D. J.; YANG, X. C.; MILNER, T. A.. Agmatine containing axon terminals in rat hippocampus form synapses on pyramidal cells. **Neurosci Lett**, v. 250, n. 3, p.185-8. 1998.

_____. Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? **Trends Pharmacol Sci**, v. 21, n. 5, p.187-93. 2000.

ROCCA, W. A., et al. Increased risk of parkinsonism in women who underwent oophorectomy before menopause. **Neurology**, v. 70, n. 3, p.200-9. 2008.

RODRIGUES, M.; CAMPOS, L. C. Estratégia para o tratamento com levodopa na Doença de Parkinson. **Revista Analytica**. v. 23, p.44-51. 2006.

ROSENZWEIG, E. S.; BARNES, C. A. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. **Prog Neurobiol**, v. 69, n. 3, p.143-79. 2003.

SANT' ANNA G. S., et al. Ultrasound promoted synthesis of 2-imidazolines in water: a greener approach toward monoamine oxidase inhibitors. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 19, n. 2, p.546-9. 2009.

SANTOS, A. R. et al. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. **Neuropharmacology**, v. 48, n. 7, p.1021-34. 2005.

SASTRE, M. et al. Agmatinase activity in rat brain: a metabolic pathway for the degradation of agmatine. **J Neurochem**. v. 67, n. 4, p.1761-5. 1996.

SAURA, J.; RICHARDS, J. G.; MAHY, N. Differential age-related changes of MAO-A and MAO-B in mouse brain and peripheral organs. **Neurobiol Aging**, v. 15, n. 4, p.399-408. 1994.

SCHMIDT, N.; FERGER, B. Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. **J Neural Transm**, v. 108, n. 11, p.1263-82. 2001.

SCHULZ, J. B., et al. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. **J Neurochem**, v. 64, n. 2, p.936-9. 1995.

SCHWARZBOLD, M. L., et al. Effects of traumatic brain injury of different severity on emotional, cognitive and oxidative stress-related parameters in mice. **J Neurotrauma**, v. 27, n. 10, p.1883-93. 2010.

SEDELIS, M., et al. MPTP susceptibility in the mouse: behavioral, neurochemical, and histological analysis of gender and strain differences. **Behav Genet**, v. 30, n. 3, p.171-82. 2000.

SHELDON, A. L.; ROBINSON, M. B. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. **Neurochem Int**, v. 51, n. 6-7, p.333-55. 2007.

SHERER, T. B., et al. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. **Exp Neurol**, v. 179, n. 1, p.9-16. 2003.

SONNIER, L., et al. Progressive loss of dopaminergic neurons in the ventral midbrain of adult mice heterozygote for Engrailed1. **J Neurosci**, v. 27, n. 5, p.1063-71. 2007.

SU, R. B., et al. Anticonvulsive effect of agmatine in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 77, n. 2, p.345-9. 2004.

TABOR, C. W.; TABOR, H. Polyamines. **Annu Rev Biochem**, v. 53, p. 749-90. 1984.

TAKSANDE, B. G., et al. Antidepressant like effect of selective serotonin reuptake inhibitors involve modulation of imidazoline receptors by agmatine. **Neuropharmacology**, v. 57, n. 4, p.415-24. 2009.

TAYLOR, T. N.; GREENE, J. G.; MILLER, G. W. Behavioral phenotyping of mouse models of Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**. v. 211, p.1-10. 2010.

TERZIOGLU, M.; GALTER, D. Parkinson's disease: genetic versus toxin-induced rodent models. **Febs J**, v. 275, n. 7, p.1384-91. 2008.

THE PARKINSON'S STUDY GROUP. Pramipexole vs levodopa as initial treatment for Parkinson's disease: 4-year randomized controlled trial. **Arch Neurol**. v. 61, p.1044-1153. 2004.

TSAI, Y. F.; TSAI, H. W.; TAI, M. Y. Comparison of brain dopamine depletion induced by low-dose 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in young and aged rats. **Neurosci Res**, v. 20, n. 1, p.27-33. 1994.

VINCENT, S. R.; KIMURA, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. **Neuroscience**, v. 46, n. 4, p.755-84. 1992.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The Open-Field Test: a critical review. **Psychol Bull**, v. 83, n. 3, p.482-504. 1976.

WANG, W. P., et al. Agmatine protects against cell damage induced by NMDA and glutamate in cultured hippocampal neurons. **Brain Res**, v. 1084, n. 1, p.210-6. 2006.

WEST, A. R.; GALLOWAY, M. P.; GRACE, A. A. Regulation of striatal dopamine neurotransmission by nitric oxide: effector pathways and signaling mechanisms. **Synapse**, v. 44, n. 4, p.227-45. 2002.

WEST, A. R.; GRACE, A. A. The nitric oxide-guanylyl cyclase signaling pathway modulates membrane activity States and electrophysiological properties of striatal medium spiny neurons recorded in vivo. **J Neurosci**, v. 24, n. 8, p.1924-35. 2004.

WIESINGER, H. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. **Prog Neurobiol**, v. 64, n. 4, p.365-91. 2001.

XIKOTA, J. C., et al. Mild cognitive deficits associated to neocortical microgyria in mice with genetic deletion of cellular prion protein. **Brain Res**, v. 1241, p.148-56. 2008.

YANG, X. C.; REIS, D. J. Agmatine selectively blocks the N-methyl-D-aspartate subclass of glutamate receptor channels in rat hippocampal neurons. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 288, n. 2, p.544-9. 1999.

YANG, Y. L., et al. Iptakalim hydrochloride protects cells against neurotoxin-induced glutamate transporter dysfunction in in vitro and in vivo models. **Brain Res**, v. 1049, n. 1, p.80-8. 2005.

YOKOYAMA, H. et al. Targeting reactive oxygen species, reactive nitrogen species and inflammation in MPTP neurotoxicity and Parkinson's disease. **Neurol Sci**, v. 29, n. 5, p.293-301. 2008.

ZHU, M. Y., et al. Chronic treatment with glucocorticoids alters rat hippocampal and prefrontal cortical morphology in parallel with endogenous agmatine and arginine decarboxylase levels. **J Neurochem**, v. 103, n. 5, p.1811-20. 2007.

ZOMKOWSKI, A. D., et al. Agmatine produces antidepressant-like effects in two models of depression in mice. **Neuroreport**, v. 13, n. 4, p.387-91. 2002.