

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

**EFEITOS DA AGMATINA NOS PREJUÍZOS DE
APRENDIZAGEM E MEMÓRIA INDUZIDOS PELA
ESCOPOLAMINA E ENVELHECIMENTO EM RATOS**

CAMILA TOCHETTO WOLLMANN

**Florianópolis
2011**

CAMILA TOCHETTO WOLLMANN

**EFEITOS DA AGMATINA NOS PREJUÍZOS DE
APRENDIZAGEM E MEMÓRIA INDUZIDOS PELA
ESCOPOLAMINA E ENVELHECIMENTO EM RATOS**

**Dissertação apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em
Farmacologia, Centro de
Ciências Biológicas,
Universidade Federal de
Santa Catarina, como requisito
parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia.**

**Orientador: Prof. Dr. Rui Daniel
S. Prediger**

**Florianópolis
2011**

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

W864e Wollmann, Camila Tochetto

Efeitos da agmatina nos prejuízos de aprendizagem e memória induzidos pela escopolamina e envelhecimento em ratos [dissertação] / Camila Tochetto Wollmann ; orientador, Rui Daniel Schröder Prediger. - Florianópolis, SC, 2011.
60 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Agmatina. 3. Envelhecimento. 4. Aprendizagem. 5. Memória. 6. Brometo de Butilescopolamônio. 7. Rato como animal de laboratório. I. Prediger, Rui Daniel Schröder. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

“É do buscar e não do achar que nasce o que eu não conhecia”.
(Clarice Lispector)

*Dedico àqueles que amo e que fazem, fizeram, ou
farão parte da minha história.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, a quem confio.

Ao Prof. Rui Daniel Prediger, por quem tenho enorme admiração e respeito, pela oportunidade, constante ajuda e orientação. Seus ensinamentos foram essenciais ao meu crescimento. Não poderia deixar de agradecer também pela amizade! Desejo muita felicidade em sua vida.

Às queridas amigas Camila e Patrícia por serem grandes companheiras antes e durante todo o mestrado, compartilhando os bons e maus momentos.

Aos colegas de LEXDON Aderbal, Filipe, Daniel e Eduardo pela grande colaboração neste trabalho.

Aos demais colegas de laboratório Vanessa, Paulo, Juliana, Prim, Sandro e Robson por sua amizade.

Aos amigos mestrandos da turma de Toledo-PR pela agradável convivência durante este período.

Aos Professores Jamil, Pádua, Leandro e Thereza que sempre se mostraram dispostos a ajudar.

À minha maravilhosa família, por estar sempre torcendo por mim.

Ao meu amado Alex por tudo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Processos de aprendizado e de memória.....	01
1.2 Envelhecimento populacional.....	04
1.3 Neurofisiologia do envelhecimento.....	05
1.4 Doença de Alzheimer.....	06
1.5 A memória e o processo de envelhecimento.....	06
1.6 Agmatina.....	08
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1 Animais.....	14
3.2 Drogas e reagentes.....	15
3.3 Testes comportamentais.....	15
3.3.1 Teste da caixa de atividade.....	15
3.3.2 Teste da esQUIVA inibitória do tipo step-down.....	16
3.3.3 Teste do labirinto aquático.....	17
3.4 Análise estatística.....	19
4. RESULTADOS.....	20
4.1 Efeitos do envelhecimento sobre o desempenho dos animais nos testes comportamentais.....	20
4.1.1 Teste da caixa de atividade.....	20
4.1.2 Teste da esQUIVA inibitóriado tipo step-down.....	20
4.1.3 Teste do labirinto aquático.....	21
4.2 Efeitos do tratamento com agmatina sobre atividade locomotora dos ratos idosos avaliada na caixa de atividade.....	22
4.3 Efeitos do tratamento com agmatina sobre os prejuízos cognitivos de ratos idosos avaliados na esQUIVA inibitória do tipo step-down.....	23
4.4 Efeitos do tratamento com agmatina sobre os prejuízos no aprendizado e memória espacial de ratos idosos avaliados no labirinto aquático.....	24
4.5 Efeito do tratamento com agmatina sobre a atividade motora de ratos adultos jovens pré-tratados com escopolamina avaliada na caixa de atividade.....	25
4.6 Efeito do tratamento com agmatina sobre os prejuízos cognitivos induzidos pela escopolamina em ratos adultos jovens avaliados na esQUIVA inibitória do tipo <i>step-down</i>	26

4.7 Efeito do tratamento com agmatina sobre os prejuízos no aprendizado e memória espacial induzidos pela escopolamina em ratos adultos jovens avaliados no labirinto aquático.....	27
5.DISSCUSSÃO.....	30
6.CONCLUSÕES.....	36
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Substratos neurais envolvidos nos processos de aprendizagem e memória.....	03
FIGURA 2 – Vias metabólicas de agmatina e os compostos relacionados.....	09
FIGURA 3 - Ilustração do teste da caixa de atividade.....	16
FIGURA 4 - Ilustração do teste da esQUIVA inibitória do tipo <i>step-down</i>	17
FIGURA 5 - Ilustração do teste do labirinto aquático.....	18
FIGURA 6 – Efeito do envelhecimento sobre o desempenho locomotor em ratos avaliados no teste da caixa de atividade.....	20
FIGURA 7 – Efeito do envelhecimento sobre a capacidade de retenção de memória de curto (1,5 h) e longo prazo (24 h) na tarefa de esQUIVA inibitória do tipo <i>step-down</i> em ratos.....	21
FIGURA 8 – Efeito do envelhecimento sobre o desempenho no aprendizado e memória espacial em ratos avaliados no labirinto aquático.....	22
FIGURA 9 - Efeitos do tratamento agudo com agmatina (10, 50 ou 100 mg/kg, i.p.) na atividade locomotora de ratos idosos avaliados na caixa de atividade.....	23
FIGURA 10 - Efeitos do tratamento com agmatina (10, 50 e 100 mg/kg, i.p.) sobre a retenção das memória de curto (1,5 h) e longo prazo (24 h) avaliados na tarefa de esQUIVA inibitória do tipo <i>step-down</i> em ratos idosos.....	24
FIGURA 11 - Efeitos do tratamento agudo com agmatina (10, 50 ou 100 mg/kg, i.p.) no desempenho de ratos idosos avaliados no labirinto aquático.....	25
FIGURA 12 - Efeitos do tratamento agudo com agmatina (10, 50 ou 100 mg/kg, i.p.) na atividade locomotora de ratos adultos jovens pré-tratados com escopolamina (1 mg/kg, i.p.) avaliada na caixa de atividade.....	26
FIGURA 13 - Efeitos do tratamento com agmatina (10, 50 e 100 mg/kg, i.p) sobre a retenção das memória de curto (1,5 h) e longo prazo (24 h) avaliados na tarefa de esQUIVA inibitória do tipo <i>step-down</i> em ratos adultos jovens pré-tratados com escopolamina (1 mg/kg).....	27
FIGURA 14 - Efeitos do tratamento agudo com agmatina (10, 50	

ou 100 mg/kg, i.p.) no desempenho de ratos adultos jovens pré-tratados com escopolamina (1 mg/kg, i.p.) avaliados no labirinto aquático..... 28

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Classificação dos diferentes tipos de memória quanto tempo de retenção e ao conteúdo.....	02
TABELA 2 – Sumário dos efeitos da agmatina sobre o comportamento de ratos adultos jovens (3 meses) tratados com escopolamina e ratos idosos (15 meses).....	29

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADC	Arginina descarboxilase
Aβ	Peptídeo beta-amilóide
DA	Doença de Alzheimer
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Doença de Parkinson
EI	Esquiva inibitória
GD	Giro denteado
h	Hora
i.p.	Intraperitoneal
MAO	Monoamina oxidase
NMDA	N-metil -D- Aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
RNA	Ácido ribonucléico
SNC	Sistema nervoso central
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

RESUMO: A agmatina é uma substância endógena que possui características de um neuromodulador. Devido à abundância de agmatina no sistema nervoso central, particularmente no hipocampo, alguns estudos recentes têm investigado o papel desta poliamina sobre processos de aprendizagem e memória. O principal objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da administração exógena de agmatina (10, 50 e 100 mg/kg, i.p.) nos prejuízos da memória espacial de curto e longo prazo decorrentes do envelhecimento ou de um pré-tratamento com escopolamina (1 mg/kg, i.p.) em ratos avaliados nos testes do labirinto aquático e esQUIVA inibitória do tipo *step-down*. Ratos Wistar machos envelhecidos (15 meses de idade) apresentaram prejuízos locomotor e cognitivo decorrentes da idade nos testes comportamentais realizados. A escopolamina, através do bloqueio de receptores muscarínicos para acetilcolina, induziu prejuízo cognitivo no grupo de animais adultos jovens (3 meses de idade). De maneira importante, o tratamento agudo com agmatina (50 ou 100 mg/kg, i.p.) foi capaz de reverter os prejuízos da memória de curto e longo prazo relacionados ao envelhecimento em ratos avaliados no teste da esQUIVA inibitória do tipo *step-down*. No entanto, o tratamento agudo com estas mesmas doses de agmatina reduziu o desempenho motor dos animais na caixa de atividade. Além disso, agmatina não foi capaz de reverter os deficits de aprendizado e memória induzidos pela escopolamina em ratos adultos jovens. Em conjunto, os resultados do presente estudo demonstram que o tratamento agudo com agmatina é capaz de reverter os prejuízos nas memórias de curto e longo prazo associados ao envelhecimento em roedores e que esta resposta parece ser independente do sistema colinérgico.

Palavras-chave: Agmatina, Envelhecimento, Aprendizado e Memória, Escopolamina, Rato.

ABSTRACT: Agmatine is an endogenous substance that has been characterized as a neuromodulator. Due to the abundance of agmatine in the central nervous system, particularly in the hippocampus, recent studies have investigated the role of this polyamine on learning and memory. The main objective of this study was to investigate the effects of exogenous administration of agmatine (10, 50 and 100 mg/kg, i.p.) in the short- and long-term spatial memory impairments induced by aging or scopolamine administration (1 mg/kg, i.p.) in rats evaluated in the water maze and step-down inhibitory avoidance tasks. Aged rats (15 months-old) displayed marked motor and cognitive impairments. Scopolamine induced cognitive impairment in young adult rats (3 months-old) through the blockage of acetylcholine muscarinic receptors. Acute treatment with agmatine (50 or 100 mg/kg, i.p.) reversed age-related short- and long-term spatial memory impairments in rats assessed in the step-down inhibitory avoidance test. However, at the same doses, agmatine reduced motor activity of aged rats in the activity cage. Moreover, agmatine failed to reverse learning and memory deficits induced by scopolamine in young adult rats. Altogether, the findings of the present study suggest that acute treatment with agmatine reverses, at least in part, age-related short- and long-term memory impairments and that this response appears to be independent of the cholinergic system.

Keywords: Agmatine, Aging, Learning and Memory, Scopolamine, Rat.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Processos de aprendizado e memória

A memória é a retenção da informação aprendida (LYNCH, 2004), sendo um processo que requer a atividade integrada de diferentes regiões do encéfalo e sistemas de neurotransmissão (HU et al., 2005). Já o aprendizado pode ser definido como o mecanismo pelo qual novas informações ou conhecimentos são adquiridos, ou seja, é a aquisição de novas informações, sendo o primeiro estágio da memória (LYNCH, 2004).

Pelo fato das memórias, tanto dos homens quanto de outros animais, serem provenientes das suas experiências, é mais correto falar em “memórias” ou processos de memória do que simplesmente em “memória”, uma vez que podem existir tantas memórias quanto o número de experiências possíveis (IZQUIERDO, 2002). Como a natureza das experiências vivenciadas é a mais variada possível, é de se esperar que existam diferentes tipos de memórias e que estas estejam relacionadas a diferentes áreas cerebrais e, conseqüentemente, mecanismos celulares distintos.

Atualmente, existem dezenas de diferentes classificações para os processos de aprendizado e memória, sofrendo grande variação conforme o enfoque utilizado pelo autor. De maneira geral, os tipos de memória podem ser classificados de acordo com a sua natureza, conteúdo e tempo de retenção (ver Tabela 1) (para revisão, ver IZQUIERDO, 2002).

Tabela 1: Classificação dos diferentes tipos de memória quanto à natureza, tempo de retenção e principais características. Fonte: modificado de IZQUIERDO, 2002.

Tipos e Características da Memória		
	<i>Tipos e Subtipos</i>	<i>Características</i>
Quanto ao tempo de retenção	Ultra-rápida	Dura de frações de segundos a alguns segundos; memória sensorial
	Curta duração	Dura minutos ou horas, garante o sentido de continuidade do presente
	Longa duração	Dura horas, dias ou anos, garante o registro do passado autobiográfico e dos conhecimentos do indivíduo
Quanto à natureza	Explícita	Pode ser descrita por meio de palavras
	Episódica	Tem uma referência temporal; memória de fatos seqüenciados
	Semântica	Envolve conceitos atemporais; memória cultural
	Implícita	Não pode ser descrita por meio de palavras
	De representação perceptual	Imagens sem significado conhecido; memória pré-consciente
	De procedimentos	Hábitos, habilidades e regras
Associativa	Condicionamento clássico e operante	
Não associativa	Habituação ou sensibilização	
	Operacional	Permite o raciocínio e o planejamento do comportamento

No que se refere à duração da retenção da memória, sabe-se que em nível celular, o armazenamento da memória de longa duração é associado com expressão gênica, síntese de proteínas e novas conexões sinápticas. Inibidores de síntese de proteínas podem bloquear a formação de memória de longa duração, sem, todavia, afetar as memórias de curta duração (LYNCH, 2004).

A busca pela localização espacial da memória existe há mais de um século. No princípio, os pesquisadores afirmavam que os processos cognitivos estavam centrados no neocórtex. Atualmente, sabe-se que diversas estruturas encefálicas estão envolvidas com as diferentes etapas (aquisição, consolidação e evocação) da memória, com destaque

para o hipocampo, a amígdala, o septo medial, o córtex temporal, o córtex pré-frontal, o estriado e o cerebelo (LENT, 2002) (ver Figura 1).

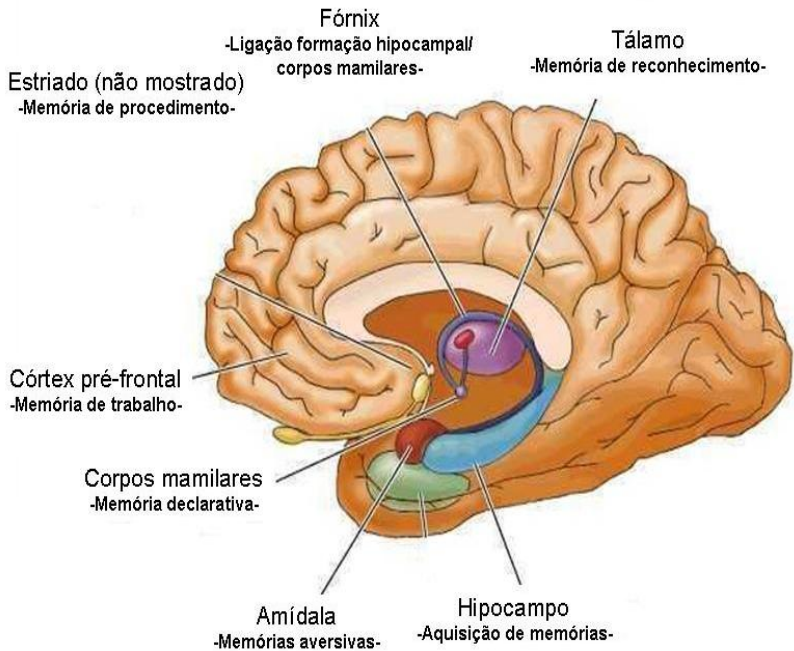


Figura 1. Estruturas encefálicas envolvidas nos processos de aprendizagem e memória. Fonte: retirado de LENT, 2002.

Como ilustrado na Figura 1, o hipocampo exerce um papel crucial nos processos de aprendizado e memória, principalmente na etapa de consolidação das memórias do tipo explícita ou declarativa em humanos, e espacial em roedores (OTTO; EICHEMBAUM, 1992; WANG et al., 2006).

De acordo com IZQUIERDO (1988), toda memória implica na mudança de comportamento, somente podendo ser avaliada através dessa mudança. Desta maneira, somente tem-se certeza de que determinados conhecimentos ou habilidades foram adquiridos satisfatoriamente no momento em que serão utilizados e, portanto, recordados para a realização de uma tarefa ou atividade. Se não é possível medir a evocação, isto é, a alteração do comportamento, não é possível detectar a existência da memória (IZQUIERDO, 1988).

É diante deste contexto, que o desenvolvimento de testes que visam à mensuração de comportamentos específicos, permite a avaliação do aprendizado e do estado da memória em seres humanos. Da mesma forma, a avaliação do aprendizado e memória em animais de laboratório, dentre eles os roedores, é possível através do desenvolvimento de modelos experimentais capazes de detectar aprendizados específicos. No entanto, por razões óbvias, como os animais não são capazes de declarar o conhecimento e as aptidões aprendidas, as mesmas devem ser avaliadas através da mudança do comportamento (GOLD, 1986).

1.2 Envelhecimento populacional

Devido às melhores condições sócio-econômicas atuais e os avanços da medicina no diagnóstico precoce e no tratamento de doenças antes não controláveis, aumentou-se a expectativa de vida e, conseqüentemente, o percentual de pessoas idosas nas sociedades em todo o mundo (BORTZ, 1995). Estima-se que a população idosa no mundo (definida como aquela com 60 anos de idade ou mais) aumentará de 605 milhões no ano 2000 para 1,2 bilhões em 2025 (UNITED NATIONS, 1999). Juntamente com a longevidade, a redução nas taxas de natalidade é um fator que contribui para que os indivíduos que estão acima de 65 anos representem aproximadamente 6,9% da população mundial (DAVANZO, 2001).

Este fenômeno de envelhecimento populacional é também verificado no Brasil. Com base no censo de 2000, existem no Brasil aproximadamente 14 milhões de idosos, sendo que nos próximos 20

anos, este número poderá ultrapassar os 30 milhões, vindo a representar cerca de 13% da população brasileira (IBGE, 2000).

O envelhecimento é um processo altamente complexo, marcado por eventos sucessivos que promovem alterações no funcionamento normal de um organismo ao longo do tempo (BRANNON, 2010). Além do declínio do funcionamento de atividades fisiológicas, as dificuldades cognitivas e em especial as dificuldades de memória são tradicionalmente consideradas características intrínsecas do processo de envelhecimento (FALKEINSTEIN; SOMMER, 2006). De modo geral, no momento em que os comprometimentos progredem e tornam-se graves o suficiente para prejudicar o desempenho profissional, o relacionamento social e a qualidade de vida dos indivíduos, estes deixam de ser alterações fisiológicas e passam a ser indicadores de possível demência (COHEN; WELLER, 2005).

1.3 Neurofisiologia do envelhecimento

As alterações no sistema nervoso central (SNC) podem desempenhar um papel importante no processo de envelhecimento: alterações neurofisiológicas que resultam em redução no tamanho e número de neurônios, uma diminuição na eficiência do contato sináptico e mudanças neuroquímicas através de uma redução na concentração de neurotransmissores (RAZ, 2000). Além disso, distúrbios neuroanatômicos em estruturas como o córtex pré-frontal (GRADY et al., 1998) e uma redução no volume do cérebro, tanto na substância cinzenta quanto na branca (RAZ, 2000) já foram associados ao processo de envelhecimento.

Porém devem ser destacadas as várias alterações físico-químicas de células encontradas em certos tecidos cerebrais (como o hipocampo), as quais têm demonstrado desempenhar um papel importante na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson (DP) e a doença de Alzheimer (DA) (BRANNON, 2010).

1.4 Doença de Alzheimer

Tratando-se da doença de Alzheimer (DA), a característica clínica proeminente da doença é a perda progressiva nas funções cognitivas. Inicialmente, ocorre prejuízo do aprendizado e da memória de curto-prazo, sem alteração em outras funções cognitivas. Em seguida, são observadas mudanças na memória de longo-prazo, na orientação e nas funções executivas relacionadas à concentração e planejamento (WALSH; SELKOE, 2004). Também podem ocorrer alterações na personalidade e no comportamento, tais como irritabilidade, ansiedade, agitação ou mesmo alucinações. Com a progressão da doença, é observada a deterioração da linguagem, habilidades visuo-espaciais e funções motoras (TERI et al., 1989; CLARK et al., 2000; PETRELLA et al., 2003; WALSH; SELKOE, 2004).

As características neuropatológicas da DA incluem a perda de sinapses e a presença de placas senis e dos emaranhados neurofibrilares. As placas senis são compostas primariamente da proteína β -amilóide ($A\beta$) composta de 39-43 aminoácidos formada após processamento proteolítico por α - e β -secretases à partir da proteína precursora amilóide (APP) (HAALS; DE STROOPER, 1999; PREDIGER et al., 2007).

Entretanto, o envelhecimento *per se*, mesmo sem as mencionadas patologias, traz perceptíveis deficiências locomotoras e cognitivas em humanos (SNYDER et al., 2007; MATTAY; GOLDBERG et al., 2008).

1.5 Memória e o processo de envelhecimento

De acordo com GRADY (2006), os declínios mais evidentes gerados pelo envelhecimento podem ser observados na memória episódica, na atenção e nos aspectos da percepção emocional. O hipocampo representa um dos primeiros alvos do SNC susceptível aos danos estruturais e fisiológicos relacionados ao envelhecimento (ROSENZWEIG; BARNES, 2003; JACOBSON et al., 2008), sendo estes danos hipocampais responsáveis, ao menos em parte, para o declínio da memória declarativa com o envelhecimento (DRISCOLL; SUTHERLAND, 2005).

De maneira importante, estudos prévios têm demonstrado que o declínio no processo cognitivo e locomotor relacionado ao envelhecimento, verificado em humanos e roedores, está associado, ao menos em parte, a degeneração de neurônios colinérgicos (BARTUS et al., 1982; ALTAVISTA et al., 1990; GALLAGHER; COLOMBO, 1995; BAXTER et al., 1999). Conforme descrito por ATRI (2004), o bloqueio de receptores colinérgicos muscarínicos interfere no armazenamento de novas informações, sendo que o mecanismo envolvido neste processo se pronuncia pela supressão da atividade neural excitatória. Como exemplo, podemos citar a escopolamina, um antagonista não-seletivo dos receptores muscarínicos para a acetilcolina capaz de promover déficits de aprendizagem e memória poucos minutos após a sua administração. Por esta razão, a escopolamina tem sido usada como modelo farmacológico para induzir amnésia e déficits cognitivos em animais de laboratórios (HARRISON et al., 2009).

Estudos recentes têm indicado que a reposição da acetilcolina é capaz de melhorar a capacidade cognitiva e comportamental de portadores da DA (BLENNOW et al., 2006), uma vez que alterações na neurotransmissão colinérgica e na enzima colina-acetiltransferase ocorrem freqüentemente nos indivíduos afetados por esta doença (MATTSON, 2004). Além disso, os medicamentos usados atualmente no tratamento da DA (com exceção da memantina) atuam através da inibição da enzima acetilcolinesterase (responsável pela metabolização da acetilcolina na fenda sináptica). Essas drogas têm efeito paliativo sobre os prejuízos cognitivos observados em pacientes com a DA, sendo que evidências recentes sugerem que estes fármacos possam retardar a evolução natural da doença (BLENNOW et al., 2006).

Entretanto, o sistema colinérgico não é o único sistema de neurotransmissão afetado pelo envelhecimento. Alterações nos sistemas glutamatérgico (JACOBSON et al., 2008), serotoninérgico (LAMAR et al., 2007), dopaminérgico (DREHER et al., 2008; ROLLO, 2009) e noradrenérgico (ALMAGUER-MELIAN et al., 2005) também já foram demonstradas durante o processo de envelhecimento.

Além disso, um número crescente de evidências sugerem o envolvimento da L-arginina, um aminoácido semi-essencial, no processo de envelhecimento. L-arginina é metabolizada pela óxido

nítrico sintetase (NOS), com a formação do óxido nítrico (NO) e L-citrulina (WU; MORRIS, 1998). Em condições normais, o NO é fundamental para a regulação fisiológica do SNC (MONCADA et al., 1991; LIU et al., 2008a). A L-arginina, quando metabolizada pela arginase promove a síntese de L-ornitina e uréia. Porém, a L-arginina também pode ser metabolizada por arginina descarboxilase (ADC) com a formação de agmatina e dióxido de carbono (WU; MORRIS, 1998).

Embora o papel da arginase no SNC seja mal compreendido, pesquisas recentes têm demonstrado mudanças relacionadas à idade na atividade da arginase e na expressão de proteínas em estruturas cerebrais relacionadas à memória, associada à significativas correlações com o desempenho comportamental de animais, sugerindo um potencial envolvimento da arginase no processo de envelhecimento cerebral (LIU et al., 2008c).

De acordo com a afirmação de LI e DINSE (2002), com o envelhecimento da população mundial há uma urgência na melhor compreensão dos mecanismos e processos que influenciam no envelhecimento das funções cognitivas e sensório-motoras, buscando-se "reduzir o declínio ou promover melhorias individuais e ambientais nas funções compensatórias".

1.6 Agmatina

A agmatina foi primeiramente descrita por Kossel em 1910, sendo conhecida como um intermediário no metabolismo das poliaminas de várias bactérias, fungos, parasitas, plantas e invertebrados marinhos, sendo que nestes indivíduos as poliaminas têm uma importante função no crescimento e diferenciação celular (REIS; REGUNATHAN, 2000). Estudos recentes sugerem que a agmatina esteja também presente em tecidos de mamíferos, incluindo o SNC (LI et al, 1994;. REIS; REGUNATHAN, 2000; LIU et al., 2008a).

Como descrito anteriormente, a agmatina é proveniente da descarboxilação da L-arginina, pela ação da enzima arginina descarboxilase (Figura 2). A atividade da arginina descarboxilase é associada com as membranas mitocondriais, sendo mais prevalente nos rins, fígado e cérebro (LORTIE et al., 1996; GRUNDEMANN et al., 2003). A agmatina produzida pode ser metabolizada a produtos como

espermina, por ação da enzima agmatinase, ou metabolizada a ácido guanido butanóico (o qual será excretado pelo organismo), por ação da enzima diamina oxidase (Figura 2) (Reis e REGUNATHAN, 2000; RAASCH et al., 2001; MOINARD et al., 2005).

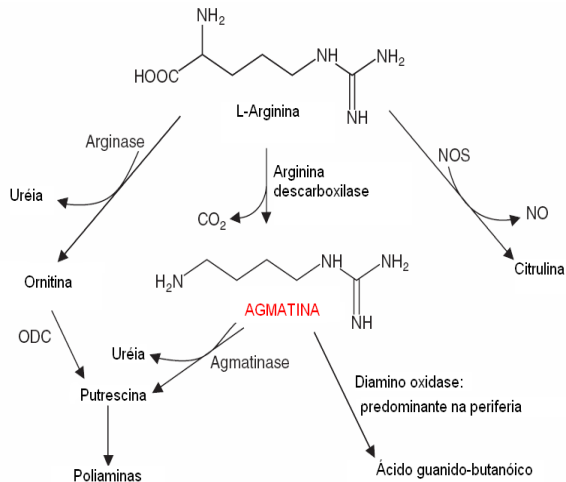


Figura 2. Vias de síntese e degradação da agmatina, modificado de (HALARIS; PILETZ, 2007).

Entretanto, deve ser destacado que a presença da agmatina na via metabólica da arginina, e também a sua existência em mamíferos, foi questionada até o ano de 2004 (COLEMAN et al., 2004; HALARIS; PILETZ, 2007). Tem sido bem documentado que as poliaminas desempenham um papel importante na proliferação e diferenciação celular, síntese de DNA, RNA e proteínas, na fosforilação proteica, e na transdução de sinal, e que a poliamina espermidina tem efeitos positivos na aprendizagem e memória (WILLIAMS, 1997; WALLACE, 2000; RUBIN et al., 2000, 2001; OREDSSON, 2003; BERLESE et al., 2005; GUERRA et al., 2006). Um estudo recente demonstrou que a redução dos níveis de poliaminas (induzida por difluorometilornitina, um potente inibidor específico e irreversível da ornitina descarboxilase) prejudica a

neurogênese no giro denteado (GD) no hipocampo de ratos adultos jovens (MALATERRE et al., 2004; LIU et al., 2008b).

A concentração da agmatina varia regionalmente nos mamíferos. Comparativamente, o encéfalo apresenta aproximadamente 10% da concentração de agmatina presente no estômago, órgão que apresenta concentrações elevadas desta amina. Ela está presente no córtex cerebral (principalmente lâmina VI e V), hipocampo, complexo amigdalóide, hipotálamo e tronco cerebral. Em nível celular, a agmatina está presente no corpo celular, dendritos, axônios e terminais nervosos dos neurônios (REIS; REGUNNATHAN, 2000; HALARIS; PLIETZ, 2007; LIU et al., 2009).

No encéfalo, no entanto, a agmatina parece ter outras funções além de um intermediário metabólico. Sua concentração cerebral é semelhante à de outros neurotransmissores "clássicos". Além disso, ela é armazenada nos neurônios, sintetizada localmente, degradada por enzimas, sujeita a recaptação, liberada por despolarização, se liga com alta afinidade aos receptores de superfície celular, sendo bioativa em tecidos neurais. Estas observações sugerem que a agmatina pode atuar como um neurotransmissor/neuromodulador no SNC (REIS et al., 1998; REIS; REGUNATHAN, 2000; LIU et al., 2008b). Além disso, existem evidências de que a agmatina pode ser sintetizada em células gliais, lançada no espaço extracelular e, em seguida, recaptada e armazenada em neurônios para posteriormente ser liberada novamente (KUZIRIAN et al., 1986; SASTRE et al., 1997; REIS; REGUNATHAN, 2000). A agmatina é inativada, em nível central, por um mecanismo de degradação enzimática por ação da enzima agmatinase, que a converte em putrescina (SASTRE et al., 1996; RAASCH, 2001), como ilustrado na Figura 2.

Através do uso da técnica imunohistoquímica, utilizando anticorpos específicos anti-agmatina, foi demonstrado que ela está amplamente distribuída no SNC de roedores (incluindo ratos e camundongos), principalmente no córtex cerebral, hipocampo, tronco encefálico, mesencéfalo, tálamo e hipotálamo (WANG et al., 1995; OTAKE et al., 1998). Portanto, os neurônios que contém agmatina estão localizados em regiões cerebrais relacionadas com o controle de diversas funções importantes para a manutenção da homeostasia, tais

como controle visceral e neuroendócrino, processamento das emoções, percepção da dor e cognição (REIS; REGUNATHAN, 2000). De maneira interessante, muitos neurônios glutamatérgicos pré-sinápticos, principalmente neurônios hipocampais, contêm agmatina, sugerindo assim que a agmatina e o glutamato possam estar co-localizados no mesmo terminal (GALEA et al., 1996; REIS et al., 1998; REGUNATHAN et al., 1999; YANG; REIS, 1999; REIS; REGUNATHAN, 2000; RAASCH et al., 2001; WEISINGER, 2001; BERKELS et al., 2004).

Do ponto de vista de mecanismo de ação, a agmatina possui alta afinidade pelos receptores α_2 -adrenérgicos e imidazólicos (LI et al., 1994; REIS; REGUNATHAN, 2000; RAASCH et al., 2001). Liga-se também a receptores imidazólicos do tipo 1 (I1) e, como consequência, promove redução da pressão sanguínea central, natriurese, fluxo urinário e analgesia. Liga-se também a receptores imidazólicos do tipo 2 (I2) e promove redução da atividade da monoamina oxidase (MAO), crescimento celular, analgesia e está relacionada com a depressão (REIS; REGUNATHAN, 2000; RAASCH et al., 2001; MOINARD et al., 2005). Esta amina liga-se com baixa afinidade em receptores α_1 - e β adrenérgicos, 5-HT₃-serotoninérgicos, D₂-dopaminérgicos, κ -opióides e receptores A₁-adenosinérgicos (RAASCH et al., 2001).

Na última década, diversos estudos têm demonstrado que a agmatina pode bloquear os canais dos receptores NMDA para glutamato (YANG; REIS, 1999; REIS; REGUNATHAN, 2000; FENG et al., 2002; LUSZCZKI et al., 2009), receptores nicotínicos e serotoninérgicos (LORING, 1990; BERKELS et al., 2004; WANG et al., 2006) e canais de Ca²⁺ voltagem-dependentes (WENG et al., 2003.; ZHENG et al., 2004; LUSZCZKI et al., 2009), sendo capaz também de inibir todas as isoformas da NOS (TASSONE et al., 2002; HALARIS; PLIETZ, 2007; LUSZCZKI et al., 2009).

De especial importância, HONG e colaboradores (2009) demonstraram recentemente que a agmatina promove neuroproteção por inibir o processo de apoptose (“morte programada”) induzida pelo fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) em cultura de células de gânglio de retina de ratos. Da mesma forma, ZHU e colaboradores (2006) também relataram o efeito neuroprotetor da agmatina contra o dano celular

causado pelos glicocorticóides e glutamato em culturas primárias de neurônios do hipocampo. Portanto, embora escassos, estes estudos prévios sugerem que a agmatina possa apresentar uma atividade neuroprotetora.

Além disso, a agmatina apresenta efeito antidepressivo em alguns modelos experimentais (ZOMKOWSKI et al., 2002, 2004, 2005; ARICIOGLU; ALTUMBAS, 2003; LI et al., 2003). Existem outras possíveis funções para a agmatina no SNC, tais como modular processos de aprendizado e memória (ARTENI et al., 2002), ansiolítica (ARICIOGLU; ALTUMBAS, 2003; LAVINSKY et al., 2003) e anticonvulsivante (SU et al., 2004), além de participar do controle da dor (FAIRBANKS et al., 2000; KEKESI et al., 2004; SANTOS et al., 2005).

De maneira interessante, estudos prévios mostraram que o treinamento de roedores no labirinto aquático (um teste comportamental para avaliação do aprendizado e memória) aumenta os níveis de agmatina endógena no giro denteado (GD) e região CA1 do hipocampo, no córtex e núcleo vestibular (LIU et al., 2008a). Os resultados deste estudo levantam a questão de que a agmatina possa estar diretamente envolvida no processamento do aprendizado e memória (LIU et al., 2009). Adicionalmente, existem evidências de que a agmatina exógena também possa modular o aprendizado e a memória em roedores (STEWART; MCKAY, 2000; ARTENI et al., 2002.; MCKAY et al., 2002; LIU et al., 2008b).

Durante o envelhecimento, a taxa de neurogênese hipocampal é diminuída significativamente e essa diminuição está associada a prejuízos no aprendizado e memória (KUHN et al., 1996;. WATI et al., 2006). Estando a agmatina envolvida nos processos acima mencionados, supõe-se que mudanças nos níveis de agmatina possam contribuir significativamente com o declínio cognitivo relacionado ao avanço da idade (LIU et al., 2008c).

Diante do exposto acima, para testar a hipótese de que a agmatina possa participar diretamente nos processos de aprendizado e memória, investigou-se no presente estudo os efeitos da administração

exógena de agmatina sobre os prejuízos no aprendizado e memória induzidos pela escopolamina (agente amnésico que atua como antagonista dos receptores muscarínicos para acetilcolina) ou pelo envelhecimento em ratos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

✓ Avaliar os efeitos da administração sistêmica de agmatina, nos possíveis prejuízos de memória espacial e locomotores induzidos pela escopolamina ou pelo envelhecimento em ratos.

2.2 Objetivos Específicos

✓ Investigar os efeitos da administração intraperitoneal (i.p.) de agmatina nos possíveis prejuízos da memória espacial de ratos adultos jovens induzidos pela escopolamina avaliados através dos testes da esQUIVA inibitória do tipo *step-down* e do labirinto aquático.

✓ Avaliar os efeitos da administração i.p. de agmatina nos possíveis prejuízos na atividade locomotora induzidos pela escopolamina em ratos adultos jovens avaliados no teste da caixa de atividade.

✓ Investigar os efeitos da administração i.p. de agmatina nos possíveis prejuízos na memória espacial induzidos pelo envelhecimento em ratos idosos avaliados nos testes da esQUIVA inibitória do tipo *step-down* e do labirinto aquático.

✓ Investigar os efeitos da administração i.p. de agmatina nos possíveis prejuízos na atividade locomotora induzidos pelo envelhecimento em ratos idosos avaliados no teste da caixa de atividade.

3 Materiais e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com 3 meses (adultos jovens) ou 15 meses (idosos) de idade. Os animais foram criados no Biotério Setorial do Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas (LEXDON, Departamento de Farmacologia, CCB,

UFSC), mantidos em ambiente controlado a uma temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade entre 60 – 80%, ciclo claro/escuro de 12 h e alimentados com ração comercial e água *ad libitum*. Todas as manipulações foram feitas entre as 8:00 e 17:00 h. O presente estudo seguiu as recomendações do Guia de Uso e Cuidado com Animais Laboratoriais do *National Institutes of Health* (NIH) dos Estados Unidos da América (NIH *Publication* No. 85-23, revisado em 1996). Os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA): PP358, Processo:23080.019002/2009-71).

3.2 Drogas e reagentes

Para o tratamento dos animais utilizou-se agmatina (Sigma, St. Louis, EUA), dissolvida em salina (NaCl 0,9%) nas doses de 10, 50 e 100 mg/kg, administrada pela via intraperitoneal (i.p.). A agmatina foi administrada 15 min antes da realização dos testes comportamentais.

As doses utilizadas de agmatina, assim como o intervalo de tempo entre as administrações e o início dos testes comportamentais foram baseados em estudos prévios da literatura (LAVINSKY et al., 2003; SANTOS et al., 2005).

Para o pré-tratamento (realizado especificamente no grupo de animais adultos jovens), utilizou-se escopolamina (Merck, Darmstadt, Alemanha), também dissolvida em salina, na dose de 1 mg/kg, administrada pela via i.p. A escopolamina foi administrada 30 min antes dos testes comportamentais.

Da mesma forma, as doses utilizadas de escopolamina, assim como o intervalo de tempo entre as administrações e o início dos testes comportamentais foram baseados em estudos prévios da literatura (CUNHA et al., 2008; HARRISON et al., 2009).

3.3 Testes comportamentais

3.3.1 Teste da caixa de atividade

A avaliação da atividade locomotora dos ratos foi realizada em uma caixa de madeira medindo 70 x 30 x 22 cm. Esta apresentava três

células fotoelétricas instaladas a 3 cm de altura do chão em grade, espaçadas igualmente ao longo de sua extensão e acopladas a um contador digital que registrava o número de vezes que o animal interrompia os feixes de luz (cada interrupção do feixe de luz constituiu em uma medida de atividade) (Figura 3). Desta forma, somente os movimentos horizontais dos animais foram detectados pelas fotocélulas durante um período de 30 minutos, com medidas de atividade a cada 5 minutos.

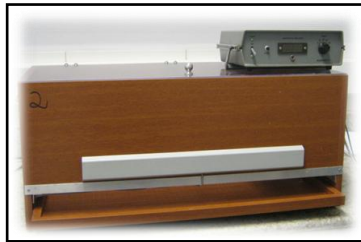


Figura 3: Ilustração do teste da caixa de atividade. Fonte: LEXDON-UFSC.

3.3.2 Teste da esQUIVA inibitória do tipo *step-down*

As memórias de curto e de longo prazo foram avaliadas através do modelo da esQUIVA inibitória do tipo *step-down*. Sendo que nesta tarefa, o animal aprende a relacionar a descida de uma plataforma com um leve choque aplicado nas patas. Com isso, numa segunda exposição à caixa de esQUIVA ele evita um comportamento inato de descer da plataforma para explorar a caixa.

O teste foi realizado em uma caixa de metal e acrílico medindo 50 x 25 x 25 cm. Parte do chão do aparelho possui uma grade com barras de bronze com 1 mm de diâmetro, com espaçamento de 1 cm entre elas, e de uma plataforma metálica. O animal foi colocado sobre a plataforma e sua latência para descer sobre a grade (com as quatro patas) foi cronometrado.

Na sessão de treino, imediatamente após o animal descer sobre a grade, ele foi estimulado com um leve choque nas patas (0.3 mA)

durante 2 segundos. Cada animal foi testado 1,5 h e 24 h após o treino para avaliação das memórias de curta e longa duração, respectivamente, realizando-se para isto o mesmo procedimento, mas omitindo-se o choque, sendo novamente cronometrado o tempo que o animal levou para descer da plataforma. Em casos específicos em que o animal não desceu da plataforma, durante as sessões de teste, um tempo máximo de 180 segundos, foi aguardado para que o animal fosse retirado da caixa.

Neste teste o aprendizado consiste em o animal não descer da plataforma, ou fazê-lo após um período de tempo maior do que aquele observado na sessão de treino (ROESLER et al., 1999).



Figura 4: Ilustração do teste da esquiua inibitória do tipo step-down (Fonte: LEXDON-UFSC).

3.3.3 Teste do labirinto aquático

O labirinto aquático consiste de um tanque circular de cor preta (1,7 m de diâmetro e 80 cm de altura), baseado no modelo proposto por Morris e colaboradores (1982), e localizado no interior de uma sala com várias pistas visuais fixadas nas paredes. O tanque foi preenchido com água até a altura de 60 cm, sendo a água mantida à temperatura constante (25 ± 2 °C). Foram estabelecidas 4 posições de partida (Norte, Sul, Leste e Oeste) que dividiram a superfície do labirinto em 4 quadrantes (Nordeste, Noroeste, Sudeste e Sudoeste). A plataforma era de acrílico transparente (10 x 10 cm) e ficava submersa 1 cm da superfície da água.

Foi utilizada a versão memória espacial de referência, cujo protocolo experimental consistiu em cinco sessões de treino e uma sessão de teste, conforme descrito por Prediger e colaboradores (2006).

Os animais foram submetidos às sessões de treino 30 ou 15 min após a administração, respectivamente, de escopolamina e/ou agmatina. A sessão de teste foi realizada 24 h após o treinamento. Durante o treinamento os animais foram colocados para nadar até encontrarem a plataforma, em um período máximo de 60 s. Caso o animal não encontrasse a plataforma nesse intervalo de tempo, o mesmo era conduzido manualmente até a mesma, onde permanecia por 10 s. Após os 10 s sobre a plataforma, o animal foi retirado do labirinto e colocado em uma caixa acrílica por 20 s, sendo então posicionado no ponto de partida seguinte. O tempo (latência) necessário para o animal encontrar a plataforma foi registrado. Este procedimento foi realizado 5 vezes durante a sessão de treino, onde os animais foram liberados para nadar de pontos de partida diferentes de forma pseudo-aleatória, sendo que nesta etapa a plataforma permaneceu na mesma posição (quadrante Sudeste). Na sessão de teste, realizada 24 h após o treino, a plataforma foi removida do tanque e os animais foram colocados para nadar (a partir da posição Norte) durante 60 s, durante os quais foi quantificado o tempo (latência) para os ratos encontrarem a plataforma e o tempo despedido (duração) no quadrante onde a plataforma encontrava-se na sessão de treino.

Na sessão de teste foi avaliada a % de tempo no quadrante correto, o tempo de latência para o animal localizar a plataforma e a velocidade de nado (m/s).

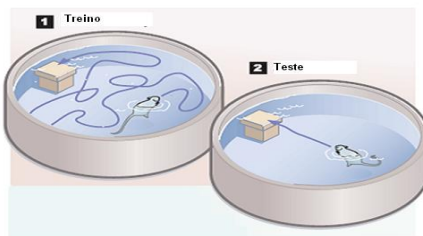


Figura 5: Ilustração do teste do labirinto aquático de Morris para roedores (retirado de TAKAHASHI et al., 2008).

3.3 Análise Estatística

No teste da esquia inibitória do tipo *step-down* foi realizada uma análise não paramétrica onde foram apresentadas as medianas e intervalo interquartis das latências de descida da plataforma e estes foram analisados estatisticamente através do teste Kruskal-Wallis, seguido do teste *post hoc* de Dunn através do Graph Pad Prism 4® (GraphPad Software Inc.).

Os outros resultados foram expressos pela média \pm erro padrão da média (E.P.M.), sendo utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma ou mais vias (dependendo do protocolo experimental) e para comparações múltiplas entre os grupos foi realizado o teste *post hoc* de Newman-Keuls utilizando o programa STATISTIC® software package (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

Para todos os testes a probabilidade aceita como indicativo da existência de diferença estatisticamente significativa foi de $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos do envelhecimento sobre o desempenho dos animais nos testes comportamentais

4.1.1 Teste da caixa de atividade

A Figura 6 mostra o número de cruzamentos totais realizados pelos animais de 3 e 15 meses no teste da caixa de atividade durante um período de 30 minutos. A ANOVA de uma via revelou um prejuízo significativo na atividade locomotora espontânea dos ratos idosos (15 meses) [$F(1, 12)=8,25, P<0,05$] demonstrado pela diminuição do número de cruzamentos totais dos mesmos em comparação ao desempenho dos animais adultos jovens (3 meses).

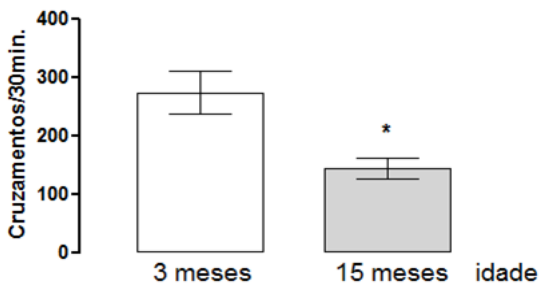


Figura 6 – Efeito do envelhecimento sobre o desempenho locomotor em ratos jovens (3 meses) e idosos (15 meses) avaliados no teste da caixa de atividade. As barras verticais representam o número de cruzamentos (média ± E.P.M) durante 30 minutos ($n=7$ animais por grupo). * $p\leq 0,05$ comparando-se ao grupo controle de adultos jovens (teste de Newman-Keuls).

4.1.2 Teste da esQUIVA inibitória do tipo step down

A Figura 7 ilustra a latência em segundos para que os animais desçam da plataforma, 1,5 h e 24 h após terem recebido o choque durante o treinamento. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's demonstrou um prejuízo na capacidade de retenção da memória, tanto de curto- quanto de longo-prazo, pelo grupo de animais idosos (15 meses) [$P<0,05$], tendo em vista uma redução na latência para que os

mesmos descessem da plataforma quando comparado ao tempo gasto pelos animais adultos jovens (3 meses).

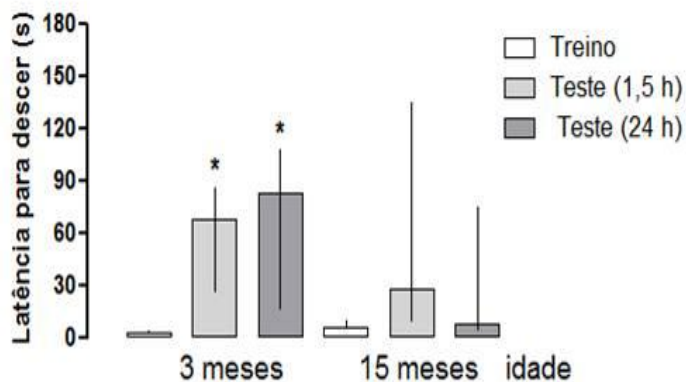


Figura 7 – Efeito do envelhecimento sobre a capacidade de retenção de memória de curto- (1,5 h) e longo-prazo (24 h) na tarefa de esquiiva inibitória do tipo step-down em ratos jovens (3 meses) e idosos (15 meses). Os dados são apresentados como mediana (intervalos interquartis) dos tempos de latência para descida da plataforma nas sessões de treino (branco) e teste (cinza) ($n=7$ animais por grupo). * $P \leq 0,05$ em comparação ao grupo controle de adultos jovens (teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's).

4.1.3 Teste do Labirinto Aquático

Os efeitos do envelhecimento sobre os processos de aprendizado e memória espacial de ratos foram também avaliados no teste do labirinto aquático durante as sessões de treino e teste. De acordo com a ANOVA de uma via com medidas repetidas, os animais idosos demonstraram prejuízo de aprendizado espacial durante o treino quando comparados ao grupo de animais jovens, sendo este indicado por um aumento significativo na latência para encontrar a plataforma durante o treino [$F(2,9)=5,91$, $P<0,05$] (Figura 8A). Estes resultados foram confirmados na sessão de teste, aonde os animais idosos apresentaram um menor tempo de nado no quadrante correto ($P<0,05$) (Figura 8B).

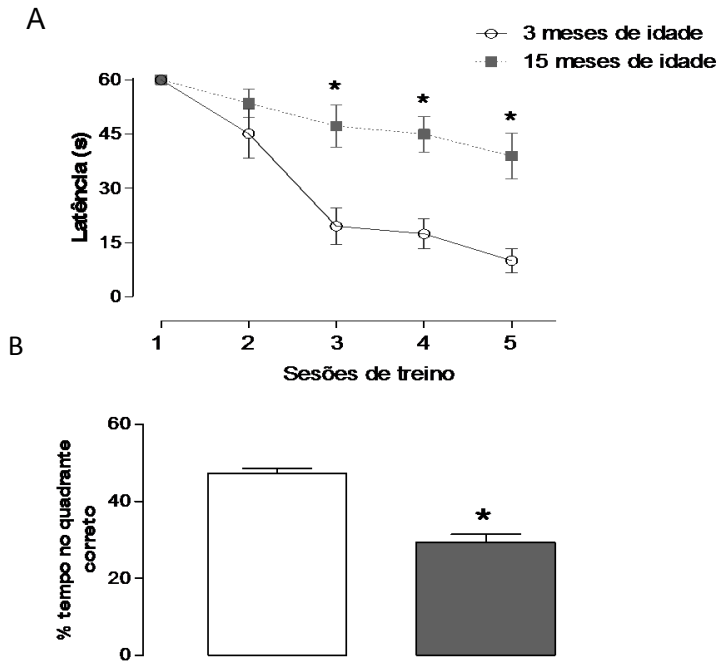


Figura 8 – Efeito do envelhecimento sobre o aprendizado e a memória espacial em ratos jovens (3 meses) e idosos (15 meses) avaliados no labirinto aquático. (A) As linhas horizontais representam a média \pm E.P.M. da latência (s) gasta pelos animais para encontrar a plataforma submersa durante o treinamento. (B) As barras verticais representam a média \pm E.P.M. da porcentagem de tempo gasto pelos animais no quadrante correto durante a sessão de teste ($n=7$ animais por grupo). * $P \leq 0,05$ em comparação ao grupo controle de adultos jovens (teste de Newman-Keuls).

4.2 Efeitos do tratamento com agmatina sobre a atividade locomotora dos animais idosos avaliada na caixa de atividade

A Figura 9 ilustra o efeito do tratamento com agmatina (10, 50 ou 100 mg/kg, i.p.) sobre a atividade locomotora dos animais idosos (15 meses) avaliada no teste da caixa de atividade durante 30 min. A

ANOVA de uma via revelou um efeito significativo para o fator tratamento no número de cruzamentos na caixa de atividade [F(3,20)=6,60, $P<0,005$]. Posterior teste de Newman-Keuls indicou que a administração de agmatina, na dose de 50 mg/kg, i.p., promoveu uma redução na atividade espontânea dos ratos idosos na caixa de atividade, sendo que as demais doses de agmatina não alteraram este parâmetro (Figura 9).

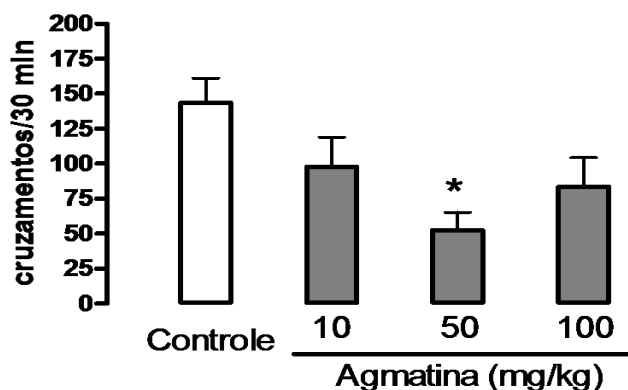


Figura 9 - Efeitos do tratamento agudo com agmatina (10, 50 ou 100 mg/kg, i.p.) na atividade locomotora de ratos idosos (15 meses) avaliada na caixa de atividade durante 30min. As barras verticais (média ± E.P.M) representam o número de cruzamentos ($n=7-8$ animais por grupo). * $p \leq 0,05$ se comparado ao grupo controle (Teste de Newman-Keuls).

4.3 Efeitos do tratamento com agmatina sobre os prejuízos cognitivos de animais idosos avaliados na esQUIVA inibitória do tipo *step-down*

Como ilustrado na Figura 10, os animais idosos (15 meses) tratados com agmatina (nas doses de 10 e 50 mg/kg, i.p.) apresentaram uma melhora significativa na capacidade de retenção das memórias decurso- e longo-prazo, indicado uma latência maior [$P<0,05$] para descer da plataforma nas sessões de teste realizadas, respectivamente, 1,5 h e 24 h após o treinamento.

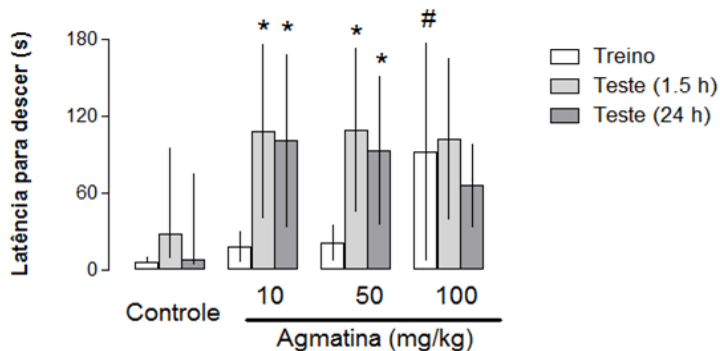


Figura 10 - Efeitos do tratamento com agmatina (10, 50 e 100 mg/kg, i.p.) sobre a retenção de memória de curto- (1,5 h) e longo-prazo (24 h) avaliados na tarefa de esQUIVA inibitória do tipo *step-down* em ratos de 15 meses de idade. Os dados são demonstrados como mediana (intervalos interquartis) dos tempos de latência para descida da plataforma nas sessões de treino (branco) e teste (cinza) ($n= 7-8$ animais por grupo). As comparações estatísticas foram realizadas através do teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's. * $P \leq 0,05$ comparado a sessão de treino do mesmo grupo. # $P \leq 0,05$ comparado a sessão de treino do grupo controle.

4.4 Efeitos do tratamento com agmatina sobre os prejuízos no aprendizado e memória espacial de ratos idosos avaliados no labirinto aquático

Os efeitos do tratamento agudo com agmatina (10, 50 e 100 mg/kg, i.p.) na reversão dos prejuízos no aprendizado e memória espacial de ratos idosos (15 meses) avaliados no labirinto aquático estão ilustrados na Figura 11. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou não haver diferença estatisticamente significativa entre a latência para encontrar a plataforma submersa durante o treino [$F(3,24)=0,14$, $p= 0,93$] (Figura 11A). De maneira consistente, a ANOVA de uma via revelou um efeito não significativo para o fator tratamento na porcentagem do tempo gasto no quadrante correto durante a sessão de teste do labirinto aquático [$F(3,21)=0,78$, $p= 0,51$].

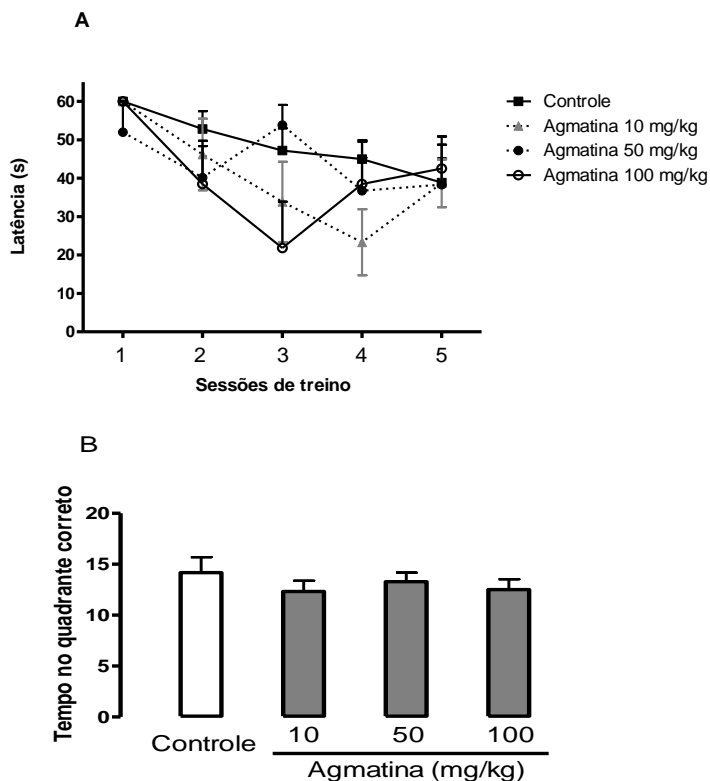


Figura 11 - Efeitos do tratamento agudo com agmatina (10, 50 ou 100 mg/kg, i.p.) no desempenho de ratos idosos (15 meses) avaliados no labirinto aquático. (A) As linhas horizontais representam a média \pm E.P.M. da latência (s) gasta pelos animais para encontrar a plataforma submersa durante o treinamento. (B) As barras verticais representam a média \pm E.P.M. da porcentagem de tempo gasto pelos animais no quadrante correto durante a sessão de teste ($n=7-8$ animais por grupo).

4.5 Efeitos do tratamento com agmatina sobre a atividade motora de ratos adultos jovens pré-tratados com escopolamina

A atividade motora dos ratos adultos jovens (3 meses de idade) pré-tratados com escopolamina (1 mg/kg, i.p.) e posteriormente tratados com agmatina (10, 50 ou 100 mg/kg, i.p.) foi avaliada na caixa de ativi

dade durante trinta minutos (Figura 12). A ANOVA duas vias (pré-tratamento x tratamento) indicou uma redução significativa no número de cruzamentos no grupo de animais pré-tratados com escopolamina e que posteriormente receberam agmatina na dose de 100 mg/kg (i.p.) [$F(4,34)= 2,51, P < 0,05$].

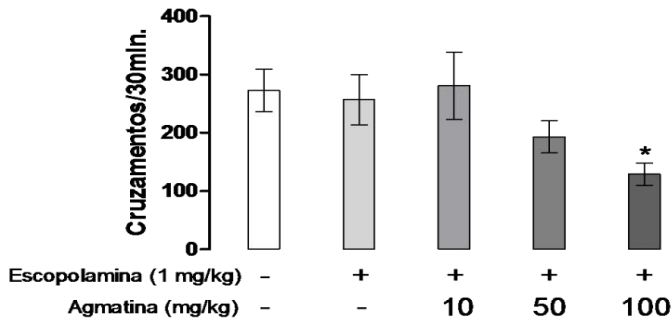


Figura 12 - Efeitos do tratamento agudo com agmatina (10, 50 ou 100 mg/kg, i.p.) na atividade locomotora de ratos adultos jovens (3 meses) pré-tratados com escopolamina (1 mg/kg, i.p.), avaliados na caixa de atividade durante 30 min. As barras verticais representam a média \pm E.P.M. do número de cruzamentos ($n= 7-8$ animais por grupo). * $p \leq 0,05$ se comparado ao grupo controle (teste de Newman-Keuls).

4.6 Efeitos do tratamento com agmatina sobre os prejuízos cognitivos induzidos pela escopolamina em ratos adultos jovens avaliados na esQUIVA inibitória do tipo step-down

Como pode ser visto na Figura 13, o pré-tratamento com escopolamina (1 mg/kg, i.p.) promoveu um prejuízo significativo nas memórias de curto- e longo-prazo, indicado por uma redução nas latências de descida nas sessões de teste do step-down. Entretanto, o tratamento com agmatina (10, 50 e 100 mg/kg, i.p.) não foi capaz de reverter os prejuízos nas memórias de curto- e longo-prazo induzidos pelo pré-tratamento com escopolamina (1 mg/kg, i.p.) nos animais adultos jovens (3 meses) avaliados na esQUIVA inibitória do tipo *step-down*.

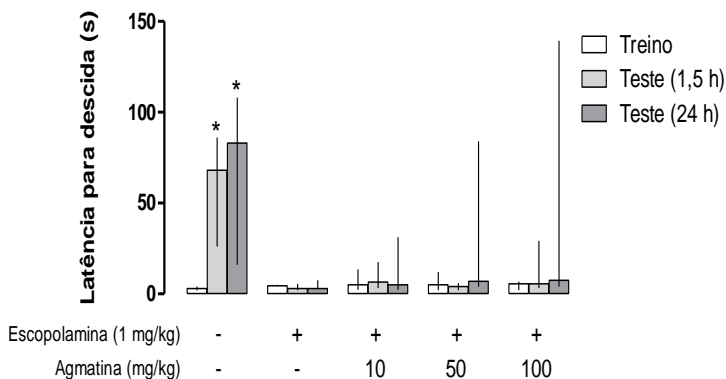


Figura 13 - Efeitos do tratamento com agmatina (nas doses de 10, 50 e 100 mg/kg, i.p) sobre a retenção de memória de curto- (1,5 h) e longo-prazo (24 h) na tarefa de esquiwa inibitória do tipo *step-down* em ratos adultos jovens (3 meses de idade) pré-tratados com escopolamina (1 mg/kg). Os dados são expressos como mediana dos tempos de latência para descida da plataforma nas sessões de treino (branco) e teste (cinza) ($n= 7-8$ animais por grupo). * $p \leq 0,05$ comparado à sessão de treino do mesmo grupo (teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's).

4.7 Efeitos do tratamento com agmatina sobre os prejuízos no aprendizado e memória espacial induzidos pela escopolamina em ratos adultos jovens avaliados no labirinto aquático

A Figura 14 ilustra a latência para que os animais encontrassem a plataforma submersa durante as sessões de treino (Figura 14A) e o número de cruzamentos realizados pelos animais na zona da plataforma durante o teste (Figura 14B). A ANOVA de duas vias com medidas repetidas demonstrou um prejuízo significativo no aprendizado e memória espacial no grupo de animais tratados com escopolamina (1 mg/kg, i.p.), indicado pelo aumento significativo nas latências para encontrar a plataforma submersa durante as sessões de treino [$F(1, 14)=25,54$, $P < 0,05$]. Entretanto, nenhuma das doses testadas de agmatina foi capaz de reverter este prejuízo no aprendizado espacial de ratos adultos jovens induzido pela escopolamina [$F(20, 175)=1,26$, $p=0,20$] (Figura 14A).

De maneira semelhante, o tratamento com agmatina não reverteu, em nenhuma das doses testadas o prejuízo na memória espacial causado pelo pré-tratamento com a escopolamina, sendo que estes apresentaram um menor número de cruzamentos sobre a zona da plataforma na sessão de teste [$F(4, 32)=0,81, p=0,52$] (Figura 14B).

Figura A

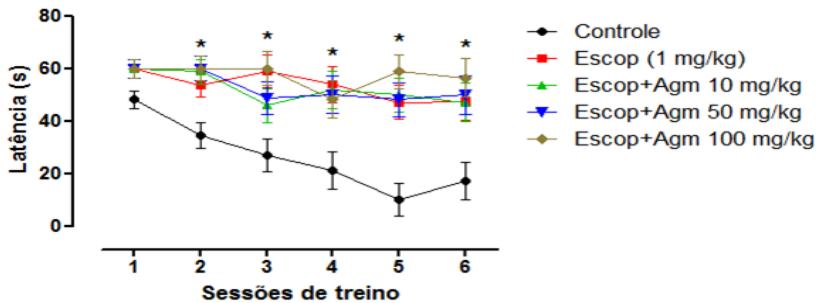


Figura B

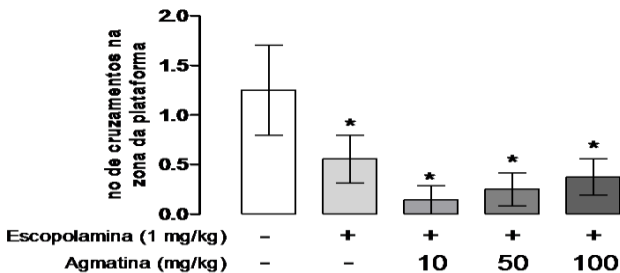


Figura 14 - Efeitos do tratamento agudo com agmatina (10, 50 ou 100 mg/kg, i.p.) no desempenho de ratos adultos jovens (3 meses) pré-tratados com escopolamina (1 mg/kg, i.p.) avaliados no labirinto aquático. (A) As linhas horizontais representam a média \pm E.P.M. da latência (s) gasta pelos animais para encontrar a plataforma submersa durante o treinamento. (B) As barras verticais representam a média \pm E.P.M. do número de cruzamentos na zona da plataforma durante a sessão de teste ($n= 7-8$ animais por grupo). * $P \leq 0,05$ em comparação ao grupo controle de adultos jovens (teste de Newman-Keuls).

Em síntese, os principais resultados obtidos no presente estudo estão ilustrados na Tabela 2.

TABELA 2. Sumário dos efeitos da agmatina sobre o comportamento de ratos adultos jovens (3 meses) tratados com escopolamina e ratos idosos (15 meses).

Teste Comportamental	Efeitos da agmatina em ratos jovens tratados com escopolamina	Resultados da agmatina em ratos idosos
Caixa de Atividade	Dose de 100 mg/kg ↓atividade motora	Dose de 50 mg/kg ↓atividade motora
Esquiva Inibitória (step-down)	Nenhuma dose testada reverteu os déficits cognitivos induzidos pela escopolamina	Doses de 10 e 50 mg/kg ↑ memórias de curto e longo prazo
Labirinto Aquático	Nenhuma dose testada reverteu os déficits cognitivos induzidos pela escopolamina	Nenhuma dose testada alterou os parâmetros avaliados nas sessões de treinamento e teste

5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo confirmam estudos prévios da literatura referentes aos prejuízos causados pelo processo de envelhecimento sobre a atividade locomotora (BRANNON, 2010) e cognitiva (DE-MELLO et al., 2005; PREDIGER et al., 2005, 2006; LIU et al., 2008c) em roedores. De maior destaque, os resultados do presente estudo sugerem: 1) Efeito benéfico do tratamento agudo com agmatina na reversão dos prejuízos da memória de curto- e longo-prazo associados ao envelhecimento em ratos avaliados no teste da esQUIVA inibitória do tipo *step-down*; 2) Prejuízo na atividade motora de ratos após tratamento agudo com doses elevadas de agmatina (50-100 mg/kg, i.p.); 3) Que os efeitos da agmatina sobre as funções cognitiva e motora de ratos parecem ser independentes dos receptores muscarínicos para acetilcolina.

A agmatina é um composto endógeno, com muitas funções biológicas, incluindo propriedades neuroprotetora, anti-amnésica, ansiolítica, anticonvulsivante e antinociceptiva (OLMOS et al., 1999; ARTENI et al., 2002; DEMEHRI et al., 2003; SANTOS et al., 2005; GADOTTI et al., 2006; GONG et al., 2006, JAROGNIEW et al., 2009). De especial importância para o presente estudo, LIU e colaboradores (2008c) demonstraram através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas uma diminuição dos níveis de agmatina na região CA1 do hipocampo e no córtex pré-frontal de ratos idosos.

Devido aos efeitos benéficos da agmatina relatados em diversos trabalhos que avaliaram suas ações em parâmetros de aprendizado e memória (MCKAY et al, 2002; LIU et al, 2008a; LIU et al, 2009a; LIU; BERGIN, 2009b), e pelo fato da agmatina tratar-se de uma substância endógena com características moduladoras e que pode ter suas concentrações em diferentes regiões cerebrais alteradas pelo processo de envelhecimento, buscou-se avaliar os efeitos do tratamento agudo com agmatina sobre os prejuízos cognitivos verificados em ratos envelhecidos (15 meses de idade) e em ratos adultos jovens pré-tratados com escopolamina, um antagonista não seletivo dos receptores muscarínicos para acetilcolina.

Os resultados do presente estudo demonstraram que o tratamento agudo com agmatina (na dose de 50 mg/kg, i.p.) promoveu uma redução da atividade locomotora de ratos idosos avaliada na caixa de atividade durante 30 min. De acordo com os nossos resultados, LIU e BERDIN (2009b) também encontraram redução da atividade locomotora em ratos submetidos ao teste do campo aberto após administração i.c.v. de agmatina no dia 1 (tratamento agudo), mas não ao fim de 12 dias de administrações repetidas de agmatina, sugerindo o desenvolvimento de tolerância a este comprometimento motor. Além disso, este mesmo estudo demonstrou também que o efeito da agmatina sobre a atividade locomotora de ratos é dose-dependente, sendo observado somente após administração de doses superiores a 100 µg (i.c.v.) (LIU e BERDIN, 2009b).

Está bem estabelecido que as memórias podem ser classificadas de acordo com sua duração em memória de trabalho (memória imediata, durando segundos ou poucos minutos), memória de curto-prazo (que desenvolve-se em poucos segundos ou minutos e dura por algumas horas) e a memória de longo-prazo (que consolida-se lentamente e é relativamente permanente) (IZQUIERDO et al., 1999). De fato, memórias de curto- e longo-prazo são identificadas como entidades distintas (IZQUIERDO et al., 1998). Estes diferentes tipos de memória podem ser avaliados em animais em diferentes tarefas comportamentais.

Neste estudo, a agmatina apresentou um efeito protetor no que se refere à consolidação da memória aprendida, tanto de curto- quanto de longo-prazo, em ratos idosos avaliados no teste de esQUIVA inibitória do tipo *step-down*, mas não no labirinto aquático. Da mesma forma, ARTENI e colaboradores (2002) observaram um efeito facilitador da agmatina no processo de consolidação da memória no teste da esQUIVA inibitória do tipo *step-down* quando foi administrada imediatamente após a sessão de treinamento, porém quando administrada uma hora antes da sessão de treino, não foi observado o mesmo efeito facilitador no processo de aquisição da memória.

O labirinto aquático tem sido utilizado amplamente para avaliar a influência de drogas, do envelhecimento ou de lesões cerebrais na perturbação da capacidade de memória espacial de ratos, avaliada pela dificuldade do animal em utilizar pistas para localizar plataformas

submersas (MORRIS, 1981; DAY; SCHALLERT, 1996). Sabe-se também que danos no hipocampo ou neocórtex (MORRIS et al, 1982; EICHEBAUM et al., 2001; LIU et al., 2008a), acidente vascular cerebral (GREEN et al., 1992) e envelhecimento fisiológico normal (SCHALLERT, 1988; SCHALLERT, 1996) causam deficiência de aprendizado no labirinto aquático de Morris similar ao prejuízo causado por drogas anticolinérgicas.

No presente estudo o teste do labirinto aquático (versão memória espacial de referência) os animais idosos tratados com agmatina (10, 50 ou 100 mg/kg, i.p.) não apresentaram reversão dos prejuízos no aprendizado e na memória espacial associados ao processo de envelhecimento, não sendo observados diminuição significativa da latência para encontrar a plataforma submersa durante o treinamento e tampouco um aumento no tempo gasto no quadrante correto na sessão de teste. Deve ser mencionado que resultados semelhantes foram descritos por LIU e BERGIN (2009b), em trabalho que utilizou a mesma versão do labirinto aquático, no qual os animais adultos jovens tratados com agmatina (10 ou 100 µg, i.c.v.) apresentaram um desempenho semelhante ao do grupo tratado com solução controle. Por outro lado, os níveis endógenos de agmatina mostraram-se aumentados no hipocampo de ratos submetidos a esse mesmo teste comportamental, sugerindo uma relevância da liberação desta substância nesse tipo de aprendizado espacial (LIU et al., 2008a). De maneira importante, nos animais submetidos somente a tarefa de nadar tal aumento não foi verificado (LIU et al., 2008a).

O sistema colinérgico, como citado na introdução, é um dos sistemas de neurotransmissão sabidamente afetados durante o processo de envelhecimento (BARTUS et al., 1982; ALTAVISTA et al., 1990; GALLAGHER; COLOMBO, 1995; BAXTER et al., 1999). Cabe ressaltar que alguns estudos demonstraram que os prejuízos na memória em pacientes portadores da doença de Alzheimer (DA) podem estar associados com a perda de neurônios colinérgicos (PERRY et al., 1977; SHERMAN et al., 2003). Sabe-se também que as tarefas aprendidas no âmbito da influência da escopolamina são mais difíceis de recuperar devido a sua capacidade de bloquear os receptores muscarínicos para acetilcolina (CROW; GROVE-WHITE, 1973; GHONEIM ;

MEWALDT, 1975, 1977; FRITH et al, 1984; HARRISON et al., 2009), e que os tratamentos clínicos disponíveis para a DA (com exceção da memantina) são fármacos inibidores da acetilcolinesterase (SUGIMOTO et al., 2000; BLENNOW et al., 2006).

Considerando esta hipótese, utilizou-se no presente estudo um pré-tratamento com escopolamina (1 mg/kg, i.p.) para indução de prejuízos de aprendizado e memória em ratos adultos jovens (3 meses) que receberam posteriormente tratamento com agmatina e foram então submetidos aos testes comportamentais. Após o pré-tratamento com a escopolamina somente os ratos tratados com a maior dose de agmatina (100 mg/kg, i.p.) apresentaram prejuízo na função motora quando submetidos ao teste da caixa de atividade. Em acordo com os nossos achados, um estudo prévio da literatura que avaliou os efeitos da agmatina em limiares de resposta ao choque periférico relatou que a administração da agmatina nas doses de 5 e 10 mg/kg (i.p.) (doses baixas) antes do condicionamento, não foi capaz de prejudicar o desempenho locomotor dos roedores durante o treinamento (STEWART; MCKAY, 2000), corroborando com os resultados descritos por LIU e BERDIN (2009b) de que o prejuízo motor causado pelo tratamento com agmatina é dependente da dose.

Como descrito anteriormente na introdução, a agmatina possui alta afinidade pelos receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos e imidazólicos (LI et al., 1994; REIS; REGUNATHAN, 2000; RAASCH et al., 2001) e a dificuldade motora apresentada pelos animais tratados com agmatina pode estar relacionada a sua afinidade pelos receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos. Existem dados da literatura que corroboram com esta hipótese, pois melhoras significativas no comportamento locomotor de roedores foram relatadas quando antagonistas $\alpha 2$ -adrenérgicos foram administrados em ratos submetidos ao teste do labirinto aquático e tarefas de condicionamento do medo (NIITTYKOSKI et al., 1998; MCKAY et al., 2002).

Além disso, estudos prévios têm demonstrado que a agmatina é capaz de inibir todas as isoformas da NOS (TASSONE et al., 2002; HALARIS; PLIETZ, 2007; LUSZCZKI et al., 2009), cujo bloqueio está também relacionado a um prejuízo locomotor em roedores (MAREN, 1998; MCKAY et al., 2002).

É importante salientar que a escopolamina *per se* não prejudicou o desempenho locomotor dos animais no referido teste. Este resultado vai de encontro a diversos estudos que demonstraram efeitos estimulantes da escopolamina na dose de 1 mg/kg, i.p. sobre a atividade locomotora em diferentes linhagens de camundongos (O'NEILL et al, 1994; VINADER-CAEROLS et al. 1996; CALAMANDREI et al, 1997;. DODART et al, 1997;. ITZHAK; MARTIN, 2000; MORAGREGA et al., 2002).

Um prejuízo na memória espacial de curto (1,5 h) e longo prazo (24 h) foi induzido devido ao pré-tratamento com a escopolamina (1 mg/kg, i.p.) em animais submetidos ao teste da esquiiva inibitória, no entanto este prejuízo não foi revertido pelo tratamento com agmatina em nenhuma das doses testadas (10, 50 ou 100 mg/kg, i.p.). De maneira semelhante, quando submetidos ao teste do labirinto aquático, ratos adultos jovens (3 meses) pré-tratados com escopolamina apresentaram um prejuízo no aprendizado e memória espacial de referência, sendo que esta resposta não foi revertida pelo tratamento com nenhuma das doses testadas de agmatina. Trabalhos prévios da literatura também demonstraram que em ratos, o bloqueio muscarínico prejudica a aprendizagem da localização da plataforma submersa no labirinto aquático de Morris (SUTHERLAND; WHISHAW; REGEHR, 1982; WHISHAW et al., 1985; DAY; SCHALLERT, 1996; SHERMAN et al., 2003).

Existe um consenso na literatura de que o aprendizado da presente versão espacial no labirinto aquático requer a integridade da região dorsal do hipocampo (MOSEY et al., 1995, MCKAY et al., 2002). É interessante notar que OTAKE e colaboradores (1998), que realizaram uma imunomarcção da agmatina em numerosos sítios de ação central, propuseram que as maiores concentrações de agmatina endógenas são encontradas no hipocampo ventral. Estes achados da literatura sugerem que o aprendizado neste teste possa estar condicionado a uma administração seletiva de agmatina na região dorsal do hipocampo.

Os resultados obtidos no presente estudo, referentes aos testes comportamentais realizados nos animais que receberam um pré-

tratamento com a escopolamina, demonstram que a agmatina não conseguiu em nenhum dos testes realizados reverter os prejuízos de aprendizado e memória induzidos pelo antagonismo dos receptores muscarínicos para acetilcolina. Levando em consideração o fato do sistema colinérgico não ser o único envolvido nos processos de aprendizado e memória, sugere-se que o efeito positivo da agmatina sobre os prejuízos cognitivos observados em ratos idosos seja mediado por sua ação em outros sistemas de neurotransmissão.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que o tratamento agudo com agmatina (i.p.) é capaz de reverter os prejuízos da memória de curto- e longo-prazo relacionados ao envelhecimento em ratos avaliados na tarefa de esquivas inibitória do tipo *step-down*. Dessa maneira, podemos concluir que a agmatina possui efeitos benéficos sobre prejuízos relacionados ao envelhecimento fisiológico normal em parâmetros de aprendizado e memória.

No entanto o tratamento agudo com doses elevadas de agmatina (50-100 mg/kg, i.p.) prejudicam a atividade motora de ratos. Além disso, agmatina não foi capaz de reverter os deficits de aprendizado e memória induzidos pela escopolamina em ratos adultos jovens.

Em conjunto, os resultados do presente estudo demonstram que o tratamento agudo com agmatina é capaz de reverter os prejuízos nas memórias de curto e longo prazo associados ao envelhecimento em roedores e que esta resposta parece ser independente do sistema colinérgico.

Esse estudo contribui para atentarmos sobre os efeitos benéficos da agmatina perante prejuízos de memória em animais idosos. Dessa maneira, se torna uma substância interessante para trabalhos futuros que elucidem os mecanismos pelos quais esta promove seus efeitos, bem como sua avaliação em outros modelos experimentais de memória.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMAGUER-MELIAN, W., R., et al. Effect of LTP-reinforcing paradigms on neurotransmitter release in the dentate gyrus of young and aged rats. **Biochem Biophys Res Commun**, v.327, n.3, p.877-83. 2005.

ARTENI, N.S., et al. Agmatine facilitates memory of an inhibitory avoidance task in adult rats. **Neurobiol. Learn. Mem.** v. 78, p. 465-469. 2002.

ATRI, A., S., et al. Blockade of central cholinergic receptors impairs new learning and increases proactive interference in a word paired-associate memory task. **Behav Neurosci**, v.118, n.1, p.223-36. 2004.

BAXTER, M. G., et al. Presynaptic markers of cholinergic function in the rat brain: relationship with age and cognitive status. **J Neurosci**, v.89, n.3, p.771-9. 1999.

BERKELS, R., TAUBERT, D. Agmatine Signaling: Odds and Threads. **Cardiovasc Drug Rev**, v. 22, No. 1, p. 7–16. 2004.

BLENNOW, K., et al. "Alzheimer's disease". **Lancet**, v. 368, p. 387-403. 2006.

BORTZ, W. M. Viva mais de cem anos. Tradução de Paulo Froes, Rio de Janeiro: **Record**, p. 334. 1995.

BRANNON L. Q., TRYGVE, O. T. Polyphenols and Aging. **Curr Aging Sci**. v. 3, p. 34–42. 2010.

COELHO Fº, J.M., RAMOS, L.R. Epidemiologia do Envelhecimento no Nordeste do Brasil: Resultados de Inquérito Domiciliar. **Rev de Saúde Pública**, São Paulo, v.33, n.5, p. 445-453. 1999.

COHEN, N., WELLER, R.O. Neuropathology of dementias. **ACNR**, v. 5, p. 18-21. 2005.

CUNHA G.M.A., et al. Adenosine A_{2A} receptor blockade prevents memory dysfunction caused by β -amyloid peptides but not by scopolamine or MK-801. **Exp Neurol**, v. 210, p. 776-781. 2008.

DAVANZO, J. Preparing for an aging world. **Population matters**. 2001.

Disponível em:

< http://www.rand.org/pubs/research_briefs/RB5058/index1.html>.

Acesso em: 05 jan. 2011.

DAY, L.B.; SCHALLERT, T. Anticholinergic Effects on Acquisition of Place Learning in the MorrisWater Task: Spatial Mapping Deficit or Inability to Inhibit Nonplace Strategies? **Behav Neurosci**, v.110, n.5, p. 998-1005. 1996.

DE-MELLO, N.; SOUZA-JUNIOR, I.Q.; CAROBREZ, A.P. Pilocarpine prevents age-related spatial learning impairments in rats. **Behav Brain Res**, v. 158, p. 263-268. 2005.

DRISCOLL, I., SUTHERLAND, R.J. The aging hippocampus: navigating between rat and human experiments. **J Neurosci**. v. 16, p. 87-121. 2005.

FALKENSTEIN, M., SOMMER, S. Os benefícios do tempo. In: FERRARI, A.C. (Ed.). *Viver mente & cérebro*, São Paulo: **Duetto**, v. 160, p. 26-31. 2006.

GOLD, P.E. Glucose modulation of memory storage processes. **Behav Neur Biol**, v. 45, p. 342-349. 1986.

GONG, Z.H., et al. Anxiolytic effect of agmatine in rats and mice. **Eur J Pharmacol**, v. 550, p. 112-116. 2006.

GRADY, C.L., et al. Age-related changes in regional cerebral blood flow during working memory for faces. **NeuroImage**, v. 8, p. 409-425. 1998.

GRADY, C.L., et al. Age-related Changes in Brain Activity across the Adult Lifespan. **J Cognit Neurosci**, v. 18, p. 227-241. 2006.

GREEN, E. J., et al. Protective effects of brain hypothermia on behavior and histopathology following global cerebral ischemia in rats. **Brain Research**, v. 580, p. 197-204. 1992.

GRUNDEMANN, D., et al. Agmatine Is Efficiently Transported by Non-Neuronal Monoamine Transporters Extraneuronal Monoamine Transporter (EMT) and Organic Cation Transporter 2 (OCT2). **JPET** , v. 304, p. 810–817. 2003.

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

HARRISON F.E., et al. Ascorbic acid attenuates scopolamine-induced spatial learning deficits in the water maze. **Behav Brain Res**. v. 205, p. 550-8. 2009.

HASHER, L., ZACKS, R. Working memory, comprehension and aging: A review and a new view. In G. K. Bower (Ed.), **Psychol Learn Motiv**, v. 22, p. 192-225. 1988.

HONG, S., et al. Agmatine protects culture retinal ganglion cells from necrosis factor-alpha-induced apoptosis. **Life Sci**, v. 84, p. 28-32. 2009.

HU, Y., et al. A new approach to the pharmacological regulation of memory: Sarsasapogenin improves memory by elevation the low muscarinic acetylcholine receptor density in brains of memorydeficit rat models. **Brain Research**, v. 1060, p. 26- 39, 2005.

IBGE. Dados sobre a população. Idade e sexo. 2000.

IZQUIERDO, I. Organização, consolidação, construção e reconstrução da memória. Rio de Janeiro, Brasil, **UFRJ Editora**. 1988.

IZQUIERDO, I. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, v.393, p.635-6. 1998.

IZQUIERDO, I., et al. Separate mechanisms for short- and long-term memory. **Behav Brain Res**, v.103, n.1, p.1-11. 1999.

IZQUIERDO, I. Memória. **Editora Artmed**, Porto Alegre, 2002.

JACOBSON, L., et al. Correlation of cellular changes and spatial memory during aging in rats. **Exp Gerontol**, v. 43, p. 929-938. 2008.

JAROGNIEW, J. L., et al. Influence of agmatine on the protective action of numerous antiepileptic drugs against pentetrazole-induced seizures in mice. **Pharmacological Reports**, v. 61, p. 252-260. 2009.

LAMAR, M., et al. 5-HT, prefrontal function and aging: fMRI of inhibition and acute tryptophan depletion. **Neurobiol Aging**, v. 30, p. 1135-1146. 2007.

LAVINSKY, D., et al. Agmatine induces anxiolysis in the elevated plus maze task in adult rats. **Behav. Brain Res**. v. 141, p. 19-24. 2003.

LENT, R. Cem bilhões de neurônios. Conceitos fundamentais de Neurociência. Rio de Janeiro, **Editora Atheneu**, p. 311-324, 2002.

LI, S.C., DINSE, H.R. Aging of the brain, sensorimotor, and cognitive processes. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 26, p. 729-732. 2002.

LYNCH, M.A. Long-Term Potentiation and Memory. **Physiological Reviews**, v. 84, p. 87- 136. 2004.

LI, Y.F., et al. Antidepressant-like effect of agmatine and its possible mechanism. **Eur. J. Pharmacol**_v. 469, p. 81-88. 2003.

LIU, P., et al. Spatial learning results in elevated agmatine levels in the rat brain. **Hippocampus**, v. 18, p.1094–1098. 2008a.

- LIU, P., et al. Behavioural effects of intracerebroventricular microinfusion of agmatine in adult rats. **Behav Neurosci**, v.122, p. 557–569. 2008b.
- LIU,P., et al. Tucker, and Hu Zhang. Effects of Aging on Agmatine Levels in Memory-Associated Brain Structures. **Hippocampus**, v.18, p. 853–856. 2008c.
- LIU, P., et al. Memory-Related Changes in L-Citrulline and Agmatine in the Rat Brain. **Hippocampus** v. 19, p. 597–602. 2009a.
- LIU, P.; BERGIN, D.H. Differential Effects of i.c.v. Microinfusion of Agmatine on Spatial Working and Reference Memory in the rat. **J Neurosci**, v.159, p.951–961. 2009b.
- MCKAY , B.E., et al. Learning and memory in agmatine-treated rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 72, p. 551–557. 2002.
- MATTAY, V. S., et al. Neurobiology of cognitive aging: insights from imaging genetics. **Biol Psychol**, v.79, n.1, p.9-22. 2008.
- MATTSON, M.P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. **Nature**, v. 430, p. 631-639. 2004.
- MOINARD, C.; CYNOBER, L. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. **Clin Nutr**, v. 24, p. 184-197. 2005.
- MORAGREGA, I. et al. Motor Activity in Group-Housed and Isolated Mice With Short and Long Attack Latencies: Effects of Scopolamine. **Aggressi Behav**. v. 28, p. 328–336. 2002.
- MORRIS, R.G.M., et al. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature**, v. 297, p. 681-683. 1982.
- OTAKE, K., et al. Regional localization of agmatine in the rat brain: an immunocytochemical study. **Brain Res**, v. 787, p. 1-14. 1998.
-

OTTO, T.; EICHENBAUM, H. Neuronal activity in the hippocampus during delayed non-match to sample performance in rats: Evidence for hippocampal processing in recognition memory. **Hippocampus**, v. 2, p. 324-334. 1992.

PREDIGER, R.D.; BATISTA, L.C.; TAKAHASHI, R.N. 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, p. 957-964. 2005.

PREDIGER, R.D.S., et al. Pilocarpine improves olfactory discrimination and social recognition memory deficits in 24 month-old rats. **Eur J Pharmacol**, v. 531, p. 176-82. 2006.

PREDIGER, R.D.S., et al. Differential susceptibility following beta-amyloid peptide-(1-40) administration in C57BL/6 and Swiss albino mice: Evidence for a dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response. **Behav Brain Res**, v. 177, p. 205-13. 2007.

RAASCH, W., et al. Biological significance of agmatine, an endogenous ligand at imidazoline binding sites. **Br. J. Pharmacol**, v. 133, p. 755-780. 2001.

RAWLINS, J.N.P.; O'KEEFE, J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature**, v. 297, p. 681-683, 1982.

RAZ, N. Aging and the brain and its impact on cognitive performance: integration of structural and functional findings. **The handbook of aging and cognition**, 2^oed., p. 1-90. 2000.

REIS, D.J.; REGUNATHAN, S. Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? **Trends Pharmacol Sci**, v. 21, p. 187-193. 2000.

ROESLER, R., et al. Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrP(C). **Brain Res Mol Brain Res**, v.71, n.2, p. 349-53. 1999.

ROLLO, C. D. Dopamine and Aging: Intersecting Facets. **Neurochem Res**, v. 34, p. 601-29. 2009.

SANTOS, A.R.S., et al. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. **Neuropharmacology**, v. 48, p. 1021-1034. 2005.

SHERMAN, S.J., et al. Scopolamine Impairs Human Recognition Memory: Data and Modeling. **Behav Neurosci**, v. 117, p. 526–539. 2003.

STEWART, L.S.; MCKAY, B.E. Acquisition deficit and time-dependent retrograde amnesia for contextual fear conditioning in agmatine-treated rats. **Behav Pharmacol**, v. 11, p. 93-97. 2000.

SU, R.B., et al. Anticonvulsive effect of agmatine in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 77, p. 345-349. 2004.

TAKAHASHI, R.N.; PAMPLONA, F.A.; PREDIGER, R.D. Adenosine receptor antagonists for cognitive dysfunction: a review of animal studies. **Front Biosci**, v. 13, p. 14-32. 2008.

UNITED NATIONS. World Population Prospect. The 1998 revision. E.U.A: **United Nations publication**. 1999.

WALSH, D.M.; SELKOE, D.J. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. **Neuron**, v. 44, p. 181-93. 2004.

WANG, W.P., et al. Agmatine protects against cell damage induced by NMDA and glutamate in cultured hippocampal neurons. **Brain Res**, v. 1084, p. 210–216. 2006.

WATI, H., et al. A decreased survival of proliferated cells in the hippocampus is associated with a decline in spatial memory in aged rats. **Neurosci Lett**, v. 399, p. 171– 174. 2006.

WILLIAMS, K. Interactions of polyamines with ion channels. **Biochem J**, v. 325, p. 289–297. 1997.

WU, G.; MORRIS, S.M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochem J**, v. 336, p. 1–17. 1998.

ZHU, M.Y., et al. Neuroprotective effects of agmatine against cell damage caused by glucocorticoids in cultured rat hippocampal neurons. **J Neurosci**, v. 141, p. 2019–2027. 2006.
