

Andréia Simões de Castro Cunha

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIDISCINÉTICO DA
AGMATINA EM CAMUNDONGOS: ENVOLVIMENTO DO
ESTRESSE OXIDATIVO, ÓXIDO NÍTRICO E RECEPTORES
GLUTAMATÉRGICOS DO TIPO NMDA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Rui Daniel S. Prediger

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cunha, Andréia Simões de Castro

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIDISCINÉTICO DA AGMATINA EM
CAMUNDONGOS: ENVOLVIMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO, ÓXIDO
NÍTRICO E RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS DO TIPO NMDA / Andréia
Simões de Castro Cunha ; orientador, Rui Daniel Schröder
Prediger - Florianópolis, SC, 2015.

100 p.

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

Inclui referências

1. Neurociências. 2. Agmatina. 3. Discinesia Orofacial.
4. Óxido Nítrico. 5. Receptores do tipo NMDA. I. Prediger,
Rui Daniel Schröder. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III.
Titulo.

ANDRÉIA SIMÕES DE CASTRO CUNHA

“INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-DISCINÉTICO DA AGMATINA EM CAMUNDONGOS: ENVOLVIMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO, ÓXIDO NÍTRICO E RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS DO TIPO NMDA”

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 10 de fevereiro de 2015.

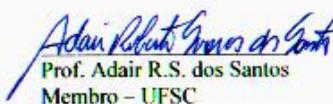


Prof. Rodrigo Bairy Leal
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:



Prof. Rui Daniel Schröder Prediger
Orientador – UFSC



Prof. Adair R.S. dos Santos
Membro – UFSC



Prof. Ana Lúcia S. Rodrigues
Membro - UFSC



Prof. Juliano Ferreira
Membro externo ao Programa

Este trabalho é dedicado à minha
família e aos meus amigos queridos.

AGRADECIMENTOS

À UFSC, ao CNPq e à CAPES pelo suporte estrutural e financeiro durante o período de realização do presente estudo, essencial para a execução do trabalho.

Ao professor Dr. Rui Daniel Schröder Prediger, pela oportunidade de realizar esse trabalho, pela confiança e pelos ensinamentos sob a sua orientação. Muito obrigada!

Aos professores Dr. Adair Roberto Soares dos Santos, Dr. Juliano Ferreira, Dr^a. Ana Lúcia Severo Rodrigues e Dr^a. Ana Cristina Guerra de Souza pelas contribuições para o aprimoramento deste trabalho.

Ao professor Dr. Marcelo Farina, a professora Dr^a. Ana Lúcia Severo Rodrigues e a seus estudantes (Dirleise, Danúbia, Maurício e Morgana) pela colaboração, pela receptividade em seus laboratórios e pelos ensinamentos.

Ao Filipe Carvalho Matheus pela grande contribuição e auxílio no planejamento, execução dos experimentos e correção dos trabalhos, além do esforço e paciência em me ajudar a resolver os imprevistos durante os experimentos.

Ao Nivaldo, secretário da PPG em Neurociências, pela eficiência e preocupação com os estudantes da nossa Pós-graduação.

Aos colegas do Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas (LEXDON, FMC, UFSC) pela receptividade, companheirismo e agradável convivência.

Aos meus exemplos de vida, Maridete e Rui, por todos os esforços para que eu tivesse a melhor educação e uma vida digna. Agradeço pelo apoio, dedicação, carinho e confiança. Vocês são o meu tudo e a vitória é nossa!

À minha irmã, Ayana Simões e ao meu sobrinho, Pedro Henrique, pela cumplicidade, amor e carinho. Muito obrigada pela torcida e pela promessa. Que o Senhor do Bonfim continue realizando nossos sonhos.

Aos meus avós queridos pela dedicação, amor e por tudo que representam na minha vida e a minha família pelo apoio e carinho.

Aos meus amigos lindos e queridos que deixei em Salvador, mas nunca da minha vida. Onde eu estiver, o carinho, a amizade e a parceria serão sempre o nosso elo. O Whastapp e o Skype também!

A B05 por ter sido minha primeira bancada, meu primeiro contato com a ciência, por terem me ensinado a essência para sobreviver nesse mundo acadêmico e o conceito real da palavra equipe. Agradeço pelas pessoas maravilhosas que conheci, pela união e amizade.

Aos meus amigos incríveis de Floripa (Anna, Alessandro, Anderson e Anai) por tornarem minha vida mais leve e muito feliz.

Ao Anderson pelo companheirismo, pelo carinho e por ser um bom ouvinte das minhas aflições durante o mestrado.

As meninas do NUTE por terem transformado dias cansativos e estressantes em risadas, gordices no Hippo e, tudo isso, para além do trabalho. Muito obrigada também pela linda surpresa e pelo carinho.

RESUMO

As discinesias representam por uma série de movimentos involuntários orofaciais, do tronco e dos membros. Esta condição pode ser incapacitante e está presente em diversas doenças neurológicas, incluindo a esquizofrenia e a doença de Parkinson (DP). Até o presente momento, os mecanismos neuroquímicos associados ao desenvolvimento das discinesias são complexos. Neste sentido, este trabalho buscou investigar um possível efeito neuroprotetor da agmatina sobre as discinesias orofaciais (DOs) induzidas pela reserpina, devido à sua ação antioxidante e inibitória sobre a síntese de óxido nítrico (NO) e dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (NMDAR). A indução das DOs em camundongos machos da linhagem *Swiss* foi realizada através de duas administrações de reserpina (1 mg/kg, via s.c.), com intervalo de 48 h, seguido do tratamento com agmatina sozinha ou associada à amantadina, MK801, arcaína ou 7-Nitroindazol (7-NI) pela via intraperitoneal (i.p), 24 h após a última administração de reserpina, sendo a avaliação das frequências das DOs realizada 30 min após os tratamentos. Foi avaliado o efeito da agmatina (30 mg/kg) no teste do campo aberto, nos níveis de nitrato e nitrito (NOx), nos parâmetros de estresse oxidativo e nos níveis de proteínas associadas às discinesias. Os resultados mostraram um efeito antidiscinético da agmatina (30 mg/kg) e um efeito sinérgico entre as doses sub-efetivas de agmatina (10 mg/kg) e MK801 (0,01 mg/kg) ou 7-NI (0,1 mg/kg). A dose ativa da arcaína (1 mg/kg) não alterou o efeito antidiscinético promovido pela agmatina. No córtex cerebral, a reserpina aumentou os níveis de NOx, no entanto a agmatina não reverteu este efeito, enquanto que no estriado não houve diferenças neste parâmetro entre os grupos avaliados. No teste do campo aberto, a agmatina não reverteu a hipolocomoção causada pela reserpina nos parâmetros avaliados. Neste modelo, não houve alteração dos parâmetros de estresse oxidativo avaliados no córtex pré-frontal e no estriado, nem nos níveis das proteínas TH, DAT, VMAT-2, DARPP 32, pDARPP 32[Thr75], e dos receptores dopaminérgicos D1 e D2 no estriado. Estes resultados sugerem, de maneira inédita, o potencial da agmatina em reverter as DOs induzidas pela reserpina em camundongos. Além disso, estes dados sugerem o envolvimento da inibição da produção do NO e do bloqueio dos NMDAR como possíveis mecanismos associados ao efeito antidiscinético da agmatina.

Palavras-chave: agmatina, reserpina, discinesia orofacial, movimentos voluntários anormais (VCM), estresse oxidativo, óxido nítrico,

receptores do tipo NMDA.

ABSTRACT

Dyskinesias consist in a series of trunk, limbs and orofacial involuntary movements. This condition can be disabling and can be observed in many neurological diseases, including schizophrenia and Parkinson's disease (PD). At this moment, the neurochemical mechanisms involved in the development of dyskinesias are complex. Thus, the aim of the present study was to investigate the putative protective effects of agmatine against the orofacial dyskinesias (ODs) induced by reserpine considering its inhibiting effects on nitric oxide (NO) synthesis and on glutamate NMDA receptors (NMDAR). ODs induction was performed in male Swiss mice through two reserpine injections (1 mg/kg, s.c) with an interval of 48 h. Twenty-four hours after the last reserpine administration, mice were treated with agmatine alone or in combination with amantadine, MK801, arcaine or 7-Nitroindazole (7-NI) by intraperitoneal (i.p.) route and, 30 min after the drugs treatments, the ODs frequency was evaluated. The effects of reserpine and agmatine (30 mg/kg) on locomotor activity were assessed in the open field test. Finally, nitrate and nitrite (NO_x) levels, the oxidative stress parameters and the imunocontent of proteins related with dyskinesias were evaluated in cerebral cortex and striatum. The present results showed an antidyskinetic effect of agmatine (30 mg/kg) and a synergistic response following the co-administration of sub-effective doses of agmatine (10 mg/kg) and MK801 (0.01 mg/kg) or 7-NI (0.1 mg/kg). The active dose of arcaine (1 mg/kg) did not alter the antidyskinetic effect induced by agmatine. Reserpine increased NO_x levels in cerebral cortex and agmatine did not reverse it, whereas in the striatum no significant differences were observed in NO_x levels. In the open field test, agmatine failed to reverse the reduction of locomotor activity induced by reserpine. No changes in the oxidative stress parameters in prefrontal cortex and striatum as well as in the striatal imunocontent of TH, DAT, VMAT-2, DARPP 32, pDARPP 32[Thr75], dopamine D1 and D2 receptors were observed. These results demonstrate, for the first time, the potential of agmatine to reverse the ODs induced by reserpine in mice. Furthermore, the current findings suggest the involvement of the inhibition of NO production and the blockade of NMDAR as possible mechanisms associated with antidyskinetic effect of agmatine.

Keywords: agmatine, reserpine, orofacial dyskinesia, vacuous chewing movements (VCM), oxidative stress, nitric oxide, NMDA receptors

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Subdivisões clínicas das discinesias induzidas por L-DOPA.....	23
Figura 2 - Modelo clássico das alterações nos gânglios basais associadas às discinesias induzidas por L-DOPA.....	26
Figura 3 - Mecanismo de ação da reserpina.....	34
Figura 4 - Vias de síntese e degradação da agmatina.....	36
Figura 5 - Desenho esquemático dos protocolos experimentais da avaliação do efeito antidiscinético da agmatina em camundongos administrados com reserpina.....	46
Figura 6 - Desenho esquemático dos protocolos experimentais investigando a participação dos receptores NMDA no efeito antidiscinético da agmatina em camundongos administrados com reserpina.....	47
Figura 7 - Desenho esquemático dos protocolos experimentais investigando a participação do sistema nitrérgico no efeito antidiscinético da agmatina em camundongos administrados com reserpina.....	48
Figura 8 - Desenho esquemático dos protocolos experimentais da avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo e da alteração no imunoconteúdo de proteínas relacionadas ao desenvolvimento das discinesias no córtex pré-frontal e estriado.....	49
Figura 9 - Efeito antidiscinético do tratamento com agmatina em camundongos administrados com reserpina.....	56
Figura 10 - Efeito do tratamento com agmatina sobre a locomoção em camundongos tratados com reserpina ou veículo avaliada no teste do campo aberto.....	58
Figura 11 - Curva dose-resposta de antagonistas dos receptores glutamérgicos do tipo NMDA em relação à frequência de discinesias orofaciais.....	60

Figura 12 - Efeito da coadministração de doses sub-efetivas de agmatina e antagonistas dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA nas discinesias orofaciais induzidas pela reserpina em camundongos.....62

Figura 13 - Efeito da coadministração de doses ativas da agmatina e arcaína nas discinesias orofaciais induzidas pela reserpina em camundongos.....63

Figura 14 - Curva dose-resposta do 7-Nitroindazol e o efeito da coadministração das doses sub-efetivas da agmatina e do 7-Nitroindazol nas discinesias orofaciais induzidas pela reserpina em camundongos.....65

Figura 15 - Efeito do tratamento com agmatina sobre os níveis de NOx no córtex e no estriado de camundongos administrados com reserpina avaliados pela técnica de Griess.....67

Figura 16 - Efeito do tratamento com agmatina sobre o imunconteúdo de proteínas relacionadas às discinesias no estriado de camundongos tratados com veículo ou reserpina.....71

Tabela 1 - Efeito da agmatina (30 mg/kg, i.p.) sobre parâmetros de estresse oxidativo no córtex pré-frontal e no estriado de camundongos tratados com reserpina (1 mg/kg, s.c.) ou veículo.....69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT - serotonina
6-OHDA - 6-hidroxidopamina
7-NI - 7-Nitroindazol
A2AR - Receptores para adenosina do tipo A2A
AADC - aminoácido aromático descarboxilase
ADC - arginina descarboxilase
AGM - sulfato de agmatina
AIMs - movimentos involuntários anormais
AMA - cloridrato de amantadina
ANOVA - análise de variância
ARC - arcaína
ATAs - antipsicóticos atípicos
CB1 - receptores canabinoídes do tipo 1
CFA - Adjuvante Completo de Freund
CREB - elemento de ligação em resposta a cAMP
CREB - proteína ligante ao elemento de resposta ao AMP cíclico
D1R - receptores para dopamina do tipo D1
D2R - receptores para dopamina do tipo D2
DA - dopamina
DARPP-32 - fosfoproteína regulada por AMPc de 32 Kda total
DAT - transportador de dopamina
DCFH-DA - di-hidro cloro de fluoresceína
dMSNs - neurônios espinais médios da via direta
DMSO- Dimetil sulfóxido
DOPAC - ácido 3,4-dihidroxifenilacético
DOs – discinesias orofaciais
DP - doença de Parkinson
DS - estriado dorsal
DT – discinesia tardia
E.P.M - erro padrão da média
EDTA- ácido etileno-dinitrilo-tetra-acético
ERK - cinase regulada por estímulos extracelulares
EROs- espécies reativas de oxigênio
GABA - ácido γ -aminobutírico
GAD - ácido glutâmico descarboxilase
GPe - globo pálido externo
GPi - segmento interno do globo pálido
GPx- glutationa peroxidase
GR- glutationa redutase

GSH- glutationa
GSSG- glutationa oxidada
H3 - histona 3
HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência
i.p.- intraperitoneal
iMSNs - neurônios espinais médios da via indireta
iNOS - óxido nítrico sintase induzível
L-ARG - L-arginina
LC - locus caeruleus
L-DOPA - L-3,4 dihidroxifenilalanina
LPS - lipopolissacarídeo
MAGUK - guanilato cinase associado à membrana
mGluR5 - receptor metabotrópico para o glutamato do tipo 5
MK801 - maleato de dizocilpina
MSNs - neurônios espinais médios
mTORC1 - *mammalian target of rapamycin complex 1*
NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NMDA - N-metil-D-aspartato
NMDAR - receptor ionotrópico N-metil-D-aspartato
nNOS - óxido nítrico sintase neuronal
NO - óxido nítrico
NOS - óxido nítrico sintase
Nrf-2 - fator relacionado ao fator nuclear do eritroide-2
NST - núcleo subtalâmico
p-DARPP-32[Thr34] - fosfoproteína regulada por AMPc de 32 Kda fosforilada no resíduo treonina 34
p-DARPP-32[Thr75] - fosfoproteína regulada por AMPc de 32 Kda fosforilada no resíduo treonina 75
PKA - proteína cinase dependente de AMPc
PP-1 – proteína fosfatase 1
PSD - densidade pós-sináptica
PSD-95 - proteína de densidade pós-sináptica-95
s.c. – subcutânea
SDS- dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE- eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
SNC- sistema nervoso central
SNpc - substância negra parte compacta
SNpr - substância negra parte reticulata
SOD- superóxido dismutase
TAs - antipsicóticos típicos
TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TBS- tampão tris-salina

TCE - traumatismo cranioencefálico

TH- tirosina hidroxilase

TNF- α - fator de necrose tumoral

VCM - movimentos involuntário de mastigação (“*Vacuus Chewing Movements*”)

VMAT-2 - transportador vesicular de monoaminas do tipo 2

VTA- área tegmentar ventral

YKS - Yokukansan

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 DISCINESIAS INDUZIDAS POR FÁRMACOS.....	21
1.1.1 Discinesias induzidas por L-DOPA	21
1.1.1.1 História e aspectos gerais.....	21
1.1.1.2 Tipos de discinesias induzidas por L-DOPA.....	22
1.1.1.3 Mecanismos envolvidos na LID.....	23
<i>1.1.1.3.1 Mecanismos envolvendo o sistema dopaminérgico</i>	<i>23</i>
<i>1.1.1.3.2 Mecanismos não dopaminérgicos</i>	<i>27</i>
1.1.2 Discinesia Tardia	30
1.1.2.1 História e aspectos gerais.....	30
1.1.2.2 Mecanismos envolvidos na DT.....	30
1.2 O MODELO DAS DISCINESIAS INDUZIDAS POR RESERPINA.....	32
1.3 AGMATINA.....	35
2 JUSTIFICATIVA	41
3 OBJETIVOS	43
3.1 OBJETIVO GERAL.....	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 ANIMAIS.....	45
4.2 DROGAS.....	45
4.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	45
4.3.1 Avaliação do efeito antidiscinético da agmatina	45
4.4 AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE MOVIMENTOS INVOLUNTÁRIOS DE MASTIGAÇÃO (“ <i>VACUOS CHEWING MOVEMENTS</i> ” – VCM).....	50
4.5 CAMPO ABERTO.....	50
4.6 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E MOLECULARES.....	50
4.6.1 Enzimas antioxidantes	51
4.6.1.1 Superóxido dismutase (SOD).....	51
4.6.1.2 Atividade da catalase.....	51
4.6.1.3 Glutaciona peroxidase (GPx).....	51
4.6.1.4 Glutaciona redutase (GR).....	51
4.6.2 Tióis não-protéicos (GSH)	52
4.6.3 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (“TBARS”)	52
4.6.4 Técnica de Griess	52
4.6.5 Eletroforese seguido de imunodeteção de proteínas (“western blotting”)	53

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
5 RESULTADOS.....	55
5.1 EFEITO ANTIDISCINÉTICO DO TRATAMENTO COM AGMATINA EM CAMUNDONGOS ADMINISTRADOS COM RESERPINA.....	55
5.2 EFEITO DO TRATAMENTO COM AGMATINA SOBRE A LOCOMOÇÃO EM CAMUNDONGOS AVALIADA NO TESTE DO CAMPO ABERTO.....	57
5.3 INVESTIGAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES NMDA NO EFEITO ANTIDISCINÉTICO DA AGMATINA EM CAMUNDONGOS.....	59
5.4 INVESTIGAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO SISTEMA NITRÉRGICO NO EFEITO ANTIDISCINÉTICO DA AGMATINA EM CAMUNDONGOS.....	64
5.5 EFEITO DO TRATAMENTO COM AGMATINA SOBRE OS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CAMUNDONGOS.....	67
5.6 EFEITO DO TRATAMENTO COM AGMATINA SOBRE O IMUNOCONTEÚDO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À DISCINESIA EM CAMUNDONGOS.....	70
6 DISCUSSÃO.....	73
7 CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS.....	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 DISCINESIAS INDUZIDAS POR FÁRMACOS

As discinesias induzidas por fármacos são representadas por uma série de movimentos involuntários de abertura e fechamento da boca, com ou sem protusão da língua, e movimentos do tronco, da pelve, flexão/extensão dos membros inferiores e superiores, assim como respiração irregular e vocalizações (GODBERG, 2002; AQUINO & LANG, 2014; AQUINO & FOX, 2015). Estes sintomas extrapiramidais podem ser incapacitantes e estão presentes em diversas doenças neurológicas, incluindo a discinesia tardia (DT) e a doença de Parkinson (DP) (AQUINO & LANG, 2014; KOBYLECKI *et al.*, 2014; AQUINO & FOX, 2015). O desenvolvimento dessa condição é causado, dentre outras situações, pelo uso durante longos períodos de antipsicóticos, como o haloperidol e a clorpromazina, e da L-3,4 dihidroxifenilalanina, a levodopa (L-DOPA), o principal fármaco usado para tratar os sintomas motores em pacientes com a DP (TOLOSA *et al.*, 1998; BASSIT & LOUZÃ NETO, 1999).

1.1.1 Discinesias induzidas por L-DOPA

1.1.1.1 História e aspectos gerais

A DP é uma doença neurodegenerativa crônica caracterizada pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal. Esta via está relacionada principalmente com o controle dos movimentos e a sua degeneração resulta em distúrbios motores, tais como tremores de repouso, bradicinesia e rigidez muscular (OBESO, 2000; BLANDINI *et al.*, 2000; AGUIAR *et al.*, 2013; EL ARFANI, 2014). Atualmente, a L-DOPA, uma molécula precursora da dopamina descoberta na década de 1960, permanece como o tratamento não invasivo mais efetivo na DP, apesar do surgimento de outras alternativas terapêuticas (RUIZ-DE DIEGO *et al.*, 2014).

A L-DOPA foi testada pela primeira vez em pacientes parkinsonianos em 1961, entretanto os resultados encontrados durante os primeiros anos foram inconsistentes. Em 1967, Cotzias e colaboradores mostraram que a L-DOPA induzia uma melhora significativa e duradoura dos sintomas motores em pacientes com a DP. Contudo, a administração crônica de L-DOPA levou ao desenvolvimento de efeitos colaterais como distúrbios psiquiátricos,

flutuações motoras e os movimentos involuntários anormais (TOLOSA *et al.*, 1998), mais conhecidos atualmente como discinesia induzida por L-DOPA, do inglês *L-DOPA-Induced Dyskinesias* (LID). A prevalência da LID em pacientes parkinsonianos tratados com L-DOPA durante cinco anos é cerca de 50% e esta porcentagem aumenta para 90% após o período de nove anos de tratamento com a L-DOPA associado à progressão da neurodegeneração da via nigroestriatal (BHIDE *et al.*, 2013).

1.1.1.2 Tipos de discinesias induzidas por L-DOPA

Clinicamente, são observados três tipos principais de LID: as discinesias de período “*on*”, as discinesias difásicas e as distonias de período “*off*” (Figura 1). Elas são descritas em relação à duração da resposta e a efetividade da L-DOPA, ou seja, estão associadas ao grau de atividade dopaminérgica e ao estado motor do paciente parkinsoniano (OBESO *et al.*, 2007; GURIDI *et al.*, 2012; DEL BEL *et al.*, 2015).

As discinesias de período “*on*” ou de pico de dose coincidem com a concentração mais elevada da L-DOPA no plasma e com seu benefício clínico máximo. Geralmente, os movimentos são de natureza coreiforme e envolvem, principalmente, o pescoço, o tronco e os membros superiores, porém movimentos distônicos também podem ser observados. Durante as fases iniciais e finais do efeito da L-DOPA acontecem as discinesias difásicas que coincidem com concentrações baixas ou intermediárias da droga no plasma. Elas são caracterizadas por movimentos lentos repetitivos e estereotipados dos membros inferiores e tremores dos membros superiores, indicando que os pacientes não estão sob o efeito máximo da L-DOPA. Em casos graves, ocorrem movimentos das pernas de grande amplitude, abruptos, contínuos e ritmados, semelhantes ao balismo. Em alguns casos, as discinesias difásicas podem interferir drasticamente na marcha, gerando um padrão característico (OBESO *et al.*, 2007; GURIDI *et al.*, 2012).

Diferentes das discinesias, as distonias de período “*off*” são caracterizadas por posturas fixas e dolorosas, causadas pela contração simultânea e sustentada de músculos agonistas e antagonistas. Elas podem apresentar uma distribuição generalizada ou podem ser localizadas, como a extensão do pé ou flexão dos dedos dos pés. Estas manifestações foram observadas em pacientes com a DP antes do surgimento do tratamento com a L-DOPA, porém elas são mais frequentes e características de períodos “*off*” da droga. Geralmente, os três tipos de discinesias estão presente em pacientes com flutuações

motoras (OBESO *et al.*, 2007; GURIDI *et al.*, 2012).

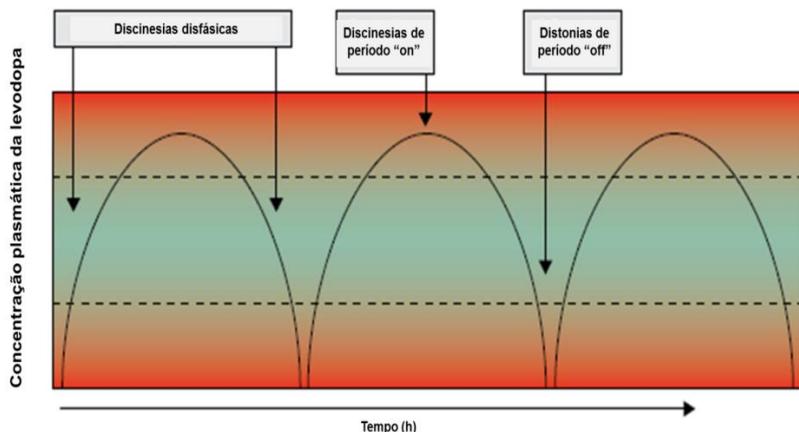


Figura 1: Subdivisões clínicas das discinesias induzidas por L-DOPA (adaptado de CALABRESI *et al.*, 2010).

1.1.1.3 Mecanismos envolvidos na LID

1.1.1.3.1 Mecanismos envolvendo o sistema dopaminérgico

Os mecanismos envolvidos na expressão e manutenção da LID são complexos, envolvendo diversos sistemas de neurotransmissão. Evidências indicam que fatores dopaminérgicos pré- e pós-sináptico contribuem para o desenvolvimento da LID (BORDIA *et al.*, 2013). Para compreender melhor o desenvolvimento da discinesia induzida por L-DOPA é preciso saber como estão organizados os circuitos neurais envolvendo os gânglios da base e a sua importância no controle motor adaptativo.

O estriado e o núcleo subtalâmico (NST) recebem aferências excitatórias do córtex cerebral. Cerca de 95% dos neurônios estriatais são neurônios espinais médios (MSNs) GABAérgicos, enquanto que o NST é composto por neurônios glutamatérgicos excitatórios (SANO *et al.*, 2013). Os MSNs da via direta (dMSNs) que expressam, predominantemente, receptores dopaminérgicos do tipo D1 (D1R) exibem um aumento de atividade em resposta a dopamina (DA) e se projetam diretamente para os núcleos dos gânglios da base de saída, inibindo-os. Como consequência, ocorre uma desinibição do tálamo e

estimulação de áreas corticais, promovendo o movimento. Por outro lado, os MSNs da via indireta estriato-palidal (iMSNs) expressam principalmente os receptores dopaminérgicos do tipo D2 (D2R) e exibem uma diminuição da atividade em resposta a DA. Eles influenciam os núcleos da base indiretamente, enviando projeções até o globo pálido externo (GPe), levando a sua inibição. Deste modo, os neurônios do NST são desinibidos, ativando os núcleos de saída, o segmento interno do globo pálido (GPi) e a substância negra parte reticulata (SNpr). Estes núcleos inibem o tálamo com a consequente inibição do movimento. Portanto, a DA promove o movimento por ativar os dMSNs que expressam D1R e pela inibição de iMSNs que expressam D2R (HEIMAN *et al.*, 2014). Isto permite sequências de movimentos coordenados, inibindo movimentos concorrentes (Figura 2a) (CENCI & LINDGREN, 2007).

Como citado anteriormente, os sintomas motores da DP são causados pela morte dos neurônios dopaminérgicos na substância negra parte compacta (SNpc) com a consequente perda da inervação dopaminérgica do estriado dorsal (HEIMAN *et al.*, 2014). Na LID, mecanismos pré-sinápticos incluem esta perda dopaminérgica nigroestriatal, o qual resulta em uma redução na capacidade de recaptação de DA pelo transportador de dopamina (DAT) e um aumento dos níveis de DA extracelulares, devido ao tratamento com a L-DOPA. A administração da L-DOPA via oral produz um aumento transitório na concentração de DA no estriado de pacientes afetados pela LID e o mesmo foi observado em modelos animais (BORDIA *et al.*, 2013). Além disso, neurônios serotoninérgicos exibem a maquinaria enzimática do sistema dopaminérgico responsável pela descarboxilação da L-DOPA a DA e para o armazenamento de neurotransmissor nas vesículas sinápticas, chamados de aminoácido aromático descarboxilase (AADC) e de transportador vesicular de monoaminas (VMAT), respectivamente. De acordo com este fato, estudos mostraram que neurônios serotoninérgicos são capazes de armazenar a DA após a administração de L-DOPA e que a remoção da inervação serotoninérgica reduz a quantidade de DA extracelular formada a partir da L-DOPA em cerca de 80% no estriado de ratos lesionados com 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) (TANAKA *et al.*, 1999).

Estudos sugerem que a DA liberada a partir de terminais serotoninérgicos é responsável por induzir e manter a LID em ratos lesionados com 6-OHDA (CARTA & BEZARD, 2011). Com a progressão da neurodegeneração dopaminérgica, a L-DOPA induz um aumento na concentração de DA sináptica a níveis não fisiológicos,

devido à ausência de mecanismos de controle da DA nos neurônios serotoninérgicos, promovidos por D2R e pela recaptação da DA por DAT. Esse excesso de DA na fenda sináptica sensibiliza o D1R com a ativação de vias que levam a transcrição de genes relacionados à LID nos neurônios pós-sinápticos (dMSNs), como a via de sinalização da proteína cinase A (PKA) e do elemento de ligação em resposta a cAMP (CREB) (CARTA & BEZARD, 2011; FRANCARDO & CENCI, 2014; HEIMAN *et al.*, 2014).

Essas mudanças na transcrição e expressão de genes de maneira sustentada incluem a regulação positiva de genes que codificam neurotransmissores inibitórios e/ou suas enzimas de síntese. A projeção GABAérgica dos dMSN para os núcleos de saída dos gânglios basais (GPI, SN_{pr}) torna-se hiperativa e grandes quantidades de GABA e do peptídeo dinorfina são liberadas nestes gânglios. O desequilíbrio neuroquímico traduz-se em padrões de disparo anormais, que presumivelmente, representam o código neural para a LID (CENCI & LINDGREN, 2007). Uma redução pronunciada na atividade dos neurônios GABAérgicos do GPi é considerado um marcador de movimentos hipercinéticos e é compatível com a LID severa (Figura 2b) (PORRAS *et al.*, 2014a).

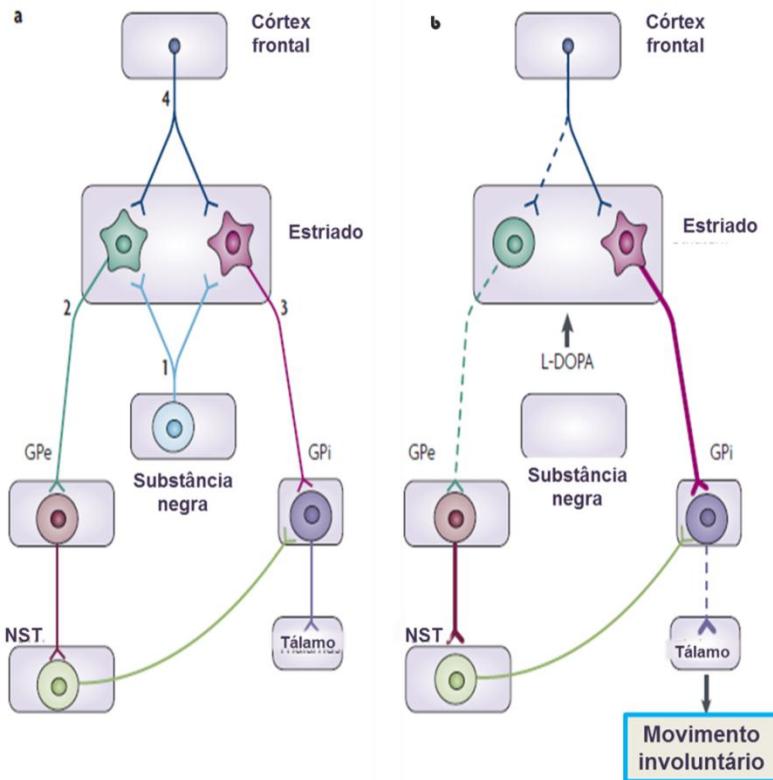


Figura 2: Modelo clássico das alterações nos circuitos neurais dos gânglios basais associado às discinesias induzidas por L-DOPA. **a.** Interconexões normais entre os gânglios da base. (1) Sinapses entre as projeções dopaminérgicas da via nigroestriada indireta (receptores dopaminérgicos D2 inibitórios) e direta (receptores dopaminérgicos D1 excitatórios) e os neurônios espinais médios (MSNs) do estriado, os quais compõem as vias GABAérgicas eferentes indireta (2) e direta (3). A via indireta se projeta para os neurônios do globo pálido externo (GPe), os quais fazem sinapse com neurônios do núcleo subtalâmico (NST). Os neurônios glutamatérgicos do NST se projetam para o globo pálido interno (GPi), os quais fazem sinapses através de projeções GABAérgicas com o tálamo. A via direta envia projeções ao GPi, os quais fazem sinapses GABAérgicas com o tálamo. Outro importante aferente para o estriado é proveniente do córtex frontal. **b.** Alterações nas interconexões entre os gânglios da base causadas pela L-DOPA e pela degeneração dopaminérgica da substância negra, levando ao desenvolvimento das discinesias (adaptado de JENNER, 2008).

1.1.1.3.2 Mecanismos não dopaminérgicos

Receptores para adenosina do tipo A2A (A2AR) apresentam um papel modulatório em regiões cerebrais inervadas por aferentes dopaminérgicos (CENCI & LIDGREN, 2007). A ativação dos A2AR leva a inibição da sinalização do D2R. Esta inibição gera um aumento da atividade do iMSNs, resultando em uma atividade reduzida dos aferentes glutamatérgicos corticoestriatais e redução da atividade motora (FUXE et al. 2007). A administração de antagonistas de A2AR tem efeitos benéficos no prejuízo motor e nas discinesias produzidas pelo uso prolongado de L-DOPA em pacientes (BARA-JIMENEZ *et al.*, 2003) e em modelos de primatas lesionados com MPTP e de ratos tratados com 6-OHDA (KANDA *et al.*, 2000; PINNA *et al.*, 2001; TRONCI *et al.*, 2007; ARMENTERO *et al.*, 2011).

Outro sistema importante no desenvolvimento da LID é o sistema glutamatérgico. O neurotransmissor glutamato é liberado em terminais corticoestriatais e se liga a receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos. A hiperativação do receptor ionotrópico do tipo N-metil-D-aspartato (NMDAR) e do receptor metabotrópico do tipo 5 (mGluR5) leva à ativação da via de sinalização ERK1/2 e alterações na transcrição de genes, através da fosforilação de fatores de transcrição e de histonas (HEIMAN *et al.*, 2014).

Os NMDAR são complexos heteroméricos formados por duas principais famílias de subunidades, NR1 e NR2A-NR2D (PICCONI *et al.*, 2008). Em sinapses glutamatérgicas, os NMDAR estão concentrados na densidade pós-sináptica (PSD), os quais interagem de maneira específica, formando um complexo dinâmico que é crítico na determinação da força sináptica da transmissão. Este complexo também inclui o D1R e ele se liga diretamente a subunidade NR1 do NMDAR e essa interação influencia o tráfego, a sinalização e a dessensibilização de ambos os receptores. A ativação simultânea de D1R e NMDAR é decisiva para determinar a eficácia da transmissão corticoestriatal e, provavelmente, contribui no desenvolvimento das disfunções motoras. Foi constatado que os níveis das proteínas totais de membrana das subunidades de NMDAR e D1R estavam inalterados em ratos lesionados com 6-OHDA tratados com L-DOPA e isto sugere que as alterações no tráfego destes receptores, em vez de alterações dos seus níveis, podem estar envolvidas na LID (FIORENTINI *et al.*, 2006).

Estudos recentes mostraram um tráfego alterado das subunidades dos NMDARs nos neurônios estriatais em modelos de LID em ratos. Análises bioquímicas revelaram alta concentração da subunidade NR2A

e baixa concentração da subunidade NR2B em ratos discinéticos tratados com L-DOPA em comparação com aqueles não discinéticos (GARDONI *et al.*, 2006). Além disso, a ligação do NR2B com proteínas da família MAGUK (guanilato cinase associado à membrana), como a proteína de densidade pós-sináptica-95(PSD-95), é desfeita na densidade pós-sináptica em ratos não discinéticos tratados com um peptídeo sintético (TAT2B). Este desacoplamento levou ao desenvolvimento de movimento involuntários anormais em resposta à L-DOPA (GARDONI *et al.*, 2006) e o tratamento com o peptídeo TAT2A, que desacopla a ligação NR2A/PSD-95 foi capaz de reduzir a LID (GARDONI *et al.*, 2012). De acordo com este fato, Maranis e colaboradores (2012) demonstraram que a infusão cerebral do antagonista seletivo para a subunidade NR2B do NMDAR tem efeito antidiscinético quando administrado no núcleo caudado-putâmen.

A amantadina, um antagonista dos NMDAR, é a única droga aprovada atualmente para uso clínico na DP que melhora tanto os sintomas motores quanto reduz a severidade das discinesias causadas pela L-DOPA. No entanto, ela apresenta diversos efeitos colaterais como a perda da libido, delírios e alucinações em pacientes idosos que comprometem a aderência ao tratamento (POSTMA & VAN TIBURG, 1975; METMAN *et al.*, 1999; NEAGOE, 2013).

A ativação dos D2R parece promover a liberação de endocanabinoides, reduzindo a excitação sináptica em terminais glutamatérgicos via receptores CB1 (MARTINEZ *et al.*, 2012). Os receptores de canabinoides são amplamente expressos tanto em neurônios pré- quanto pós-sinápticos nos gânglios da base. O envolvimento de endocanabinoides na LID é bastante controverso, uma vez que tanto o antagonismo quanto a ativação farmacológica dos receptores canabinoides parecem atenuar a LID em modelos animais (MARTINEZ *et al.*, 2012; GONZALEZ-APARICIO & MORATALLA, 2014). Estes resultados divergentes podem refletir, pelo menos em parte, a complexidade da neuromodulação mediada por canabinoides. Em ratos tratados com 6-OHDA, a administração sistêmica subcrônica do agonista de receptores CB1, WIN55212-2 (WIN), atenua a LID em doses que não afetam a locomoção e reverte a hiperativação de PKA por um mecanismo mediado por CB1 (MARTINEZ *et al.*, 2012). Em camundongos C57BL/6 lesionados com 6-OHDA, a administração sistêmica da oleiletanolamida (OEA), um antagonista do receptor TRPV1 (*Transient Receptor-Potential Vanilloid 1*) e análogo estrutural do endocanabinoide anandamida, reduz a intensidade da expressão de FosB e o desenvolvimento das discinesias via TRPV1. A OEA pode

exercer esse efeito indiretamente via receptores CB1, reduzindo liberação de glutamato nos aferentes corticoestriatais. Isso sugere que a estimulação de CB1 e TRPV1 por endocanabinóides apresentam efeitos opostos na LID (GONZALEZ-APARICIO & MORATALLA, 2014).

O óxido nítrico (NO) é considerado um neurotransmissor gasoso e um radical livre instável com a capacidade de se difundir em água e em lipídios. O NO é produzido a partir de L-arginina pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS) após a ativação do NMDAR e o influxo de cálcio (MITKOVSKI *et al*, 2012). A sinalização via NO tem um papel importante na integração da informação transmitida através das via corticoestriatal (DEL-BEL *et al.*, 2005).

Padovan-Neto e colaboradores (2013, 2015) observaram que a administração aguda ou crônica de 7-Nitroindazol (7-NI), um inibidor preferencial da nNOS, reduz a LID, atenua a diminuição de neurônios positivos para óxido nítrico sintetase neuronal (nNOS) e atenua a expressão de FosB/ Δ FosB estriatal em ratos lesionados no estriado por 6-OHDA. Neste modelo, foi também observado um aumento pronunciado na concentração de DA no estriado não lesionado em comparação com os animais falso operados. O 7-NI reduziu a concentração do ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) e da razão DOPAC/DA no estriado contralateral a lesão dos ratos discinéticos e este efeito parece interferir na disponibilidade de DA no estriado lesionado e contribuir para o seu efeito antidiscinético (DEL-BEL *et al*, 2014).

Outros trabalhos mostraram que a administração crônica deste inibidor de nNOS reduz a LID com a diminuição nos níveis de pERK, além de reduzir a fosfoacetilação da histona 3 (H3), sem afetar o efeito terapêutico da L-DOPA no estriado em camundongos deficientes de Pitx3, um fator de transcrição envolvido no desenvolvimento dos neurônios dopaminérgicos no mesencéfalo (SOLÍS *et al*, 2015). Além disso, o 7-NI foi capaz de bloquear a ativação microglial no estriado de ratos lesionados com 6-OHDA. A ativação microglial está associada à perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc (BORTOLANZA *et al.*, 2015).

Estes dados corroboram com a evidência de que o efeito antidiscinético dos inibidores da síntese do NO é, pelo menos em parte, ligado a expressão dos fatores de transcrição FosB/ Δ FosB. Outra via relacionada à discinesia é a cAMP/PKA/DARPP-32. A estimulação dos D1R ativa as cinases ERK 1, ERK 2 e o complexo de proteínas mTORC1 (“*mammalian target of rapamycin complex 1*”), reguladores essenciais da transcrição e tradução. A ativação anormal dessas

proteínas tem sido relacionada com o desenvolvimento da LID (PAVÓN *et al.*, 2006; SANTINI *et al.*, 2012). A fosfoproteína regulada por AMPc de 32 Kda (DARPP-32) é conhecida por ser um componente chave da integração dos sinais de neurotransmissores e neuromoduladores no estriado, particularmente em resposta à DA e ao glutamato (FERNANDEZ *et al.*, 2006).

1.1.2 Discinesia Tardia

1.1.2.1 História e aspectos gerais

Em 1957, Schönecker avaliou três casos de mulheres idosas com o quadro clínico de depressão e demência que desenvolveram discinesias orofaciais ao serem expostas ao neuroléptico clorpromazina durante períodos de até oito semanas. Em duas pacientes avaliadas, a discinesia teve duração de aproximadamente três meses após a retirada do antipsicótico, o que mostrou a persistência do sintoma, fato não observado nos casos anteriores. Nos anos subsequentes, foram relatados diversos casos de discinesia persistente, tanto orofacial como dos membros e, em 1964, Faurbye e colaboradores utilizaram o termo Discinesia Tardia (DT) pela primeira vez (BASSIT & LOUZÃ NETO, 1999). A DT é agravada pelos efeitos da esquizofrenia e tem sido associada com a redução na qualidade de vidas desses pacientes (RANA *et al.*, 2013).

Os fatores de risco relacionados à DT têm sido identificados, incluindo a idade avançada, diagnóstico de problemas psiquiátricos, sexo feminino, história de diabetes e dano cerebral. A prevalência é dependente do tipo de antipsicótico. O uso de medicamentos de primeira geração, antipsicóticos típicos (TAs), e de segunda geração, antipsicóticos atípicos (ATAs), apresentam taxas de 32,4% e 13,1%, respectivamente (RANA *et al.*, 2013). Apesar de uma menor prevalência de DT em relação ao uso de ATAs, estes estão associados com outros efeitos colaterais, incluindo ganho de peso e distúrbios severos na regulação de lipídios e de glicose (BORDIA *et al.*, 2012). Em idosos, a DT se desenvolve mais rapidamente e com uma probabilidade maior de ser irreversível (RANA *et al.*, 2013).

1.1.2.2 Mecanismos envolvidos na DT

Os mecanismos envolvidos na DT são complexos e parecem estar relacionados com o bloqueio dos D1R e, principalmente, dos D2R. O

bloqueio dos D2R leva a hipersensibilização destes receptores presentes nos gânglios da base, ou seja, induz um aumento desses receptores na superfície e, conseqüentemente, uma maior quantidade de D1R e D2R são estimulados após a liberação da DA na fenda sináptica. Outras hipóteses sugerem um aumento persistente do *turnover* de DA no estriado e um desequilíbrio entre os sistemas colinérgicos e dopaminérgicos na DT (KULKARNI & NAIDU, 2003). Baixas doses de buspirona revertem os movimentos involuntários de mastigação, do inglês “*Vacuus Chewing Movements*” (VCM), induzidos pelo haloperidol em ratos induzidos através da redução na responsividade aos receptores somatodendríticos 5-HT-1A (HALEEM *et al.*, 2007). Este mesmo trabalho mostrou que a hiperssensibilidade somatodendrítica serotoninérgica influencia na neurotransmissão dopaminérgica e pode contribuir para o desenvolvimento da DT (HALEEM *et al.*, 2007).

Em adição, disfunções dos neurônios Gabaérgicos da via nigroestriatal, a excitotoxicidade glutamatérgica via NMDAR e o estresse oxidativo parecem estar envolvidos na DT (KULKARNI & NAIDU, 2003). O haloperidol é metabolizado por algumas enzimas, incluindo a citocromo P450, resultando na geração de grandes quantidades de radicais livres que podem gerar neurotoxicidade (PEROZA *et al.*, 2013). O uso crônico de haloperidol ou clorpromazina está relacionado com a diminuição na concentração de enzimas antioxidantes, como a superóxido dimutase (SOD) e a catalase, no córtex pré-frontal de ratos (NAIDU *et al.*, 2002). Além disso, foi observado um aumento da peroxidação lipídica e do ânion superóxido no estriado de ratos após a administração crônica de haloperidol (BISHNOI *et al.*, 2008).

A *Bauhinia forficata* é uma planta conhecida por suas propriedades antioxidantes, principalmente no tratamento do diabetes. Este produto foi adicionado ao bebedouro (2.5 g/L) de ratos e preveniu o dano oxidativo e a peroxidação lipídica em homogenatos cerebrais induzidos por diferentes pró-oxidantes, além de prevenir parcialmente os VCMs induzidos por haloperidol (PEROZA *et al.*, 2013). Isto sugere que a atividade antioxidante de produtos naturais está envolvida, ao menos em parte, na proteção dos VCMs (PEROZA *et al.*, 2013). O carvedilol, um antagonista dos receptores alfa- e beta-adrenérgico, também foi capaz de diminuir, de maneira dose dependente, o aumento na concentração de produtos da peroxidação lipídica induzido por haloperidol ou clorpromazina, além de aumentar os mecanismos de defesa celular como a glutathione e de induzir a produção da SOD e da catalase (NAIDU *et al.*, 2002).

Na clínica, pacientes discinéticos apresentaram uma redução na concentração de GABA no fluido cerebrospinal. A hipofunção do tônus inibitório do GABA nos gânglios basais apresenta um papel importante na patofisiologia da DT. Animais tratados com neurolépticos mostraram uma diminuição do *turnover* de GABA e uma redução nos níveis da enzima ácido glutâmico descarboxilase (GAD), fator limitante na síntese de GABA. A progesterona pode afetar a função do sistema nervoso central (SNC) independentemente dos receptores de progesterona, através do seu metabólito, allopregnanolona, que é um potente agonista do receptor GABA-A. A administração prévia de progesterona preveniu os movimentos discinéticos orofaciais, a peroxidação lipídica e a redução das enzimas antioxidantes e dos níveis de DA em animais tratados com haloperidol. O efeito protetor da progesterona foi atenuado pela coadministração da finasterida, um inibidor da 5 α -redutase, que inibe a conversão de progesterona em alopregnanolona, confirmando o papel deste metabólito (BISHNOI *et al.*, 2008).

O envolvimento da excitotoxicidade glutamatérgica na DT também tem sido proposto, uma vez que a inibição na liberação de neurotransmissores excitatórios e o bloqueio do D2R acarretam um aumento na liberação de glutamato e aspartato no estriado (CARLSSON & CARLSSON, 1990). De acordo com este fato, um estudo em pacientes com DT observou altas concentrações de N-acetilaspártato e N-aspartilglutamato no fluido cerebrospinal (TSAI *et al.*, 1998). Além disso, existem evidências de que a ativação constante dos receptores glutamatérgicos leva a danos oxidativos no estriado (KULKARNI & NAIDU, 2003). O Yokukansan (YKS) é um remédio japonês tradicional o qual contém em sua composição um componente considerado um antagonista dos NMDAR. Um trabalho de Kawakami e colaboradores (2011) mostrou que o YYS reduziu o VCM induzido por haloperidol e aumentou a taxa de sobrevivência em células da linhagem PC12 tratadas com NMDA.

1.2 O MODELO DAS DISCINESIAS INDUZIDAS POR RESERPINA

Como descrito anteriormente, até o presente momento, os mecanismos bioquímicos e moleculares associados ao desenvolvimento tanto da DT quanto da LID são complexos. Entretanto, apesar da LID e da DT serem induzidas por drogas com mecanismos farmacológicos opostos e estarem relacionadas à diferentes doenças, existem evidências de que compartilham mecanismos bioquímicos semelhantes (CERASA *et al.*, 2014). O estresse oxidativo, a disfunção do sistema nitrérgico e a

neurotoxicidade glutamatérgica com o desenvolvimento de plasticidade neural aberrante no estriado e córtex pré-frontal têm sido apontados como possíveis mecanismos envolvidos no desenvolvimento das discinesias e investigados em modelos de discinesias orofaciais (DOs) (DE KEYSER, 1991; ANDREASSEN & JORGENSEN, 2000; BURGER *et al.*, 2005; SANTINI, 2012; PADOVAN-NETO, 2013). Neste contexto, o modelo da indução de DOs pela reserpina tem sido utilizado amplamente na literatura para a investigação de novos alvos terapêuticos e agentes antidiscinéticos (BURGER *et al.*, 2003; ABÍLIO *et al.*, 2003; NAIDU *et al.*, 2004; BILSKA *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2011).

A reserpina foi usada na clínica para o controle da hipertensão arterial, esquizofrenia e insônia. Atualmente, a reserpina não é mais utilizada clinicamente em razão dos seus efeitos colaterais sérios, principalmente a hipotensão e a depressão (AL-BLOUSHI *et al.*, 2009). Ela é um alcalóide isolado das raízes da planta *Rauwolfia serpentina* com ação depressora do SNC (BEAR *et al.*, 2008) e atua através da inibição do transportador vesicular de monoaminas do tipo 2 (VMAT-2). A alta afinidade da reserpina pelo VMAT-2 impede a ligação das monoaminas (DA, noradrenalina, adrenalina e serotonina) a este sítio, inibindo o seu armazenamento vesicular, impossibilitando a liberação dessas moléculas na fenda sináptica pelo processo de exocitose. Através destes mecanismos, a reserpina leva à depleção destes neurotransmissores nos terminais nervosos (Figura 3) e, como consequência, é capaz de induzir hipolocomoção, rigidez muscular transitória e movimentos involuntários, sendo estas respostas dependentes da dose utilizada (COLPAERT, 1987; GERLACH & RIEDERER, 1996; DAWSON *et al.*, 2000). Além disso, a reserpina promove a autooxidação da DA e catabolismo oxidativo pela monoamina oxidase (MAO), estando estes eventos relacionados com o processo de estresse oxidativo (TREVIZOL *et al.*, 2011).

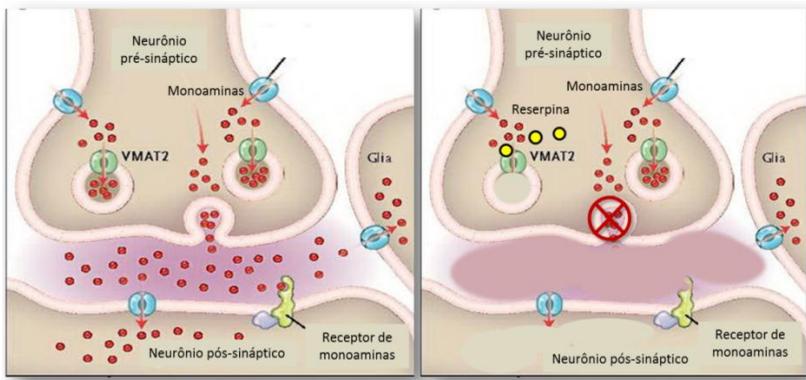


Figura 3: Mecanismo de ação da reserpina (adaptado de RILSTONE *et al.*, 2013).

Este modelo é caracterizado por um aumento na torção da musculatura facial, dos VCM e da protusão da língua e estes movimentos orofaciais são observados três dias após o início do tratamento (NEISEWANDER *et al.*, 1991; SUSSMAN *et al.*, 1997; BLANCHET *et al.*, 2012). Três dias após a administração de 1 mg/kg de reserpina, cerca de 74% de DA estriatal estava depletada em ratos (BLANCHET *et al.*, 2012). Esses dados sugerem que as DOs não é um efeito agudo da reserpina e, sim, uma adaptação ao tratamento da reserpina. Este rápido desenvolvimento das DOs não é semelhante ao que acontece em humanos, visto que nesta espécie as DOs se desenvolvem a longo prazo. No entanto, as DOs podem persistir por pelo menos 60 dias após o término do tratamento e esta persistência está relacionada com as alterações nos níveis de DA e D2R no estriado (NEISEWANDER *et al.*, 1991). Foi observado também que esses movimentos orofaciais foram mais persistentes em animais com mais idade do que em animais jovens e o mesmo é observado em pacientes DT (BLANCHET *et al.*, 2012).

A indução das DOs pela reserpina é considerada um modelo de DT (BURGER *et al.*, 2005; TREVIZOL *et al.*, 2011) e o desenvolvimento das DOs tem sido associado com os processos de estresse oxidativo, sendo inibido pela administração de agentes antioxidantes como o Ebselen (um calcogênio orgânico com atividade semelhante a glutathione peroxidase), a vitamina E, a vitamina C, o qual também é capaz de inibir os NMDAR, e o ácido gálico (MAJEWSKA *et al.*, 1990; BURGER *et al.*, 2003; ABÍLIO *et al.*, 2003, FARIA *et al.*, 2005; RECKZIEGEL *et al.*, 2013) e potencializado pelo fármaco pró-

oxidante, o ácido 3-nitropropiónico, inibidor da succinato desidrogenase (CALVENTE *et al.*, 2002).

Faria e colaboradores (2005) observaram uma atenuação das DOs e um aumento nos níveis da catalase estriatal promovida pelas vitaminas C e E, sendo estes efeitos potencializados quando elas foram coadministradas, sugerindo o envolvimento da atividade da catalase nas DOs. Outro estudo mostrou que o aumento da peroxidação lipídica poderia estar relacionado com a indução dos VCMs (CASTRO *et al.*, 2006). Além disso, Burger e colaboradores (2004) mostraram que os níveis de TBARS estavam aumentados no estriado e nas áreas sub-corticais de ratos tratados com reserpina. O tratamento com diselenida reverteu estas alterações bioquímicas induzidas por reserpina, entretanto, não foi capaz de atenuar as DOs (BURGER *et al.*, 2004).

Dutra (2002) mostrou que o MK801, um antagonista dos NMDAR, reduziu a frequência das DOs em camundongos tratados com reserpina. Foi observada uma correlação negativa entre o aumento nas DOs e a inibição da captação do glutamato neste modelo em sinaptossomas obtidas das regiões sub-corticais do SNC (BURGER *et al.*, 2005). Tem sido proposto que o aumento no metabolismo da DA, o qual aumenta a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), ocorre paralelamente à redução na captação de glutamato e podem estar envolvidos no desenvolvimento das DOs (TREVIZOL *et al.*, 2011).

A liberação exacerbada de glutamato aumenta os níveis intracelulares de cálcio e, conseqüentemente, promove a ativação de enzimas dependentes de cálcio, como a NOS. Como citado anteriormente, o 7-NI foi capaz de reverter as LIDs em ratos lesionados com 6-OHDA (PADOVAN-NETO *et al.*, 2013; 2015). No modelo da reserpina, o tratamento com 7-NI não foi capaz de reverter o prejuízo na frequência de locomoção e no tempo de imobilidade no teste do campo aberto 24 h após a administração da reserpina (TADAIESKY *et al.*, 2006). Porém, o efeito do tratamento com 7-NI sobre as DOs induzidas por reserpina não foi avaliado até o momento.

1.3 AGMATINA

A agmatina é uma poliamina encontrada de maneira altamente preservada em bactérias, plantas e invertebrados (TABOR & TABOR, 1984). A agmatina foi identificada no cérebro de mamíferos e em muitos outros órgãos e tecidos como o estômago, intestino delgado e aorta (RAASCH *et al.*, 1995; REIS & REGUNATHAN, 2000; BATTAGLIA *et al.*, 2007). Ela é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica

(PILETZ *et al.*, 2003) e as vias de síntese e degradação desta poliamina fazem parte do metabolismo da L-arginina (Figura 4), o qual está envolvido no ciclo da uréia, na produção de outras poliaminas e do NO. Nesta via, a agmatina é sintetizada a partir da descarboxilação da L-arginina pela enzima arginina descarboxilase (ADC) e é hidrolisada a putrescina, um precursor das poliaminas superiores, espermina e espermidina, pela enzima agmatinase ou metabolizada a ácido guanido-butanóico através da enzima diamina oxidase (PETROFF, 2002; PILETZ *et al.*, 2013). Essa via metabólica também está relacionada à síntese de importantes neurotransmissores como o glutamato e o GABA (PETROFF, 2002).

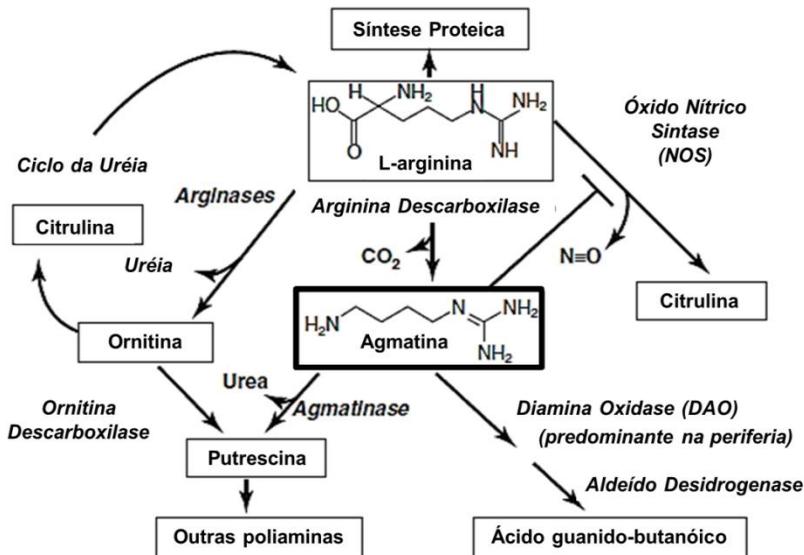


Figura 4: Vias de síntese e degradação da agmatina (adaptado de PILETZ *et al.*, 2013).

A agmatina tem sido considerada um neuromodulador. Além de ser sintetizada no cérebro, ela é armazenada em vesículas sinápticas, liberada nos terminais axonais por despolarização dependente de cálcio, inativada por recaptação e degradada por enzimas específicas (REIS & REGUNATHAN, 1998). Em contrapartida, ainda não foram identificados receptores específicos para a agmatina e, por esta razão, ela é considerada um neuromodulador, ao invés de um neurotransmissor (REIS & REGUNATHAN, 2000).

A agmatina tem a capacidade de se ligar a todas as subclasses de $\alpha 2$ -adrenoreceptores, aos sítios de ligação imidazólicos, aos receptores nicotínicos de acetilcolina e bloquear canais de cátions associados à ligantes, incluindo NMDAR, sendo considerada um antagonista desse receptor (REIS & REGUNATHAN, 1998; HALARIS & PILETZ, 2007; UZBAY, 2011; *et al.*, 2013). Ela também atua como um inibidor da NOS (AUGUET *et al.*, 1995; GALEA *et al.*, 1996; DEMADY *et al.*, 2000).

Em estudos experimentais, a agmatina exibiu propriedades anticonvulsivante, antinociceptiva, ansiolítica e antidepressiva (UZBAY, 2011; PILETZ *et al.*, 2013; MORETTI *et al.*, 2014). A administração de agmatina exógena reduziu as convulsões induzidas por pentilenotetrazol e inibiu a liberação *in vivo* de glutamato no córtex cerebral de ratos (FENG *et al.*, 2005).

Pacientes com depressão apresentam níveis elevados de agmatina no plasma (HALARIS *et al.*, 2009). Em camundongos, a agmatina apresentou um efeito do tipo antidepressivo no teste do nado forçado e da suspensão pela cauda que pode envolver a participação de NMDAR, sistema nitrérgico e $\alpha 2$ -adrenoreceptores (ZOMKOSWIKI *et al.*, 2002). A administração de baixas doses de agmatina pela via oral reverteu o comportamento tipo-depressivo induzido pelo fator de necrose tumoral (TNF- α) em camundongos no teste da suspensão pela cauda. Observou-se também um efeito sinérgico da agmatina com o MK801 e o 7-NI nas respostas tipo antidepressivas, indicando um possível envolvimento dos NMDAR e da inibição da síntese do NO nestes efeitos da agmatina (NEIS *et al.*, 2014).

Em modelos de neuroinflamação, a agmatina foi capaz de proteger a integridade da membrana mitocondrial e conferir resistência contra a apoptose (ARNDT *et al.*, 2009). As enzimas ADC e agmatinase são expressas em macrófagos e astrócitos e são moduladas de acordo com outras enzimas do metabolismo da arginina (SASTRE *et al.*, 1998; WIESINGER, 2001). O papel da agmatina na inflamação parece ter relação com a regulação da produção de NO por iNOS, visto que foi observada uma forte associação entre as respostas inflamatórias induzidas pelo lipopolissacarídeo (LPS) e os níveis de agmatina e iNOS (SASTRE *et al.*, 1998). Em ratos envelhecidos, foi observada uma correlação negativa entre os níveis de agmatina e NOS no córtex pré-frontal e uma correlação positiva no córtex pós-rinal (GUPTA *et al.*, 2012). Associado a isto, quando os astrócitos e a linhagem celular de macrófagos, RAW 264.7, foram expostas à agmatina e à LPS, foi observado uma diminuição na produção de nitrito de maneira dose

dependente (REGUNATHAN & PILETZ, 2003).

Logo após o dano cerebral causado por traumatismo cranioencefálico (TCE), a administração da agmatina atenuou o aumento nos níveis encefálicos de NO, glutamato e da hipertensão cranial (KUO *et al.*, 2007). O tratamento com esta poliamina também melhorou o infarto cerebral, déficits motores e perda de massa corpórea induzidos pelo TCE em roedores, além de reduzir a perda neuronal, a neurotoxicidade e a apoptose e promover a angiogênese e a neurogênese (KUO *et al.*, 2011). De acordo com estes estudos, AHN e colaboradores (2014) observaram por ressonância magnética que a agmatina reduziu o volume infartado causado por isquemia em ratos.

O efeito neuroprotetor da agmatina também pode estar relacionado à sua habilidade de bloquear o canal do NMDAR e, assim, regular a neurotransmissão glutamatérgica no SNC. Ela apresenta um grupo guanidina que permite o bloqueio destes canais (YANG & REIS, 1999; SEO *et al.*, 2011). SEO e colaboradores (2011) mostraram a colocalização da agmatina com o glutamato no interior do soma das células piramidais em CA1 e CA3 e em terminais axônicos das células CA1 hipocâmpais. Porém, permanece incerto se a agmatina e o glutamato estão coarmazenados nas mesmas vesículas sinápticas.

Outras evidências mostraram que a agmatina foi capaz de proteger culturas de células corticais (ZHU *et al.*, 2003) e hipocâmpais (WANG *et al.*, 2006) contra o dano celular induzido por NMDA e glutamato. Em neurônios hipocâmpais, esse efeito neuroprotetor foi compartilhado por dois antagonistas dos NMDAR, o MK801 e a arcaína, um análogo sintético da agmatina com dois grupos guanidina (WANG *et al.*, 2006).

De acordo com estas evidências, Matheus e colaboradores (2012) observaram que a agmatina aumentou a taxa de sobrevivência de camundongos envelhecidos tratados com a toxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) pela via intranasal, além de melhorar a memória social, proteger contra a degeneração dopaminérgica e prevenir a diminuição da recaptação do glutamato hipocâmpal induzidos por MPTP. Este efeito neuroprotetor pode ser devido à modulação da captação de glutamato com redução na concentração extracelular de glutamato, atenuando a neurotoxicidade glutamatérgica.

Em outro modelo de DP, a agmatina aumentou a viabilidade celular em células SH-SY5Y tratadas com rotenona, induzindo a redução do estresse oxidativo, diminuição da expressão de Bax e da liberação de citocromo C da mitocôndria (CONDELLO *et al.*, 2011).

Em ratos tratados com agmatina por 95 dias foram observados alguns efeitos como a redução do peso corporal, da pressão sanguínea e redução no consumo de água. Entretanto, vinte dias após o fim do tratamento, estes parâmetros retornaram aos valores anteriores ao tratamento (GILAD & GILAD, 2013). Em humanos, um estudo de caso com 2 participantes, que ingeriram uma quantidade diária elevada de agmatina (2,67 g) durante um período de cinco anos, apresentaram valores normais de todos os parâmetros avaliados (hemograma, composição química do sangue e urianálise), ou seja, sem evidência de efeitos adversos. Apesar de um número limitado de participantes, até o presente momento não foi relatado nenhum efeito colateral relacionado a altas doses de agmatina desde a sua introdução no mercado em 2010 como suplemento alimentar (GILAD & GILAD, 2014). Estes dados sugerem segurança na utilização da agmatina para fins terapêuticos.

2 JUSTIFICATIVA

Os movimentos orofaciais involuntários representam sintomas presentes em diversas doenças neurológicas e permanecem com poucas alternativas terapêuticas. Na DP, por exemplo, o aparecimento de discinesias induzidas pela L-DOPA é observado em aproximadamente 90% dos pacientes após nove anos de tratamento com este fármaco. Por esta razão, existe um grande interesse pelo desenvolvimento de compostos adjuvantes antidiscinéticos que não diminuam a eficácia da L-DOPA ou piorem os sintomas da doença (BHIDE *et al.*, 2013). A amantadina é o único fármaco disponível no mercado atualmente que melhora os sintomas motores da DP e ainda reduz a severidade das discinesias causadas pela L-DOPA. No entanto, os mecanismos responsáveis por reduzir estes sintomas não estão bem definidos, além da amantadina apresentar diversos efeitos colaterais como a perda da libido, tonturas e complicações neuropsiquiátricas (POSTMA & VAN TIBURG, 1975; METMAN *et al.*, 1999; NEAGOE, 2013).

Em relação à DT, os sintomas podem persistir por meses ou anos após o término do tratamento com antipsicóticos. A prevalência da DT é 20-25% em indivíduos que recebem tratamento com neurolépticos, mas a incidência aumenta com a idade, sendo relatada uma prevalência de 50% em pacientes acima de 50 anos. Em alguns casos, a discinesia pode ser abolida com a readministração do antipsicótico ou aumentando-se a dose anteriormente utilizada, porém trata-se de um procedimento de risco (ANDREASSEN & JORGENSEN, 2000).

Neste sentido, este trabalho pretende investigar, pela primeira vez, um possível efeito protetor da agmatina sobre as discinesias orofaciais induzidas pela reserpina, considerando à sua ação moduladora sobre a síntese de NO, NMDAR e efeitos antioxidantes.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem por objetivo investigar os efeitos da administração da agmatina sobre as discinesias orofaciais induzidas pela administração de reserpina em camundongos e os prováveis mecanismos envolvidos nesse processo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o efeito da administração de agmatina sobre as discinesias orofaciais induzidas pela reserpina em camundongos;
2. Avaliar o efeito da administração de agmatina sobre a hipolocomoção induzida pela reserpina em camundongos;
3. Investigar um possível efeito sinérgico entre a coadministração de doses sub-efetivas de agmatina e amantadina (fármaco antidiscinético utilizado na clínica) nas discinesias orofaciais induzidas pela reserpina em camundongos;
4. Avaliar um possível efeito sinérgico entre a coadministração de doses sub-efetivas de agmatina e MK801 (antagonista dos NMDAR para glutamato, buscando caracterizar um possível envolvimento desses receptores nos efeitos da agmatina);
5. Avaliar um possível efeito sinérgico entre a coadministração de doses efetivas de agmatina e arcaína (antagonista dos receptores NMDA), buscando caracterizar um possível envolvimento desses receptores nos efeitos da agmatina;
6. Investigar um possível efeito sinérgico entre a coadministração de doses sub-efetivas de agmatina e 7-nitroindazol (inibidor da nNOS), buscando caracterizar um possível envolvimento da síntese de NO nos efeitos da agmatina;
7. Investigar os efeitos do tratamento com agmatina sobre a concentração de nitrito e nitrato em estruturas cerebrais (estriado e córtex cerebral) envolvidas com o desenvolvimento das discinesias em camundongos administrados com reserpina;
8. Investigar os efeitos da administração de agmatina sobre possíveis alterações no imunoconteúdo de receptores e mediadores da sinalização intracelular envolvidos com o desenvolvimento das discinesias orofaciais induzidos pela administração de reserpina no estriado de camundongos;

9. Investigar os efeitos do tratamento com agmatina sobre parâmetros de estresse oxidativo induzidos pela administração de reserpina em estruturas cerebrais de camundongos (estriado e córtex pré-frontal) envolvidas com o desenvolvimento das discinesias orofaciais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos da linhagem *Swiss* (10-12 semanas, 40-50 g) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos em gaiolas de 49 x 34 x 16 cm, em condições controladas de umidade e temperatura (23 ± 2 °C), sob ciclo claro-escuro de 12 h (fase clara 7:00 - 19:00 h) e com livre acesso à água e ração, exceto durante a realização dos testes comportamentais. Todos os procedimentos experimentais foram cuidadosamente conduzidos de acordo com as normas previstas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUAPP830/2012 - UFSC).

4.2 DROGAS

Neste estudo, as drogas utilizadas foram a reserpina, o sulfato de agmatina (AGM), o cloridrato de amantadina (AMA), o 7-nitroindazol (7-NI), a arcaína (ARC) e a L-arginina (L-ARG) todas obtidas da Sigma Chemical Co (EUA), além do (+) - MK801 (maleato de dizocilpina) adquirido da Research Biochemicals (EUA). A reserpina foi dissolvida em veículo consistindo em uma solução de ácido acético glacial a 0,5%, enquanto que o 7-NI foi dissolvido em dimetil sulfoxido (DMSO) a 1% e, posteriormente, ambos foram diluídos em salina 0,9%. Os veículos utilizados para as outras drogas foi solução de NaCl 0,9% (salina).

4.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

O projeto foi dividido em quatro etapas principais de experimentos. Em todos os ensaios ocorreu a indução das DOs através de duas administrações de reserpina (1 mg/kg, via s.c), com intervalo de 48 h, acompanhado do tratamento com as drogas citadas anteriormente via intraperitoneal (i.p), sozinhas ou em associação, 24 h após a última administração de reserpina, com a avaliação das frequências de VMC sendo realizada 30 min após os tratamentos.

4.3.1 Avaliação do efeito antidiscinético da agmatina

A primeira etapa deste trabalho foi avaliar um possível efeito antidiscinético da agmatina em camundongos tratados com reserpina (1

mg/kg, via s.c.). Para isto, foi realizada uma curva dose-resposta para a agmatina (10, 30 e 100 mg/kg, via i.p.) em relação a frequência de VCM. Para este ensaio os grupos foram divididos da seguinte maneira: veículo + veículo, veículo + reserpina, reserpina + AGM 10 mg/kg, reserpina + AGM 30 mg/kg, reserpina + AGM 100 mg/kg. Em seguida, foi realizado outro experimento com a dose de 30 mg/kg de agmatina para a verificação da frequência de VCM e avaliação de um efeito *per se* na atividade locomotora dos animais, além de uma possível reversão ou atenuação da hipolocomoção causada pela reserpina no teste do campo aberto. Neste experimento, os grupos foram divididos do seguinte modo: veículo + veículo, veículo + reserpina, veículo + AGM 30 mg/kg, reserpina + AGM 30 mg/kg. Em ambos os experimentos, a agmatina foi administrada 24 h depois da última administração da reserpina e a frequência de VCM foi realizada 30 min após a administração da agmatina e cada animal foi analisado durante 10 min. No segundo experimento, a avaliação do campo aberto foi realizada, com duração de 10 min por animal, logo após a análise da frequência de VCM (Figura 5).

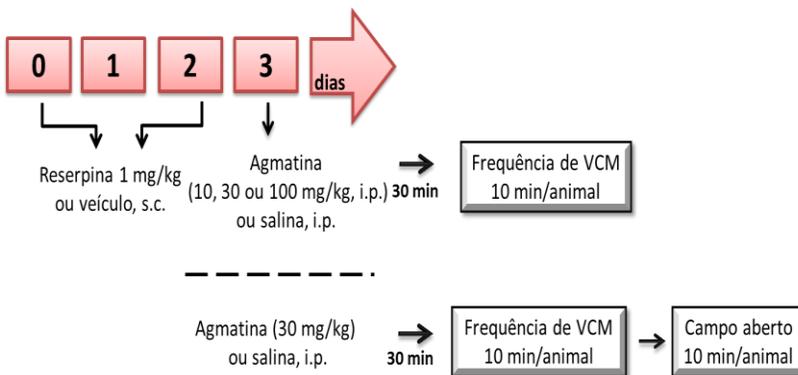


Figura 5: Desenho esquemático dos protocolos experimentais da avaliação do efeito antidiscinético da agmatina em camundongos administrados com reserpina.

A fim de avaliar a participação dos NMDAR no efeito antidiscinético da agmatina, inicialmente, foi realizada uma curva dose-resposta para os antagonistas destes receptores, amantadina (1, 10, 40 e 60 mg/kg, i.p.), MK801 (0,01; 0,03; 0,1 e 0,3 mg/kg, i.p.) e arcaína (0,0001; 0,005; 0,1 e 1,0 mg/kg, i.p.), em relação a frequência de VCM. Neste ensaio, os grupos foram divididos da seguinte maneira: veículo +

veículo, veículo + reserpina, reserpina + dose 1, reserpina + dose 2 , reserpina + dose 3 e reserpina + dose 4. Em seguida, doses sub-efetivas destas drogas (AMA 1 mg/kg e MK801 0,01 mg/kg; i.p.) foram administradas sozinhas ou combinadas com a dose sub-efetiva da agmatina (10 mg/kg) com posterior verificação da frequência de VCMs. Neste experimento, foram utilizados grupos de animais divididos em veículo + veículo, veículo + reserpina, reserpina + AGM 10 mg/kg, reserpina + AMA 1 mg/kg, reserpina + MK801 0,01 mg/kg, reserpina + AGM 10/AMA 1 mg/kg, reserpina + AGM 10/Mk801 0,01 mg/kg. Por fim, uma dose pré-determinada da arcaína (1 mg/kg, i.p) (ZOMKOWSKI *et al.*, 2006) foi coadministrada com agmatina (30 mg/kg), seguido da análise da frequência de VCMs para avaliar uma possível potencialização do efeito antidiscinético da agmatina, visto que não foi encontrada a dose sub-efetiva da arcaína no ensaio da curva dose-resposta. Para isto, foram utilizados grupos divididos do seguinte modo: veículo + veículo, veículo + reserpina, reserpina + AGM 30 mg/kg, reserpina + ARC 1 mg/kg, reserpina + AGM 30/ARC 1 mg/kg (Figura 6).

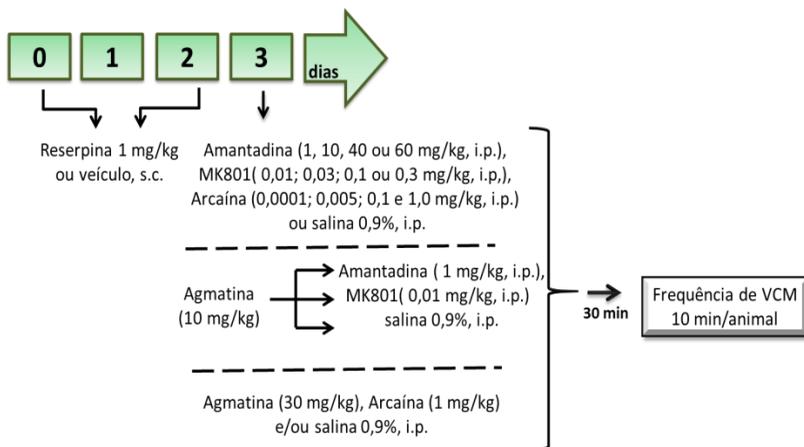


Figura 6: Desenho esquemático dos protocolos experimentais investigando a participação dos receptores NMDA no efeito antidiscinético da agmatina em camundongos administrados com reserpina.

Na terceira etapa, foi avaliada a participação do sistema nitrérgico no efeito antidiscinético da agmatina. Inicialmente, foi realizada uma curva dose-resposta para o inibidor preferencial da nNOS, o 7-NI (0,1; 1; 10 e 100 mg/kg, i.p.), em relação à frequência de VCM. Neste ensaio,

os animais foram divididos nos seguintes grupos: veículo + veículo, veículo + reserpina, reserpina + 7-NI 0,1 mg/kg, reserpina + 7-NI 1 mg/kg, reserpina + 7-NI 10 mg/kg e reserpina + 7-NI 100 mg/kg. Posteriormente, a dose sub-efetiva do 7-NI (0,1 mg/kg) foi administrada sozinha ou em associação com a dose sub-efetiva da agmatina (10 mg/kg) seguida da verificação da frequência de VCMs. Os grupos foram divididos do seguinte modo: veículo + veículo, veículo + reserpina, reserpina + AGM 10 mg/kg, reserpina + AMA 1 mg/kg, reserpina + 7-NI 0,1 mg/kg, reserpina + AGM 10/7-NI 0,1 mg/kg. Em seguida, foi realizado um ensaio para a análise dos níveis de nitrito e nitrato no estriado e no córtex cerebral através da técnica de Griess, a qual avalia indiretamente a quantidade de NO nessas estruturas. Neste experimento, foram utilizados grupos de 9 animais divididos da seguinte maneira: veículo + veículo, veículo + L-ARG 750 mg/kg, veículo + reserpina, , veículo + AGM 30 mg/kg, reserpina + AGM 30 mg/kg (Figura 7).

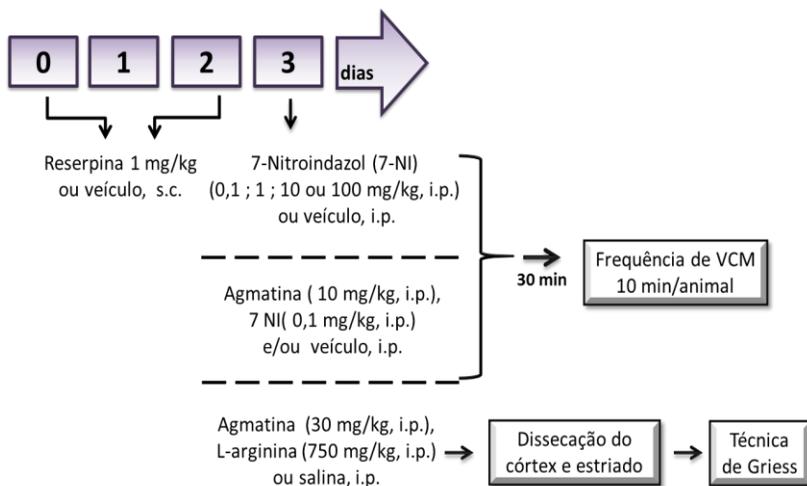


Figura 7: Desenho esquemático dos protocolos experimentais investigando a participação do sistema nitrérgico no efeito antidiscinético da agmatina em camundongos administrados com reserpina.

A última etapa consistiu na avaliação da frequência de VCMs seguida da análise dos parâmetros de estresse oxidativo (atividade da catalase; GPx, glutathione peroxidase; GR, glutathione redutase; GSH, tióis não-proteicos; SOD, superóxido dismutase; e TBARS, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e da alteração no padrão do imunocontéudo dos biomarcadores intracelulares e de superfície

relacionados à discinesia (VMAT-2, transportador vesicular de monoaminas 2; fosfoproteína regulada por AMPc de 32 Kda total e fosforilada no resíduo treonina 75, DARPP-32 e p-DARPP-32[Thr75]; DAT, transportador de dopamina; D1R, receptor dopaminérgico D1 e D2R, receptor dopaminérgico D2) por eletroforese seguido de imunodeteção de proteínas (“western blotting”). Em relação a esta etapa, os grupos foram divididos da seguinte maneira: veículo + veículo, veículo + reserpina, reserpina + agmatina 30 mg/Kg, veículo + agmatina 30 mg/kg. Os animais foram eutanasiados logo após os testes comportamentais para a retirada do córtex pré-frontal e do estriado, a fim de avaliar estes parâmetros (Figura 8).

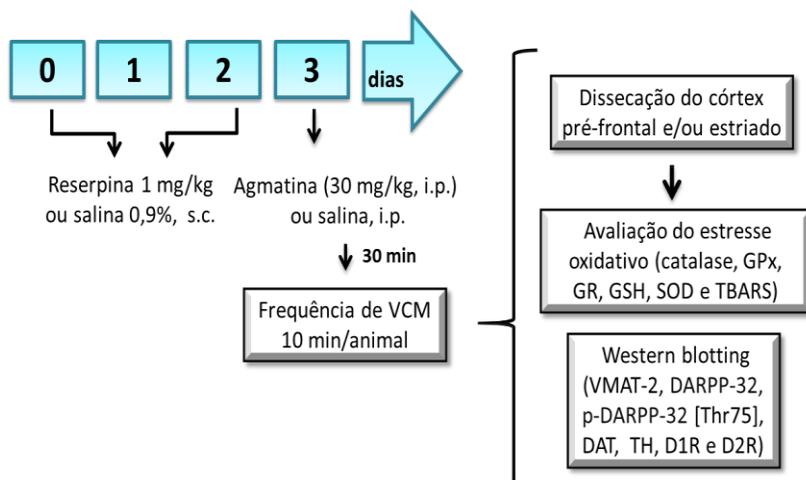


Figura 8: Desenho esquemático dos protocolos experimentais avaliando parâmetros de estresse oxidativo (atividade da catalase; GPx, glutiona peroxidase; GR, glutiona redutase; GSH, tióis não-proteicos; SOD, superóxido dismutase; e TBARS, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e da alteração no imunocônteuído de proteínas no córtex pré-frontal e/ou estriado relacionadas ao desenvolvimento das discinesias (VMAT-2, transportador vesicular de monoaminas 2; fosfoproteína regulada por AMPc de 32 Kda total e fosforilada no resíduo treonina 75, DARPP-32 e p-DARPP-32[Thr75]; DAT, transportador de dopamina; TH, tirosina hidroxilase; D1R, receptor dopaminérgico D1 e D2R, receptor dopaminérgico D2).

4.4 AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE MOVIMENTOS INVOLUNTÁRIOS DE MASTIGAÇÃO (“*VACUOS CHEWING MOVEMENTS*” – VCM)

A frequência de VCM consiste em uma contagem manual por 10 minutos contínuos da abertura da boca em um plano vertical, não direcionado a um material físico (adaptado de CARVALHO *et al.*, 2003). Espelhos foram dispostos sobre a mesa e por trás do recipiente de vidro para permitir a observação dos movimentos orais quando os animais não estavam de frente para o observador. A avaliação foi realizada 30 min após o tratamento com as drogas de interesse, administradas 24 horas após a segunda injeção da reserpina por um observador cego.

4.5 CAMPO ABERTO

A fim de avaliar possíveis alterações locomotoras, os animais foram testados durante 10 min no campo aberto, logo após a avaliação da frequência de VCM (adaptado de CARVALHO *et al.*, 2003). O aparato, feito de fórmica, é formado por um chão de cor cinza 40 x 40 cm), com paredes transparentes de 40 cm de altura. Durante os experimentos, cada camundongo foi colocado no centro do campo aberto e as sessões experimentais foram gravadas por um sistema de câmera de vídeo para posterior análise com o auxílio do programa ANY Maze (Stoelting Co., Wood Dale, IL, EUA).

4.6 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E MOLECULARES

Os camundongos foram eutanasiados por decapitação, os cérebros removidos e o estriado e o córtex pré-frontal foram dissecados no gelo e homogeneizados com Hepes 20 mM, pH 7.0 com a ajuda de um pistilo. O homogenato foi centrifugado por 20 min a 16000g a 4°C, e o sobrenadante utilizado para a determinação das atividades das enzimas SOD, catalase, GPx e GR, além da quantificação dos níveis de GSH e de TBARS. O conteúdo proteico foi quantificado de acordo com o método descrito por Lowry e colaboradores (1951).

4.6.1 Enzimas antioxidantes

4.6.1.1 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada de acordo com Misra e Fridowich (1977). A adição das amostras dos tecidos contendo SOD inibe a auto-oxidação da epinefrina. A taxa de inibição foi monitorada em 480 nm por 5 min no espectrofotômetro. A quantidade da enzima requerida para produzir 50% de inibição foi definida como uma unidade da atividade enzimática.

4.6.1.2 Atividade da catalase

A atividade da catalase foi determinada pelo monitoramento do decréscimo da absorbância em 240 nm, como descrito por Aebi (1984). Em uma placa de 96 poços será pipetado 250 μ l de 50 mM tampão fosfato, 0,5 mM EDTA, 30 mM H₂O₂ e 0,012% (vol/vol.) Triton X-100. Em seguida as amostras foram adicionadas ao meio reacional, e a reação acompanhada nos primeiros 60 segundos.

4.6.1.3 Glutaciona peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi determinada baseada no protocolo descrito por Wendel (1981). Este método consiste na mensuração indireta da GPx, através do consumo de NADPH em 340 nm por 5 min no espectrofotômetro. As amostras foram colocadas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, 1 mM EDTA, GSH 1 mM, NADPH 0,225 mM e 0,2 U/ml de GR. A enzima GPx presente na amostra utiliza GSH para reduzir o hidroperóxido de terc-butil, produzindo GSSG, o qual é rapidamente reduzido a GSH por GR, havendo o consumo de NADPH.

4.6.1.4 Glutaciona redutase (GR)

A atividade da GR foi determinada baseada no protocolo desenvolvido por Carlberg e Mannervik (1985). As amostras foram colocadas em meio reacional contendo tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0; 1 mM de EDTA e NADPH 0,225 mM. A GR reduz GSSG a GSH com o consumo de NADPH no processo. Este consumo pode ser detectado em comprimento de luz de 340 nm por 5 min no espectrofotômetro.

4.6.2 Tióis não-protéicos (GSH)

Os níveis de GSH foram mensurados como tióis não proteicos baseado no protocolo desenvolvido por Ellman (1959). As células em suspensão foram precipitadas em ácido tricloroacético gelado a 10% e centrifugado a 5000 g por 10 min. O sobrenadante foi incubado com ácido 5,5'-*ditio-bis*-2-nitrobenzóico (DTNB) em 1 M de tampão fosfato, pH 7.0. A absorbância foi medida em 412 nm. A curva padrão da GSH reduzida foi usada para calcular os níveis de GSH das amostras controles.

4.6.3 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (“TBARS”)

Os níveis de TBARS foram determinadas nos homogenatos do córtex pré-frontal, do hipocampo e estriado, utilizando o método descrito por Ohkawa e colaboradores (1979), no qual o malondialdeído (MDA), um produto final da peroxidação lipídica, reage com o ácido tiobarbitúrico para formar um complexo colorido. As amostras foram incubadas a 100 °C por 60 minutos em meio ácido contendo 0,45% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 0,67% de ácido tiobarbitúrico. Após a centrifugação, o produto de reação foi determinado em 532 nm no espectrofotômetro, empregando o MDA como padrão.

O espectrofotômetro utilizado para estes ensaios bioquímicos foi o TECAN Genios Microplate Reader (Tecan Group Ltd, Männedorf, Suíça).

4.6.4 Técnica de Griess

O NO é um composto instável, sendo rapidamente oxidado a nitrato e nitrito após a sua produção. Os metabólitos foram determinados utilizando a análise dos níveis de NO_x (nitrato e nitrito) (adaptado de HEVEL e MARLETTA, 1994). Resumidamente, os homogenatos de estriado (“*pool*” de estriados pertencentes a três animais) ou de córtex cerebral foram misturados com 25% de ácido tricloroacético e centrifugados a 1800 g durante 10 min. O sobrenadante foi imediatamente neutralizado com bicarbonato de potássio 2 M. O nitrato foi convertido a nitrito pela nitrato redutase e medido, utilizando a reação colorimétrica de Griess em um leitor de microplacas no comprimento de onda 540 nm (ZOMKOWSKI et al., 2012). Os valores obtidos neste ensaio representam a soma de nitrito e nitrato derivado do

NO. Uma curva padrão foi feita com nitrato de sódio (0-80 mM).

4.6.5 Eletroforese seguido de imunodeteção de proteínas (“western blotting”)

Com o objetivo de verificar alterações no padrão do imunocnteúdo das proteínas VMAT-2, DARPP-32, pDARPP-32[Thr75], TH e dos receptores D1 e D2 foi utilizada a técnica de “western blotting” em extratos proteicos obtidos dos tecidos cerebrais do estriado. Após eutanasiar os animais através da decapitação, seus cérebros foram removidos, lavados com solução salina (NaCl 0,9%) e os estriados foram dissecados sobre uma placa de Petri cercada de gelo, como uma maneira de reduzir possíveis perdas proteicas e serão armazenados em freezer a -80°C até a sua análise. As amostras foram misturadas com tampão de amostra, contendo: SDS 4%, EDTA 2 mM, β-mercaptoetanol 8%, e Tris 100 mM, pH 6,8, fervidas por 5 min e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS (10%) (miniVE Vertical Electrophoresis System™, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EUA). Em seguida, as proteínas presentes no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (1,2 mA/cm²; 1,5 h). A transferência foi efetuada em tampão Tris-base 25 mM glicina 192 mM, metanol 20% (pH 8,3). As membranas foram bloqueadas 1 h com leite desnatado 5% em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5), a temperatura ambiente, mantidas nesta temperatura e então incubadas a 4°C por intervalos de tempo apropriados com anticorpos primários diluídos em TBS-T contendo soroalbumina bovina (BSA) (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%, BSA 2,5%, pH 7,5) nas diluições, 1:1000 (anti-DAT, anti-TH, anti-D2R, anti-VMAT-2, anti-D1R, Santa Cruz Biotechnology, EUA; anti-pDARPP-32[Thr75], Novus Biologicals, Littleton, CO, EUA), 1:20.000 (anti-DARPP-32; Abcam plc, Massachusetts, EUA), e 1:10.000 (anti-β-actina, Abcam plc, Massachusetts, EUA). A visualização dessas proteínas foi realizada utilizando anticorpo secundário específico conjugado à peroxidase (1:5000) e as bandas imunorreativas foram reveladas usando-se um kit de aumento de quimioluminescência (ECL, Santa Cruz Biotechnology). A densidade óptica das bandas foi quantificada com o programa Scion Image® (Frederick, MD, EUA). Os valores foram expressos em porcentagem determinados pela taxa da densidade óptica (D.O.) das bandas de proteínas sobre a D.O. da β-actina.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Para análise dos dados foi empregada a análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls, para múltiplas comparações. Foi empregado também o Teste “t” de Student para comparação entre dois grupos. O nível de significância considerado para todos os testes foi de $P < 0,05$. Os resultados foram analisados através dos programas GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) e STATISTICA 7.0 (Stat Soft. Inc., Tulsa, OK, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 EFEITO ANTIDISCINÉTICO DO TRATAMENTO COM AGMATINA EM CAMUNDONGOS ADMINISTRADOS COM RESERPINA

A Figura 9A mostra o efeito do tratamento com diferentes doses da agmatina sobre a frequência de VCM em camundongos tratados com reserpina. A ANOVA indicou um efeito significativo no tratamento com agmatina [$F(4,38)=11,21$, $P<0,0001$]. A reserpina (1 mg/kg, s.c.) aumentou o número de VCM em relação ao grupo controle e a dose de 30 mg/kg (i.p.) de agmatina foi capaz de reverter este aumento, apresentando um efeito antidiscinético. Como observado na figura 9B, esta dose de agmatina não alterou *per se* o número de VCM em animais que não foram injetados com reserpina [$F(1,91)=18,45$, $P<0,0004$]. A agmatina na dose de 30 mg/kg manteve seu efeito antidiscinético em relação ao grupo reserpina [$F(1,91)=18,53$, $P=0,00004$], o qual apresentou um aumento significativo no número de VCM em relação ao controle [$F(1,91)=48,72$, $P=0,000001$].

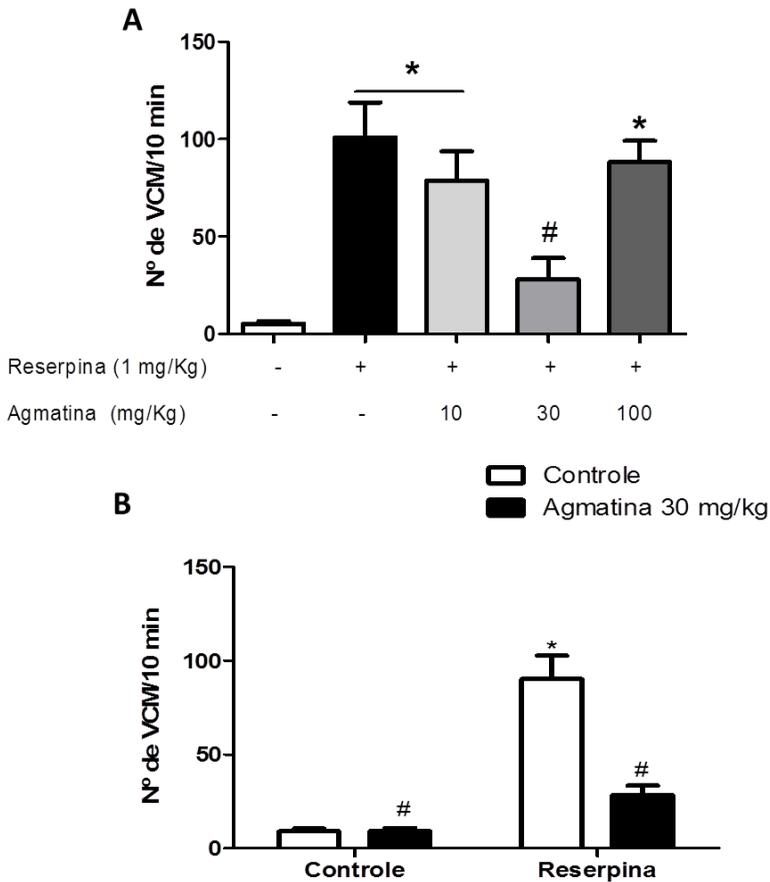


Figura 9: Efeito antidiscinético do tratamento com agmatina em camundongos administrados com reserpina. (A) Efeito do tratamento com agmatina (10-100 mg/kg, i.p.) na discinesia orofacial induzida pela reserpina (1 mg/kg, s.c.), avaliada através do número de VCM/10 min, n=8-9. (B) Efeito do tratamento com agmatina (30 mg/kg) em camundongos administrados com veículo ou reserpina (1 mg/kg, s.c.) sobre o número de VCM/10 min, n=20-25. As barras verticais representam a média \pm E.P.M. * $p \leq 0,05$ comparado com o grupo controle, # $P \leq 0,05$ comparado com o grupo reserpina; ANOVA de 1 (A) ou 2 vias (B), seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

5.2 EFEITO DO TRATAMENTO COM AGMATINA SOBRE A LOCOMOÇÃO EM CAMUNDONGOS AVALIADA NO TESTE DO CAMPO ABERTO

No teste do campo aberto foi avaliado o efeito da agmatina (30 mg/kg, i.p.) sobre a atividade locomotora de camundongos administrados com veículo ou reserpina (Figura 10). Neste teste, foi observado um prejuízo na locomoção dos animais causado pela administração da reserpina. Esta droga reduziu a distância percorrida [$F(1, 35)=42,89$; $P < 0,00001$] (Figura 10A) e a velocidade média [$F(1, 36)=46,36$; $P < 0,00001$] (Figura 10B), além de aumentar o tempo de imobilidade [$F(1, 36)=36,59$; $P < 0,00001$] (Figura 10C) do animal. Em contrapartida, a agmatina não apresentou efeito *per se* [$F(1,35)=0,42$, $P=0,84$], [$F(1,36)=0,0009$, $P=0,97$], [$F(1,36)=0,30$, $P=0,86$] e não foi capaz de reverter a hipolocomoção causada pela reserpina [$F(1,35)=0,54$, $P=0,47$], [$F(1,36)=0,32$, $P=0,58$], [$F(1,36)=0,003$, $P=0,96$] em relação a distância percorrida, a velocidade média e o tempo de imobilidade, respectivamente.

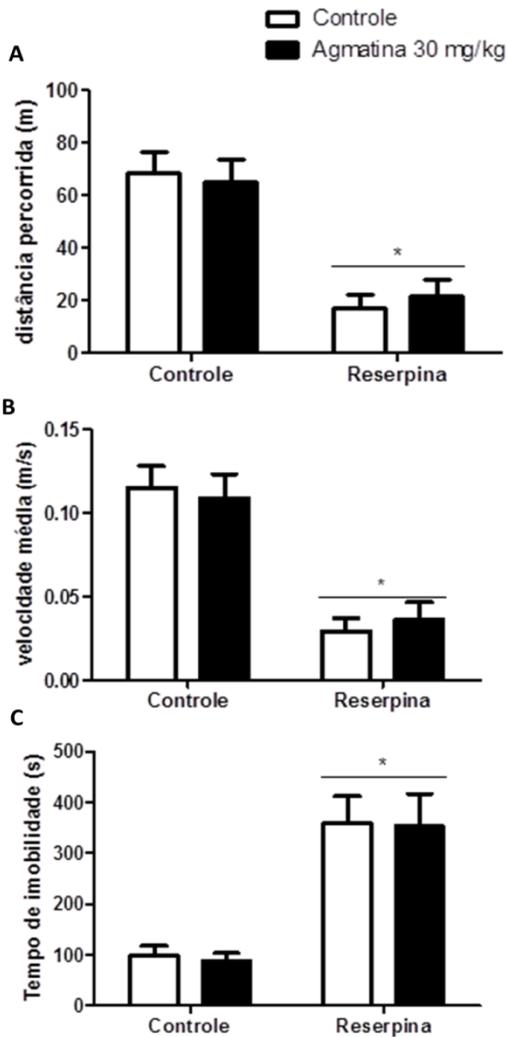


Figura 10: Efeitos do tratamento com agmatina sobre a locomoção de camundongos tratados com reserpina ou veículo avaliada no teste do campo aberto. (A) Efeito do tratamento com agmatina (30 mg/kg) em camundongos administrados com veículo ou reserpina (1 mg/kg, s.c.) na (A) distância percorrida, (B) na velocidade média e (C) no tempo de imobilidade, avaliados durante 10 min no teste do campo aberto. As barras verticais representam a média \pm E.P.M. * $p \leq 0,05$ comparado com o grupo controle; ANOVA de 2 vias, seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls, $n=10$.

5.3 INVESTIGAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES NMDA NO EFEITO ANTIDISCINÉTICO DA AGMATINA EM CAMUNDONGOS

A figura 11 mostra o efeito dos antagonistas do receptor NMDA, administrados em diferentes doses, sobre o número de VCM em camundongos tratados com reserpina. O gráfico da curva dose-resposta para a amantadina (Figura 11A) mostra que as doses de 40 e 60 mg/kg promoveram uma redução significativa do número de VCM, o que não ocorreu com a dose de 10 mg/kg [$F(5,40)=9,39$, $P<0,0001$]. Em relação ao MK801 (Figura 11B), pode-se observar que as doses de 0,03-0,3 mg/kg apresentaram um efeito antidiscinético e apenas a dose de 0,01 mg/kg não reduziu o número de VCM [$F(5,39)=15,59$, $P<0,0001$]. Do mesmo modo, todas as doses avaliadas da arcaína foram capazes de reduzir consideravelmente o número de VCM, porém a dose de 1,0 mg/kg apresentou um efeito parcial sobre os VCM [$F(5,41)=16,37$, $P<0,0001$] (Figura 11C).

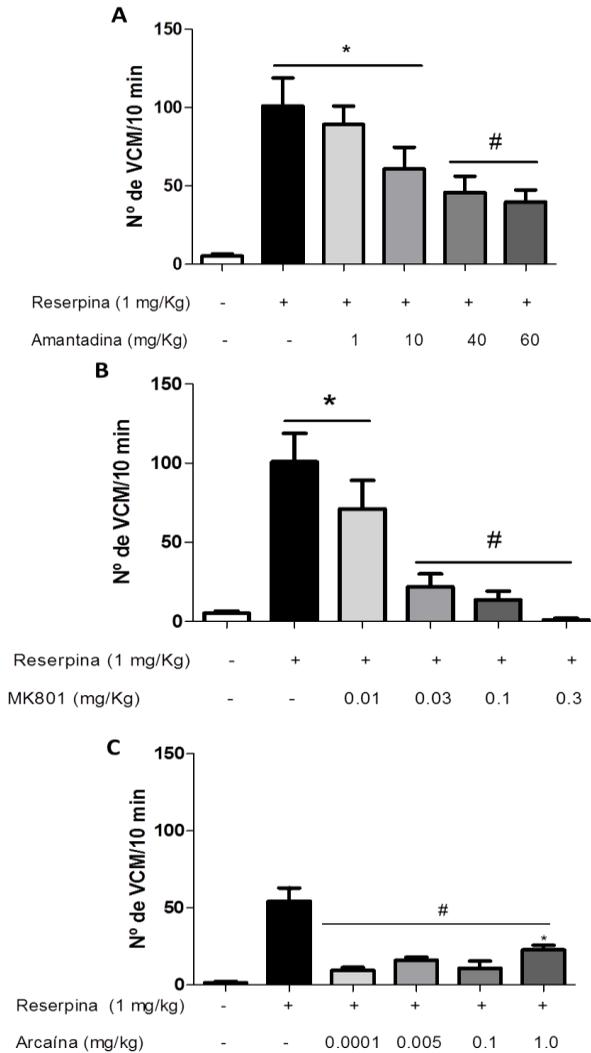


Figura 11: Curva dose-resposta dos antagonistas dos receptores do tipo NMDA em relação à frequência de VCM. Efeito do tratamento com (A) amantadina (1-60 mg/kg, i.p.), n=7-9, (B) MK801 (0,01-0,3 mg/kg, i.p), n=5-9, ou (C) arcaína (0,0001-1,0 mg/kg, i.p), n=5-10, na discinesia orofacial induzida pela reserpina (1 mg/kg, s.c.) em camundongos, avaliada através do número de VCM/10 min. As barras verticais representam a média \pm E.P.M. * $p \leq 0,05$ comparado com o grupo controle, # $P \leq 0,05$ comparado com o grupo reserpina; ANOVA de 1 via, seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

Corroborando os resultados anteriores, a figura 12A mostra um aumento no número de VCM no tratamento com a reserpina em relação ao grupo controle [$t=5,33$; $P<0,0001$; Teste “t” de Student]. Na figura 12B, observou-se uma redução no número de VCM entre as doses sub-efetivas da agmatina (10 mg/kg) e amantadina (1 mg/kg), porém não foi significativo [$F(3,28)=2,55$, $P=0,08$]. Em contrapartida, a coadministração das doses sub-efetivas da agmatina (10 mg/kg) e do MK801 (0,01 mg/kg) reduziu significativamente o número de VCM em comparação ao grupo que recebeu apenas reserpina [$F(3,30)=6,12$ $P=0,0022$] (Figura 12C).

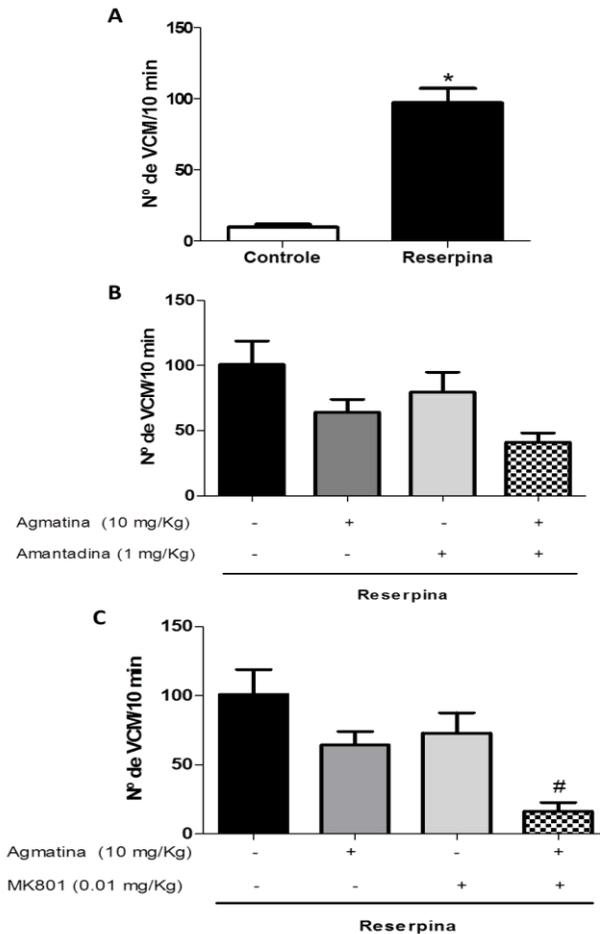


Figura 12: Efeito da coadministração das doses sub-efetivas de agmatina e dos antagonistas dos receptores NMDA na discinesia orofacial induzida pela reserpina em camundongos. (A) Efeito do tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.) sobre o número de VCM/10 min, n=9. Efeito da coadministração das doses sub-efetivas da (B) agmatina (10 mg/kg, i.p.) e amantadina (1 mg/kg, i.p.), n=5-9, ou (C) agmatina (10 mg/kg, i.p.) e MK801 (0,01 mg/kg, i.p.), n=7-9, na discinesia orofacial induzida pela reserpina (1 mg/kg, s.c.), avaliada através do número de VCM/ 10 min. As barras verticais representam a média \pm E.P.M. * $p \leq 0,05$ comparado com o grupo controle, # $P \leq 0,05$ comparado com o grupo reserpina; Teste “t” de Student (A) e ANOVA de 1 via, seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls (B) e (C).

A figura 13A mostra um aumento do número de VCM no tratamento com a reserpina em relação ao grupo controle [$t=4,51$; $P=0,002$; Teste “t” de Student]. A figura 13B mostra o efeito da coadministração das doses ativas da agmatina (30 mg/kg) e da arcaína (1 mg/kg) sobre o número de VCM. Neste experimento, observou-se que a arcaína não alterou o efeito antidiscinético promovido pela agmatina [$F(3, 17)=0,6194$; $P=0,0008$].

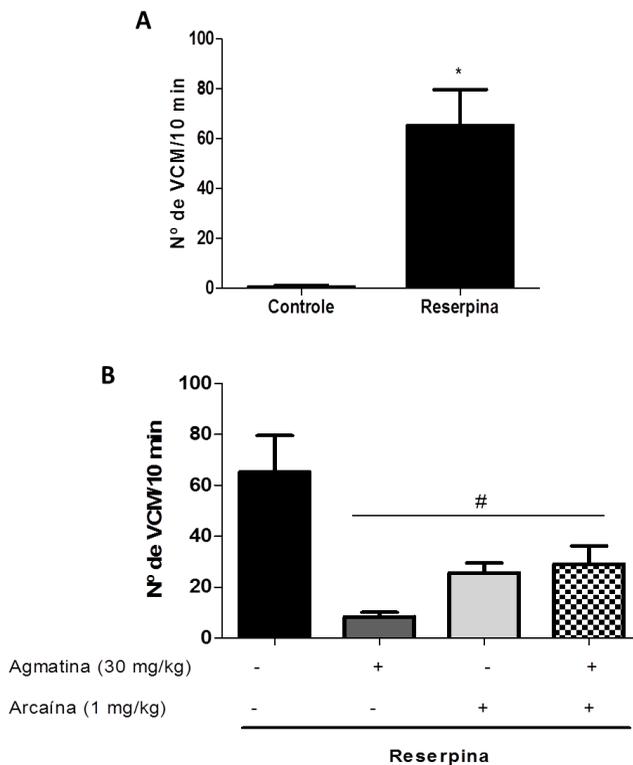


Figura 13: Efeito da coadministração das doses ativas da agmatina e da arcaína na discinesia orofacial induzida pela reserpina em camundongos. (A) Efeito do tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.) sobre o número de VCM/ 10 min, $n=4$. (B) Efeito da coadministração de agmatina (10 mg/kg, i.p.) e arcaína (1 mg/kg, i.p.) na discinesia orofacial induzida pela reserpina (1 mg/kg, s.c.), avaliada através do número de VCM/10 min, $n=4-6$. As barras verticais representam a média \pm E.P.M. * $p \leq 0,05$ comparado com o grupo controle, # $P \leq 0,05$ comparado com o grupo reserpina; Teste “t” de Student (A) e ANOVA de 1 via, seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls (B).

5.4 INVESTIGAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO SISTEMA NITRÉRGICO NO EFEITO ANTIDISCINÉTICO DA AGMATINA EM CAMUNDONGOS

Como ilustrado na figura 14A, as doses 1-100 mg/kg de 7-NI mostraram um efeito antidiscinético em comparação ao grupo reserpina. Apenas a dose de 0,1 mg/kg foi incapaz de reduzir o número de VCM [F(5,47)=9,68; P<0,0001]. Na figura 14B, é mostrado um aumento no número de VCM no tratamento com a reserpina em relação ao grupo controle [t=5,33; P<0,0001; Teste “t” de Student]. Um efeito sinérgico foi observado entre as doses sub-efetivas da agmatina (10 mg/kg) e do 7-NI (0,1 mg/kg) com uma redução significativa no número de VCM em comparação ao grupo que recebeu apenas reserpina [F(3,28)=3,27; P=0,04] (Figura 14C).

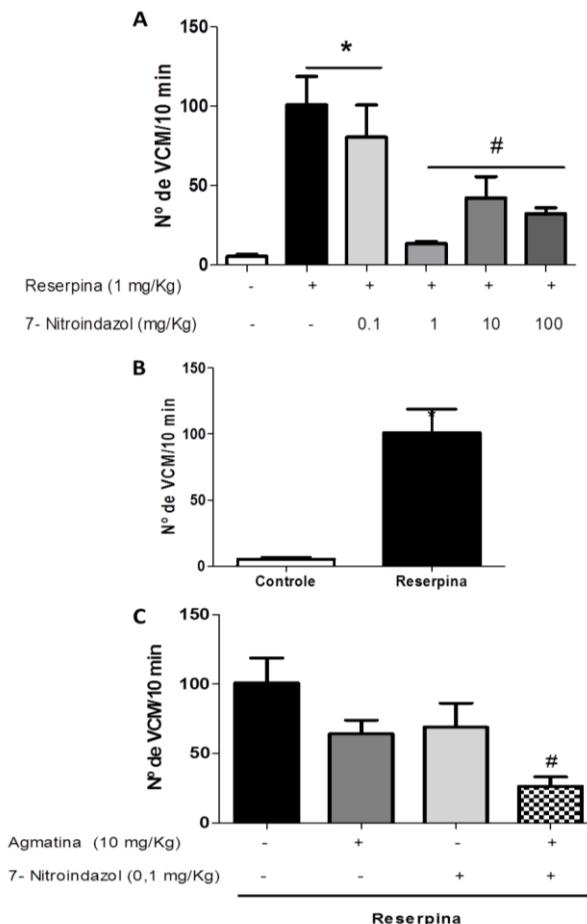


Figura 14: Curva dose-resposta do 7-Nitroindazol em relação à frequência de VCM e o efeito da coadministração das doses sub-efetivas da agmatina e do 7-Nitroindazol na discinesia orofacial induzida pela reserpina em camundongos. (A) Efeito andiscinético do tratamento com 7-Nitroindazol (0,1-100 mg/kg, i.p.) em animais tratados com reserpina (1 mg/kg, s.c.), avaliada através do número de VCM/ 10 min, n=7-9. (B) Efeito do tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.) sobre o número de VCM/10 min, n=9 (C) Efeito da coadministração das doses sub-efetivas da agmatina (10 mg/kg, i.p.) e 7-Nitroindazol (0,1 mg/kg, i.p.) na discinesia orofacial induzida pela reserpina (1 mg/kg, s.c.), avaliada através do número de VCM/10 min, n=5-9. As barras verticais representam a média \pm E.P.M. * $p \leq 0,05$ comparado com o grupo controle, # $P \leq 0,05$ comparado com o grupo reserpina; Teste “t” de Student (B) e ANOVA de 1 via, seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls (A) e (C).

A figura 15 ilustra o efeito do tratamento da agmatina (30 mg/kg, i.p.) sobre os níveis de NOx (nitrato e nitrito) nas regiões do córtex cerebral e do estriado em camundongos administrados com veículo ou reserpina. As figuras 15A e 15C mostram o efeito da L-arginina (750 mg/kg) nos níveis de NOx no córtex cerebral e no estriado, respectivamente, em relação ao grupo controle. Esta droga foi utilizada como controle positivo deste ensaio. A reserpina aumentou os níveis de NOx no córtex cerebral comparado ao grupo controle [$t=2,523$; $P=0,0268$; Teste “t” de Student], porém este efeito não ocorreu no estriado [$t=0,004738$; $P=0,9963$; Teste “t” de Student]. No córtex cerebral, a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo do tratamento com reserpina [$F(1,25)=4,34$, $P<0,05$], mas não para o tratamento com agmatina [$F(1,25)=0,03$, $P>0,05$] e não para a interação entre os tratamentos reserpina e agmatina [$F(1,25)=0,02$, $P>0,05$] (Figura 15B). No estriado, a ANOVA não mostrou significância nos níveis de NOx entre o grupo reserpina e o grupo controle [$F(1,24)=2,16$, $P=0,15$], nem um efeito da agmatina *per se* [$F(1,24)=2,8$, $P=0,11$]. Houve um leve aumento dos níveis de NOx na interação entre os tratamentos reserpina e agmatina, porém este aumento não foi significativo [$F(1, 24)=0,02$, $P=0,9$] (Figura 15D).

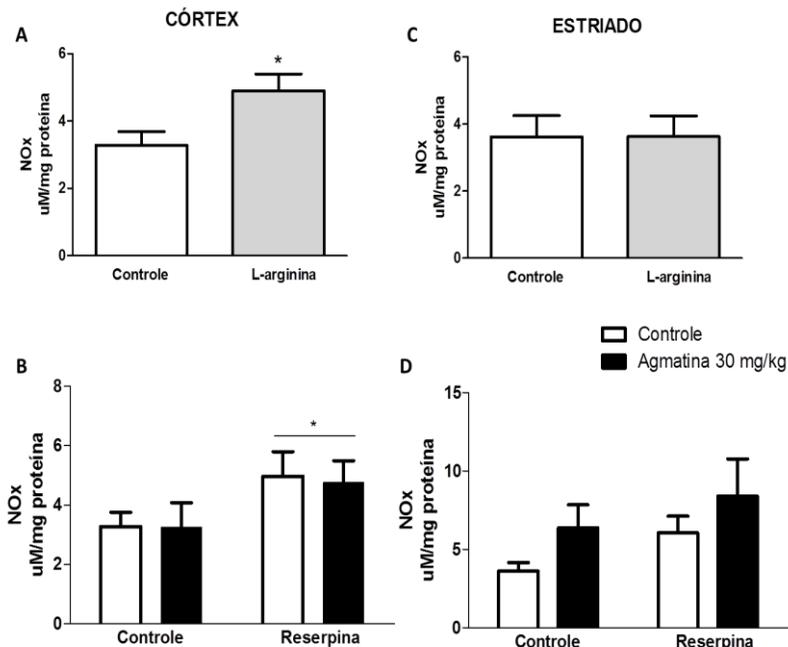


Figura 15: Efeito do tratamento com agmatina sobre os níveis de NOx no córtex cerebral e no estriado de camundongos administrados com reserpina, avaliados pela técnica de Griess. Efeito do tratamento com L-arginina (750 mg/kg, i.p.) nos níveis de NOx (A) no córtex cerebral e (C) no estriado. Efeito do tratamento com agmatina (30 mg/kg, i.p.) nos níveis de NOx (B) no córtex cerebral e (D) no estriado em camundongos administrados com veículo ou reserpina (1 mg/kg, s.c.). As barras verticais representam a média \pm E.P.M. * $p \leq 0,05$ comparado com o grupo controle; Teste “t” de Student (A) e (C) e ANOVA de 2 vias, seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls (B) e (D), $n=6-9$ (córtex) e $n=7$ (estriado).

5.5 EFEITO DO TRATAMENTO COM AGMATINA SOBRE OS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CAMUNDONGOS

Os parâmetros de estresse oxidativo (GSH, TBARS e atividade das enzimas catalase, GPx, GR e SOD) foram analisados nas regiões do córtex pré-frontal e do estriado (Tabela 1). Foi observada diferença significativa entre os grupos avaliados apenas nos níveis de GSH no estriado. No estriado, o grupo reserpina reduziu os níveis de GSH em relação aos grupos veículo+veículo, veículo+agmatina e reserpina+agmatina [$F(1,36)=6,69$, $P=0,01$]. Não foi observada alteração

nos níveis de GSH no tratamento com agmatina [F(1,36)=1,80, P=0,19] e nem no fator interação entre os tratamentos reserpina e agmatina [F(1,36)=2,9, P=0,1]. No córtex pré-frontal, a ANOVA de duas vias não revelou alteração nos níveis de GSH no tratamento com reserpina [F(1,36)=1,32, P=0,26], no tratamento com agmatina [F(1,36)=0,0004, P=0,98] e nem na interação entre os tratamentos reserpina e agmatina [F(1,36)=0,06, P=0,82].

No córtex pré-frontal, a ANOVA de duas vias não revelou alteração na atividade da catalase no tratamento com reserpina [F(1,34)=0,09, P=0,77] e no tratamento com agmatina [F(1,34)=0,00007, P=0,99]. Na interação entre os tratamentos reserpina e agmatina, a ANOVA indicou um efeito significativo [F(1,34)=9,82, P=0,004], no entanto não foi observado esta diferença no teste *post-hoc* de Newman-Keuls ($p>0,05$). No estriado, a ANOVA de duas vias não revelou alteração na atividade da catalase no tratamento com reserpina [F(1,17)=2,10, P=0,17], no tratamento com agmatina [F(1,17)=0,36, P=0,56] e nem na interação entre os tratamentos reserpina e agmatina [F(1,17)=0,03, P=0,86].

No córtex pré-frontal, a ANOVA de duas vias não revelou alteração na atividade da SOD no tratamento com reserpina [F(1,35)=2,71, P=0,11], no tratamento com agmatina [F(1,35)=0,62, P=0,44] e nem na interação entre os tratamentos reserpina e agmatina [F(1,35)=0,82, P=0,37]. No estriado, a ANOVA de duas vias não revelou alteração na atividade da SOD no tratamento com reserpina [F(1,36)=0,29, P=0,60], no tratamento com agmatina [F(1,36)=0,78, P=0,38] e nem na interação entre os tratamentos reserpina e agmatina [F(1,36)=0,25, P=0,62].

No córtex pré-frontal, a ANOVA de duas vias não revelou alteração na atividade da GPx no tratamento com reserpina [F(1,36)=2,54, P=0,12], no tratamento com agmatina [F(1,36)=1,61, P=0,21] e nem na interação entre os tratamentos reserpina e agmatina [F(1,36)=0,89, P=0,35]. No estriado, a ANOVA de duas vias não revelou alteração na atividade da GPx no tratamento com reserpina [F(1,36)=0,35, P=0,56], no tratamento com agmatina [F(1,36)=1,68, P=0,20] e nem na interação entre os tratamentos reserpina e agmatina [F(1,36)=1,15, P=0,29].

No córtex pré-frontal, a ANOVA de duas vias não revelou alteração na atividade da GR no tratamento com reserpina [F(1,36)=1,0, P=0,32], no tratamento com agmatina [F(1,36)=1,35, P=0,25] e nem na interação entre os tratamentos reserpina e agmatina [F(1,36)=0,04, P=0,84]. No estriado, a ANOVA de duas vias não revelou alteração na

atividade da GR no tratamento com reserpina [F(1,36)=0,009, P=0,93], no tratamento com agmatina [F(1,36)=0,09, P=0,76] e nem na interação entre os tratamentos reserpina e agmatina [F(1,36)=0,23, P=0,64].

No córtex pré-frontal, a ANOVA de duas vias não revelou alteração no TBARS no tratamento com reserpina [F(1,35)=1,34, P=0,26], no tratamento com agmatina [F(1,35)=0,01, P=0,92] e nem na interação entre os tratamentos reserpina e agmatina [F(1,35)=2,03, P=0,16]. No estriado, a ANOVA de duas vias não revelou alteração no TBARS no tratamento com reserpina [F(1,36)=0,060, P=0,81], no tratamento com agmatina [F(1,36)=1,02, P=0,32] e nem na interação entre os tratamentos reserpina e agmatina [F(1,36)=0,49, P=0,49].

Tabela 1

Efeito da agmatina (30 mg/kg, i.p.) sobre os parâmetros de estresse oxidativo no córtex pré-frontal e no estriado de camundongos tratados com reserpina (1 mg / kg, s.c.) ou veículo.		Estrutura cerebral			
		veículo + veículo	veículo + reserpina	veículo + AGM 30 mg/kg	reserpina + AGM 30 mg/kg
GSH	córtex pré-frontal	26,91 ± 4,13	23,77 ± 0,77	26,33 ± 1,11	24,26 ± 0,59
	estriado	25,88 ± 0,82	22,61 ± 0,97*	26,81 ± 1,62	27,21 ± 1,31#
Catalase	córtex pré-frontal	0,54 ± 0,11	1,00 ± 0,21	1,05 ± 0,18	0,49 ± 0,14
	estriado	1,25 ± 0,63	0,58 ± 0,17	0,93 ± 0,34	0,41 ± 0,12
SOD	córtex pré-frontal	36,11 ± 6,09	25,13 ± 3,06	28,82 ± 4,98	25,62 ± 2,54
	estriado	14,68 ± 0,84	13,77 ± 0,90	15,02 ± 0,86	14,98 ± 0,94
GPx	córtex pré-frontal	3,06 ± 0,31	2,93 ± 0,13	3,00 ± 0,15	2,48 ± 0,19
	estriado	5,37 ± 0,24	5,50 ± 0,25	5,99 ± 0,27	5,56 ± 0,28
GR	córtex pré-frontal	7,25 ± 0,93	6,58 ± 0,36	6,49 ± 0,38	6,04 ± 0,31
	estriado	10,09 ± 0,36	9,88 ± 0,16	10,02 ± 0,54	10,16 ± 0,25
TBARS	córtex pré-frontal	6,71 ± 0,93	7,07 ± 1,79	8,76 ± 1,50	5,30 ± 0,41
	estriado	10,89 ± 3,62	9,73 ± 2,52	6,53 ± 2,26	8,93 ± 2,26

Os resultados (média ± E.P.M) foram analisados utilizando ANOVA de 2 vias, seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls, *p≤0,05 comparado com o grupo controle, # P≤ 0,05 comparado com o grupo reserpina. GSH (tióis não-proteicos): nmol NPSH/mg proteína, n=10 (córtex pré-frontal e estriado). Catalase: μmolH₂O₂/min/mg proteína, n=9-10 (córtex pré-frontal) e n=5-6 (estriado); GPx (glutaciona peroxidase): nmolNADPH/min/mg proteína, n=10 (córtex pré-frontal e estriado); GR (glutaciona redutase): nmolNADPH/min/mg proteína, n=10 (córtex pré-frontal e estriado); SOD (superóxido dismutase): USOD/mg proteína, n=10 (córtex pré-frontal e estriado); TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), n=9-10 (córtex pré-frontal) e n=10 (estriado): nmolMDA/mg proteína, n=10 (córtex pré-frontal e estriado).

5.6 EFEITO DO TRATAMENTO COM AGMATINA SOBRE O IMUNOCONTEÚDO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À DISCINESIA EM CAMUNDONGOS

A reserpina (1 mg/kg, s.c.) e a agmatina (30 mg/kg) não alteraram o imunocontéudo das proteínas avaliado por eletroforese seguido de imunodeteccção ($p > 0,05$) (Figura 16). A ANOVA de duas vias não indicou alteraçãõ no imunocontéudo de TH no tratamento com reserpina [$F(1,12)=0,87$, $P=0,37$], no tratamento com agmatina [$F(1,12)=0,49$, $P=0,50$] e nem na interaçãõ entre os tratamentos reserpina e agmatina [$F(1,12)=0,21$, $P=0,66$] (Figura 16A). A ANOVA de duas vias não indicou alteraçãõ no imunocontéudo de DAT no tratamento com reserpina [$F(1,12)=0,05$, $P=0,83$], no tratamento com agmatina [$F(1,12)=0,14$, $P=0,71$] e nem na interaçãõ entre os tratamentos reserpina e agmatina [$F(1,12)=0,8$, $P=0,39$] (Figura 16B). A ANOVA de duas vias não indicou alteraçãõ no imunocontéudo dos receptores dopaminérgicos D1 no tratamento com reserpina [$F(1,12)=0,22$, $P=0,65$], no tratamento com agmatina [$F(1,12)=3,92$, $P=0,07$] e nem na interaçãõ entre os tratamentos reserpina e agmatina [$F(1,12)=0,34$, $P=0,57$] (Figura 16C). A ANOVA de duas vias não indicou alteraçãõ no imunocontéudo dos receptores dopaminérgicos D2 no tratamento com reserpina [$F(1,12)=0,78$, $P=0,39$], no tratamento com agmatina [$F(1,12)=1,01$, $P=0,34$] e nem na interaçãõ entre os tratamentos reserpina e agmatina [$F(1,12)=0,04$, $P=0,84$] (Figura 16D). A ANOVA de duas vias não indicou alteraçãõ no imunocontéudo de DARPP-32 no tratamento com reserpina [$F(1,12)=0,01$, $P=0,90$], no tratamento com agmatina [$F(1,12)=0,15$, $P=0,71$] e nem na interaçãõ entre os tratamentos reserpina e agmatina [$F(1,12)=0,06$, $P=0,80$] (Figura 16E). A ANOVA de duas vias não indicou alteraçãõ no imunocontéudo de p-DARPP-32[Thr75] no tratamento com reserpina [$F(1,12)=1,06$, $P=0,32$], no tratamento com agmatina [$F(1,12)=0,06$, $P=0,81$] e nem na interaçãõ entre os tratamentos reserpina e agmatina [$F(1,12)=0,00001$, $P=1,0$] (Figura 16F). A ANOVA de duas vias não indicou alteraçãõ no imunocontéudo de VMAT-2 no tratamento com reserpina [$F(1,12)=0,28$, $P=0,87$], no tratamento com agmatina [$F(1,12)=0,0009$, $P=0,98$] e nem na interaçãõ entre os tratamentos reserpina e agmatina [$F(1,12)=0,11$, $P=0,74$] (Figura 16G).

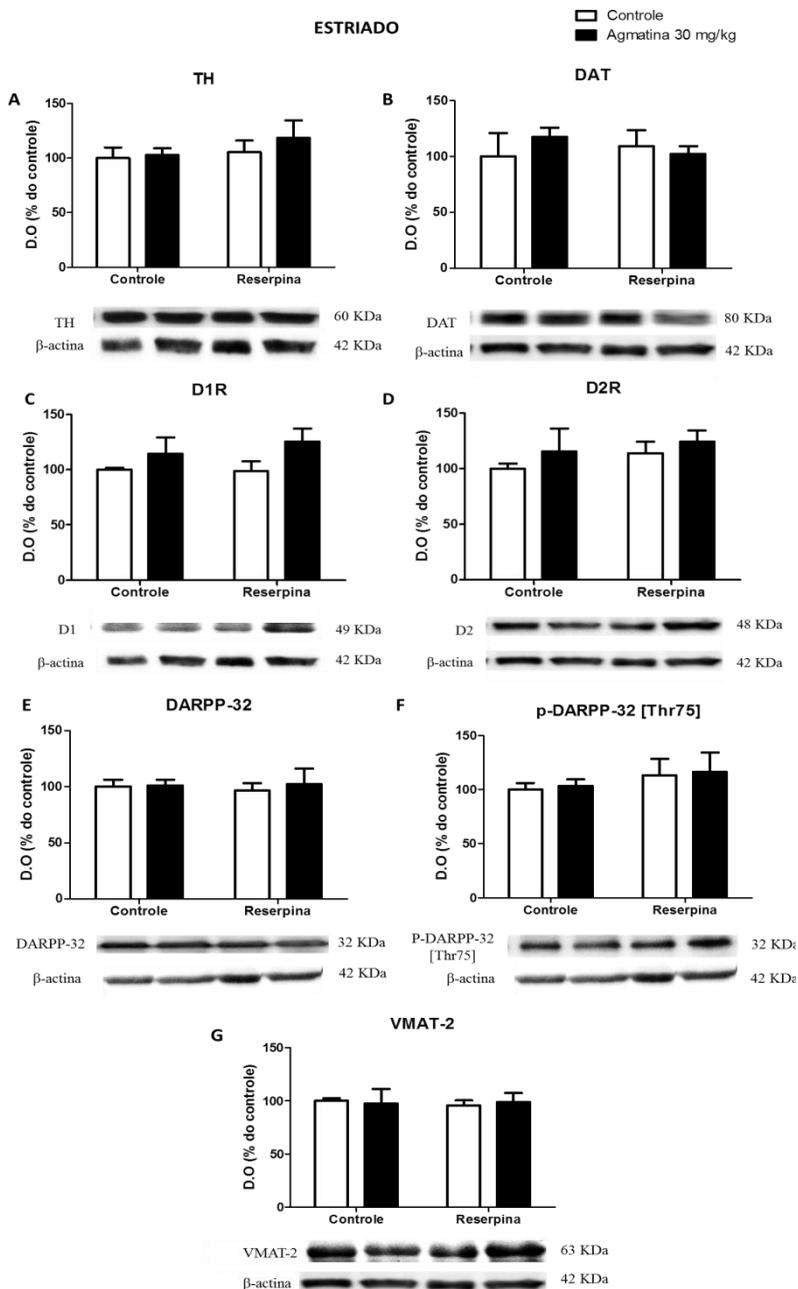


Figura 16: Efeito do tratamento com agmatina sobre o imunoc conteúdo de proteínas relacionadas à discinesia no estriado de camundongos tratados com veículo ou reserpina. Efeito do tratamento com agmatina (30 mg/kg, i.p.) sobre o padrão do imunoc conteúdo da (A) TH (tirosina hidroxilase), (B) DAT, transportador de dopamina, (C) D1R (receptor dopaminérgico D1), (D) D2R (receptor dopaminérgico D2), (E) DARPP-32 e (F) p-DARPP-32[Thr75] (fosfoproteínas regulada por AMPc de 32 KDa total e fosforilada no resíduo treonina 75) e (G) VMAT-2, transportador vesicular de monoaminas 2. Os valores foram expressos em porcentagem determinados pela taxa da densidade óptica (D.O.) das bandas de proteínas sobre a D.O. β -actina. As barras verticais representam a média \pm E.P.M. Os resultados foram analisados utilizando ANOVA de 2 vias, seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls n=4.

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que a reserpina induziu um aumento na frequência de VCM, corroborando com estudos anteriores que consideram a administração da reserpina como um modelo de discinesia em roedores (BURGER *et al.*, 2003; 2005; ABÍLIO *et al.*, 2003; NAIDU *et al.*, 2004; BILSKA *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2011; TREVIZOL *et al.*, 2011). Além disso, estes dados indicam, pela primeira vez, um efeito antidiscinético da agmatina em camundongos tratados com reserpina, sem efeito *per se* desta droga sobre a frequência de VCM. Foi demonstrado também um efeito sinérgico da coadministração da agmatina com o MK801, um antagonista dos NMDAR e o 7-NI, um inibidor preferencial da nNOS, sugerindo o envolvimento dos NMDAR e do sistema nitrérgico no efeito antidiscinético da agmatina.

Como descrito anteriormente, as ações da agmatina como um antagonista NMDAR e como um inibidor da produção de NO (através da inibição de NOS) têm sido associados a benefícios em diversos processos patológicos como a depressão (ZOMKOSWIKI *et al.*, 2002; NEIS *et al.*, 2014), o TCE (KUO *et al.*, 2007; 2011), a neuroinflamação (SASTRE *et al.*, 1998; REGUNATHAN & PILETZ, 2003), a dor (SANTOS *et al.*, 2005; GADOTTI *et al.*, 2006) e a epilepsia (FENG *et al.*, 2005).

Demehri e colaboradores (2003) verificaram o envolvimento da via da L-arginina-NO no efeito anticonvulsivante da agmatina. A L-arginina inibiu este efeito da agmatina, o qual foi recuperado com a administração de L-NAME, um inibidor da NOS. A combinação de L-NAME e agmatina promoveu uma proteção em relação às convulsões mais efetiva do que estas drogas sozinhas. Essa atividade anticonvulsivante da agmatina também pode estar relacionada ao bloqueio da liberação do glutamato. Feng e colaboradores (2005) observaram a inibição *in vivo* da liberação do glutamato pela agmatina na redução de convulsões induzidas por pentilenotetrazol no córtex cerebral de ratos.

Sabe-se que o NO interage com a neurotransmissão glutamatérgica. A ativação dos NMDAR para glutamato estimula o influxo intracelular de cálcio nos neurônios, levando a ativação de NOS de maneira dependente de cálcio. Esse processo contribui para a produção e liberação de NO, o qual se difunde de maneira retrógrada para os neurônios pré-sinápticos, aumentando a atividade glutamatérgica (UZBAY, 2012). Visto isso, o bloqueio dos receptores NMDA após a

inibição de NOS pode ser responsável pela ação anticonvulsivante da agmatina (UZBAY, 2012), podendo expandir essa atuação para as outras condições patológicas.

Uma evidência importante que indica uma possível modulação da agmatina sobre o sistema glutamatérgico é a colocalização da agmatina com o glutamato no interior do soma das células piramidais nas regiões CA1 e CA3 e em terminais axônicos das células CA1 hipocâmpais (SEO *et al.*, 2011).

Deve-se ter cautela ao utilizar um antagonista de receptores NMDA nas discinesias. Um estudo recente observou um efeito antidiscinético de um antagonista do receptor NMDA, a memantina, na LID em ratos lesionados com 6-OHDA, entretanto este efeito foi perdido após alguns dias de administração. Neste mesmo estudo, um resultado similar foi obtido com a amantadina em ratos discinéticos (TRONCI *et al.*, 2014). Uma análise da composição das subunidades do NMDAR revelou que a perda do deste efeito pela administração repetida da memantina foi associada à diminuição dos níveis da subunidade GluN2B na região sináptica, com um aumento da razão GluN2A/GluN2B na membrana sináptica estriatal comparados com os animais expostos a memantina pela primeira vez (TRONCI *et al.*, 2014). Outros trabalhos já haviam mostrado o envolvimento da alteração das subunidades do NMDAR na LID (GARDONI *et al.*, 2006; 2012; MARANIS *et al.*, 2012)

Outro trabalho também mostrou que o MK801 reduz a LID no modelo da 6-OHDA em ratos, no entanto em doses (0,2-0,3 mg/kg) que impedem os efeitos terapêuticos da L-DOPA (PAQUETTE *et al.*, 2010). De acordo com este dado, no modelo da reserpina, uma dose alta de MK801 (0,5 mg/kg) causou prejuízos na locomoção em roedores (JOHNSTON *et al.*, 2005). Visto isto, torna-se importante investigar futuramente o efeito do tratamento crônico com agmatina nas discinesias, além de avaliar sua possível interferência em relação aos benefícios da L-DOPA sobre o sistema motor.

A administração direta ou a liberação indireta de NO seguida da ativação dos receptores NMDA pode alterar o nível extracelular de diferentes receptores, incluindo receptores dopaminérgicos e serotoninérgicos. No estriado, a ativação de D1R por estimulação elétrica acarretou um aumento na produção de NO e a geração de NO, sendo estes efeitos revertidos pela administração de antagonista do D1R (IRAVANI & JENNER, 2011).

Em ratos lesionados com 6-OHDA, alguns trabalhos mostraram a efetividade do 7-NI em reduzir as DOs e esta resposta foi associada à

diminuição no número de neurônios positivos para nNOS, à atenuação dos níveis de FosB/ Δ FosB estriatal e ao bloqueio da ativação microglial no estriado (PADOVAN-NETO *et al.*, 2013; 2015; DEL-BEL *et al.*, 2014; BORTOLANZA *et al.*, 2015). Corroborando com esses dados, o presente estudo mostrou que o 7-NI, nas doses de 1-100 mg/kg, foi capaz de reverter as DOs induzidas pela reserpina. Além disso, a coadministração de doses sub-efetivas do 7-NI (0,1 mg/kg) e da agmatina (10 mg/kg) também apresentou um efeito antidiscinético neste modelo. Este resultado fortalece a evidência sobre a participação do sistema nitrérgico nas discinesias, visto que foi observada a efetividade do 7-NI em mais de um modelo, além de sugerir o envolvimento deste sistema no efeito da agmatina.

Embora o presente estudo tenha mostrado um efeito sinérgico entre as doses sub-efetivas da agmatina e do 7-NI, no córtex cerebral, a agmatina não reverteu o aumento de NO_x promovido pela reserpina, enquanto que no estriado houve um leve aumento (não estatisticamente significativo) nos níveis de NO_x em todos os grupos avaliados comparados ao grupo controle. Trabalhos prévios da literatura indicam que a agmatina (100 μ M) reduziu a excitotoxicidade e a produção de NO em células microgliciais BV2 expostas a LPS por 24 horas (AHN *et al.*, 2011). Além disso, a produção de NO e a morte neuronal foram atenuadas por L-NAME e MK801 em células neurais primárias do córtex cerebral obtidos de embriões de camundongos (TAVAKOLIFAR *et al.*, 2009). RADENOVIC e colaboradores (2003) observaram também que inibição de NOS pelo 7-NI protegeu contra o dano celular induzido pelo cainato. Neste estudo, o 7-NI produziu diminuiu os níveis de NO_x nas regiões do hipocampo, estriado, córtex pré-frontal e cerebelo. Um ponto importante a ser considerado é que a técnica de Griess é uma detecção indireta dos níveis de NO, através da análise do seu metabólito mais estável, o nitrito. No entanto, muitas substâncias tem a capacidade de produzir íons nitrito, logo os níveis de nitrito avaliados podem ser provenientes de várias fontes, não sendo específico para o NO (TSIKAS *et al.*, 1997). Isto pode explicar, ao menos em parte, o fato da agmatina não ter revertido o aumento nos níveis de NO_x no córtex induzido pela reserpina no presente estudo.

Associado a estes achados, a coadministração de uma dose ativa da arcaína (1 mg/kg, i.p.) não alterou o efeito antidiscinético promovido pela agmatina. Inicialmente, a hipótese era de que a arcaína poderia reverter o efeito da agmatina sobre a frequência de VCM, visto que Zomkowsky e colaboradores (2006) verificaram que a arcaína (1 mg/kg, i.p.) reverteu o efeito tipo antidepressivo da putrescina (10 mg/kg, i.p.),

uma poliamina que também faz parte da via da L-arginina. Contudo, no presente estudo observou-se o inverso. Além da arcaína não alterar o efeito sobre a agmatina, não foi encontrada a dose sub-efetiva quando foi realizada a sua curva dose-resposta, mesmo em doses muito baixas. As ações das poliaminas são complexas e podem exercer tanto uma modulação positiva como negativa no receptor NMDA dependendo do sítio específico de ligação ao receptor (JOHNSON, 1996).

A arcaína é um análogo sintético da agmatina e a diferença entre elas é a quantidade de resíduos de guanidina na sua composição (WANG *et al.*, 2006). Sendo assim, o efeito antidiscinético mais potente da arcaína em relação à agmatina observado neste trabalho é devido à presença de dois resíduos de guanidina em comparação com apenas um resíduo presente na agmatina, uma vez que é esta região que se liga ao receptor NMDA e parece compartilhar o mesmo sítio de ligação da arcaína no poro do canal do receptor NMDA (YANG & REIS, 1999). Estudos apontam também que antagonistas dos receptores NMDA com baixa afinidade (como a memantina) são mais bem tolerados do que aqueles que apresentam uma alta afinidade (ZOMKOSWSKY *et al.*, 2006).

YANG e REIS (1999) observaram que o resíduo de guanidina da agmatina é o sítio ativo que interage com o canal do NMDAR, uma vez que a putrescina, uma diamina que difere estruturalmente da agmatina por um grupo amino terminal, foi ineficaz em bloquear a corrente do receptor. A arcaína (300 mM) reduziu a atividade de um único canal do receptor NMDA a um nível indetectável, enquanto que as poliaminas endógenas, em concentrações de 10 mM, meramente reduziram a amplitude de um único canal em 60% a 70%. Estes resultados sugerem que o grupo guanidina é mais eficaz que o grupo amina em bloquear o canal do receptor NMDA. Moléculas contendo guanidina, tais como agmatina e arcaína, devem ser distinguidas das poliaminas com base nas suas diversas ações sobre o canal do receptor NMDA. Por fim, este resultado reforça a participação destes receptores no efeito antidiscinético da agmatina.

Apesar das evidências encontradas neste estudo sobre a participação do sistema nitrérgico e dos receptores NMDA para glutamato, não é descartada a possibilidade de que o efeito antidiscinético da agmatina envolva outros mecanismos, visto que ela atua em outros sistemas relacionados às discinesias como os α 2-adrenoreceptores, os receptores imidazólicos e os receptores nicotínicos para acetilcolina (REIS & REGUNATHAN, 1998; HALARIS & PILETZ, 2007; UZBAY, 2011). PAQUETTE e colaboradores (2012)

verificaram que o efeito antidiscinético da amantadina não foi afetado pelo antagonista 5-HT_{1A}, WAY-100635, mas foi parcialmente revertido pelo agonista do NMDAR, D-cicloserina. No entanto, o efeito antidiscinético do dextrometorfano, outro antagonista do NMDAR, foi revertido pelo WAY-100635 e mantido pela D-cicloserina. Isto sugere que o efeito da amantadina foi parcialmente dependente do antagonismo do NMDAR, enquanto que o dextrometorfano inibiu as discinesias indiretamente via agonismo do receptor 5-HT_{1A} (PAQUETTE *et al.*, 2012).

No teste do campo aberto, a reserpina reduziu a distância percorrida e a velocidade média, além de aumentar o tempo de imobilidade em camundongos. Sabe-se que a reserpina causa um prejuízo na locomoção, induzindo sintomas de parkinsonismo em roedores como hipocinesia, tremor e rigidez muscular transitória. Em vista disso, a administração deste alcaloide é considerado um modelo da DP (COLPAERT, 1987; GERLACH & RIEDERER, 1996; FERNANDES *et al.*, 2012). Além disso, a agmatina não apresentou efeito *per se* na locomoção, nem reverteu a hipolocomoção causada pela reserpina nos parâmetros avaliados no campo aberto. Esta ausência de efeito da agmatina sobre a locomoção no teste do campo aberto tem sido relatada na literatura por outros pesquisadores (LIU & COLLIE, 2009; UZBAY *et al.*, 2010; MATHEUS *et al.*, 2012; RUSHADHI *et al.*, 2013). Diante disso, estes resultados sugerem que a agmatina apresenta efeito específico sobre o VCM sem afetar a função motora dos animais.

A agmatina e a amantadina, única droga utilizada atualmente na clínica como antidiscinético na DP (VERHAGEN METMAN *et al.*, 1998), apresentam um mecanismo em comum: antagonizar o NMDAR (METMAN *et al.*, 1999; YANG & REIS, 1999). A sua capacidade de se ligar a diversos receptores, modular uma gama de neurotransmissores (REIS & REGUNATHAN, 1998) e a sua boa tolerabilidade em humanos (GILAD & GILAD, 2014) são algumas vantagens da agmatina sobre a amantadina. Tendo em vista estas prerrogativas, a agmatina seria um fármaco interessante no tratamento das discinesias ou como uma monoterapia ou associada a uma dose menor de amantadina no tratamento da DP, reduzindo os efeitos adversos promovidos por esta droga (NEAGOE, 2013) e, provavelmente, sem alterar a efetividade da levodopa na melhora dos sintomas motores globais causados pela doença.

No modelo de indução de discinesias utilizado, a reserpina reduziu os níveis de GSH em relação aos demais grupos (veículo+veículo, veículo+agmatina e reserpina+agmatina) no estriado.

Este dado revela uma possível participação do estresse oxidativo nas discinesias e que a agmatina foi capaz de reverter esta redução causada pela reserpina, mantendo os níveis de GSH semelhantes aos níveis do grupo controle.

No entanto, não houve alteração nos outros parâmetros de estresse oxidativo avaliados nas regiões do córtex e do estriado, e tão pouco no imunoc conteúdo de proteínas relacionadas às discinesias no estriado. Além disso, a agmatina *per se* também não alterou estes parâmetros. Pereira e colaboradores (2011) não encontraram alterações nos parâmetros de estresse oxidativo após a administração da reserpina, assim como em outros estudos, os quais, igualmente, não observaram estas mudanças em áreas relacionadas ao controle do movimento, como o córtex e o estriado (BURGER *et al.*, 2003a; FARIA *et al.*, 2005; RECKZIEGEL *et al.*, 2013). Entretanto, estes resultados são conflitantes com outros resultados previamente publicados (ABÍLIO *et al.*, 2003; NAIDU *et al.*, 2006; BILSKA *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2009; BARCELOS *et al.*, 2011).

No estriado, a reserpina aumentou a razão GSSG/GSH (ABÍLIO *et al.*, 2003), e o tratamento com reserpina (1 mg/kg) também causou um aumento nos níveis de TBARS corticais e estriatais, corroborando, em parte, com os resultados deste presente estudo. O tratamento da reserpina juntamente com o óleo de peixe, considerado um antioxidante, causou uma redução de 61% e 53% da peroxidação lipídica nas duas regiões cerebrais analisadas, respectivamente (BARCELOS *et al.*, 2011). O Ebselen, um antioxidante organocalcogênio com a atividade semelhante à GPx, foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica, entretanto não reverteu os VCMs em ratos tratados com reserpina (1 mg/kg). Isto evidencia que o desenvolvimento dos VCMs pode ocorrer por mecanismos independentes do estresse oxidativo (BURGER *et al.*, 2003b).

Pereira e colaboradores (2011) mostraram ainda uma correlação positiva entre a oxidação DCFH-DA (di-hidro cloro de fluoresceína), método quantitativo de análise do estresse oxidativo, e a frequência de VCM no córtex, apesar de não terem observado mudanças significativas no estresse oxidativo, após os tratamentos com *Valeriana officinalis* e/ou reserpina. Isto indica que EROs podem ter um papel no desenvolvimento dos VCMs através de outros fatores, sem associação com o estresse oxidativo. Estes resultados contraditórios da literatura podem estar relacionados com as diferenças nos protocolos de administração da reserpina e das espécies de animais utilizados nos estudos.

Como a reserpina inibe o VMAT-2 (COLPAERT, 1987; DAWSON *et al.*, 2000), foi avaliado se houve alguma mudança no imunoconteúdo desse transportador no córtex e estriado, entretanto não foi observado nenhuma diferença entre os grupos analisados.

No estudo de Santos e colaboradores (2013), a avaliação da imunohistoquímica para TH mostrou uma diminuição nos níveis de TH em áreas hipocâmpais, no córtex pré-frontal e no estriado dorsal após o tratamento subcrônico com a reserpina (10 administrações em dias intercalados de 0,1 mg/kg) em ratos Wistar. Essa diminuição foi acompanhada pela redução no número de células TH+ na SNpc, área tegmentar ventral (VTA) e locus coeruleus (LC). Em contrapartida, no presente estudo, o imunoconteúdo de TH no estriado não foi alterado pelas duas administrações de reserpina (1 mg/kg, i.p.). Isto sugere que não houve degeneração dopaminérgica no estriado. As discrepâncias encontradas entre estes estudos podem ser devido a diferenças no protocolo de administração da reserpina.

A TH é uma enzima chave na biossíntese da DA e sua função é converter a tirosina em L-DOPA (WEI *et al.*, 2007). No trabalho de Wei e colaboradores (2007), a agmatina foi coadministrada no quarto e último dia da administração da morfina e injetada por mais 3 dias após a retirada do tratamento da morfina. Foi mostrado que o pré-tratamento com a agmatina não teve efeito sobre o aumento nos níveis de mRNA de TH na VTA. Outro estudo mostrou que o tratamento com agmatina reduziu em 50% o aumento no imunoconteúdo de TH no LC, diminuiu levemente o imunoconteúdo no estriado (20%), no entanto não promoveu alterações no córtex frontal em ratos tratados com morfina (ARICIOGLU *et al.*, 2004). No presente estudo, a administração aguda de agmatina não alterou o imunoconteúdo de TH no estriado. Isto sugere que a agmatina não teve efeito sobre a síntese de DA e, como não houve degeneração dopaminérgica neste modelo, não é possível afirmar sobre o efeito neuroprotetor desta poliamina em relação ao imunoconteúdo de TH no estriado.

A avaliação do efeito neuroprotetor de uma droga nas discinesias é importante, visto que um dos fatores que levam a ocorrência da LID é a degeneração de células dopaminérgicas da substância negra (IRAVANI & JENNER, 2011; HEIMAN *et al.*, 2014). Como descrito na Introdução, diversos estudos evidenciaram o efeito neuroprotetor da agmatina. A agmatina foi capaz de aumentar a viabilidade celular (ARNDT *et al.*, 2009; CONDELLO *et al.*, 2011; KUO *et al.*, 2007; 2011; MATHEUS *et al.*, 2012; FREITAS *et al.*, 2014a;), reduzir EROs (FREITAS *et al.*, 2014a), de proteger a integridade da membrana

mitocondrial (ARNDT *et al.*, 2009) e de proteger contra a neurotoxicidade glutamatérgica (ZHU *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2006). Além disso, o tratamento com esta poliamina também melhorou o infarto cerebral e promoveu a angiogênese e a neurogênese (KUO *et al.*, 2007; 2011; AHN *et al.*, 2014). A via do NO, dos receptores NMDA, além dos receptores α 2-adrenérgicos e da via 5HT2A foram alguns dos mecanismos associados à estes efeitos neuroprotetores da agmatina (WANG *et al.*, 2006; KUO *et al.*, 2007; 2011; MATHEUS *et al.*, 2012; FREITAS *et al.*, 2014b).

DAT está localizado na membrana celular dos neurónios dopaminérgicos e sua função é transportar a DA do espaço extracelular para o neurónio pré-sináptico. Este transportador não só controla a magnitude e a duração da sinalização da DA extracelular, como também atua para manter os níveis de DA intracelulares (MASOUD *et al.*, 2015). Na LID é observado uma redução na recaptação de DA pelo DAT no estriado, com conseqüente aumento nos níveis DA extracelulares (CARTA & BEZARD, 2011). No presente estudo foi avaliado os níveis de DAT, no entanto não foi observado mudança no imunoconteúdo deste transportador. Provavelmente, o DAT pode ter sido internalizado. Além disso, seria interessante avaliar também se há redução na capacidade de captação da DA no estriado neste modelo de discinesias induzida pela reserpina. Dluzen e colaboradores (2008) revelaram que a administração de reserpina (5 mg/kg, i.p.) em ratos diminuiu a captação de [3H] dopamina em sinaptossomas de estriado preparados 12 h após o tratamento. A diminuição da função do DAT foi reestabelecida completamente 72 h após o tratamento. O mecanismo para esta redução é desconhecida e supõe-se que não seja uma ação direta da reserpina sobre o DAT.

Foi previamente demonstrado que os níveis das proteínas totais de membrana das subunidades de NMDAR e D1R estavam inalterados em ratos lesionados com 6-OHDA (FIORENTINI *et al.*, 2006). Isto sugere que alterações no tráfego destes receptores podem estar envolvidas com as disfunções motoras. Nossos resultados parecem corroborar estes achados uma vez que não observamos mudanças no imunoconteúdo de D1R e D2R em camundongos administrados com reserpina. A ativação de D2R reduz a excitação glutamatérgica indiretamente através da liberação de endocanabionoides e ativação de receptores CB1 (MARTINEZ *et al.*, 2012), enquanto o bloqueio dos D1R e D2R induz um aumento desses receptores na superfície (KULKARNI & NAIDU, 2003). Diante disso, seria interessante investigar a concentração de DA, do seu metabólito DOPAC e do

glutamato no estriado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

A DARPP-32 participa da integração dos sinais neurotransmissores e neuromoduladores no estriado em resposta à DA e ao glutamato (FERNANDEZ *et al.*, 2006). Evidências mostram que a L-DOPA aumenta a sinalização de PKA/DARPP-32 seletivamente nos MSNs e que a fosforilação dependente de DARPP-32 está envolvida nas discinesias induzidas por L-DOPA (SANTINI *et al.*, 2012). Ratos lesionados com 6-OHDA e tratados cronicamente com L-DOPA apresentaram uma concentração elevada de pDARPP-32[Thr34] estriatal (PICCONI *et al.*, 2003). Associado a este fato, Nishi e colaboradores (2005) mostraram que o glutamato induz um aumento da pDARPP-32[Thr34] que é dependente na sinalização nNOS/NO (NISHI *et al.* 2005). O estado de fosforilação do Thr34 e Thr75 parece ser regulado reciprocamente. O aumento da pDARPP-32[Thr75] resulta em uma diminuição da concentração de pDARPP-32[Thr34], via inibição de PKA, assim como a ativação de PKA leva a um aumento de pDARPP-32[Thr34] e uma redução de pDARPP-32[Thr75] (HÅKANSSON *et al.*, 2004). De maneira geral, a estimulação de D1R ativa PKA levando à fosforilação de DARPP no resíduo Thr34 com a inibição de PP-1.

A inibição de PP-1 facilita a atividade neuronal via receptores para glutamato. Em contraste, a fosforilação da DARPP-32 no resíduo Thr75 resulta na inibição de PKA, levando a atenuação da facilitação da atividade neural mediada pela DA no estriado e no núcleo accumbens (NA) (CANTRUP *et al.*, 2012). Desta forma, sugere-se que níveis elevados de pDARPP-32[Thr75] suprimem a função exarcebada do D1R no estriado. O presente estudo mostra que neste modelo, não foi observado um aumento de pDARPP-32[Thr75] em camundongos tratados com reserpina, nem a agmatina foi capaz de alterar o estado de fosforilação da DARPP-32. Isto sugere que o efeito da agmatina não é via PKA/DARPP-32.

Outra possível explicação para a ausência de alteração nos níveis de proteínas relacionada às discinesias observada neste estudo é o fato do protocolo de administração da reserpina utilizado ser agudo, sendo, provavelmente, um período curto para que as cascatas de eventos resultem na alteração no imunoconteúdo dessas proteínas aconteçam.

7 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo mostram, de maneira inédita, o potencial da agmatina em reverter as discinesias orofaciais induzidas pela reserpina em camundongos, sem alterar os parâmetros locomotores avaliados. A agmatina também foi capaz de aumentar os níveis de GSH no estriado de camundongos tratados com reserpina, sugerindo um possível efeito neuroprotetor. Além disso, estes dados indicam o envolvimento da inibição da produção do NO e do bloqueio dos receptores NMDA como possíveis mecanismos moleculares associados ao efeito antidiscinético da agmatina. No entanto, é necessário realizar um estudo mais aprofundado e conclusivo sobre os mecanismos envolvidos neste efeito da agmatina.

Considerando-se a escassez de tratamento das discinesias induzidas por fármacos com a necessidade de novos medicamentos que sejam mais toleráveis e que apresentem uma eficácia mais prolongada, a agmatina pode ser uma boa candidata no tratamento dessas discinesias, devido ao seu efeito antidiscinético observado neste presente estudo e a ausência de relatos em relação a seus efeitos adversos em humanos. Além disso, o efeito antidiscinético sinérgico observado entre as doses sub-efetivas de agmatina e outras drogas sugere que esta poliamina pode ser interessante como um adjuvante, associado a uma dose menor de amantadina, por exemplo, reduzindo seus efeitos colaterais.

REFERÊNCIAS

- ABÍLIO, V.C., et al. Vitamin E attenuates reserpine induced oral dyskinesia and striatal GSSG/GSH ratio enhancement in rats. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**. 27:109–114, 2003.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**. 105:121-6,1984.
- AGUIAR, A. S., et al. Exercise attenuates levodopa-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine-lesioned mice. **Neuroscience**, 243:46–53, 2013.
- AHN, S.K., et al. Effects of agmatine on hypoxic microglia and activity of nitric oxide synthase. **Brain Res**. 1373:48-54, 2011.
- AHN, S. S., et al. Effects of Agmatine on Blood-Brain Barrier Stabilization Assessed by Permeability MRI in a Rat Model of Transient Cerebral Ischemia. **AJNR Am. J. Neuroradiol**. 36:283-8, 2015.
- AL-BLOUSHI, S., et al. Green tea modulates reserpine toxicity in animal models. **J. Toxicol. Sci**. 34:77–87, 2009.
- ANDREASSEN, A.O.; JORGENSEN, H.A. Neurotoxicity associated with neuroleptic-induced oral dyskinesia in rats. **Prog. Neurobiol**. 61:525–541, 2000.
- AQUINO, C.C., FOX, S.H. Clinical spectrum of levodopa-induced complications. **Mov. Disord**. 30:80–9, 2015.
- AQUINO, C.C.H., LANG, A.E. Tardive dyskinesia syndromes : current concepts. **Parkinsonism Relat. Disord**. Disorders 1:13–117, 2014.
- ARICIOGLU, F., MEANS, A., REGUNATHAN, S. Effect of agmatine on the development of morphine dependence in rats: potential role of cAMP system. **Eur. J. Pharmacol**. 504:191-7, 2004.
- ARMENTERO, M. T. et al. Past, present and future of A(2A) adenosine receptor antagonists in the therapy of Parkinson's disease. **Pharmacol. Ther**. 132:280–99, 2011.
- ARNDT, M. A., et al. The arginine metabolite agmatine protects mitochondrial function and confers resistance to cellular apoptosis. **Am.**

J. Physiol. Cell Physiol. 296: 1411-9, 2009.

AUGUET, M., et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase by agmatine. **Jpn. J. Pharmacol.** 69:285–287, 1995.

BARA-JIMENEZ, W., et al. Adenosine A(2A) receptor antagonist treatment of Parkinson's disease. **Neurology.** 61:293–296, 2003

BARCELOS, R. C. S. et al. Short term dietary fish oil supplementation improves motor deficiencies related to reserpine-induced parkinsonism in rats. **Lipids.** 46:143–9, 2011.

BASSIT, D.P.; LOUZÃ NETO, M.R. Discinesia Tardia. **Editora Casa do Psicólogo**, São Paulo, 99 – 135, 1999.

BATTAGLIA, V., et al. Different behavior of agmatine in liver mitochondria: inducer of oxidative stress or scavenger of reactive oxygen species? **Biochim. Biophys. Acta.** 1768:1147-53, 2007.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso. 3ª Edição, **Artmed Editora**, Porto Alegre, 2008.

BHIDE, N., et al. The effects of BMY-14802 against L-DOPA- and dopamine agonist-induced dyskinesia in the hemiparkinsonian rat. **Psychopharmacology.** 227:533-44, 2013.

BILSKA, A., et al. .Alpha-lipoic acid differently affects the reserpine-induced oxidative stress in the striatum and prefrontal cortex of rat brain. **Neuroscience.** 146:1758-71, 2007.

BISHNOI, M., CHOPRA, K., KULKARNI, S. K. Progesterone attenuates neuroleptic-induced orofacial dyskinesia via the activity of its metabolite , allopregnanolone , a positive GABA A modulating neurosteroid. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.** 32:451–461, 2008.

BLANCHET, P.J., et al. Relevance of animal models to human tardive dyskinesia. **Behav. Brain Funct.** 8:12, 2012.

BLANDINI, F., et al. Functional changes of the basal ganglia circuitry

in Parkinson's disease. **Prog. Neurobiol.** 62:63-88, 2000.

BORDIA, T., MCINTOSH, J. M., QUIK, M. Nicotine Reduces Antipsychotic-Induced Orofacial Dyskinesia in Rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 340:612–619, 2012.

BORDIA, T., MCINTOSH, J. M., QUIK, M. The nicotine-mediated decline in l-dopa-induced dyskinesias is associated with a decrease in striatal dopamine release. **J. Neurochem.** 125:291–302, 2013.

BORTOLANZA, M. et al. Neurobiology of Disease Glial activation is associated with L -DOPA induced dyskinesia and blocked by a nitric oxide synthase inhibitor in a rat model of Parkinson's disease. **Neurobiol. Dis.** 73:377–387, 2015.

BURGER, M. E., et al. Ebselen attenuates reserpine-induced orofacial dyskinesia and oxidative stress in rat striatum. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.** 27:135–40, 2003.

BURGER, M. et al. Effects of age on reserpine-induced orofacial dyskinesia and possible protection of diphenyl diselenide. **Brain Res. Bull.** 64:339–45, 2004.

BURGER, M. E., et al. Acute reserpine and subchronic haloperidol treatments change synaptosomal brain glutamate uptake and elicit orofacial dyskinesia in rats. **Brain Res.** 1031:202–10, 2005.

CALVENTE, P. R. et al. The mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid aggravates reserpine-induced oral dyskinesia in rats. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.** 26:401–5, 2002.

CANTRUP, R., et al. Chronic hyperdopaminergic activity of schizophrenia is associated with increased Δ FosB levels and cdk-5 signaling in the nucleus accumbens. **Neuroscience.** 222:124-35, 2012.

CARLBERG, I., MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods Enzymol.** 113:484-490, 1985.

CARLSSON, M., CARLSSON, A. Interaction between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia – implications for schizophrenia and Parkinson's disease. **Trends Neurosci.** 13:272–276,

1990.

CARTA, M., BEZARD, E. Contribution of pre-synaptic mechanisms to L-DOPA-induced dyskinesia. **Neuroscience**. 198:245–51, 2011.

CARVALHO, R. ., et al. Antidyskinetic effects of risperidone on animal models of tardive dyskinesia in mice. **Brain Res. Bull.** 60:115–124, 2003.

CASTRO, J. P., et al. Effects of baclofen on reserpine-induced vacuous chewing movements in mice. **Brain Res. Bull.** 68:436–41, 2006

CENCI, M. A., LINDGREN, H. S. Advances in understanding L-DOPA-induced dyskinesia. **Curr. Opin. Neurobiol.** 17:665–71, 2007.

CERASA, A., et al. Maladaptive plasticity in levodopa-induced dyskinesias and tardive dyskinesias: old and new insights on the effects of dopamine receptor pharmacology. **Front. Neurol.** 5:49, 2014.

COLPAERT, F.C. Pharmacological characteristics of tremor, rigidity and hypokinesia induced by reserpine in rats. **Neuropharmacology**. 26:1431–1440, 1987.

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**. 116:67-75, 2010.

DAWSON, T.M. New animal models for Parkinson's disease. **Cell**. 101:115-118, 2000.

DE KEYSER, J. Excitotoxic mechanisms may be involved in the pathophysiology of tardive-dyskinesia. **Clin. Neuropharmacol.** 4:562-5, 1991.

DEL-BEL, E., et al. Counteraction by Nitric oxide synthase inhibitor of neurochemical alterations of dopaminergic system in 6-OHDA-lesioned rats under L-DOPA treatment. **Neurotox. Res.** 25:33–44, 2014.

DEL-BEL, E., et al. Role of nitric oxide on motor behavior. **Cell. Mol. Neurobiol.** 25:371–392, 2005.

DEL-BEL, E., et al. Nitric Oxide, a new player in L-DOPA-induced dyskinesia? **Front. Biosci. (Elite Ed)**. 7:193-221, 2015.

DEMADY, D. R., et al. Agmatine enhances the NADPH oxidase activity of neuronal NO synthase and leads to oxidative inactivation of the enzyme. **Mol. Pharmacol**. 59:24–9, 2001.

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

DLUZEN, D. E., BHATT, S., MCDERMOTT, J. L. Differences in reserpine-induced striatal dopamine output and content between female and male mice: implications for sex differences in vesicular monoamine transporter 2 function. **Neuroscience**. 154:1488–96, 2008.

DUTRA, R., et al. Behavioral effects of MK-801 on reserpine-treated mice. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**. 26:487-495, 2002.

EL ARFANI, A. et al. NMDA receptor antagonism potentiates the L-DOPA-induced extracellular dopamine release in the subthalamic nucleus of hemi-parkinson rats. **Neuropharmacology**. 85:198–205, 2014.

ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch. Biochem. Biophys**. 82:70-71, 1959.

FARIA, R. R., et al. Beneficial effects of vitamin C and vitamin E on reserpine-induced oral dyskinesia in rats: critical role of striatal catalase activity. **Neuropharmacology**. 48:993–1001, 2005.

FENG, Y., et al. Agmatine reduces extracellular glutamate during pentylentetrazole-induced seizures in rat brain: a potential mechanism for the anticonvulsive effects. **Neurosci. Lett**. 390:129-33, 2005.

FERNANDES, V. S. et al. Repeated treatment with a low dose of reserpine as a progressive model of Parkinson's disease. **Behav. Brain Res**. 231:154–63, 2012.

FERNANDEZ, E., et al. N. DARPP-32 is a robust integrator of dopamine and glutamate signals. **PLoS Comput. Biol.** 2:e176, 2006.

FIORENTINI, C. et al. Loss of Synaptic D1 Dopamine/N -Methyl- D - aspartate Glutamate Receptor Complexes in L -DOPA-Induced Dyskinesia in the Rat. **Mol Pharmacol.** 69, 805–812, 2006.

FRANCARDO, V., CENCI, M. A. Investigating the molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia in the mouse. **Parkinsonism Relat. Disord.** 20 Suppl 1, S20–2, 2014.

FREITAS, A. E. et al. Sub-chronic agmatine treatment modulates hippocampal neuroplasticity and cell survival signaling pathways in mice. **J. Psychiatr. Res.** 58:137-46, 2014a

FREITAS, A. E. et al. Agmatine Induces Nrf2 and Protects Against Corticosterone Effects in Hippocampal Neuronal Cell Line. **Mol. Neurobiol.** 2014b.

FUXE, K., et al. Adenosine receptor-dopamine receptor interactions in the basal ganglia and their relevance for brain function. **Physiol . Behav.** 92: 210–217, 2007.

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

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

GARDONI F, et al. A critical interaction between NR2B and MAGUK in L-DOPA induced dyskinesia. **J. Neurosci.** 26:2914–2922, 2006

GARDONI, F. et al. Targeting NR2A-containing NMDA receptors reduces L-DOPA-induced dyskinesias. **Neurobiol. Aging.** 33:2138–44, 2012.

GERLACH, M.; RIEDERER, P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. **J. Neural Transm.** 103:987-1041, 1996.

GILAD, G. M.; GILAD, V. H. CASE STUDY Long-Term (5 Years), High Daily Dosage of Dietary Agmatine — Evidence of Safety: A Case Report. **J. Med. Food.** 17:1256–1259, 2014.

GILAD, G. M.; GILAD, V. H. Evidence for oral agmatine sulfate safety – A 95-day high dosage pilot study with rats. **Food Chem. Toxicol.** 62:758–762, 2013.

GOLDBERG, R.J. Tardive dyskinesia in elderly patients: an update. **J. Am. Med. Dir. Assoc.** 3:152–161, 2002.

GONZÁLEZ-APARICIO, R., MORATALLA, R. Oleoylethanolamide reduces L-DOPA-induced dyskinesia via TRPV1 receptor in a mouse model of Parkinson's disease. **Neurobiol. Dis.** 62:416-25, 2014.

GUPTA, N., et al. Ageing alters behavioural function and brain arginine metabolism in male Sprague-Dawley rats. **Neuroscience.** 226:178–96, 2012.

GURIDI, J.; GONZÁLEZ-REDONDO, R.; OBESO, J. a. Clinical features, pathophysiology, and treatment of levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. **Parkinsons. Dis.** 2012:9431-59, 2012.

HÅKANSSON, K., et al. DARPP- 32 and modulation of cAMP signaling: involvement in motor control and levodopa-induced dyskinesia. **Parkinsonism Relat. Disord.** 10:281–6, 2004.

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

HALARIS, A., et al. Plasma agmatine and platelet imidazoline receptors in depression. **Ann. NY Acad. Sci.** 881: 445-51, 2009

HALEEM, D. J.; SAMAD, N.; HALEEM, M. A. Reversal of haloperidol-induced tardive vacuous chewing movements and supersensitive somatodendritic serotonergic response by buspirone in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 87:115–21, 2007.

HEIMAN, M. et al. Molecular adaptations of striatal spiny projection neurons during levodopa-induced dyskinesia. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 111:4578–83, 2014.

HEVEL, J. M.; MARLETTA, M. A. Nitric-oxide synthase assays. **Methods Enzymol.** 233:250-8, 1994

IRAVANI, M. M.; JENNER, P. Mechanisms underlying the onset and expression of levodopa-induced dyskinesia and their pharmacological manipulation. **J. Neural Transm.** 118:1661–90, 2011.

JENNER, P. Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. **Nat. Rev. Neurosci.** 9:665–77, 2008.

JOHNSON, T.D. Modulation of channel function by polyamines. **Trends Pharmacol. Sci.** 17:22-7, 1996.

JOHNSTON, T. H., et al. A simple rodent assay for the in vivo identification of agents with potential to reduce levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease. **Exp. Neurol.** 191:243–50, 2005.

KANDA, T., et al. Combined use of the adenosine A(2A) antagonist KW-6002 with L-DOPA or with selective D1 or D2 dopamine agonists increases antiparkinsonian activity but not dyskinesia in MPTP-treated monkeys. **Exp. Neurol.** 162:321–327, 2000.

KANNARI, K. et al. Reserpine Pretreatment Prevents Increases in Extracellular Striatal Dopamine Following L -DOPA Administration in Rats with Nigrostriatal Denervation. **J. Neurochem.** 74:263-9, 2000.

KAWAKAMI, Z., et al. Yokukansan a kampo medicine, protects against glutamate cytotoxicity due to oxidative stress in PC12 cells. **J. Ethnopharmacol.** 134:74–81, 2011.

KOBYLECKI, C. et al. Randomized clinical trial of topiramate for levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat. Disord.** 20:452–455, 2014.

KULKARNI, S.K., NAIDU, P.S. Pathophysiology and drug therapy of tardive dyskinesia: current concepts and future perspectives. **Drugs Today.** 39:19-49, 2003.

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

KUO, J.-R. et al. Agmatine-promoted angiogenesis, neurogenesis, and inhibition of gliosis-reduced traumatic brain injury in rats. **J. Trauma** 71:87-93, 2011.

LIU, P., COLLIE. N.D. Behavioral effects of agmatine in naive rats are task- and delay-dependent. **Neuroscience**. 163:82-96, 2009.

MAJEWSKA, M.D., et al. Regulation of the NMDA receptor by redox phenomena: inhibitory role of ascorbate. **Brain Res**. 537: 328-32, 1990.

MARANIS, S., et al. Investigation of the antidyskinetic site of action of metabotropic and ionotropic glutamate receptor antagonists. Intracerebral infusions in 6-hydroxydopamine-lesioned rats with levodopa-induced dyskinesia. **Eur. J. Pharmacol**. 683:71-7, 2012.

MARTINEZ, A., et al. The cannabinoid agonist WIN55212-2 decreases L-DOPA-induced PKA activation and dyskinetic behavior in 6-OHDA-treated rats. **Neurosci. Res**. 72: 236-42, 2012.

MASOUD, S. T. et al. Increased expression of the dopamine transporter leads to loss of dopamine neurons, oxidative stress and L-DOPA reversible motor deficits. **Neurobiol. Dis**. 74:66-75, 2015.

MATHEUS, F.C., Neuroprotective effects of agmatine in mice infused with a single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). **Behav. Brain Res**. 235:263-72, 2012.

METMAN L, et al. Amantadine for levodopa induced dyskinesia: a 1-year follow-up study. **Arch Neurol**. 56:1383-86, 1999.

MISRA, H.P., FRIDOWICH, I. Superoxide dismutase, a photochemical augmentation assay. **Arch. Biochem. Biophys**. 181:308-12, 1977.

MITKOVSKI, M. et al. Investigations into Potential Extrasynaptic Communication between the Dopaminergic and Nitrergic Systems. **Front. Physiol**. 3:372, 2012.

MORETTI, M., et al. Role of agmatine in neurodegenerative diseases and epilepsy. **Front. Biosci.(Elite Ed)**. 6:341-59, 2014.

NAIDU, P. S.; SINGH, A.; KULKARNI, S. K. Carvedilol attenuates neuroleptic-induced orofacial dyskinesia: possible antioxidant mechanisms. **Br. J. Pharmacol.** 136:193-200, 2002.

NAIDU, P.S., SINGH, A., KULKARNI, S.K. Reversal of reserpine induced orofacial dyskinesia and cognitive dysfunction by quercetin. **Pharmacology**. 70:59–67, 2004.

NAIDU, P. S., SINGH, A., KULKARNI, S. K. Effect of Withania somnifera Root Extract on Reserpine-induced Orofacial Dyskinesia and Cognitive Dysfunction. **Phytother. Res.** 20:146:140–6, 2006.

NEAGOE, A. D. Delirium with manic and psychotic features associated with amantadine. **Gen. Hosp. Psychiatry**. 35:680, 2013.

NEIS, V. B. et al. Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor is abolished by agmatine administration. **Behav. Brain Res.** 261:336–344, 2014.

NEISEWANDER, J. L., LUCKI, I., MCGONIGLE, P. Neurochemical changes associated with the persistence of spontaneous oral dyskinesia in rats following chronic reserpine treatment. **Brain Res.** 558:27–35, 1991.

NISHI, A. et al. Glutamate regulation of DARPP-32 phosphorylation in neostriatal neurons involves activation of multiple signaling cascades. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 102 :1199–204, 2005.

OBESO, J.A., et al. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. **Trends Neurosci.** 23:S8–19, 2000

OBESO J.A., et al. Levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. **Handb. Clin Neurol.** 84:185-218, 2007.

OHKAWA, H., OHISHI, N., YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem.** 95: 351-8, 1979.

PADOVAN-NETO, F. E., et al. Anti-dyskinetic effect of the neuronal nitric oxide synthase inhibitor is linked to decrease of FosB/DeltaFosB expression. **Neurosci. Lett.** 54:126–31, 2013.

PADOVAN-NETO, F. E. et al. Effects of prolonged neuronal nitric oxide synthase inhibition on the development and expression of L - DOPA-induced dyskinesia in 6-OHDA-lesioned rats. **Neuropharmacology.** 89:87–99, 2015.

PAQUETTE, M. A et al. MK-801 inhibits L-DOPA-induced abnormal involuntary movements only at doses that worsen parkinsonism. **Neuropharmacology.** 58:1002–8, 2010.

PAQUETTE, M. et al. Anti-dyskinetic mechanisms of amantadine and dextromethorphan in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease: role of NMDA vs. 5-HT1A receptors. **Eur. J. Neurosci.** 36:3224–34, 2012.

PAVÓN, N., et al. ERK phosphorylation and FosB expression are associated with L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice. **Biol. Psychiatry.** 59, 64–74, 2006.

PEREIRA, R. P. et al. *Valeriana officinalis* ameliorates vacuous chewing movements induced by reserpine in rats. **J. Neural. Transm.** 118:1547–57, 2011.

PEROZA LR, et al. *Bauhinia forficata* prevents vacuous chewing movements induced by haloperidol in rats and has antioxidant potential in vitro. **Neurochem. Res.** 38:789-96, 2013.

PETROFF, O.A.C. GABA and glutamate in the human brain. **Neuroscientist.** 8 :562–573, 2002.

PICCONI, B. et al. Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. **Nat. Neurosci.** 6:501–6, 2003.

PICCONI, B. et al. Striatal synaptic changes in experimental parkinsonism: role of NMDA receptor trafficking in PSD. **Parkinsonism Relat. Disord.** 14:S145–9, 2008.

PILETZ, J.E., et al.. Agmatine crosses the blood-brain barrier. **Ann. NY Acad. Sci.** 1009:64-74, 2003.

PILETZ, J. E. et al. Agmatine: clinical applications after 100 years in translation. **Drug Discov. Today**. 18:880–93, 2013.

PINNA, A., FENU, S., MORELLI, M. Motor stimulant effects of the adenosine A(2A) receptor antagonist SCH 58261 do not develop tolerance after repeated treatments in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. **Synapse**. 39:233–238, 2001.

PORRAS, G. et al. L-dopa-induced dyskinesia: beyond an excessive dopamine tone in the striatum. **Sci. Rep**. 4:3730, 2014.

POSTMA, J.U.; VAN TILBURG, W. Visual hallucinations and delirium during treatment with amantadine (Symmetrel). **J. Am. Geriatr. Soc**. 23:212-5, 1975

RAASCH, W., REGUNATHAN, S., LI, G., REIS, D.J., Agmatine, the bacterial amine, is widely distributed in mammalian tissues. **Life Sci**. 56:319–2330, 1995.

RADENOVIC, L., et al. 7-Nitroindazole reduces nitrite concentration in rat brain after intrahippocampal kainate-induced seizure. **Comp. Biochem. Physiol. Part. C Toxicol. Pharmacol**. 135:443–450, 2003.

RANA, A.Q., CHAUDRY, Z.M., BLANCHET, P.J. New and emerging treatments for symptomatic tardive dyskinesia. **Drug Des. Devel. Ther**. 7:1329-40, 2013.

RECKZIEGEL, P., et al. Gallic acid decreases vacuuous chewing movements induced by reserpine in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav**. 104:132–7, 2013.

REGUNATHAN, S.; PILETZ, J.E. Regulation of inducible nitric oxide synthase and agmatine synthesis in macrophages and astrocytes. **Ann. NY Acad. Sci**. 1009:20-9, 2003.

REIS, D.J.; REGUNATHAN, S. Agmatine: a novel neurotransmitter? **Adv. Pharmacol.**, 42: 645–649, 1998.

REIS, D. J.; REGUNATHAN, S. Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? **Trends Pharmacol. Scien.**, 21:187–93, 2000.

RILSTONE, J.J., ALKHATER, R.A., MINASSIAN, B.A. Brain dopamine-serotonin vesicular transport disease and its treatment. **N. Engl. J. Med.** 368:543-50, 2013.

RUSHADHI, M., ZHANG, H., LIU, P. Effects of prolonged agmatine treatment in aged male Sprague-Dawley rats. **Neuroscience.** 234:116–24, 2013.

SANO, H., et al. Signals through the striatopallidal indirect pathway stop movements by phasic excitation in the substantia nigra. **J. Neurosci.** 33:7583–94, 2013.

SANTINI, E., et al. Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32-kDa (DARPP-32)-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling in experimental parkinsonism. **J. Biol. Chem.** 287:27806–12, 2012.

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

SANTOS, J. R. et al. Cognitive, motor and tyrosine hydroxylase temporal impairment in a model of parkinsonism induced by reserpine. **Behav. Brain Res.** 253:68–77, 2013.

SASTRE, M., et al. Metabolism of agmatine in macrophages: modulation by lipopolysaccharide and inhibitory cytokines. **Biochem. J.** 1409:1405–1409, 1998.

SAVOLA, J. et al. Fipamezole (JP-1730) Is a Potent α 2 Adrenergic Receptor Antagonist That Reduces Levodopa-Induced Dyskinesia in the MPTP-Lesioned Primate Model of Parkinson's Disease. **Mov. Disord.**18:872–883, 2003.

SEO, S.; LIU, P.; LEITCH, B. Spatial learning-induced accumulation of agmatine and glutamate at hippocampal CA1 synaptic terminals. **Neuroscience.** 192:28–36, 2011.

SOLÍS, O., et al. Nitric oxide synthase inhibition decreases L- DOPA-induced dyskinesia and the expression of striatal molecular markers in

Pitx3 - / - aphakia mice. **Neurobiol. Dis.** 73:49–59, 2015.

SUSSMAN, A.N., TRAN-NGUYEN, L.T.L., NEISEWANDER, J. L. Acute reserpine administration elicits long-term spontaneous oral dyskinesia. **Eur. J. Pharmacol.** 337:157–160, 1997.

TABOR, C.W.; TABOR, H. Polyamines. **Annu. Rev. Biochem.** 53:749–790, 1984.

TADAIESKY, M. T.; ANDREATINI, R.; VITAL, M. A. B. F. Different effects of 7-nitroindazole in reserpine-induced hypolocomotion in two strains of mice. **Eur. J. Pharmacol.** 535:199–207, 2006.

TANAKA H., et al. Role of serotonergic neurons in L-DOPA-derived extracellular dopamine in the striatum of 6-OHDA-lesioned rats. **Neuroreport.** 10:631–34, 1999.

TAVAKOLI-FAR, B., et al. Neuroprotective effects of mebudipine and dibudipine on cerebral oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury. **Eur. J. Pharmacol.** 610:12–7, 2009.

TEIXEIRA, A.M., et al. Intense exercise potentiates oxidative stress in striatum of reserpine-treated animals. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 92:231–5, 2009

TOLOSA, E., et al. History of levodopa and dopamine agonists in Parkinson's disease treatment. **Neurology.** 50:S2-10; discussion S4-8, 1998

TREVIZOL, F. et al. Comparative study between two animal models of extrapyramidal movement disorders: prevention and reversion by pecan nut shell aqueous extract. **Behav. Brain Res.** 221:13–8, 2011.

TRONCI, E., et al. Characterization of the antiparkinsonian effects of the new adenosine A2A receptor antagonist ST1535: Acute and subchronic studies in rats. **Eur. J. Pharmacol.** 566:94–102, 2007.

TRONCI, E. et al. Effect of memantine on L-DOPA-induced dyskinesia in the 6-OHDA-lesioned rat model of Parkinson's disease. **Neuroscience.** 265:245–52, 2014.

TSAI, G. Markers of glutamatergic neurotransmission and oxidative stress associated with tardive dyskinesia. **Am. J. Psychiatry.** 155:1207–1213, 1998.

TSIKAS, D. et al. Measurement of Nitrite and Nitrate in Biological Fluids by Gas Chromatography – Mass Spectrometry and by the Griess Assay : Problems with the Griess Assay — Solutions by Gas Chromatography – Mass Spectrometry. **Anal. Biochem.** 220:208–220, 1997.

UZBAY, T., et al. Sex-related effects of agmatine on caffeine-induced locomotor activity in Swiss Webster mice. **Eur. J. Pharmacol.** 630:69–73, 2010.

UZBAY, T. I. The pharmacological importance of agmatine in the brain. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 36:502–19, 2012.

UZBAY, T., et al. Increased plasma agmatine levels in patients with schizophrenia. **J. Psychiatr. Res.** 47:1054–1060, 2013.

VERHAGEN METMAN, L., et al. Amantadine as treatment for dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. **Neurology** 50:1323–1326, 1998

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

WEI, X.-L., et al. Agmatine inhibits morphine-induced locomotion sensitization and morphine-induced changes in striatal dopamine and metabolites in rats. **Eur. Neuropsychopharmacol.** 17:790–9, 2007.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.** 77:325-333, 1981

WIESINGER, H. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. **Prog. Neurobiol.** 64:365–91, 2001.

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

ZHU, M.Y., et al. Effect of agmatine against cell death induced by NMDA and glutamate in neurons and PC12 cells. **Cell. Mol. Neurobiol.** 23:865–872, 2003.

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

ZOMKOWSKI, A. D. E.; SANTOS, A. R. S.; RODRIGUES, A. L. S. Putrescine produces antidepressant-like effects in the forced swimming test and in the tail suspension test in mice. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.** 30:1419–25, 2006.

ZOMKOWSKI, A. D. et al. The role of the NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of duloxetine in the forced swimming test. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 103:408-17, 2012.