

**VINÍCIUS DE MARIA GADOTTI**

**ANÁLISE DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA AÇÃO  
ANTINOCICEPTIVA DA AGMATINA EM CAMUNDONGOS  
E RATOS: ESTUDOS *IN VIVO*, *IN VITRO* E *EX VIVO***

**Florianópolis-SC  
2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**ANÁLISE DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA AÇÃO  
ANTINOCICEPTIVA DA AGMATINA EM CAMUNDONGOS  
E RATOS: ESTUDOS *IN VIVO*, *IN VITRO* E *EX VIVO***

**VINÍCIUS DE MARIA GADOTTI**

**Florianópolis-SC  
2009**

**ANÁLISE DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA AÇÃO  
ANTINOCICEPTIVA DA AGMATINA EM CAMUNDONGOS  
E RATOS: ESTUDOS *IN VIVO*, *IN VITRO* E *EX VIVO***

**Tese apresentada à Universidade Federal de  
Santa Catarina como requisito parcial para a  
obtenção do título de Doutor em Neurociências.**

**Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos  
Co-orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Severo Rodrigues**

**Florianópolis, 2009.**

*“O importante é termos a capacidade de  
sacrificar aquilo que somos para  
ser aquilo que podemos ser!”*

*(Charles Dubois)*

## *AGRADECIMENTOS*

À Deus pela vida.

A minha família, principalmente aos meus pais Osmar e Vera, por acreditarem nesta conquista.

Ao professor Dr. Adair Roberto Soares dos Santos pelo incentivo, orientação, confiança e amizade ao longo dos anos.

À professora Dr<sup>a</sup> Ana Lúcia Severo Rodrigues pela co-orientação, demais colaborações, amizade e confiança.

A todos aos amigos do laboratório especialmente ao Francisney Nascimento, Denise Lima, Breno Speckhann, Leidiane Mazzardo e ao Daniel Martins que colaboraram em parte dos experimentos deste trabalho. Agradeço também as colegas Ana Flávia Paszcuk, Ana Paula Luiz, Nara Lins de Meira Quintão e Elisângela Bressan do Departamento de Farmacologia que também colaboraram nos experimentos realizados neste trabalho.

Aos professores Dr. João Batista Calixto, Dr. Eduardo Ferreira e ao Dr. Rogério Tonussi pelo apoio intelectual, suporte técnico e metodológico.

Aos docentes do curso de pós-graduação em Neurociências da UFSC pelos ensinamentos.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Agradeço também a todos aqueles que infelizmente não foram citados, mas que foram importantes de maneira direta ou indireta na realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>i</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>iv</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>vii</b>
<b>Summary</b> .....	<b>ix</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1 Dor .....	1
1.2 Transmissão glutamatérgica na dor .....	6
1.3 Dor crônica .....	7
1.4 Agmatina .....	9
1.5 Agmatina e dor crônica .....	14
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>16</b>
2.1 Objetivo Geral .....	16
2.2 Objetivos Específicos .....	16
<b>3. Materiais</b> .....	<b>17</b>
3.1 Animais .....	17
3.2 Drogas e Reagentes .....	17
<b>4. Métodos</b> .....	<b>19</b>
4.1 Modelos de nocicepção aguda .....	19
4.1.1 Nocicepção induzida pelo ácido acético .....	19
4.1.2 Estudo de mecanismos de ação adicionais no modelo do ácido acético .....	19
4.1.2.1 Envolvimento dos receptores opióides .....	20
4.1.2.2 Envolvimento da proteína G <sub>i/o</sub> sensível à toxina pertussis .....	20
4.1.2.3 Envolvimento do cálcio .....	21
4.1.2.4 Envolvimento dos canais de potássio .....	21
4.1.2.5 Envolvimento do sistema adenosinérgico .....	22
4.1.2.6 Envolvimento dos receptores gabaérgicos .....	22
4.1.2.7 Envolvimento da glândula adrenal .....	22
4.1.3 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato .....	22
4.1.4 Nocicepção induzida por agonistas glutamatérgicos .....	23
4.1.5 Nocicepção causada por citocinas inflamatórias .....	24
4.1.6 Envolvimento do sistema adenosinérgico .....	24
4.2 Modelos de nocicepção Crônica .....	25
4.2.1. Inflamação induzida pelo CFA .....	25
4.2.2 Ligação parcial do nervo ciático em camundongos .....	25
4.2.3 Avaliação da alodinia mecânica .....	26
4.2.4 Avaliação do edema de pata .....	26
4.2.5 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase .....	26
4.2.6 Esmagamento do nervo ciático em ratos .....	27
4.2.6.1 Avaliação da recuperação funcional motora em ratos .....	27
4.2.6.2 Avaliação da função sensorial em ratos .....	28
4.3 Análises histológicas e imunohistológicas .....	28
4.3.1 Análise histológica e morfométrica .....	28
4.3.2 Análise de imunohistoquímica .....	31
4.3.2.1 Análise quantitativa das imagens .....	32
4.4 Análise estatística .....	33

<b>5. Resultados</b> .....	<b>34</b>
5.1 Testes Comportamentais .....	34
5.1.1 Nocicepção induzida pelo ácido acético .....	34
5.1.2 Estudo de mecanismos de ação no modelo do ácido acético .....	34
5.1.2.1 Envolvimento dos receptores opióides .....	34
5.1.2.2 Envolvimento da proteína G <sub>i/o</sub> sensível à toxina pertussis .....	35
5.1.2.3 Envolvimento do cálcio .....	36
5.1.2.4 Envolvimento dos canais de potássio .....	37
5.1.2.5 Envolvimento do sistema adenosinérgico .....	38
5.1.2.6 Envolvimento dos receptores gabaérgicos .....	39
5.1.2.7 Envolvimento da glândula adrenal .....	40
5.1.3 Nocicepção induzida pelo glutamato .....	41
5.1.4 Nocicepção induzida por agonistas glutamatérgicos .....	42
5.1.4.1 Efeito da L-NOARG na nocicepção induzida por agonistas glutamatérgicos .....	43
5.1.4.2 Efeito do MK-801 na nocicepção induzida por agonistas glutamatérgicos .....	44
5.1.5 Nocicepção causada por citocinas inflamatórias .....	45
5.1.6 Envolvimento do sistema adenosinérgicos .....	46
5.2 Modelos de nocicepção Crônica .....	48
5.2.1. Inflamação induzida pelo CFA .....	48
5.2.2 Neuropatia causada pela ligação parcial no do nervo ciático .....	49
5.2.3 Edema de pata causado pela injeção de CFA .....	50
5.2.4 Ensaio da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) .....	51
5.2.5 Esmagamento do nervo ciático em ratos .....	51
5.2.5.1 Avaliação da recuperação funcional motora - Índice Funcional do nervo ciático .....	51
5.2.5.2 Avaliação da recuperação funcional motora - Índice Estático do nervo ciático .....	52
5.2.5.3 Avaliação da função sensorial – Alodinia mecânica .....	53
5.3 Análises histológicas e imunohistológicas .....	53
5.3.1 Análise histológica e morfométrica .....	53
5.3.2 Análise imunohistoquímica .....	55
<b>6. Discussão</b> .....	<b>61</b>
<b>7. Conclusão</b> .....	<b>78</b>
<b>8. Referências</b> .....	<b>80</b>
<b>9. Anexos</b> .....	<b>98</b>



## *LISTA DE ABREVIATURAS*

5-HT	Serotonina
5-HT <sub>2A</sub>	Receptor serotoninérgico do subtipo 2A
5-HT <sub>3</sub>	Receptor serotoninérgico do subtipo 3
A <sub>1</sub>	Receptor adenosinérgico do subtipo 1
A <sub>2A</sub>	Receptor adenosinérgico do subtipo 2A
A <sub>2B</sub>	Receptor adenosinérgico do subtipo 2B
A <sub>3</sub>	Receptor adenosinérgico do subtipo 3
AB	Albumina bovina
ADC	Arginina descarboxilase
AI	Área de interesse
AMPA	Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
ATP	Trifostato de adenosina
BHE	Barreira hemato encefálica
BK	Bradicinina
CCDV <sub>s</sub>	Canais de cálcio dependentes de voltagem
CDMEL	Corno dorsal da medula espinhal lombar
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CFA	Adjuvante completo de Freund
Dd	Debris de degeneração
DI <sub>50</sub>	Dose inibitória em 50%
DO	Densidade óptica
DRG	Gânglio da raiz dorsal
EGTA	Ácido etilenoglicol-bis(b-aminoetil-éter)-N-N-N'-N'-tetraacético
EMT	Transportador extra-neuronal de monoaminas
ENC	Esmagamento do nervo ciático
E.P.M.	Erro padrão da média
ERK/MAPK-1	Proteína quinase ativada por mitógeno 1
Fm	Fibras mielinizadas
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GABA <sub>A</sub>	Receptor gabaérgico do subtipo A
GABA <sub>B</sub>	Receptor gabaérgico do subtipo B
GABA <sub>C</sub>	Receptor gabaérgico do subtipo C
GLAST/SLCIA-3	Transportador de glutamato e aspartato
GLT-1/SLCIA-2	Transportador de glutamato 1
GFAP	Proteína acídica fibrilar glial
GluR	Receptores glutamatérgicos
GTP	Guanosina trifosfato
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
I <sub>1</sub>	Sítio de ligação imidazólico do subtipo 1
I <sub>2</sub>	Sítio de ligação imidazólico do subtipo 2
I <sub>3</sub>	Sítio de ligação imidazólico do subtipo 3
IEC	Índice estático do ciático
IFC	Índice funcional do ciático
iGluR	Receptores glutamatérgicos ionotrópicos
IL-1 $\beta$	Interleucina 1-beta
IL-6	Interleucina 6
i.c.v.	Intracerebroventricular
IM	Inibição máxima
iNOS	Sintase do óxido nítrico induzível

i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
i.t.	Intratecal
L <sub>5</sub> -L <sub>6</sub>	Segmentos das vértebras lombares 5 e 6
LIF	Fator inibitório de leucemia
L-NOARG	N-nitro-L-arginina
LNP	Ligação Parcial Nervo
LHLR	Hormônio liberador do hormônio luteinizante
MAO	Monoamina oxidase
mGluR	Receptores glutamatérgicos metabotrópicos
MK-801	(5S,10R)-(+)-5-Metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]
MPO	Mieloperoxidase
NMDA	Ácido N-metil-D-aspartico
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintase do óxido nítrico
NPY	Neuropeptideo Y
OCT-2	Transportador de cátions orgânicos 2
ODC	Ornitina descarboxilase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução de tampão fostato
PAG	Substância cinzenta periaquedutal
PFA	Paraformaldeído
PG	Proteína G
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGs	Prostaglandinas
SNC	Sistema nervoso central
SB	Substância branca
SC	Substância cinzenta
SP	Substância P
SFB	Soro fetal bovino
Tc	Tecido conjuntivo
TEA	Tetraetilamônio
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral- $\alpha$
trans-ACPD	Ácido ( $\pm$ )-1-aminociclopentano-trans-1,3-dicarboxílico
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

## *LISTA DE FIGURAS*

Figura 1: Diagrama ilustrando as mudanças na sensação da dor causada por estímulo .....	2
Figura 2: Transmissão da informação nociceptiva através das fibras aferentes ao SNC .....	5
Figura 3: Fórmula estrutural da agmatina .....	9
Figura 4: Biossíntese da agmatina em mamíferos .....	12
Figura 5: Esquema de tratamento dos animais na realização dos experimentos de mecanismo de ação o acético ou glutamato .....	20
Figura 6: Imagens da análise morfométrica das secções transversas do nervo ciático de ratos .....	31
Figura 7: Efeito antinociceptivo da agmatina na nocicepção induzida pelo ácido acético em camundongos .....	34
Figura 8: Influência do pré-tratamento com naltrindol, nor-binaltorfimina ou naloxona metiodida sobre o efeito antinociceptivo da agmatina no modelo do ácido acético .....	35
Figura 9: Influência do pré-tratamento com toxina pertussis sobre o efeito antinociceptivo da agmatina no modelo do ácido acético .....	36
Figura 10: Influência do pré-tratamento com CaCl <sub>2</sub> ou EGTA sobre o efeito antinociceptivo da agmatina no modelo do ácido acético .....	36
Figura 11: Influência do pré-tratamento com glibenclamida ou TEA sobre o efeito antinociceptivo da agmatina no modelo ácido acético .....	37
Figura 12: Influência do pré-tratamento apamina ou caribdotoxina sobre o efeito antinociceptivo da agmatina no modelo do ácido acético .....	38
Figura 13: Influência do pré-tratamento com cafeína sobre o efeito antinociceptivo da agmatina no modelo do ácido acético .....	39
Figura 14: Influência do pré-tratamento com bicuculina ou saclofeno sobre o efeito antinociceptivo da agmatina no modelo do ácido acético .....	40
Figura 15: Influência da adrenalectomia bilateral sobre o efeito antinociceptivo da agmatina no modelo do ácido acético .....	41
Figura 16: Efeito antinociceptivo da agmatina na nocicepção induzida pela injeção i.pl. de glutamato em camundongos .....	41
Figura 17: Efeito antinociceptivo da agmatina na nocicepção induzida pela injeção i.t. de glutamato, NMDA, e trans-ACPD em camundongos .....	42

Figura 18: Efeito antinociceptivo da agmatina na nocicepção induzida pela injeção i.t. de AMPA ou cainato em camundongos .....	43
Figura 19: Efeito antinociceptivo da agmatina na nocicepção induzida pela injeção i.t. de NMDA ou trans-ACPD em camundongos .....	43
Figura 20: Efeito antinociceptivo da L-NOARG na nocicepção induzida pela injeção i.t. de glutamato, AMPA, NMDA, cainato ou trans-ACPD em camundongos .	44
Figura 21: Efeito antinociceptivo do MK-801 na nocicepção induzida pela injeção i.t. de glutamato, AMPA, NMDA, cainato e trans-ACPD em camundongo.....	45
Figura 22: Efeito antinociceptivo da agmatina na nocicepção induzida pela injeção i.t. de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ (B) em camundongos .....	46
Figura 23: Influência do pré-tratamento com DPCPX ou ZM-241385 sobre o efeito antinociceptivo da agmatina no modelo do glutamato em camundongos .....	46
Figura 24: Influência do pré-tratamento com DPCPX ou naloxona sobre o efeito antinociceptivo da associação de adenosina e agmatina no modelo do glutamato em camundongos .....	47
Figura 25: Influência do pré-tratamento com ZM-241385 ou efaroxan sobre o efeito antinociceptivo da associação de adenosina e agmatina no modelo do glutamato em camundongos .....	48
Figura 26: Efeito anti-hipernociceptivo da agmatina na alodinia mecânica induzida pelo CFA em camundongos .....	49
Figura 27: Efeito anti-hipernociceptivo da agmatina na alodinia mecânica causada pelo LPNC em camundongos .....	50
Figura 28: Efeito da agmatina no edema de pata induzido pela injeção i.pl. de CFA em camundongos .....	50
Figura 29: Efeito da agmatina na atividade da enzima MPO induzida pela injeção i.pl. de CFA em camundongos .....	51
Figura 30: Efeito da agmatina na recuperação funcional (IFC) antes e após o ENC em ratos .....	52
Figura 31: Efeito da agmatina na recuperação funcional (IEC) antes e após o ENC em ratos .....	52
Figura 32: Efeito anti-hipernociceptivo da agmatina na alodinia mecânica causada pelo ENC em ratos .....	53
Figura 33: Imagens de secções transversas da porção distal do nervo ciático de ratos em aumento de 1000x .....	54
Figura 34: Parâmetros morfométricos da regeneração das fibras nervosas do nervo ciático de ratos .....	55

Figura 35: Imunomarcção para astrócitos e microglias no CDMEL de ratos 35 dias após o ENC .....	57
Figura 36: Efeito da agmatina sobre o número de células positivas para astrócitos e microglias no CDMEL de ratos 35 dias após o ENC .....	58
Figura 37: Efeito da agmatina sobre a atividade celular de astrócitos e microglias no CDMEL de ratos 35 dias após o ENC .....	58
Figura 38: Efeito da agmatina sobre o perímetro celular de astrócitos e microglias no CDMEL de ratos 35 dias após o ENC .....	59
Figura 39: Efeito da agmatina sobre proporção de aspecto de astrócitos e microglias no CDMEL de ratos 35 dias após o ENC .....	59
Figura 40: Efeito da agmatina sobre o diâmetro de Feret de astrócitos e microglias no CDMEL de ratos 35 dias após o ENC .....	60
Figura 41. Representação da área utilizada para determinar o número de células e determinar a intensidade de fluorescência de astrócitos e microglias no CDMEL de ratos 35 dias após o ENC .....	60
Figura 42. Mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva da agmatina .....	77

## RESUMO

O presente trabalho avaliou alguns dos mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva da agmatina em modelos de nociceção aguda, crônica inflamatória e neuropática em camundongos. Além disso, também analisou a ação da agmatina em relação à recuperação da função sensório-motora sobre a regeneração do nervo ciático de ratos submetidos à lesão por esmagamento. A agmatina (1-30 mg/kg), administrada pela via i.p., 30 min antes, causou inibição significativa e dependente da dose da nociceção induzida pelo ácido acético com  $DI_{50}$  de 5,6 mg/kg. A antinociceção causada pela agmatina (10 mg/kg, i.p.) no modelo do ácido acético foi significativamente revertida pelo pré-tratamento dos animais com naltrindol (antagonista do receptor  $\delta$ -opióide, 1 mg/kg, i.p.), nor-binaltorfimina (antagonista do receptor  $\kappa$ -opióide, 1 mg/kg, i.p.), naloxona metiodida (1 mg/kg, i.p.), toxina pertussis (inibidor da proteína  $G_{i/o}$ , 0,5  $\mu$ g/i.t.), por cloreto de cálcio (doador de íons  $Ca^{2+}$ , 200 nmol/i.c.v.), glibenclamida (bloqueador dos canais de potássio dependentes de ATP, 80  $\mu$ g/i.t.), TEA (bloqueador dos canais de potássio dependentes de voltagem, 0,1  $\mu$ g/i.t.), apamina (bloqueador dos canais de potássio ativado por cálcio de baixa condutância, 50 ng/i.t.), cafeína (antagonista não seletivo dos receptores adenosinérgicos, 3 mg/kg, i.p.), bicuculina (antagonista seletivo do receptor  $GABA_A$ , 1 mg/kg, i.p.). No entanto, a antinociceção produzida pela agmatina no modelo do ácido acético não foi afetada pelo pré-tratamento dos animais com caribdotoxina (bloqueador dos canais de potássio ativado por cálcio de alta condutância, 250 pg/i.t.) e saclofeno (antagonista seletivo do receptor  $GABA_B$ , 10 mg/kg, i.p.) ou pela adrenalectomia dos camundongos. A agmatina (1-100 mg/kg, i.p.), administrada pela via i.p., 30 min antes, causou inibição significativa e dependente da dose da nociceção induzida pelas injeções i.t de glutamato, NMDA e trans-ACPD, com valores de  $DI_{50}$  de 16,7; 6,7 e 27,0 mg/kg, respectivamente. No entanto, a agmatina nas mesmas doses e esquema de tratamento não apresentou efeito significativo na nociceção causada pelo AMPA ou pelo cainato. Além disso, a agmatina injetada pela via i.t. (10-100  $\mu$ g/site) também causou inibição significativa e dependente da dose da nociceção induzida pela injeção i.t de NMDA ou de trans-ACPD, com valores de  $DI_{50}$  de 29,6 e 36,0  $\mu$ g/site, respectivamente. A agmatina (10-100 mg/kg), administrada pela via i.p., 30 min antes, também causou uma inibição significativa e dependente da dose da nociceção induzida pela injeção i.t. de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , com  $DI_{50}$  de 61,3 e 30,4 mg/kg. A agmatina (10-100 mg/kg, i.p) causou inibição significativa e dependente da dose da nociceção induzida pela injeção i.pl. de glutamato, com  $DI_{50}$  de 19,5 mg/kg. A antinociceção causada pela agmatina (30 mg/kg, i.p.) no modelo do glutamato foi significativamente revertida pelo pré-tratamento dos animais com DPCPX (antagonista seletivo dos receptores  $A_1$ , 5 mg/kg, i.p.), mas não com ZM-241385 (antagonista seletivo dos receptores  $A_{2A}$ , 3 mg/kg, i.p.). Além disso, foi observado um efeito sinérgico causado pelo tratamento dos animais com uma associação de adenosina (30 mg/kg, i.p.) e agmatina (10 mg/kg, i.p.), ambas em doses-sub-ativas, no modelo do glutamato. A antinociceção causada pela associação de agmatina e adenosina no modelo do glutamato foi significativamente revertida pelo pré-tratamento dos animais com DPCPX (5 mg/kg, i.p.) e naloxona (antagonista opióide não seletivo, 1 mg/kg, i.p.), mas não com ZM-241385 (3 mg/kg, i.p.) ou com efaroxan (antagonista imidazólico  $I_1$ , 1 mg/kg, i.p.). A agmatina (30 mg/kg, i.p., 30 min antes), inibiu significativamente (inibição de  $52\pm 7\%$  em 4h) a hipernociceção mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA na pata dos camundongos. Quando a agmatina (30 mg/kg, i.p.), foi administrada 2 vezes por dia, durante 7 dias, também inibiu a hipernociceção mecânica causada pelo CFA. A agmatina (30 mg/kg, i.p., 30 min antes) também reduziu a hipernociceção mecânica causada pela ligação parcial do nervo ciático (LPNC) em camundongos com inibição de  $81\pm 8\%$  em 2h. No entanto, o tratamento dos animais com agmatina (30 mg/kg, i.p., 30 min antes) não reduziu o edema de pata nem a atividade da enzima mieloperoxidase, ambos induzidos pela injeção de CFA. O

tratamento de ratos com agmatina (30 mg/kg, i.p., 2x ao dia), durante 35 dias, acelerou a recuperação da função sensório-motora dos animais após a lesão por esmagamento do nervo ciático (ENC). Neste sentido, a agmatina (30 mg/kg, i.p., 2x/dia) também reduziu a hipernocicepção mecânica causada pelo ENC com inibição de  $91 \pm 6$  % 14 dias após a cirurgia. Os dados morfométricos revelaram que o grupo dos animais tratados com agmatina (30 mg/kg, i.p., 2x/dia) apresentou densidade significativamente maior de fibras mielinizadas, espessura maior da bainha de mielina, aumento da porcentagem de área de fibras mielinizadas, uma maior área de tecido conjuntivo e uma redução da porcentagem de fragmentos de degeneração. Além disso, o tratamento dos ratos com agmatina (30 mg/kg, i.p. 2x/dia) diminuiu o número de células positivas para GFAP, mas não de OX-42. No entanto, o mesmo tratamento dos animais diminuiu a intensidade de fluorescência tanto para GFAP e OX-42. O tratamento com agmatina alterou os aspectos morfológicos nos astrócitos, pois reduziu o perímetro celular e aumentou a proporção de aspecto da célula (*aspect ratio*). No entanto, em relação à morfologia da microglia, nenhum parâmetro foi alterado pelo tratamento com agmatina. Assim, estes resultados indicam que a agmatina produz antinocicepção significativa e de forma dependente da dose em vários modelos de nocicepção por mecanismos que envolvem uma interação com os sistemas glutamatérgico (através dos receptores NMDA e metabotrópicos), opióide (através dos receptores  $\kappa$  e  $\delta$ ), adenosinérgico através dos receptores  $A_1$ ), da proteína  $G_{i/o}$ , dos canais de cálcio, dos canais de potássio, do sistema gabaérgico (através dos receptores  $GABA_A$ ). Nossos dados também fornecem evidências de que o tratamento com agmatina induz aumento da recuperação funcional motora e redução da hipernocicepção mecânica. Além disso, a capacidade da agmatina de interferir no processo de ativação das células gliais, principalmente nos astrócitos, os quais modulam a liberação de citocinas inflamatórias, parece contribuir para seu efeito antinociceptivo e anti-hipernociceptivo.

Palavras-chave: Agmatina, nocicepção, receptores glutamatérgicos, citocinas pró-inflamatórias, células gliais.

## SUMMARY

The present work investigated some mechanisms involved in the antinociceptive action of agmatine in models of acute, chronic inflammatory and neuropathic nociception in mice. Moreover, we also analyzed the action of agmatine in the functional sensory-motor recovery of the sciatic nerve of rats submitted to crush lesion. Agmatine (1-30 mg/kg), given by i.p. route, 30 min earlier, produced dose-dependent inhibition of acetic acid-induced visceral pain, with mean ID<sub>50</sub> value of 5.6 mg/kg. The antinociception caused by agmatine in the acetic acid test was significantly attenuated by pretreatment of mice with naltrindol ( $\delta$ -opioid receptor antagonist, 1 mg/kg, i.p.), nor-binaltorphimine ( $\kappa$ -opioid receptor antagonist, 1 mg/kg, i.p.), naloxone methiodide (1 mg/kg, i.p.), pertussis toxin (G<sub>i/o</sub>-protein inhibitor, 0.5  $\mu$ g/i.t) or by calcium chloride (Ca<sup>2+</sup> donor, 200 nmol/i.c.v.), glibenclamide (a blocker of ATP-sensitive potassium channels, 80  $\mu$ g/i.t.), TEA (non-selective blocker of voltage-sensitive potassium channels, 0.1  $\mu$ g/i.t.), apamine (a blocker of small (or low)- conductance Ca<sup>2+</sup>-sensitive potassium channels, 50 ng/i.t.), caffeine (non-selective antagonist of adenosinergic receptors, 3 mg/kg, i.p.), bicuculline (GABA<sub>A</sub> receptor antagonist, 1 mg/kg, i.p.). However, the antinociception elicited by agmatine was not affected by i.p. pre-treatment of animals with charybdotoxin (a blocker of large (or fast)- conductance Ca<sup>2+</sup>-sensitive potassium channels, 250 pg/i.t.) or saclophen (selective GABA<sub>B</sub> receptor antagonist, 10 mg/kg, i.p.). Likewise, the antinociception caused by agmatine was not affected by the adrenalectomy of animals. Intraperitoneal administration of agmatine (1.0–100.0 mg/kg) dose dependently inhibited the nociceptive response induced by i.t. injection of glutamate, NMDA and trans-ACPD, with mean ID<sub>50</sub> values of 16.7, 6.8 and 27.0 mg/kg, respectively. However, agmatine completely failed to affect the nociception induced by AMPA or kainate. Agmatine injected by i.t. route (10–100  $\mu$ g/site) also produced dose related inhibition of NMDA- and trans-ACPD-induced biting response with mean ID<sub>50</sub> values of 29.6 and 36.0  $\mu$ g/site, respectively. In addition, agmatine (10.0–100.0 mg/kg, i.p., 30 min before) dose dependently inhibited the nociceptive response induced by i.t. injection of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , with mean ID<sub>50</sub> values of 61.3 and 30.4 mg/kg, respectively. Agmatine (3-100 mg/kg, i.p.) also caused significant and dose-dependent inhibition of glutamate-induced nociception in the mice paw, with mean ID<sub>50</sub> values of 19.5 mg/kg. The antinociception caused by agmatine in the glutamate test was significantly attenuated by pretreatment of mice with DPCPX (adenosine A<sub>1</sub> receptor antagonist, 5 mg/kg, i.p.), but not with ZM-241385 (adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonist, 3 mg/kg, i.p.). Moreover, a synergistic antinociceptive effect in the glutamate test was caused by treatment of animals with an association of sub-active doses of adenosine (30 mg/kg, i.p.) and agmatine (10 mg/kg, i.p.), which was significantly attenuated by pretreatment of mice with DPCPX (5 mg/kg, i.p.) and naloxone (non-selective opioid receptor antagonist, 1 mg/kg, i.p.), but not with ZM-241385 (3 mg/kg, i.p.) or efaroxan (I<sub>1</sub> receptor antagonist, 1 mg/kg, i.p.). Agmatine (30 mg/kg, i.p. 30 min early), produced time-dependent inhibition of mechanical hypernociception induced by CFA injected in the mice paw with inhibition of 52 $\pm$ 7% after 4 h. Agmatine (30 mg/kg, i.p.), given twice a day during 7 days, also inhibited the mechanical hypernociception caused by CFA. Moreover, AGM also significantly reduced the mechanical hypernociception caused by partial sciatic nerve ligation with inhibition of 81 $\pm$ 8% after 2 h. Nevertheless, AGM failed to inhibit the paw oedema caused by CFA and the myeloperoxidase enzyme activity. The treatment of rats with agmatine (30 mg/kg, i.p., 2x/day) accelerated the recovery of the sensory-motor function of animals after sciatic nerve crush (SNC). Moreover, agmatine also inhibited the mechanical hypernociception caused by SNC with inhibition of 91 $\pm$ 6 % 14 days after surgery. Morphometric data revealed that animals treated with agmatine (30 mg/kg, i.p., twice a day) showed significantly increase in the density of myelin fibers, thickness of myelin sheath, percentile of the area of myelinated fibers, area of connective tissue and a decrease of the



percentile of fragments of degeneration. Besides, the treatment of the mice with agmatine (30 mg/kg, i.p., twice a day) inhibited the number of GFAP-positive cells, but not of OX-42. However the same treatment of animals decreased the fluorescence intensity to GFAP and OX-42. The treatment with agmatine altered morphologic aspects of the astrocytes, because it was shown to reduce the cellular perimeter and to increase the aspect ratio. However, agmatine did not alter the morphology of the microglia. Together, these results indicate that agmatine produces significant and dose-dependent antinociception through mechanisms that involve an interaction with glutamatergic system (NMDA and metabotropic receptors), opioid system (through  $\kappa$  and  $\delta$  receptor), adenosinergic system (via adenosine  $A_1$  receptors), the  $G_{i/o}$  protein sensitive to pertussis toxin, calcium channels, potassium channels and gabaergic system (via  $GABA_A$  receptors). These data also provide evidence that early neural mobilization treatment induced an improvement in functional recovery and reduction of mechanical allodynia. Moreover, the ability of agmatine to interfere in the activation of glial cells, mainly astrocytes, which modulate the release of pro-inflammatory cytokines, seems to contribute for the antinociceptive and antihypernociceptive actions of agmatine.

Keywords: Agmatine, nociception, glutamate receptors, pro-inflammatory cytokines, glial cells.

**A maior parte destes resultados está publicado em:**

GADOTTI, V. M., TIBOLA, D., PASZCUK, A. F., RODRIGUES, A. L. S., CALIXTO, J. B., SANTOS, A. R. S. Contribution of spinal glutamatergic receptors to the antinociception caused by agmatine in mice. *Brain Research.* , v.1093, p.116 - 122, 2006.

PASZCUK, A. F., GADOTTI, V. M., TIBOLA, D., QUINTÃO, N. L. M., RODRIGUES, A. L. S., CALIXTO, J. B., SOARES, A. R. S. Antinociceptive Properties of Agmatine in Persistent Inflammatory and Neuropathic Models of Pain in mice.. *Brain Research.* , v.1159, p.124 - 133, 2007.

**Outros trabalhos que foram realizados durante o doutorado e já se encontram publicados em:**

ROSA, K. A., GADOTTI, V. M., ROSA, A. O., RODRIGUES, A. L. S., CALIXTO, J. B., SANTOS, A. R. S. Evidence for the Involvement of Glutamatergic System in the Antinociceptive Effect of Ascorbic Acid. *Neuroscience Letters.* , v.381, p.185 - 188, 2005.

GADOTTI, V. M., SCHMELING, L. O., MACHADO, C., LIZ, F. H., CECHINEL FILHO, V., SILVA, C. M., SANTOS, A. R. S. Antinociceptive Actions of the Extract and the Flavonoid Quercitrin Isolated from *Bauhinia microstachya* Leaves. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* , v.57, p.1345 - 1352, 2005.

ROSA, J. M., GADOTTI, V. M., RODRIGUES, A. L. S., GOULART, E., SILVA, A. V., SEHNEM, B., ROSA, L. S., GONÇALVES, R. M., CORRÊA, R., SANTOS, A. R. S. Antidepressant and Antinociceptive actions of 4-(4'-chlorophenyl)-6-(4'-methylphenyl)-2-hydrazinepyrimidine Mannich Base in Mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* , v.82, p.156 - 162, 2005.

BUDNI, J., GADOTTI, V. M., KASTER, M. P., SANTOS, A. R. S., RODRIGUES, A. L. S. Role of Different Types of Potassium Channels in the Antidepressant-like Effect of Agmatine in the Mouse Forced Swimming Test. *European Journal of Pharmacology.* , v.575, p.87 - 93, 2007.

MEOTTI, F. C., CARQUEJA, C. L., GADOTTI, V. M., WALZ, R., TASCIA, C. I., SANTOS, A. R. S. Pain Sensitivity in Mice Lacking Cellular Prion Protein. *Behavioural Brain Research.* , v.1151, p.84 - 90, 2007.

LUCENA, G. M. R. S., GADOTTI, V. M., MAFFI, L. C., SILVA, G. S., AZEDO, M. S., SANTOS, A. R. S. Antinociceptive and Anti-inflammatory Properties from the Bulbs of *Cipura paludosa* AUBL.. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* , v.112, p.19 - 25, 2007.

LUCENA, G. M. R. S., FRANCO, J. L., CAMILA, AZEDO, M. S., MEOTTI, F. C., GADOTTI, V. M., DAFRE, A. L., SANTOS, A. R. S., FARINA, M. *Cipura paludosa* Extract Prevents Methyl Mercury-Induced Neurotoxicity in Mice.. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* , v.101, p.127 - 131, 2007.

LAPA, F., GADOTTI, V. M., MISSAU, F., PIZZOLATTI, M. G., MARQUES, M. C. A., FARINA, M., RODRIGUES, A. L. S., SANTOS, A. R. S. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and the flavonoid rutin obtained from *Polygala paniculata* L. in mice. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v. 104, p. 306-315, 2009.

# 1. INTRODUÇÃO

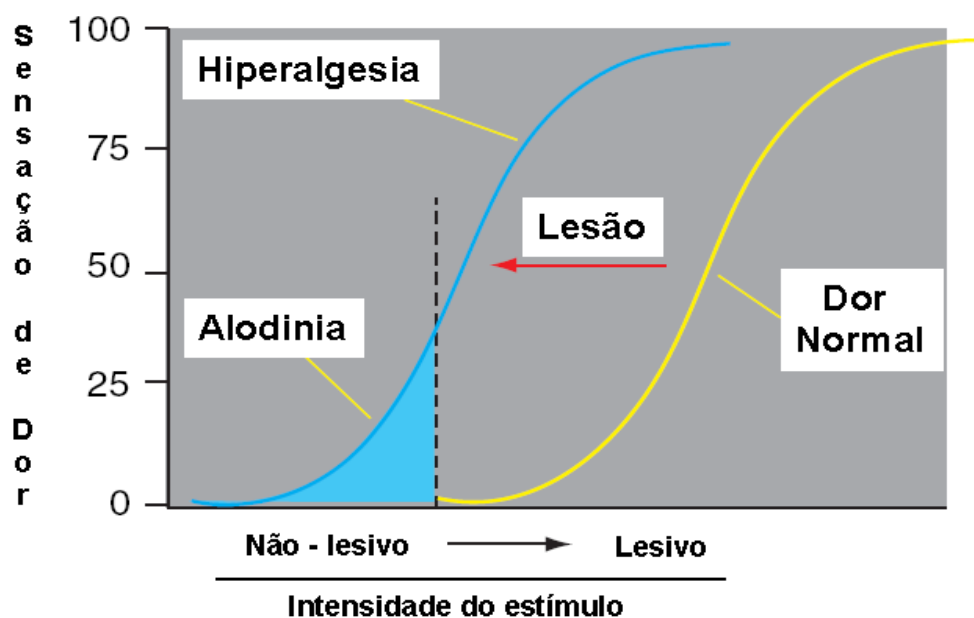
## 1.1 DOR

A dor tem importante papel no controle da homeostasia, atuando como um mecanismo de alerta do corpo informando que algo está ameaçando nosso bem-estar, possibilitando assim nossa atenção para identificação e controle desta ameaça em potencial (WALL, 1999). A dor é considerada por isso como um sintoma clínico importante para a detecção e avaliação de muitas doenças. Entretanto, sua percepção é complexa e envolve tanto a tradução de um estímulo nocivo, bem como processos emocionais e cognitivos em nosso cérebro (JULIUS e BASBAUM, 2001). Assim, pode-se dizer que a dor é influenciada por fatores fisiológicos e psicológicos e por isso avaliada em animais de forma indireta, sendo denominado de nocicepção seu componente fisiológico (TJØLSEN e HOLE, 1997).

Em termos de duração, um episódio de dor pode ser transitório, agudo ou crônico. Na dor de origem transitória, o dano real é quase inexistente, exigindo geralmente pouca atenção, pois provoca uma dor com duração de segundos ou minutos e acaba por se dissipar como por exemplo em uma leve queimadura. Já a dor aguda difere da dor crônica em relação ao tempo de permanência, sendo que se persistir mais que alguns dias ou semanas, então passa a ser considerada como dor crônica. Da mesma forma que a dor aguda, a dor crônica também é causada por lesão ou patologia, podendo permanecer mesmo depois da recuperação do indivíduo (LOESER e MELZACK, 1999). O rápido início da dor é referido como o componente fásico, enquanto a fase mais persistente é referida como o componente tônico. Quanto a sua origem, existem quatro tipos principais de dor. A dor “nociceptiva”, que se origina devido à estimulação dos nociceptores localizados na pele, vísceras e outros órgãos. A dor “neurogênica” que reflete o dano de tecido neuronal na periferia ou no sistema nervoso central (SNC). Outro tipo é a dor “neuropática”, que acontece devido a uma disfunção ou dano de um nervo ou grupo de nervos. Por último, a dor “psicogênica”, que não é oriunda de uma fonte somática identificável e que pode refletir fatores psicológicos (MILLAN, 1999). No entanto, quando ocorre um significativo dano tecidual, a dor é geralmente mais persistente, pois sofre a influência de mediadores inflamatórios liberados subjacentes à lesão tecidual. Nestas circunstâncias, geralmente ocorre um quadro de hipersensibilidade causado pela ativação e sensibilização dos nociceptores periféricos pelos mediadores químicos liberados pela lesão do tecido (DRAY, 1997).

Dentre as desordens que comumente ocorrem em pacientes que apresentam dor com quadros de hipersensibilidade, denominados de hipernocicepção, pode-se citar a hiperalgesia

(aumento na intensidade da dor) e a alodinia (quando um estímulo, que não é capaz de ativar nociceptores, passa a ser percebido como doloroso) (LOESER e TREEDE, 2008) (Fig 1). Neste sentido, apesar dos neurônios espinhais possuírem uma relação estímulo-resposta estável para estímulos intermitentes, breves e não nocivos, eles estão sujeitos à plasticidade sináptica. Com isso, estímulos nociceptivos repetitivos de baixa frequência ou lesão tecidual periférica originam mudanças funcionais na medula espinhal, tais como redução do limiar nociceptivo, expansão do tamanho do campo receptivo (hiperalgesia secundária) e descargas neuronais prolongadas, gerando assim um quadro de hipersensibilidade (MA e WOOLF, 1996).



**Figura 1:** Diagrama ilustrando as mudanças na sensação da dor causada por estímulo. Adaptado a partir de Cervero e Laird, 1996.

Os nociceptores são as estruturas específicas responsáveis pela recepção do estímulo nociceptivo em nível periférico nas terminações nervosas das fibras sensoriais. Eles estão localizados na porção distal dos neurônios aferentes sensitivos que estão amplamente distribuídos na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras. A pele é responsável por fornecer a maioria das informações nociceptivas da periferia ao SNC, pois a maior parte dos estímulos nociceptivos é captada neste tecido. Além disso, os nociceptores são receptores sensíveis a diferentes estímulos que podem ser térmicos, mecânicos ou químicos. No entanto, a sinalização química é provavelmente a mais comum e apresenta as mais diversas formas de geração de sinal nos neurônios sensitivos (BESSION e CHAOUCH, 1987; DRAY, 1997; BESSION, 1999; MILLAN, 1999). Existem ainda os chamados nociceptores silenciosos (“silent” ou “sleeping”), que são uma pequena proporção das fibras aferentes, as quais

normalmente não são responsivas a estímulos. Entretanto, quando influenciados por mediadores inflamatórios ou após a administração de agentes flogísticos, apresentam atividade espontânea ou tornam-se sensibilizados e respondem a estímulos originalmente não nociceptivos (JULIUS e BASBAUM, 2001).

Os corpos celulares dos neurônios aferentes primários encontram-se nos gânglios trigeminais e nos gânglios da raiz dorsal (DRG). Ambas as estruturas são agrupamentos de corpos celulares de neurônios, normalmente encapsulados por células satélites de origem glial, responsáveis por conduzir a informação gerada na periferia para o núcleo trigeminal caudal ou para o corno dorsal da medula espinhal (BESSON, 1999). Situados na coluna vertebral e dispostos lateralmente ao longo da medula espinhal, os DRGs contém ainda células dendríticas e macrófagos, além de uma rica rede de capilares sanguíneos que apresentam propriedades diferentes da barreira hematoencefálica do SNC (OLSSON, 1990). Após emergir de seu corpo celular, o axônio aferente primário bifurca-se para enviar prolongamentos à medula espinhal e outro para inervar os tecidos corporais.

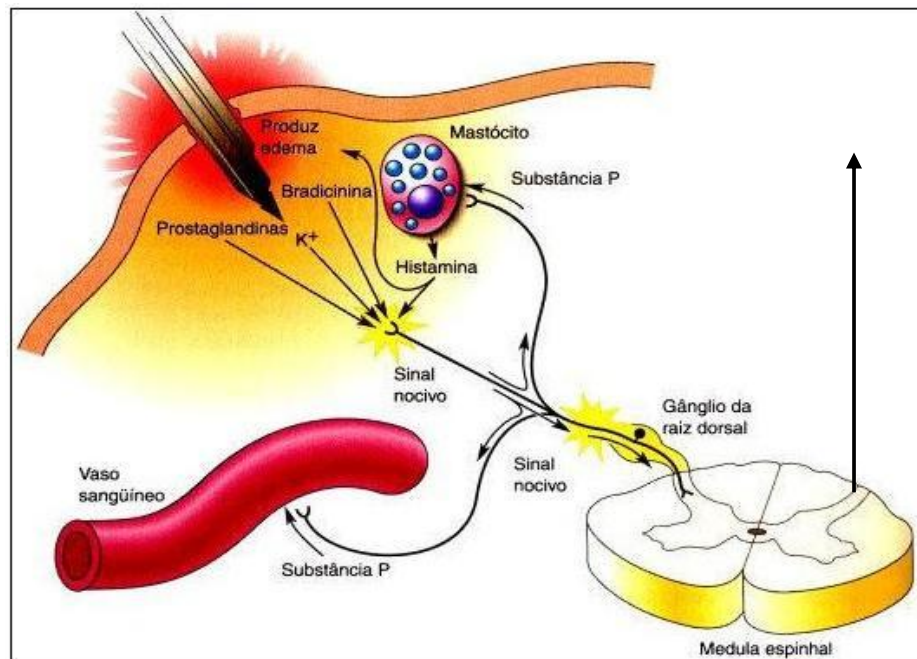
Os aferentes primários são classificados de acordo com critérios funcionais e anatômicos, entre eles velocidade de condução, diâmetro e grau de mielinização. Os neurônios mais mielinizados, de maior diâmetro e que apresentam a maior velocidade de condução são as fibras A $\beta$ . Essas fibras respondem de forma máxima ao leve toque ou movimento, são encontradas basicamente nos nervos que inervam a pele e contribuem de forma mínima para a dor. Entretanto, a estimulação destes mecanorreceptores pode aliviar a dor, o que ocorre quando elas são ativadas por fricção da pele pela mão após alguma lesão. Por outro lado, existem outros dois tipos de aferentes primários responsáveis pela transmissão da sensação da periferia à medula espinhal. As fibras de pequeno e médio diâmetro originam a maioria dos nociceptores e incluem as fibras C não mielinizadas e as fibras pouco mielinizadas A $\delta$ , respectivamente. Estas fibras são as responsáveis por transmitir o estímulo nociceptivo (PLEUVRY, 1996; SHELLEY, 1994). No entanto, a condução ocorre de forma mais lenta do que aquela observada para as fibras A $\beta$ . As fibras A $\delta$  transmitem a sensação da periferia ao SNC em uma velocidade entre 12 a 30 m/s, enquanto as fibras C, também conhecidas como fibras polimodais C conduzem o estímulo em uma velocidade entre a 0,5 a 2 m/s. Existem ainda duas classes principais de fibras A $\delta$ , sendo diferenciadas por suas diferenças de resposta ao limiar de estimulação térmica ou por lesão tecidual. As fibras A $\delta$  do tipo I respondem a temperaturas inferiores a 53°C, enquanto as fibras A $\delta$  do tipo II respondem a temperaturas menores que 43°C (MILLAN, 1999; JULIUS e BASBAUM, 2001).

Após a lesão tecidual ocorre a produção e liberação de mediadores inflamatórios pelos

neurônios sensoriais e por células não neuronais como plaquetas, células sanguíneas, mastócitos, células endoteliais, fibroblastos e células de Schwann (BESSION, 1997). Assim, diversos neurotransmissores e neuromoduladores como substância P (SP), óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PGs), neuropeptídeo Y (NPY), opióides, serotonina (5-HT), adrenalina, adenosina, citocinas, glutamato entre outros aminoácidos excitatórios são liberados após um estímulo capaz de gerar lesão tecidual. Neste sentido, a maior parte da estimulação destas fibras é produzida pela ativação de receptores específicos acoplados a cascatas de segundos mensageiros intracelulares e canais iônicos. Estes processos de ativação afetam a excitabilidade da membrana e podem alterar a transcrição gênica, induzindo assim alterações de longo prazo, no fenótipo dos neurônios sensoriais. Desta forma, estas alterações podem causar aumento ou diminuição da produção de mediadores químicos (por exemplo, citocinas pró-inflamatórias), expressão de receptores (por exemplo, receptores de glutamato, opióides, entre outros), bem como na indução de enzimas (por exemplo, iNOS). Além disso, uma excitabilidade anormal causada por inflamação ou lesão neuronal, normalmente pode decorrer do aparecimento de novos canais iônicos e receptores. Sendo assim, substâncias capazes de causar modificações seletivas destes processos podem dar origem a novos agentes analgésicos e antiinflamatórios (DRAY et al., 1994; GUIRIMAND e LE BARS, 1996; BESSION, 1997; COGGESHALL e CARLTON, 1997; DRAY, 1997; BESSION, 1999; MILLAN, 1999; RAJA et al., 1999).

Assim, os mediadores químicos liberados após diferentes estímulos fazem com que a informação nociceptiva seja transmitida pelas fibras aferentes às diferentes estruturas do SNC, como por exemplo, o tálamo, para que este a processe e responda adequadamente em cada situação através do envolvimento de outras estruturas cerebrais como o córtex somatosensorial, hipocampo, substância cinzenta periaquedutal e núcleo mediano da rafe, entre outras. Além disso, também ocorre o envolvimento de neurônios descendentes, que por sua vez participam do controle endógeno da dor pela liberação de mediadores químicos na medula espinhal como a serotonina, noradrenalina e opióides endógenos, entre outros. Inicialmente, os impulsos nociceptivos chegam através dos neurônios aferentes primários no corno dorsal da medula espinhal, área primária de recebimento da maioria das informações somatosensoriais oriundos da periferia (Fig. 2) (COGGESHALL e CARLTON, 1997). O corno dorsal da medula é uma estrutura dividida em lâminas com base em sua citoarquitetura. Desta forma, as fibras aferentes primárias C e A $\delta$  têm suas terminações principalmente nas lâminas mais superficiais [lâmina I (zona marginal) e lâminas II (substância gelatinosa)] (BESSION e CHAOUCH, 1987). A informação nociceptiva se projeta do corno dorsal da medula para o tálamo através de neurônios de segunda ordem, ou neurônios sensoriais

secundários, que compreendem as vias ascendentes. Os neurônios sensoriais secundários são ativados pela liberação de glutamato e SP dos aferentes primários, além disso, este processo excitatório também depende de canais de cálcio e sódio, sendo os canais de cálcio os principais reguladores da liberação de neurotransmissores e, conseqüentemente, promotores da liberação de citocinas pró-inflamatórias pelas células da glia (HILL, 2001).



**Figura 2:** Transmissão da informação nociceptiva através das fibras aferentes ao SNC. Adaptado a partir de Bear et al., 2002.

No entanto, a transmissão da informação nociceptiva na medula espinhal pode ser regulada negativamente por interneurônios inibitórios, que fazem sinapses na substância gelatinosa, onde liberam neurotransmissores e neuromoduladores tais como o ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), opióides endógenos e glicina, entre outros (para revisão ver MILLAN, 1999). Com relação às vias ascendentes que compreendem os neurônios de 2ª ordem, as mais importantes são: o trato espinotalâmico, o trato espinoreticular e o trato espinomesencefálico, entre outros. Neste sentido, o organismo também possui mecanismos intrínsecos para o controle da dor, pois após a estimulação de diferentes núcleos do tálamo, os sinais são transmitidos para diversas áreas do córtex sensorial somático, substância cinzenta periaquedutal (PAG), hipotálamo, amígdala e cerebelo, onde a informação do presente contexto é integrada com experiências do passado e processada para produzir a percepção da dor e promover a resposta adequada que é enviada para a medula espinhal através dos neurônios descendentes (GUYTON, 1992; BESSON, 1999; CRAIG e

DOSTROVSKY, 1999; MILLAN 1999). Além disso, a modulação descendente da informação nociceptiva envolve uma série de estruturas cerebrais, como mencionado anteriormente, e sistemas de neurotransmissores, dentre os quais podemos mencionar os sistemas opióide, serotoninérgico, noradrenérgico, gabaérgico, adenosinérgico, além de canabinóides endógenos entre outras substâncias (para revisão ver MILLAN, 2002).

## ***1.2 TRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA NA DOR***

A informação nociceptiva que se projeta pelas vias ascendentes, também chamadas de vias de 2ª ordem, é estimulada pelos neurônios aferentes primários principalmente pela liberação de glutamato e substância P (SP) (HILL, 2001). Assim, é notório que o glutamato exerce um papel fundamental na sinalização do processo nociceptivo a nível espinhal, sendo liberado a nível central após lesão tecidual (JACKSON et al., 1995). O glutamato desempenha importante papel no controle dos processos excitatórios e de sensibilização dos nociceptores e conseqüentemente no estabelecimento de alodinia mecânica ou térmica (JACKSON et al., 1995). Todos os receptores de glutamato, cada um com sua peculiaridade, participam da indução, modulação e manutenção da dor (CARLTON e COGGESHALL 1999; BEIRITH et al., 2002). Os receptores glutamatérgicos (GluR) são divididos em duas grandes classes: ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos do glutamato (iGluR) são canais iônicos permeáveis a cátions e são ainda subdivididos em três sub-classes: ácido caínico (cainato), ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) (OZAWA et al., 1998).

Os receptores metabotrópicos do glutamato (mGluR) são acoplados as proteínas de ligação ao GTP, conhecidas como proteínas G, e operam tanto pela liberação de segundos mensageiros intracelulares ou por influenciar canais iônicos através da interação com as sub-unidades da proteína G através da membrana (MELDRUM, 2000). Atualmente 8 subtipos de receptores metabotrópicos já foram clonados e denominados GluRms 1-8, classificados em diferentes grupos: grupo I (GluRms 1 e 5) que levam a estimulação da fosfolipase C, II (GluRms 2 e 3) e III (GluRms 4, 5, 6, 7 e 8) que inibem a atividade da adenilato ciclase (OZAWA et al., 1998, GOUDET et al., 2008). A ativação dos nociceptores periféricos, causada por lesão tecidual, inflamação ou lesão de nervo, provoca co-liberação de glutamato e SP, dos aferentes primários, ativando assim seus receptores específicos localizados nas fibras secundárias (CHIZH, 2002). Além disso, os receptores NMDA também estão presentes pré-sinápticamente nos terminais nervosos dos neurônios aferentes primários que contém SP (SHIGEMOTO et al., 1992; LIU et al., 1994). Existem ainda dados na literatura demonstrando que a ativação dos receptores NMDA pré-sinápticos, aumentam os efeitos pós-



sinápticos causados pelo glutamato na produção da dor, pois a liberação espinal de SP é, pelo menos em parte, dependente da ativação dos receptores NMDA pelo glutamato (LIU et al., 1994; AFRAH et al., 2001). O glutamato e a SP liberados centralmente, são capazes de ativar as células da glia promovendo a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), ambos mediadores nociceptivos (para revisão ver WIESELER-FRANK et al., 2004). Sabe-se ainda que a administração de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em animais e humanos são capazes de produzir dor e hiperalgesia pela ativação e sensibilização de neurônios sensoriais nociceptivos (para revisão ver McMAHON et al., 2005). Neste sentido, Kleinschnitz e colaboradores (2004) demonstraram recentemente que os receptores glutamatérgicos NMDA modulam a expressão de citocinas pró-inflamatórias, o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  em dois modelos de lesão de nervo periférico em camundongos. Além disso, está bem estabelecido que tais citocinas pró-inflamatórias, bem como a ativação dos receptores glutamatérgicos, causa potente estimulação da produção de óxido nítrico, outro importante modulador da transmissão nociceptiva (EVANS e RALSTON, 1996; HILL, 2001).

No entanto, tem sido demonstrado que diversos sistemas de transmissores têm a capacidade de interferir na transmissão nociceptiva no SNC por causa de sua ação modulatória sob o sistema glutamatérgico. Desta forma, o sistema adenosinérgico se apresenta como um importante modulador do sistema do glutamato, principalmente através do receptor A<sub>1</sub> que inibe a liberação de glutamato prevenindo assim a despolarização dos neurônios sensoriais. A interação da adenosina em receptores A<sub>1</sub> pré e pós-sinápticos causa uma diminuição da ativação dos receptores NMDA (CUNHA et al. 2005). Neste sentido, a modulação dos receptores adenosinérgicos tem sido reconhecida como fundamental na homeostasia do SNC e está envolvida na regulação não só da dor (nocicepção), mas também de outras funções como a memória e cognição, regulação do ciclo sono-vigília, ansiedade e depressão (RIBEIRO et al., 2003; KASTER et al., 2004; FREDHOLM et al., 2005) Com relação à dor, a adenosina e seus receptores desempenham múltiplas funções na transmissão nociceptiva tanto em nível periférico quanto central. Na medula espinal, esta bem estabelecida que a ativação do receptor adenosinérgico do subtipo A<sub>1</sub> produz antinocicepção em modelos de nocicepção aguda, inflamatória e neuropática (SAWYNOK, 1998).

### ***1.3 DOR CRÔNICA***

Muitos processos inflamatórios crônicos e neuropatias são desordens clínicas as quais afetam pacientes promovendo nestes, dores crônicas as quais permanecem ainda hoje sem

uma terapia realmente eficiente na grande maioria dos casos. Ambos os processos são caracterizados por estados de hiper-sensibilidade no foco ou gatilho da lesão, e na área adjacente (WOOLF e SALTER, 2000).

A dor neuropática envolve mecanismos fisiológicos muito complexos, pois são resultantes de lesão primária ou disfunção de estruturas do sistema somatosensorial, podendo acometer raízes e nervos periféricos, nervos cranianos, medula espinhal ou cérebro (LOESER e TREEDE, 2008). Apesar da incidência da dor neuropática não ser conhecida no Brasil, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 20% da população adulta em países desenvolvidos sofrem de algum tipo de dor crônica, sendo que uma parcela correspondente a 1,5% apresenta algum tipo de dor neuropática (BOWSHER, 1993). Infelizmente, cerca de 50% desses indivíduos fica parcial ou totalmente incapacitado, de maneira transitória ou permanente, o que compromete de modo significativo tanto a qualidade de vida como a capacidade produtiva (CHONG e BAJWA, 2003). A dor neuropática é um tipo de dor crônica que persiste meses e até mesmo anos após uma lesão neuronal (ZIMMERMANN, 2001).

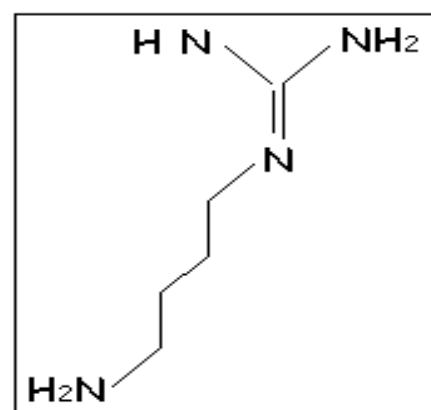
Na etiologia das lesões em neurônios periféricos, estão incluídas lesões por penetração, esmagamento, isquemia, temperatura ou choque elétrico (ROBINSON, 2000,2004; CAMPBELL, 2008). No entanto, lacerações por vidro, faca, lâmina, metal de automóvel ou por fraturas em ossos grandes correspondem a aproximadamente 30% das lesões severas observadas clinicamente (ROBINSON, 2000,2004; CAMPBELL, 2008). Uma outra lesão comum é através do mecanismo de compressão, o qual envolve deformação mecânica, bem como isquemia tecidual (STANEC et al., 1997; CAMPBELL, 2008). Os mecanismos subjacentes à dor neuropática permanecem não esclarecidos por completo e por isso não são totalmente compreendidos, mas estudos em animais experimentais mostram evidências de um importante papel para os receptores NMDA nos processos de dor neuropática (MAO et al., 1992; YOSHIMURA e YONEHARA, 2006). Além do mais, como já mencionado anteriormente, os receptores glutamatérgicos, principalmente o do subtipo NMDA contribuem de maneira importante para a transmissão excitatória em condições fisiológicas e fisiopatológicas, além de desempenhar importante papel na plasticidade neuronal (DICKENSON et al., 1997). Quando ocorre lesão de nervo, alguns componentes da resposta inflamatória são ativados, resultando na liberação de mediadores e no recrutamento de células inflamatórias para o sítio da lesão. A presença de células de Schwann, neutrófilos e macrófagos contribuem para que axônios que sofrem degeneração sejam removidos e ocorra a síntese e liberação de diversos mediadores inflamatórios, fenômeno conhecido como degeneração *Walleriana* (TRACEY e WALKER, 1995).

Estudos recentes demonstram ainda que as células gliais participam ativamente dos processos nociceptivos crônicos, por apresentarem vários receptores relevantes e sintetizarem inúmeros mediadores que podem regular a atividade neuronal (HAYDON, 2001; WATKINS et al., 2001). No SNC elas correspondem a microglia, oligodendrócitos e astrócitos (para revisão ver WATKINS E MAIER, 2003, CAMPANA, 2007). Existe uma interação neurônio-glia significativa, na qual as células gliais podem ser ativadas em resposta a mediadores liberados de neurônios, resultando na liberação de citocinas, bradicinina (BK), PGs, aminoácidos excitatórios, entre outros, que por sua vez irão atuar em neurônios, aumentando a excitabilidade neuronal através da liberação de SP e neurotransmissores excitatórios (OKA e HORI, 1999). O reconhecimento dessas propriedades funcionais das células gliais indica fortemente que células não-neuronais podem participar dos processos de dor neuropática (para revisão ver WATKINS et al., 2001; WATKINS e MAIER, 2003; CAMPANA, 2007). Além disso, sabe-se que a degeneração de fibras nociceptivas A $\delta$  e C resultam no brotamento de fibras A $\beta$  na lâmina II da medula espinhal, conferindo às fibras mielinizadas a possibilidade de interagir com neurônios nociceptivos de segunda ordem. Apesar dos mecanismos envolvidos na reorganização sináptica espinhal não serem totalmente conhecidos, esse fenômeno pode explicar como estímulos táteis inócuos passam a ser percebidos como dolorosos, propiciando o aparecimento de alodinia mecânica (MANNION et al., 1996).

#### 1.4 AGMATINA

A agmatina é uma amina catiônica apresentada sob fórmula estrutural na figura 3, que foi descoberta no início do século XX por Kossel. Sabe-se hoje em dia, que ela se apresenta como um constituinte abundante de plantas, bactérias e mamíferos (TABOR e TABOR, 1984; REIS e REGUNATHAN, 2000; RAASCH et al., 2001).

Apenas em 1994, quando se tentava descobrir um ligante endógeno para os sítios imidazólicos, a agmatina foi isolada do cérebro de mamíferos e identificada por espectroscopia (LI et al., 1994; EGLIN et al., 1998; REIS e REGUNATHAN, 2000). A agmatina é sintetizada a partir de seu precursor, L-arginina, pela ação da enzima arginina descarboxilase (ADC) (Fig. 4), sendo que ambas, agmatina e ADC, são encontradas em bactérias, plantas, animais invertebrados e vertebrados (TABOR e TABOR, 1984;



**Figura 3:** Fórmula estrutural da agmatina

YAMAMOTO et al., 1988; LI et al., 1994). Várias isoformas da enzima ADC têm sido purificadas e clonadas dos diferentes organismos onde ela é encontrada, e apesar de algumas semelhanças e certa homologia, existem várias características que as diferenciam entre si, inclusive daquelas encontradas em humanos (WU e MORRIS, 1973; BELL e MALMBERG, 1990 MALMBERG e CELLINO, 1994; REIS e REGUNATHAN, 2000).

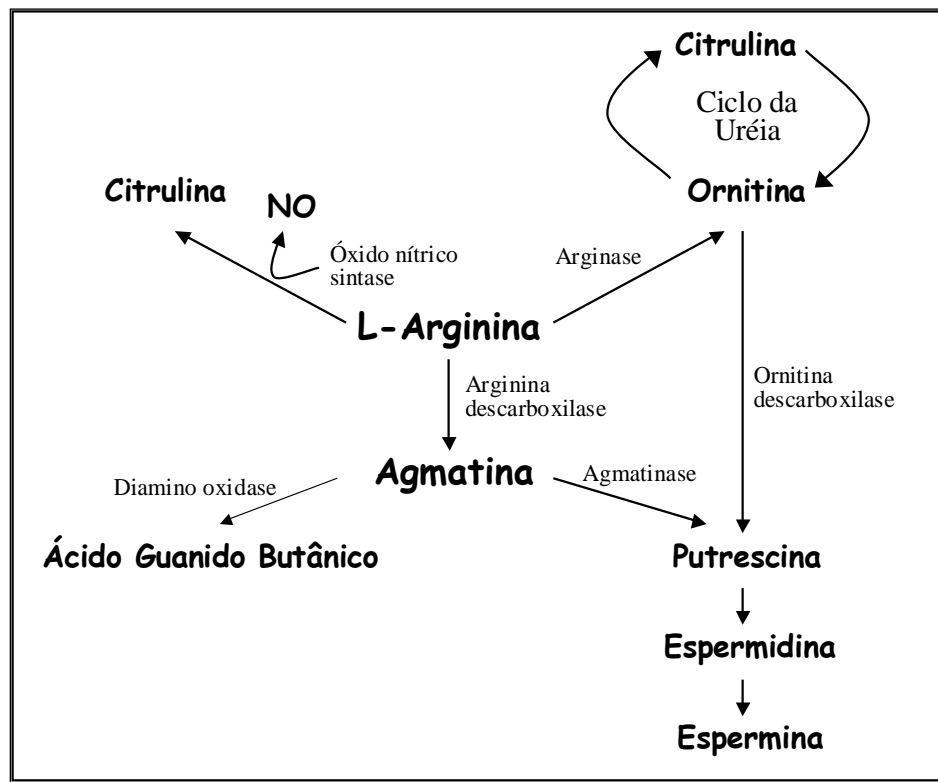
A agmatina foi identificada quimicamente por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) tanto no SNC quanto em órgãos periféricos de mamíferos, tais como intestino, rins, estômago, vasos, pulmão, fígado, coração, glândula adrenal entre outros (RAASCH et al., 1995a,b, 2001; FENG et al., 1997). A concentração de agmatina em todo SNC de ratos, representa aproximadamente 10% da agmatina encontrada no estômago, órgão que apresenta a maior concentração de agmatina (aproximadamente 71 ng/g de peso). Já em humanos, foi demonstrado por HPLC que os níveis de agmatina no fluido cerebro-espinhal em indivíduos saudáveis encontram-se em torno de 24,3 a 54,0 ng/ml. No entanto, a concentração plasmática de agmatina varia em torno de 8,4 a 65,1 ng/ml (REGUNATHAN et al., 2009). Contudo, a concentração de agmatina em nível central é muito semelhante a dos neurotransmissores clássicos (RAASCH et al., 1995a,b; OTAKE et al., 1998; REIS e REGUNATHAN, 2000). Além disso, estudos de imunohistoquímica revelaram que a agmatina encontra-se de maneira abundante em neurônios, local onde ocorre sua síntese e armazenamento. Apesar dos astrócitos possuírem atividade da enzima ADC, o conteúdo de agmatina nestas estruturas é muito reduzido, provavelmente pelo fato de a agmatina não ser armazenada nos astrócitos (REGUNATHAN et al., 1995; REIS et al., 1998; OTAKE et al., 1998; REIS e REGUNATHAN, 2000). Os neurônios que contém agmatina estão localizados em regiões cerebrais relacionadas com o controle visceral e neuroendócrino, processamento das emoções, percepção da dor e cognição (REIS e REGUNATHAN, 2000). Através de técnica de imunohistoquímica, utilizando anticorpos específicos para a agmatina, foi demonstrado que ela está amplamente distribuída no cérebro de rato, principalmente no córtex cerebral, tronco encefálico, mesencéfalo, tálamo e hipotálamo (WANG et al, 1995; OTAKE et al., 1998). A distribuição dos neurônios contendo agmatina relaciona-se com o padrão de distribuição dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos e os sítios de ligação imidazólicos, tendo em vista que (1) na maior parte das regiões, onde a agmatina está presente, também são expressos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos e sítios de ligação imidazólicos (KAMISAKI et al., 1990; DE VOS et al., 1991, 1994; NICHOLAS et al., 1993, 1996; KING et al., 1995; RUGGIERO et al., 1995; RAASCH et al., 2001) e (2) os neurônios agmatinérgicos são encontrados em regiões cerebrais nas quais se projetam para áreas que contém receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos e sítios de ligação imidazólicos (JONES e YANG, 1985; SAPER et al., 1986;

BERENDSE e GROENEWEGEN 1991; RAASCH et al., 2001). Os sítios imidazólicos são subdivididos em 3 grupos, baseados na sua distribuição e afinidade por ligantes. Tem sido proposto que os sítios de ligação imidazólicos, entre outras funções, exercem atividade neuroprotetora (QIU e ZHENG, 2006), além de modular respostas comportamentais e neuroendócrinas em modelos animais de estresse (SMITH et al., 2009), depressão (HALARIS e PILETZ, 2001, ZOMKOWSKI et al., 2002, 2004, 2005, 2006, BUDNI et al., 2007) e até mesmo na dor (BORONAT, et al., 1998). Os sítios imidazólicos I<sub>1</sub> estão localizados no córtex frontal e no bulbo ventrolateral, sendo que, estes sítios são os mais bem estudados tanto fisiologicamente quanto farmacologicamente. Entre outras funções, os sítios I<sub>1</sub> estão associados com a regulação central da pressão sanguínea. Os sítios imidazólicos I<sub>2</sub> são encontrados em vários tecidos, tais como cérebro, fígado, estômago e rim, sendo que evidências experimentais sugerem que a ativação dos receptores I<sub>2</sub> promove efeito neuroprotetor por aumentar a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), inibir a atividade da monoamino oxidase (MAO) e reduzir o acúmulo de cálcio celular (QIU e ZHENG, 2006). Neste sentido, Raasch e colaboradores (1999) demonstraram que o tratamento crônico com ligantes específicos para I<sub>1</sub> também reduz a atividade da MAO em vários órgãos de rato. Os sítios imidazólicos I<sub>3</sub> foram os últimos a serem identificados e conseqüentemente os menos estudados até o momento, no entanto, parecem estar envolvidos na secreção de insulina pelas células β do pâncreas (MICHEL e ERNSBERGER, 1992; EGLIN et al., 1998; RAASCH et al., 2001, HEAD, 2003).

Da mesma forma que os astrócitos, as demais células da glia também sintetizam agmatina, além disso, expressam os sítios imidazólicos. Com isso, pode-se sugerir que a agmatina sintetizada pelas células gliais é liberada para o espaço extracelular para subsequente transporte e armazenamento em neurônios (FENG et al., 1997; REIS e REGUNATHAN, 2000). Em concordância com esta hipótese, dados da literatura demonstram que a agmatina presente no espaço extracelular pode ser transportada e armazenada em neurônios (KUZIRIAN et al., 1986; SASTRE et al., 1997; GRÜNDEMANN et al., 2003). No entanto, em tecidos periféricos também existe uma dissociação entre síntese e armazenamento de agmatina, por exemplo, em vasos sanguíneos a agmatina é armazenada tanto nas células endoteliais quanto nas células da musculatura lisa vascular, mas apenas o endotélio expressa a enzima ADC. Assim, supõe-se que a agmatina, pelo menos em vasos sanguíneos, é sintetizada no endotélio e posteriormente transportada e armazenada nas células do músculo liso vascular (REGUNATHAN et al., 1996). SASTRE e colaboradores (1997) propuseram que a agmatina, liberada por exocitose dependente de cálcio, é inativada em nível central por mecanismos dependentes da recaptação sinaptossomal. No entanto,

GRÜNDEMANN e colaboradores (2003) identificaram duas proteínas transportadoras não-neuronais para a agmatina: Transportador de cátion orgânico 2 (OCT-2) e Transportador extra-neuronal de monoaminas (EMT), respectivamente em ratos e humanos. Estas proteínas apresentam eficiência, especificidade e transportam a agmatina de forma bidirecional através da membrana, sendo que, o transportador identificado em humanos demonstrou ser mais eficiente. Além do mecanismo de recaptação, a agmatina também pode ser inativada, em nível central, por um mecanismo de degradação enzimática por ação da enzima agmatinase, que a converte em putrescina como mostrado na figura 4. Além disso, a atividade da arginase, enzima que hidrolisa a L-arginina em ornitina e uréia, é dependente de agmatina (SASTRE et al., 1996, RAACH, 2001). A putrescina (Fig. 4) é precursor para a biossíntese das outras poliaminas (espermidina e espermina), sendo esta via presente em mamíferos por decorrência da ação da enzima ornitina descarboxilase (ODC) (REIS e REGUNATHAN, 2000).

Neste sentido, a agmatina preenche vários requisitos importantes para ser classificada como um neurotransmissor clássico, podendo assim ser enquadrada como um novo neurotransmissor/neuromodulador no SNC, pois ela: (1) possui uma enzima responsável por sua síntese e uma pela sua degradação; (2) é armazenada em vesículas e liberada mediante exocitose dependente de cálcio e (3) liga-se a alvos específicos (para revisão ver REIS e REGUNATHAN, 2000; RAASCH et al., 2001).



**Figura 4:** Biossíntese da agmatina em mamíferos. Adaptado a partir de Reis e Regunathan, 2000 e Raasch et al., 2001.

É importante salientar que a agmatina apresenta várias ações farmacológicas importantes, entre elas a capacidade de se ligar com alta afinidade aos sítios de ligação imidazólicos e aos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos e estimular a liberação de catecolaminas e alguns hormônios (LI et al, 1994; REIS e REGUNATHAN, 2000; RAASCH et al., 2001; BERKELS et al., 2004). Além disso, a agmatina exerce uma importante função na neurotransmissão no SNC, pois é capaz de bloquear as correntes iônicas geradas pela ativação de receptores NMDA de forma dependente da concentração e da voltagem sem, no entanto, alterar o influxo iônico provocado pela ativação dos receptores AMPA e cainato. Este bloqueio nos receptores NMDA acontece de maneira não-competitiva e ocorre em um sítio dentro do poro do canal do receptor. De fato, muitos neurônios glutamatérgicos pré-sinápticos, principalmente neurônios hipocámpais, contêm agmatina, sugerindo assim que a agmatina e o glutamato são co-localizados no mesmo terminal. Alguns trabalhos também demonstram que a agmatina é capaz de modular a atividade de canais iônicos operados por ligantes, como o receptor nicotínico e o 5-HT<sub>3</sub>, ativados pela acetilcolina e serotonina, respectivamente. Além disso, é importante ressaltar que a agmatina é capaz de inibir todas as isoformas da sintase do óxido nítrico (NOS) (GALEA et al., 1996; REIS et al., 1998; REGUNATHAN et al., 1999; YANG e REIS, 1999; REIS e REGUNATHAN, 2000; RAASCH et al., 2001; WEISINGER, 2001; BERKELS et al., 2004).

Devido a sua influência em diferentes sistemas de neurotransmissores e hormônios, estudos têm demonstrado que a agmatina exerce diversas funções fisiológicas importantes tanto centralmente quanto periféricamente. Em nível periférico exerce uma importante função cardiovascular no controle da pressão arterial em nível cardíaco e vascular (para revisão ver RAASCH et al., 2001). A agmatina modula o metabolismo da glicose e insulina, além de promover a liberação de adrenalina e noradrenalina das células cromafins da adrenal e liberação de insulina das ilhotas de Langerhans pancreáticas (ALBERTI et al., 1973; SCHWARTZ et al., 1997; REIS e REGUNATHAN, 2000). Recentemente foi demonstrado que o fígado desempenha papel fisiológico crucial na regulação da manutenção da agmatina em humanos (HAENISCH et al., 2008). No rim, a agmatina é natriurética, aumenta a excreção de íons Na<sup>+</sup> e a filtração glomerular (SCHWARTZ et al., 1997). A agmatina também é dotada de funções em nível gastrointestinal. GLAVIN e colaboradores (1995) demonstraram que a agmatina possui atividade pró-secretória e ulcerogênica, pois ela aumenta a secreção de ácido gástrico e pepsina, reduz a espessura do muco e ainda exacerba as lesões na mucosa induzidas por estresse. A *Helicobacter pylori*, bactéria gram-negativa causadora de úlcera gástrica e duodenal apresenta atividade da enzima ADC, podendo levar a síntese e liberação de agmatina (TOMB et al., 1997; RAASCH et al., 2001). O crescimento

desta bactéria é dependente das concentrações de agmatina, além disso, a quantidade de agmatina encontrada no suco gástrico de pacientes infectados com *H. pylori* é aproximadamente o dobro daquelas encontradas em pacientes não-infectados (RAASCH et al., 2001). A agmatina também está envolvida nos processos de crescimento celular (para revisão ver RAASCH et al., 2001). De fato, recentes trabalhos têm demonstrado que agmatina é capaz de inibir a proliferação de células tumorais (DUDKOWSKA et al., 2003; GARDINI et al., 2003; KRIBBEN et al., 2004; MOLDERINGS et al., 2004; HAENISCH et al., 2008).

Em nível central também são atribuídas diversas funções neurobiológicas para a agmatina. No SNC, a agmatina promove a liberação do hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH) do hipotálamo (KALRA et al., 1995, REIS E REGUNATHAN, 2000). Além disso, foi demonstrado que após tratamento de ratos com glicocorticóides, ocorre uma alteração nos níveis endógenos de agmatina e na expressão de ADC no cérebro. Neste sentido, o tratamento com agmatina preveniu alterações morfológicas cerebrais causadas pelo tratamento com glicocorticóide (ZHU et al., 2007). A agmatina apresenta ainda importante atividade neuroprotetora em diversos modelos animais de isquemia focal, global e isquemia da medula espinhal, promovendo redução de infartos isquêmicos, perda de neurônios hipocámpais e aceleração da recuperação do déficit motor (GILAD et al., 1996; GILAD e GILAD, 2000; OLMOS et al., 1999). Recentemente, Hong e colaboradores (2009) demonstraram que a agmatina promove neuroproteção por inibir apoptose induzida por TNF- $\alpha$  em cultura de células de gânglio de retina de ratos. A agmatina também apresenta efeito antidepressivo em alguns modelos comportamentais de depressão (ZOMKOWSKI et al., 2002, 2004, 2005; ARICIOGLU e ALTUMBAS, 2003; LI et al., 2003). Outras possíveis funções neurofisiológicas também são atribuídas para a agmatina, incluindo propriedade cognitiva (ARTENI et al. 2002), ansiolítica (ARICIOGLU e ALTUMBAS, 2003; LAVINSKY et al., 2003) e anticonvulsivante (DEMEHRI et al., 2003), além de participar do controle da dor (FAIRBANKS et al., 2000; KEKESI et al., 2004; SANTOS et al., 2005).

### ***1.5 AGMATINA E DOR***

Nos últimos anos, há um número crescente de evidências indicando que a agmatina inibe a transmissão nociceptiva em nível central e previne os estados de alodínia, hiperalgesia e autotomia que acompanham a hipernocicepção provocada por inflamação, lesão da medula espinhal e lesão de nervo periférico em modelos animais de dor inflamatória e neuropática (HORVÁTH et al., 1999; FAIRBANKS et al., 2000; ARICIOGLU-KARTAL et al., 2003; HOU et al., 2003; KARADAG et al., 2003; ÖNAL et al., 2003; YU et al., 2003; KEKESI et



al., 2004; SANTOS et al., 2005; COURTEIX et al., 2007). Assim, a agmatina é capaz de promover antinocicepção (analgesia) ou anti-hipernocicepção contra estímulos nocivos (anti-hiperalgesia) e não-nocivos (anti-alodinia) que aparecem após lesão de tecido (NGUYEN et al., 2003). A agmatina também promove um aumento, de maneira dependente da dose, da analgesia causada pela morfina, particularmente quando administrada pela via intratecal (i.t.) (YESILYURT e UZBAY, 2001). Esta ação parece estar relacionada com as evidências de que, cronicamente, a agmatina inibe a tolerância e os sintomas de retirada aos opióides (por exemplo, morfina) em ratos e camundongos (KOLESNIKOV et al., 1996; ARICIOGLUKARTAL e REGUNATHAN, 2002; ARICIOGLU et al., 2004). Neste sentido, GAO e colaboradores (2008) demonstraram que o efeito da agmatina na tolerância produzida por opióides está relacionado a uma inibição da internalização e da *down-regulation* do receptor  $\mu$ -opióide via ativação do receptor  $I_1$ -imidazólico. Além disso, MORGAN e colaboradores (2002) demonstraram que a agmatina também modula eventos neuroadaptativos relacionados à auto-administração crônica de opióide em ratos. Entretanto, apesar do crescente número de trabalhos demonstrando o efeito antinociceptivo e anti-hipernociceptivo da agmatina em diferentes espécies, seu preciso mecanismo de ação ainda permanece não compreendido por completo.

Neste sentido, o presente trabalho propõe elucidar alguns dos mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva da agmatina em alguns modelos de nocicepção aguda, crônica de origem inflamatória e neuropática em camundongos. Também se procurou verificar a ação da agmatina em relação à recuperação da função sensório-motora e a regeneração de nervo periférico de ratos submetidos à lesão por esmagamento do nervo ciático. Além disso, analisou-se o efeito da agmatina na ativação de microglias e astrócitos na medula espinhal dos ratos submetidos à lesão do nervo ciático por esmagamento.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivos analisar os mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva da agmatina, bem como sua ação sobre a recuperação da função sensório-motora e da regeneração de nervo periférico e a ativação de células gliais na medula espinhal, através de estudos farmacológicos “*in vivo*”, “*in vitro*” e “*ex vivo*” em camundongos e ratos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar a atividade antinociceptiva da agmatina, administrada sistemicamente nos modelos de nocicepção induzida pelo ácido acético, pelo glutamato, por agonistas glutamatérgicos específicos e por citocinas pró-inflamatórias em camundongos.

Verificar a participação dos subtipos de receptores opióides, da proteína  $G_{i/o}$  sensível à toxina pertussis, dos canais de cálcio, dos canais de potássio, do sistema gabaérgico, do sistema adenosinérgico e da glândula adrenal na antinocicepção causada pela agmatina no modelo de nocicepção causada pelo ácido acético em camundongos.

Verificar a participação dos subtipos de receptores adenosinérgicos envolvidos na antinocicepção causada pela agmatina no modelo de nocicepção causada pelo glutamato em camundongos.

Verificar a atividade da agmatina administrada sistemicamente, no modelo de dor inflamatória crônica causada pelo CFA em camundongos, bem como analisar seu possível efeito sob o edema de pata e a atividade da enzima mieloperoxidase induzidos pelo CFA.

Verificar a atividade da agmatina, quando administrada sistemicamente, na recuperação da função sensório-motora, bem como sua ação sobre a regeneração do nervo ciático no modelo de dor neuropática causada pelo esmagamento do nervo ciático em ratos, através de experimentos histomorfométricos.

Verificar o efeito da agmatina administrada sistemicamente sobre parâmetros morfológicos e atividade astrocitária e microglial no corno dorsal da medula, no modelo de dor neuropática causada pelo esmagamento do nervo ciático em ratos.

### 3. MATERIAIS

#### 3.1 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos Swiss (25 a 35 g) e ratos Wistar (180-210 g) de ambos os sexos obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), mantidos em temperatura controlada de  $22\pm 2^\circ\text{C}$ , em ciclo de 12h claro e 12h escuro (luzes acesas às 6h) e com água e ração *ad libitum*. Os animais (machos e fêmeas foram distribuídos de forma homogênea entre os grupos experimentais) foram mantidos no laboratório para aclimação por pelo menos 1 hora antes da realização dos experimentos, sendo que os experimentos descritos foram realizados de acordo com as normas éticas para o estudo de dor com animais de laboratório (ZIMMERMANN, 1983). O número de animais utilizados e os estímulos empregados foram os mínimos necessários para demonstrar efeito dos tratamentos. Além disso, todos os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC (protocolo 23080.005145/2003-19).

#### 3.2 DROGAS E REAGENTES

As seguintes substâncias foram utilizadas neste trabalho: ácido acético, éter etílico, álcool etílico, xilol, ácido acético, formaldeído, cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), hidrocloreto de morfina,  $\text{H}_2\text{PO}_4$  e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merck, Haar, Germany); sulfato de agmatina, hidrocloreto de ácido L-glutâmico, toxina pertussis, ácido etilenoglicol-bis(b-aminoetil-éter)-N-N'-N'-tetraacético (EGTA), dexametasona, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), hexadeciltrimetil amônio bromido (HTAB), N $\omega$ -nitro-L-arginina (L-NOARG), tetrametilbenzidina, peróxido de hidrogênio, 2,2,2-tribromoetanol, hidrocloreto de naloxona, naloxona metiodida, adjuvante completo de Freund (CFA), Tetraetilamônio (TEA), apamina, caribdotoxina, cafeína, baclofeno, hidrato de cloral, DPCPX, quetamina, xilazina, cloreto de zinco, acetato de cálcio, dicromato de potássio, soro fetal bovino, albumina bovina anticorpo primário anti-GFAP, anticorpo primário anti-OX-42, anticorpo secundário anti-GFAP, anticorpo secundário anti-OX-42 (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA); ácido cálcico (cainato), ácido ( $\pm$ )-1-aminociclopentano-trans-1,3-dicarboxílico (trans-ACPD), ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico (AMPA), ácido N-metil-Daspartico (NMDA), (5S,10R)-(+)-5-Metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d] (MK-801), hidrocloreto de efaroxan, glibenclamida, ZM-241385, naltrindol, dihidrocloreto de norbinaltorfimina, bicuculina, saclofeno (Tocris Cookson Inc., Ellisville, USA); interleucina

1beta (IL-1 $\beta$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (R&D Systems, Minneapolis, USA) cloreto de sódio (LabSynth, Diadema, Brasil). Todas as substâncias foram dissolvidas imediatamente antes do uso em solução salina (0,9%) ou tampão fosfato (PBS).

## 4. MÉTODOS

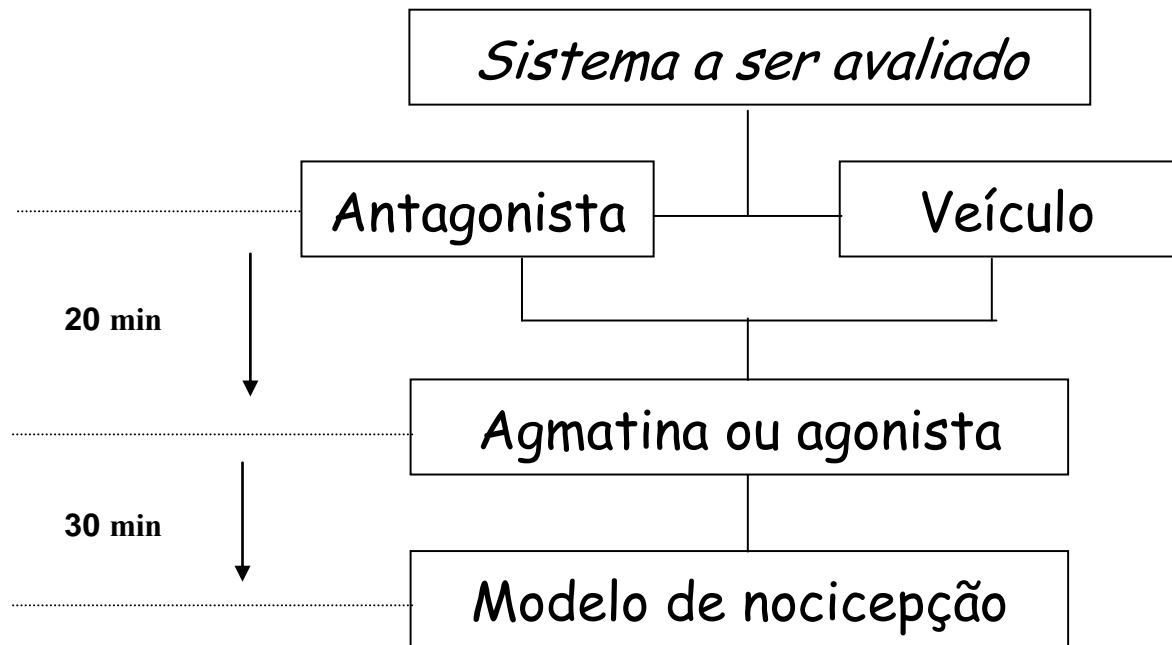
### 4.1 MODELOS DE NOCICEPÇÃO AGUDA

#### 4.1.1 Nociceção induzida pelo ácido acético

Preliminarmente foi verificado o efeito da agmatina no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Este teste é descrito como um modelo de nociceção inflamatória visceral e permite avaliar a atividade antinociceptiva de substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico (KOSTER et al., 1959; VINEGAR et al., 1979; TJØLSEN e HOLE, 1997). A resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético (0,6%) diluído em solução salina (NaCl 0,9%). As contorções abdominais consistem na contração da musculatura abdominal juntamente com a extensão de uma das patas posteriores, de acordo com o método descrito anteriormente (KOSTER et al., 1959; SANTOS et al., 2005). Grupos de animais foram pré-tratados com agmatina pela via intraperitoneal (i.p.) (1–30 mg/kg), 30 min antes da realização dos experimentos, respectivamente, sendo que os grupos controles foram tratados com solução salina (10 ml/kg). Após a injeção do ácido acético os camundongos foram colocados individualmente em funis de vidro e o número de contorções abdominais foi cumulativamente quantificado durante um período de 20 min. A atividade antinociceptiva foi determinada pela inibição do número das contorções abdominais observadas nos animais pré-tratados sistemicamente (i.p.) com agmatina. Os animais foram injetados com ácido acético (0,6%) e o número de contorções abdominais foi avaliado conforme descrito anteriormente.

#### 4.1.2 Estudo de mecanismos de ação no modelo do ácido acético

De acordo com os resultados obtidos no modelo de nociceção anteriormente descrito, a etapa subsequente deste trabalho foi analisar alguns dos mecanismos que poderiam estar envolvidos no efeito antinociceptivo da agmatina. Para este fim a dose de agmatina utilizada para verificar a possível reversão causada por antagonistas foi de 10 mg/kg, administrada pela via i.p., 30 min antes da realização dos experimentos. As doses dos antagonistas ou agonistas utilizadas foram selecionadas com base em dados da literatura ou então obtidas através de resultados prévios do laboratório. Os experimentos foram realizados seguindo o esquema ilustrado na figura 5.



**Figura 5:** Tratamento dos animais na realização dos experimentos de mecanismo de ação utilizando os modelos de nocicepção induzida pelo ácido acético ou glutamato.

Desta forma, foram realizados os seguintes experimentos:

#### 4.1.2.1 Envolvimento dos receptores opióides

Com o objetivo de obter mais informações a respeito da participação dos receptores opióides na ação antinociceptiva da agmatina, os animais foram pré-tratados com o naltrindol (antagonista do receptor  $\delta$ -opióide, 1 mg/kg, i.p.), nor-binaltorfimina (antagonista do receptor  $\kappa$ -opióide, 1 mg/kg, i.p.) ou com naloxona metiodida (antagonista do receptor  $\mu$ -opióide no sistema nervoso periférico, 1 mg/kg, i.p.) 20 min antes da administração de agmatina (10 mg/kg, i.p.) ou salina (10 mg/kg, i.p.) como anteriormente descrito (SANTOS et al., 1998). Outros grupos de animais receberam agmatina, naltrindol, nor-binaltorfimina ou salina e após 30 min de tratamento dos animais com as diferentes substâncias, a resposta nociceptiva foi analisada em relação à nocicepção causada pelo ácido acético.

#### 4.1.2.2 Envolvimento da proteína $G_{i/o}$ sensível à toxina pertussis

Com o objetivo de evidenciar a possível participação da proteína  $G_{i/o}$  sensível à toxina pertussis na ação antinociceptiva da agmatina, grupos de animais foram pré-tratados com toxina pertussis (0,5  $\mu$ g/i.t.) ou com salina (5  $\mu$ l/i.t.). Para a administração intratecal, os animais foram imobilizados manualmente, e uma agulha conectada a uma microseringa de 25  $\mu$ l foi inserida através da pele no espaço subdural entre as vértebras espinhais L5-L6. As

injeções foram administradas durante um período de 5 segundos. Transcorridos 7 dias do pré-tratamento, os animais receberam agmatina (10 mg/kg, i.p.), morfina (5 mg/kg, s.c.) ou salina (10 ml/kg, i.p.) de acordo com o método anteriormente descrito (SANTOS et al., 1999). Após 30 min de tratamento dos animais com as diferentes substâncias, a resposta nociceptiva foi analisada na nocicepção causada pelo ácido acético.

#### **4.1.2.3 Envolvimento do cálcio**

Com o objetivo de verificar a possível participação dos canais de cálcio na ação antinociceptiva da agmatina, os animais foram pré-tratados com cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) (doador de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , 200 nmol/i.c.v.) ou EGTA (quelante de íons divalentes, 30 nmol/i.c.v.) 20 min antes da administração da agmatina (LIANG et al., 2004). Após 30 min do tratamento dos animais com agmatina, a resposta nociceptiva foi analisada em relação a nocicepção causada pelo ácido acético. Grupos de animais controles foram tratados com veículo,  $\text{CaCl}_2$  ou EGTA 30 min antes da injeção de ácido acético. A administração por via i.c.v. foi realizada em camundongos levemente anestesiados com éter, através da inserção da agulha injetora conectada por uma cânula de polipropileno em uma microsseringa Hamilton de 25  $\mu\text{l}$  diretamente no ventrículo lateral esquerdo, com a fissura bregma como referência (1 mm lateral e 1 mm posterior ao bregma e 2,4 mm de profundidade).

#### **4.1.2.4 Envolvimento dos canais de potássio**

A fim de evidenciar a possível participação de diferentes tipos de canais de potássio na ação antinociceptiva da agmatina, grupos de animais foram pré-tratados com glibenclamida (bloqueador dos canais de potássio dependentes de ATP, 80  $\mu\text{g}/\text{i.t.}$ ), tetraetilamônio (TEA, bloqueador dos canais de potássio dependentes de voltagem, 0,1  $\mu\text{g}/\text{i.t.}$ ), apamina (bloqueador dos canais de potássio ligados aos canais de cálcio de baixa condutância, 50 ng/i.t.) ou caribdotoxina (bloqueador dos canais de potássio ligados aos canais de cálcio de alta condutância, 250 pg/i.t.) 20 min antes do tratamento dos animais com agmatina (10 mg/kg, i.p.), morfina (2,5 mg/kg, s.c. utilizada como controle) ou salina (10 ml/kg, i.p.). As doses utilizadas foram semelhantes as utilizadas anteriormente (SANTOS et al., 1999). A resposta nociceptiva causada pelo ácido acético foi avaliada 30 min após a administração de agmatina ou salina. Outros grupos de animais receberam agmatina, salina, morfina, glibenclamida, apamina, TEA ou caribdotoxina e após 30 min do tratamento dos animais com as diferentes substâncias, a resposta nociceptiva foi analisada em relação à nocicepção causada pelo ácido acético.

#### **4.1.2.5 Envolvimento do sistema adenosinérgico**

Com a finalidade de verificar a possível participação do sistema adenosinérgico, na ação antinociceptiva da agmatina, grupos de animais foram pré-tratados com cafeína (antagonista não seletivo dos receptores adenosinérgicos, 3 mg/kg, i.p.) ou com salina (10 ml/kg). Depois de 20 min do pré-tratamento, os animais receberam agmatina (10 mg/kg, i.p.) ou salina (10 ml/kg, i.p.). Após 30 min de tratamento dos animais, a resposta nociceptiva foi analisada em relação à nocicepção causada pelo ácido acético. As doses dos antagonistas utilizados para a realização dos experimentos foram selecionadas baseadas em resultados prévios do laboratório.

#### **4.1.2.6 Envolvimento dos receptores gabaérgicos**

Com o objetivo de evidenciar a possível participação do sistema GABAérgico na ação antinociceptiva da agmatina, grupos de animais foram pré-tratados com bicuculina (antagonista seletivo do receptor GABA<sub>A</sub>, 1 mg/kg, i.p.) ou saclofeno (antagonista seletivo do receptor GABA<sub>B</sub>, 10 mg/kg, i.p.) 20 min antes dos animais receberem agmatina (10 mg/kg, i.p.), muscimol (agonista seletivo do receptor GABA<sub>A</sub>, 0,5 mg/kg, i.p.), baclofeno (agonista seletivo do receptor GABA<sub>B</sub>, 1 mg/kg, i.p.) ou salina (10 ml/kg, i.p.) como anteriormente descrito (SANTOS et al., 1999). Após 30 min do tratamento dos animais com as diferentes agonistas, agmatina ou salina, a resposta nociceptiva foi analisada em relação à nocicepção causada pelo ácido acético.

#### **4.1.2.7 Envolvimento da glândula adrenal**

A fim de verificar a possível contribuição dos glicocorticóides endógenos na ação antinociceptiva da agmatina, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 7% (0,6 ml/kg) e as glândulas adrenais foram retiradas bilateralmente através de incisão cirúrgica dorsal como descrito anteriormente (VAZ et al., 1996). Depois da cirurgia os animais retornaram as suas caixas e permaneceram com comida e bebida à vontade, no entanto a água foi substituída por solução salina (NaCl, 0,9%) para manter a concentração plasmática fisiológica de sódio. Outro grupo experimental foi o “sham-operado” o qual também recebeu com água e comida à vontade. Após uma semana, os animais receberam agmatina (10 mg/kg, i.p.) ou salina (10 mg/kg, i.p.) 30 min antes da injeção de ácido acético. Os animais “sham-operados” foram utilizados com controles.



#### **4.1.3 Nociceção induzida pela injeção intraplantar de glutamato**

Este modelo se presta ao estudo de substâncias que atuam sobre o sistema glutamatérgico (BEIRITH et al., 2002). Este sistema de neurotransmissor é um dos mais importantes sistemas envolvidos na modulação da nociceção e da antinociceção tanto em nível periférico quanto central (FUNDYTUS, 2001; RIEDEL e NEECK, 2001). Além disso, a injeção i.pl. de glutamato induz a estimulação direta dos neurônios nociceptivos, causando assim a liberação de vários mediadores inflamatórios e neuropeptídeos também envolvidos na transmissão nociceptiva (BEIRITH et al., 2003).

Sendo assim, esse teste foi empregado com o objetivo de evidenciar a possível interação do sistema glutamatérgico na ação antinociceptiva da agmatina. Para isso os animais foram colocados individualmente em funis de vidro e logo após receberam 20 µl de solução de glutamato tamponado (20 µmol/pata) na região intraplantar da pata posterior direita. Durante os 15 min subseqüentes, foi cronometrado o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com glutamato, tempo este que foi considerado como indicativo de nociceção (BEIRITH et al., 2002). Os animais foram tratados com a agmatina pela via i.p. (10–100 mg/kg, 30 min antes), os grupos controles foram tratados com solução salina (10 ml/kg).

#### **4.1.4 Nociceção induzida por agonistas glutamatérgicos**

Com o objetivo de evidenciar mais diretamente a participação dos receptores glutamatérgicos na ação antinociceptiva da agmatina, foi avaliado efeito da agmatina (1–100 mg/kg), L-NOARG (inibidor da síntese de NO, 75 mg/kg) e MK-801 [antagonista do receptor NMDA, numa dose baixa (0,05 mg/kg) ou alta (0,5 mg/kg)], administradas por via intraperitoneal, 30 min antes da nociceção decorrente da injeção i.t. de glutamato, NMDA, cainato, AMPA ou trans-ACPD. Além disso, para investigar diretamente o papel dos receptores glutamatérgicos em nível espinhal na ação antinociceptiva da agmatina, seu efeito foi avaliado quando administrada pela via i.t. (10–100 µg/site, 10 minutos antes) na nociceção causada pelo NMDA ou trans-ACPD. Os animais receberam uma injeção i.t. de 5 µl dos agonistas glutamatérgicos. O procedimento foi realizado em camundongos conscientes de acordo com o método descrito por Hylden e Wilcox (1980). Os animais foram imobilizados manualmente, e uma agulha conectada a uma microseringa de 25 µl foi inserida através da pele no espaço subdural entre as vértebras espinhais L5-L6. As injeções foram administradas durante um período de 5 segundos e a resposta nociceptiva foi causada pelo glutamato (aminoácido excitatório, 175 nmol/sítio), AMPA (agonista seletivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos do subtipo AMPA, 135 pmol/sítio), NMDA (agonista seletivo

de receptores glutamatérgicos ionotrópicos do subtipo NMDA, 450 pmol/sítio), cainato (agonista seletivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos do subtipo cainato, 110 pmol/sítio) ou trans-ACPD (agonista específico dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos, 50 nmol/sítio, i.t.) (SCHEIDT et al., 2002). O tempo total em que os animais permaneceram lambendo ou mordendo a região inferior do corpo (membros inferiores, cauda, dorso e abdome) foi contado com um cronômetro e considerado indicativo de nocicepção. A reação comportamental foi avaliada em tempos específicos, imediatamente após a injeção i.t. de cada agonista utilizado: trans-ACPD: 15 min; NMDA: 5 min; cainato: 4 min; glutamato: 3 min; e AMPA: 1 min (SCHEIDT et al., 2002).

#### **4.1.5 Nocicepção causada por citocinas pró-inflamatórias**

Para verificar a participação de citocinas pró-inflamatórias em nível espinhal na antinocicepção causada pela agmatina, verificou-se sua ação contra a nocicepção causada pela injeção i.t. de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) em camundongos. O procedimento foi realizado conforme descrito no item 4.1.2.2. A resposta nociceptiva foi causada pela injeção TNF- $\alpha$  (0,1 pmol/site, i.t.) or IL-1 $\beta$  (1 pmol/site, i.t.). Animais controles receberam um volume similar do veículo pela via i.p. (10 ml/kg). Os animais foram observados individualmente por 15 min logo após a injeção intratecal. O tempo total em que os animais permaneceram lambendo ou mordendo os membros inferiores, cauda, dorso ou abdome, foi cronometrado e considerado indicativo de nocicepção. As doses de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foram pré-determinadas com base em experimentos realizados em nosso laboratório.

#### **4.1.6 Envolvimento do sistema adenosinérgico**

Com o objetivo verificar a participação dos subtipos de receptores adenosinérgicos na ação antinociceptiva da agmatina, grupos de animais foram pré-tratados com DPCPX (antagonista seletivo do receptor A<sub>1</sub>, 5 mg/kg, i.p.) ou ZM-241385 (antagonista seletivo do receptor A<sub>2A</sub>, 3 mg/kg, i.p.) 20 min antes dos animais receberem agmatina (10 mg/kg, i.p.) ou salina (10 ml/kg, i.p.). Após 30 min do tratamento dos animais com agmatina ou salina, a resposta nociceptiva foi analisada em relação à nocicepção causada pelo glutamato. As doses dos antagonistas utilizados para a realização dos experimentos foram selecionadas baseadas em resultados prévios do laboratório.

Também analisou se, no modelo do glutamato, uma possível ação antinociceptiva sinérgica da administração de doses sub-ativas de adenosina (30 mg/kg, i.p.) e agmatina (10 mg/kg, i.p.). Além disso, foi verificada a possível participação dos sistemas opióide e imidazólico, além do sistema adenosinérgico, nesta ação antinociceptiva causada pela ação

sinérgica de adenosina e agmatina em doses sub-ativas no modelo do glutamato. Os experimentos foram realizados seguindo o esquema ilustrado na figura 5. Para esta finalidade, os animais foram pré-tratados com DPCPX (antagonista seletivo do receptor A<sub>1</sub>, 5 mg/kg, i.p.), ZM-241385 (antagonista seletivo do receptor A<sub>2A</sub>, 3 mg/kg, i.p.), naloxona (antagonista não seletivo dos receptores opióides, 1 mg/kg, i.p.) ou efaroxan (antagonista misto dos receptores I-imidazólico/  $\alpha_2$ -adrenérgico) como descrito anteriormente (SANTOS et al., 2005). Depois de 20 min os animais receberam adenosina (30 mg/kg, i.p.) e após 15 min receberam agmatina (10 mg/kg, i.p.). Outros grupos de animais foram administrados com salina (10 ml/kg, i.p.) e após 15 min receberam agmatina ou adenosina e após 15 min receberam salina. Depois de 30 min dos animais receberem o último tratamento da associação (agmatina ou salina), sendo as possíveis reversões do efeito antinociceptivo sinérgico da associação de adenosina e agmatina analisadas no modelo do glutamato.

## ***4.2 Modelos de nociceção Crônica***

### **4.2.1. Inflamação induzida pelo Adjuvante Completo de Freund (CFA)**

Inicialmente os camundongos foram anestesiados por inalação de oxigênio (3%) e isoflurano (2%) para receberem em seguida 20  $\mu$ l de CFA (*Mycobacterium tuberculosis* liofilizados) pela via intraplantar (i.pl.) (FERREIRA et al., 2001). A pata contralateral (esquerda) recebeu o mesmo volume de solução salina tamponada (PBS; 137nmol/l de NaCl; 2,7 de nmol/l de KCl; e 10 nmol/l de tampão fosfato). Os grupos controles receberam 20  $\mu$ l de PBS na pata ipsilateral. A dose de CFA utilizada foi a necessária para produzir significativo edema de pata e hiperalgesia mecânica ipsilateral. Para avaliar o efeito do tratamento agudo da agmatina em relação à nociceção crônica induzida pela injeção de CFA (24 h depois dos animais receberem a injeção intraplantar de CFA), a hiperalgesia mecânica foi avaliada imediatamente antes do tratamento (tempo 0) e em 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10 e 24 h após o tratamento com agmatina. Para investigar os efeitos do tratamento prolongado dos camundongos com agmatina (30 mg/kg, i.p.), a administração foi realizada duas vezes por dia (durante 12 dias). A hiperalgesia mecânica foi avaliada 4 h depois do primeiro tratamento diário (tempo da máxima inibição observada no tratamento agudo). O tratamento repetido se estendeu do 4º ao 10º dia após a injeção de CFA, sendo que, foi interrompido por 3 dias. Passados estes 3 dias, o tratamento foi reiniciado para avaliar aparecimento de uma possível tolerância causada pela agmatina (BORTOLANZA et al., 2002).

#### **4.2.2 Neuropatia induzida pela ligação parcial do nervo ciático em camundongos**

Inicialmente os camundongos foram anestesiados com hidrato de cloral 7% (0,6 ml/kg). Em seguida, foi realizada uma incisão cirúrgica para localizar o nervo ciático dos animais. Uma vez o nervo localizado, foi realizada a amarração aproximadamente na porção 1/3 a 1/2 distal, de acordo com o método anteriormente descrito (MALMBERG e BASBAUM, 1998). Nos animais falsos operados, o nervo ciático foi exposto sem ligação. A lesão foi fechada e coberta solução iodada. Após a cirurgia foram esperados cinco dias, para recuperação dos animais, antes de começar os procedimentos comportamentais. A cirurgia produziu significativa hiperalgesia mecânica ipsilateral. Os animais operados receberam agmatina (30 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) e animais do grupo “sham”-operados receberam apenas veículo (10 ml/kg,i.p.) 5 dias depois da cirurgia. A hiperalgesia mecânica foi avaliada imediatamente antes (tempo 0) e em 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; e 24 h depois do tratamento dos animais com agmatina.

#### **4.2.3 Avaliação da hiperalgesia mecânica**

A hiperalgesia mecânica foi avaliada conforme descrita anteriormente (BORTOLANZA et al., 2002). A frequência de resposta de retirada da pata em 10 aplicações do filamento de von Frey de 0,6 g (VFH, Stoelting, Chicago, USA) foi expressa como valor percentual. Os camundongos foram aclimatizados em caixas de acrílico individuais (9 x 7 x 11 cm) em uma plataforma elevada para permitir o acesso a superfície ventral das patas traseiras dos animais. A frequência de retirada foi determinada antes e depois da ligação parcial do nervo ciático ou da injeção de CFA.

#### **4.2.4 Avaliação do edema de pata**

O edema de pata foi avaliado com um plestimômetro (modelo Ugo basile, Comerio, VA, Italy) em vários tempos diferentes após a injeção de CFA. O edema de pata foi expresso em mililitros através da diferença de volume entre as patas direita e esquerda. Para avaliar o possível efeito da agmatina em prevenir (efeito profilático) o edema de pata induzido pelo CFA, os animais receberam agmatina (30 mg/kg, i.p.) 30 min antes da injeção i.pl. de CFA. O aumento no volume das patas foi avaliado em 1, 2, 4, 6, 8 e 24 h depois da injeção de CFA. Para avaliar o possível efeito terapêutico da agmatina, os mesmos animais foram tratados com agmatina (30 mg/kg, i.p.) 24 h depois da injeção de CFA e o volume das patas foram avaliados em 1, 2, 4 e 6 h depois da administração de agmatina no 2º dia (Paszczuk et al., 2007).

#### 4.2.5 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase

O recrutamento de neutrófilos para a pata dos camundongos foi avaliado pela medida da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) conforme descrito anteriormente (SOUZA et al., 2000). Os animais foram tratados com agmatina (30 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg) e após 30 min receberam uma injeção intraplantar de 20µl de CFA ou salina (usado com controle) na pata direita. Após 3 h da injeção de CFA ou salina na pata os animais foram sacrificados e o tecido sub-cutâneo foi removido, homogeneizado em 5% (p/v) em tampão EDTA/NaCl (pH 4,7) e centrifugado a 10.000 rpm por 15 min a 4°C. O *pellet* foi resuspenso em tampão hexadeciltrimetilamôniobromido (pH 5,4) e as amostras foram congeladas e descongeladas 3 vezes em nitrogênio líquido. No descongelamento, as amostras foram centrifugadas (10.000 rpm, 15 min, 4°C) e 25 µl do subrenadante foi utilizado para o ensaio de MPO. A reação enzimática foi avaliada com 1,6 mM de tetrametilbenzidina, 80 mM de tampão fosfato de sódio com pH 7,2 e 0,3 mM de peróxido de hidrogênio. A absorbância foi medida em 650 nm e os resultados expressos em DO (densidade óptica) por miligrama de tecido.

#### 4.2.6 Lesão por esmagamento do nervo ciático (ENC) em ratos

Durante os 10 primeiros dias, que antecederam a cirurgia, os animais receberam treinamento diário para se familiarizarem aos procedimentos de coleta de dados na pista de marcha. Os animais foram anestesiados com uma injeção i.p. de uma mistura contendo quetamina (100 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg). Em seguida, foi realizada uma incisão cirúrgica para localizar o nervo ciático dos animais. Uma vez tendo sido localizado o nervo, foi feito um esmagamento com auxílio de uma pinça cirúrgica, de acordo com os métodos descritos anteriormente por (VAREJAO, 2004). Nos animais falsos operados, o nervo ciático foi exposto sem lesão. Em seguida, um fio de sutura estéril foi amarrado no nervo para marcar o local do esmagamento (para posterior análise histológica), sendo este fio não-absorvível (8-0) (REINECKE et al., 2003). Os animais foram aleatoriamente divididos em 3 grupos compostos por 8 animais: grupo 1 - animais operados sem esmagamento do nervo ciático e que não receberam tratamento (sham ou falso-operado, usado como controle); grupo 2 - animais operados submetidos ao esmagamento do nervo ciático e sem receber tratamento (operados, também foram usados como controle); grupo 3 - animais operados e submetidos ao esmagamento do nervo ciático e receberam tratamento com agmatina (30 mg/kg, i.p.), que iniciou-se no 1º dia após o esmagamento. A agmatina foi administrada 2 vezes por dia, sendo que a primeira injeção diária foi realizada logo após a observação dos parâmetros sensório-motor. As avaliações foram realizadas no período da manhã.

#### **4.2.6.1 Avaliação da recuperação funcional motora em ratos**

Todos os animais foram avaliados em relação aos índices funcionais e a hiperalgesia mecânica, no período anterior a cirurgia [pré-operatório (Pre)], e a cada 3 ou 4 dias até a terceira semana e então toda semana até o término do experimento na quinta semana. Na 5ª semana após a lesão por esmagamento do nervo ciático, os animais foram sacrificados em câmara de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) para coleta do material para as análises histológicas. As análises dos dados foram realizadas após a coleta das imagens em uma pista de marcha feita de madeira e vidro, com 42 cm de comprimento, 8,5 cm de largura e 9 cm de altura para as proteções laterais. O fundo da pista é feito de vidro, sendo que, abaixo da pista está localizado um espelho em um ângulo de 45 graus de inclinação (VAREJÃO et al., 2001; WESTERGA E GRAMBERG, 1990). A digitalização da marcha dos animais foi obtida através de uma câmera filmadora digital da marca Panasonic PV-GS19 Mini DV, posicionada a 1 metro de distância da pista de marcha, a qual gravou as imagens em fita mini DV. As capturas das imagens das pegadas dos ratos na pista de marcha foram feitas com os ratos em perfil e através do espelho colocado embaixo da pista num ângulo de 45° de inclinação. As imagens foram armazenadas digitalmente através do programa “Windows Movie Maker” versão 2.0, sendo que o programa “Image Pro Plus” (versão 6.0, National Instituto of Health) foi utilizado para o cálculo dos parâmetros funcionais com descrito anteriormente por DE MEDINACELI e colaboradores (1982) e adaptada por Bain e colaboradores (1989).

#### **4.2.6.2 Avaliação da função sensorial em ratos**

A hiperalgesia mecânica foi avaliada conforme descrita anteriormente (BORTOLANZA et al., 2002). A frequência de resposta de retirada 10 aplicações do filamento de von Frey de 6 g (VFH, Stoelting, Chicago, USA) foi expressa como valor percentual. A aplicação do filamento de von Frey foi executada utilizando-se uma plataforma construída especialmente para este teste (PITCHER et al, 1999). A plataforma (70 x 40 cm) consiste de uma tela de arame com malha de 6 mm. Para facilitar a aplicação do filamento na superfície ventral da pata posterior, os animais foram colocados individualmente em uma câmara de observação feita em acrílico (9 x 7 x 11 cm) sem fundo e coberta com tampa, posicionada sobre a plataforma para permitir o acesso a superfície ventral das patas traseiras dos animais. As respostas à hiperalgesia mecânica iniciaram no dia anterior ao procedimento cirúrgico (basal pré-cirurgia).

### *4.3 ANÁLISES HISTOLÓGICAS E IMUNOHISTOLÓGICAS*

#### **4.3.1 Análise histológica e morfológica**

Todos os processos de análise histológica e morfológica foram realizados no Laboratório de Marcadores Histo-Citológicos do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética da UFSC.

Na 5ª semana após o esmagamento do nervo ciático, os ratos foram eutanasiados na câmara de CO<sub>2</sub>. O nervo ciático foi retirado através de uma nova incisão no mesmo local da utilizada no procedimento inicial. As amostras foram fixadas em uma solução de formalina-zinco (cloreto de zinco 1.6%, formaldeído 4%, acetato de cálcio 20%) durante 24 h. Após a fixação, as amostras foram colocadas em dicromato de potássio a 5% por 5 dias. Passado esse período, as amostras foram lavadas em água corrente e deixadas na água por toda noite para retirar todo o dicromato antes da desidratação gradual com etanol. Em seguida, foi seccionado um segmento do nervo entre 3 a 5 mm distalmente à lesão. Depois de uma cuidadosa desidratação em etanol, utilizou-se a metodologia de rotina (CARGNIN-FERREIRA e SARASQUETE, 2008), para a inclusão em parafina 58°C, utilizando como líquido intermediário o xilol e levando a cabo as seguintes pautas: Desidratação e inclusão em parafina: Etanol 70% (mínimo 24 horas), Etanol 80% (45 minutos), Etanol 90% (45 minutos), Etanol absoluto 100% I (45 minutos), Etanol absoluto II (45 minutos), Etanol-Xilol 1/1 (45 minutos), Xilol I (45 minutos), Xilol II (45 minutos), Parafina I (1 hora), Parafina II (1 hora), Parafina III (1 hora). Uma vez o material incluído verticalmente em parafina e feitos seus blocos, os mesmos foram cortados em um micrótopo Leica RM 2025 com espessura de 5 µm. Os cortes foram então estirados e recolhidos em um banho termostático a 52°C e dispostos sobre lâminas gelatinizadas para sua fácil adesão.

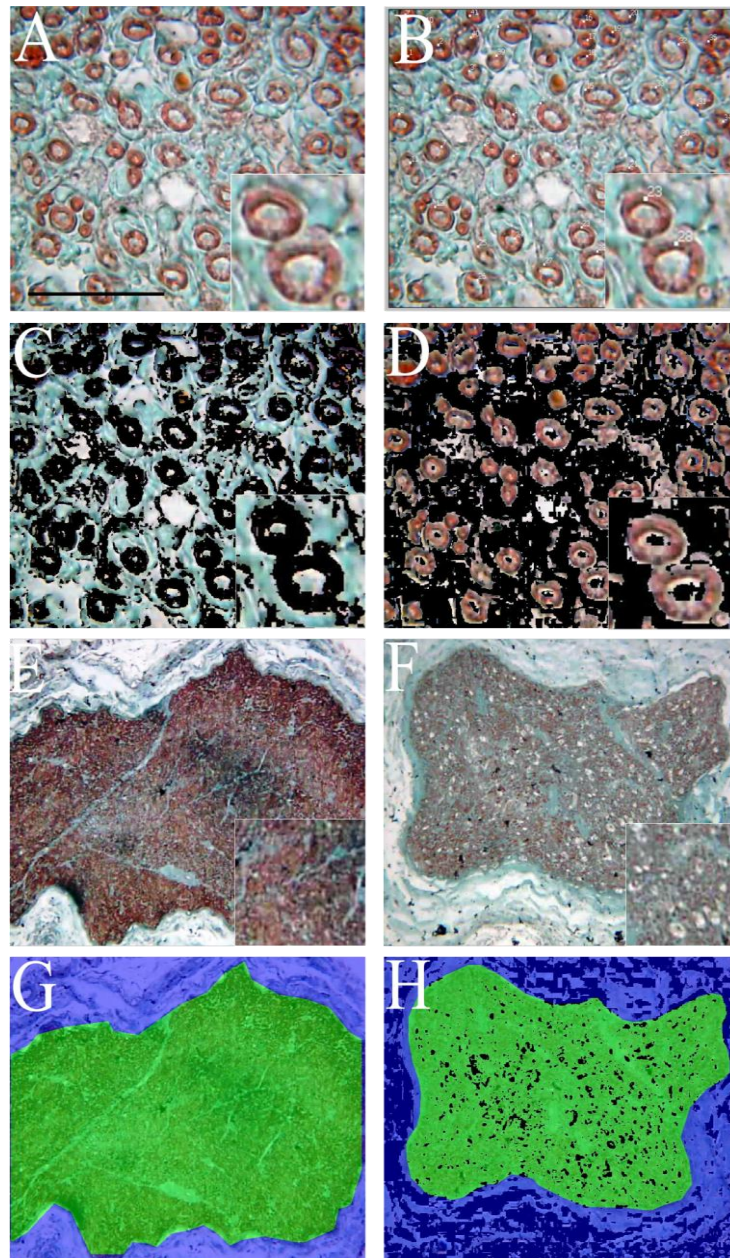
Os cortes obtidos foram desparafinizados e hidratados segundo a metodologia de rotina e corados com a técnica de Cason (CARGNIN-FERREIRA e SARASQUETE, 2008) e “Oil Red” (KIERNAN, 2004) descritas a seguir: As preparações histológicas foram dispostas numa solução de Orange G (1%), Fucsina Ácida (1%), Azul de Anilina (1%) e ácido fosfotúngstico (1%) durante 5 minutos e depois em solução hidroalcolica “Oil Red” (1%) por 1 minuto. Passado esse tempo, as lâminas foram então lavadas para retirada do excesso de corante, desidratadas e montadas em meio de montagem aquosa. O uso desta técnica em detrimento da coloração bicromática hematoxilina-eosina radica no fato de que técnicas tricrômicas, como a usada neste trabalho, evidenciam sobremaneira compostos protéicos e glicídicos assim como estruturas morfológicas similares com cores distintas, aumentando os contrastes e evidenciando melhor as estruturas analisadas.

A análise histológica foi realizada em corte transversal da porção distal do nervo

direito restrita ao tecido conjuntivo e à área de bainha mielinizada. As imagens foram adquiridas usando-se uma câmera digital de microscopia modelo TA – 0124-A, conectada a um microscópio de luz DME (Leica). As imagens foram capturas em aumento de 1000x e ampliada mais 200x para análise, pelo Image Pro Plus Software 6.0 (Media Cybernetics, Bethesda, Maryland). Posteriormente, as imagens foram analisadas em um programa de imagem (Chtool) desenvolvido pelo Projeto Cyclops (Depto. de Informática – UFSC) para análises histopatológicas dos projetos desenvolvidos pelo Dr. Eduardo Cargnin Ferreira e para o Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário. Contrariamente aos procedimentos em análises de imagens histológicas, onde se convertem as imagens policromáticas em uma escala de cinza e se analisam quantitativamente áreas de interesse, o programa atualmente desenvolvido analisa as imagens policromáticas diretamente, o que leva a uma maior precisão nas quantificações planimétricas das alterações histopatológicas porque integram distintas tonalidades de cor derivados das técnicas de coloração utilizadas.

Para a análise morfométrica foram selecionados os melhores cortes, pela microscopia de pequeno aumento, descartando os cortes de má qualidade os quais poderiam prejudicar o processo de medida dos parâmetros. Os critérios de seleção dos cortes foram a integridade da morfologia do nervo, particularmente do perineuro, qualidade da coloração, ausência de artefatos de técnicas (rachaduras, dobras). Depois de corados, os cortes foram observados e fotografados com microscopia de luz e uma série de 5 parâmetros foram quantificados: (1) densidade de fibras mielinizadas (fibras/mm<sup>2</sup>) (Figura 6B) e (2) espessura da bainha de mielina ( $\mu\text{m}$ ) foi realizada com um aumento de 1000x. Para este último parâmetro, foi escolhida uma área representativa, onde foram contados 10 axônios íntegros. (3) área de fibras mielinizadas (%) (Figura 6C); (4) área de tecido conjuntivo (%) (Figura 6D) neste parâmetro os fragmentos de degeneração foram subtraídos da imagem analisada, e (5) fragmentos de degeneração (%) (Figura 6G).





**Figura 6:** Imagens da análise morfométrica das secções transversas do nervo ciático de ratos. (A) porção distal do nervo esmagado após 5 semanas do esmagamento no aumento de 1000x; (B) contagem dos axônios; (C) quantificação da área de fibras mielinizadas; (D) quantificação da área de tecido conjuntivo; (E e G) porção distal do nervo após 5 semanas do esmagamento no aumento de 100x, animal Sham (observar que não apresentam fragmentos de degeneração no meio do tecido); (F e H) quantificação dos fragmentos de degeneração. As secções foram coradas com Cason e “oil red”. Barra da escala: 10µm.

#### 4.3.2 Análise de Imunohistoquímica

Todo o processo de análise imunohistológica foi realizado no Laboratório de Neurobiologia da Nociceção - LANEN do Departamento de Farmacologia UFSC. Após trinta e cinco dias da coleta dos dados comportamentais, os ratos foram anestesiados profundamente com hidrato de cloral (15%, 0,5 g/kg) e perfundidos com tampão fosfato (PBS; 0.1 M; pH 7.4; 300 ml) e em seguida com solução de paraformaldeído em PBS (PFA;

4%; pH 7,4; 500 ml). Depois da perfusão, o segmento da medula espinhal lombar (L4-L5) foi removido, e fixado por 4 h em solução a 4 % de paraformaldeído (4 °C), crioprotelado por 12 h em solução de sacarose a 30 % (4 °C), congelado em meio de congelamento O.C.T. (Optimal Cutting Temperature) (Sakura Finetechnical Co., Ltd., Tokyo, Japan) e armazenado a -80 °C até o uso. Fatias transversas de doze micrometros de espessura foram cortadas com um criostato, descongeladas sobre lâminas de vidro e processadas para marcação imunohistoquímica para GFAP e OX-42. As fatias foram lavadas três vezes com PBS e incubadas em temperatura ambiente com 0,1% de Triton X-100 por 30 min. Para prevenir a marcação não específica, as fatias foram incubadas em temperatura ambiente com soro fetal bovino (SFB; 5%) e albumina bovina (AB; 1%) ambos diluídos em PBS por 1 h. Subsequentemente, as fatias foram incubadas por 12 h a 4 °C com os anticorpos primários: anti-GFAP (anticorpo policlonal; 1:500; DakoCytomation, Carpinteria, USA) e anti-CD11b/c (OX-42; anticorpo monoclonal contra o receptor de complemento 3; 1:200; Invitrogen, New York, USA). Depois da incubação, as fatias foram lavadas três vezes com PBS e incubadas em temperatura ambiente com os anticorpos secundários, FITC (1:100; Sigma, St. Louis, USA) o qual se ligará ao anti-GFAP e Alexa Fluor Red 546 (1:500; Invitrogen, New York, USA) o qual se ligará ao anti-CD11b/c. Os anticorpos foram diluídos em 2 % SFB/PBS. Após a incubação, as fatias foram lavadas três vezes com PBS, foram montadas com glicerina tamponada (pH 9,0) e visualizadas com microscopia fluorescente.

#### **4.3.2.1 Análise quantitativa das imagens**

Todo o processo de análise das imagens foi realizado no Departamento de Biologia Molecular e Sinais Neurais do Instituto Max-Planck de Medicina Experimental em Göttingen, Alemanha. As imagens de imunofluorescência foram adquiridas através de um microscópio Olympus (BX-41) equipado com uma câmera digital (3.3 Mpixel QCOLOR3C, Qimaging<sup>TM</sup>), com lente objetiva de ampliação de 10x, filtros compatíveis para FITC e Alexa Fluor 546 (U-MWG2 e U-MWB2, respectivamente Olympus) e software de aquisição de imagem (Qcapture Pro 5.1, QImaging<sup>TM</sup>). A contagem de células marcadas com OX-42 e GFAP, média de intensidade de fluorescência e análise de morfologia foram realizadas em uma área delimitada na porção medial que compreende a porção medial do corno dorsal da medula espinhal lombar (CDMEL) (lâminas 1 e 2, ipsilateral à lesão do nervo) (Figura – área desenhada). Para tais análises utilizou-se o software de análise de imagem, ImageJ (RASBAND, 2008). As análises foram realizadas em 6 fatias escolhidas aleatoriamente da medula espinhal a nível L4-L5. Sendo que cada grupo experimental foi composto por 6-8 animais. O número de células positivas para GFAP e OX-42 foi normalizado de acordo com

áreas de interesse selecionada para contagem. O tempo de exposição e os parâmetros definidos para o processamento das imagem foi constante para todas as amostras. Subtraiu-se a iluminação não homogênea (*uneven illumination*), a interferência entre fluoróforos (*spectral bleed through*) e o ruído gerado pela câmera (NEHER, 2004). O estudo morfológico foi feito com o plugin Particle 8 Plus desenvolvido para o software Image J (LANDINI, 2008) onde os seguintes parâmetros foram avaliados: perímetro e área de distribuição da célula (definições dos parâmetros morfológicos podem ser encontrado em: <http://www.dentistry.bham.ac.uk/landinig/software/software.html>).

#### 4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

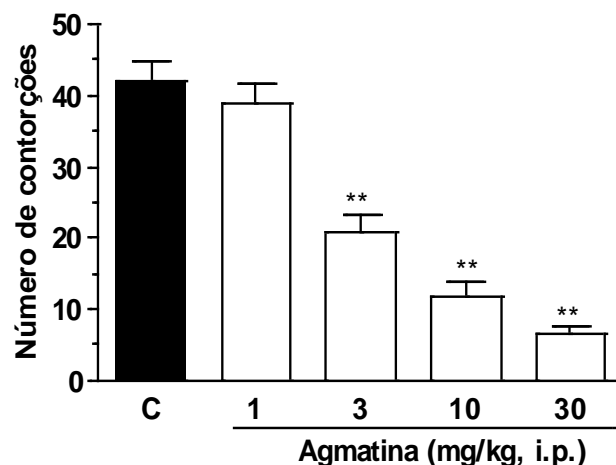
Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), exceto os valores de  $DI_{50}$  (doses de agmatina que reduziram as respostas nociceptivas em 50% em relação ao grupo controle), que estão apresentadas como médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança em nível de 95%. As análises estatísticas entre os grupos experimentais foram realizadas por meio de análise de variância de (ANOVA) seguida do teste *post-hoc* para múltiplas comparações de Bonferroni, Newman-Keuls ou pelo teste de Dunnett. Valores de p menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ) foram considerados como indicativos de significância. Os valores de  $DI_{50}$  foram obtidos através do método de regressão linear utilizando-se o software Graph Pad Instat® (1994, San Diego, CA) versão 4.0

## 5. RESULTADOS

### 5.1 TESTES COMPORTAMENTAIS

#### 5.1.1 Nocicepção induzida pelo ácido acético

Os resultados apresentados na figura 7 mostram que a agmatina, administrada pela via i.p., produziu uma inibição significativa e dependente da dose do número das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos, com valores de  $DI_{50}$  (e seus respectivos limites de confiança de 95%) de 5,6 (3,9-8,0) mg/kg e inibição de  $83 \pm 4\%$ .

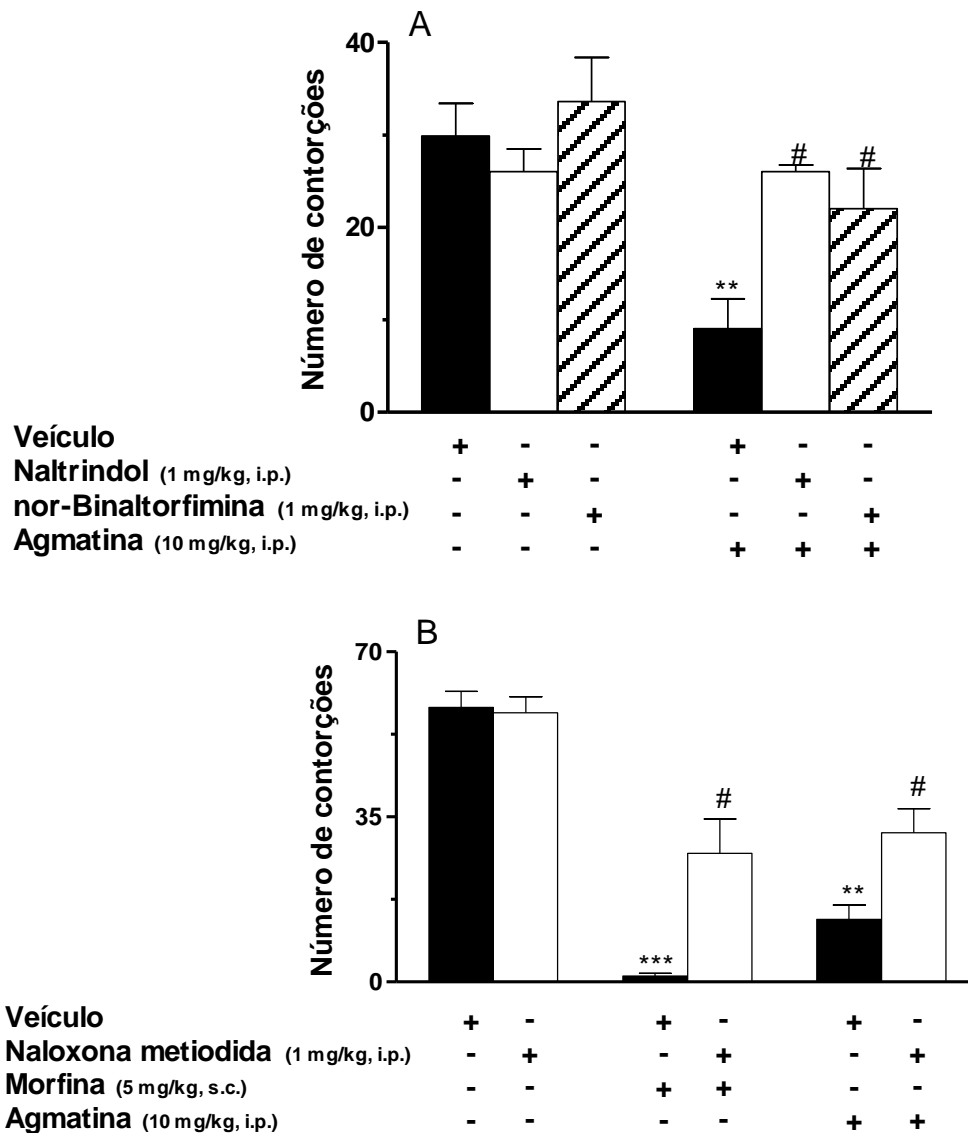


**Figura 7:** Efeito antinociceptivo da agmatina (1-30 mg/kg) administrada pela via i.p. em relação a nocicepção induzida pelo ácido acético (0,6%) em camundongos. Cada grupo representa a média de 8-12 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. \*\*  $P < 0,01$  difere significativamente do grupo controle (C; barra cheia).

#### 5.1.2 Estudo de mecanismos de ação

##### 5.1.2.1 Envolvimento dos receptores opióides

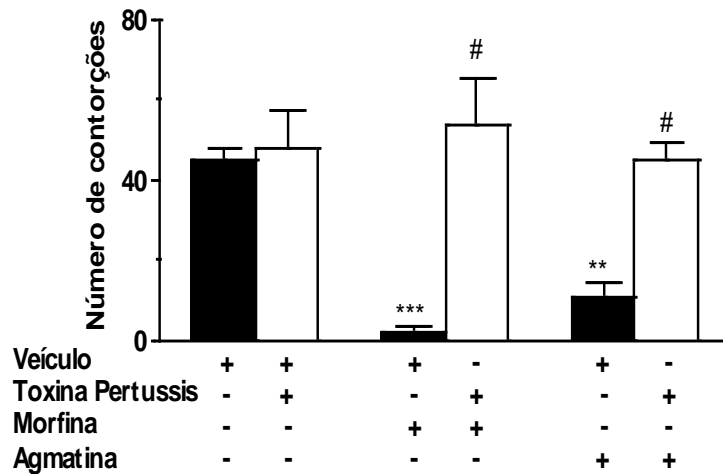
Como pode ser observado na figura 8A, o pré-tratamento dos animais com naltrindol (antagonista seletivo dos receptores  $\delta$ -opióide, 1 mg/kg, i.p.) ou com nor-binaltorfimina (antagonista seletivo dos receptores  $\kappa$ -opióide, 1 mg/kg, i.p.) foi capaz de produzir reversão significativa da antinocicepção causada pela agmatina (10 mg/kg, i.p.) no modelo do ácido acético. Além disso, quando os animais foram pré-tratados com naloxona metiodida (antagonista não seletivo de receptores opióides que não ultrapassa a barreira hematoencefálica, 1 mg/kg, i.p.) também houve um reversão de maneira significativa da antinocicepção causada pela agmatina (10 mg/kg, i.p.) no modelo do ácido acético (Fig. 8B).



**Figura 8:** Influência do pré-tratamento dos camundongos com naltrindol (1 mg/kg, i.p., A) ou nor-binaltorfimina (1 mg/kg, i.p., A) e naloxona metiodida (1 mg/kg, i.p., B) sobre o efeito antinociceptivo da agmatina (10 mg/kg, i.p.) em relação à nocicepção induzida pelo ácido acético (0,6%). Cada grupo representa a média de 6-10 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001 difere significativamente dos grupos controle (veículo, naltrindol, nor-binaltorfimina e naloxona metiodida) e # P < 0,01 difere significativamente dos grupos dos animais tratados com o agonista (agmatina) versus agonista + antagonista (naltrindol, nor-binaltorfimina e naloxona metiodida).

### 5.1.2.2 Envolvimento da proteína $G_{i/o}$ sensível à toxina pertussis

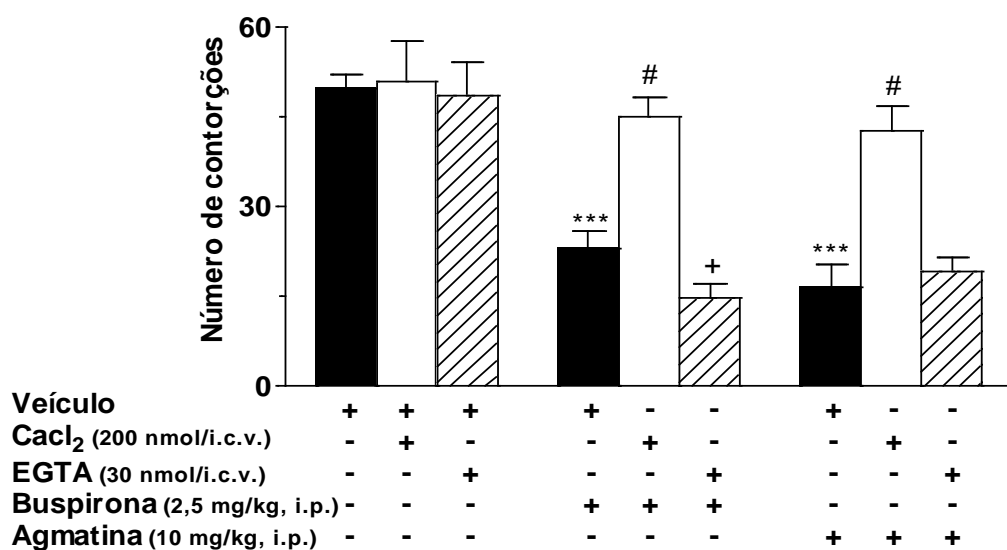
Os resultados apresentados na figura 9 mostram que o pré-tratamento dos animais com toxina pertussis (0,5  $\mu$ g/i.t., 7 dias antes), o qual produz uma inativação da proteína  $G_{i/o}$ , causou uma reversão total da antinocicepção causada pela agmatina (10 mg/kg, i.p.) e pela morfina (5 mg/kg, s.c.) no modelo do ácido acético



**Figura 9:** Influência do pré-tratamento dos camundongos com toxina pertussis (0,5 µg/i.t) sobre o efeito antinociceptivo da agmatina (10 mg/kg, i.p.) em relação à nocicepção induzida pelo ácido acético (0,6%). Cada grupo representa a média de 6-10 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001 difere significativamente dos grupos controle (veículo e toxina pertussis) e # P < 0,01 difere significativamente dos grupos dos animais tratados com os agonistas (agmatina e morfina) versus agonista + antagonista (toxina pertussis).

#### 4.1.2.3 Envolvimento do cálcio

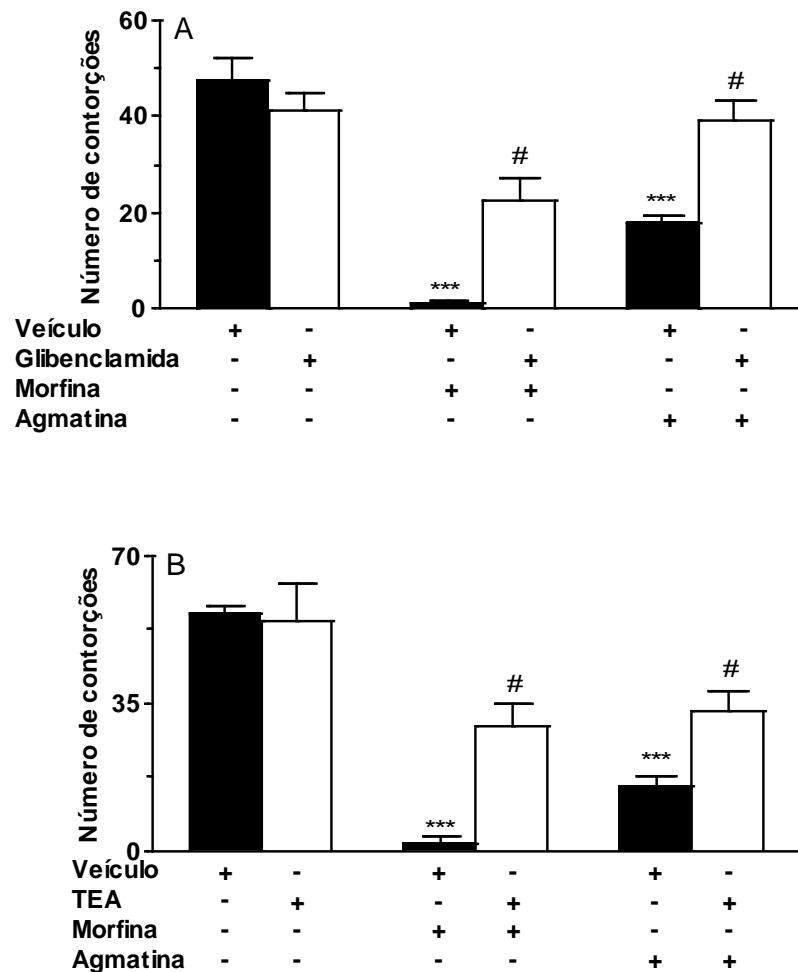
Como podemos observar na figura 10, o pré-tratamento dos animais com CaCl<sub>2</sub> (200 nmol/i.c.v.) reverteu completamente a antinocicepção causada pela agmatina (10 mg/kg, i.p.) e pela bupirona (2,5 mg/kg, i.p.). No entanto, o pré-tratamento com EGTA (30 nmol/i.c.v.) não alterou a resposta antinociceptiva da agmatina no modelo do ácido acético.



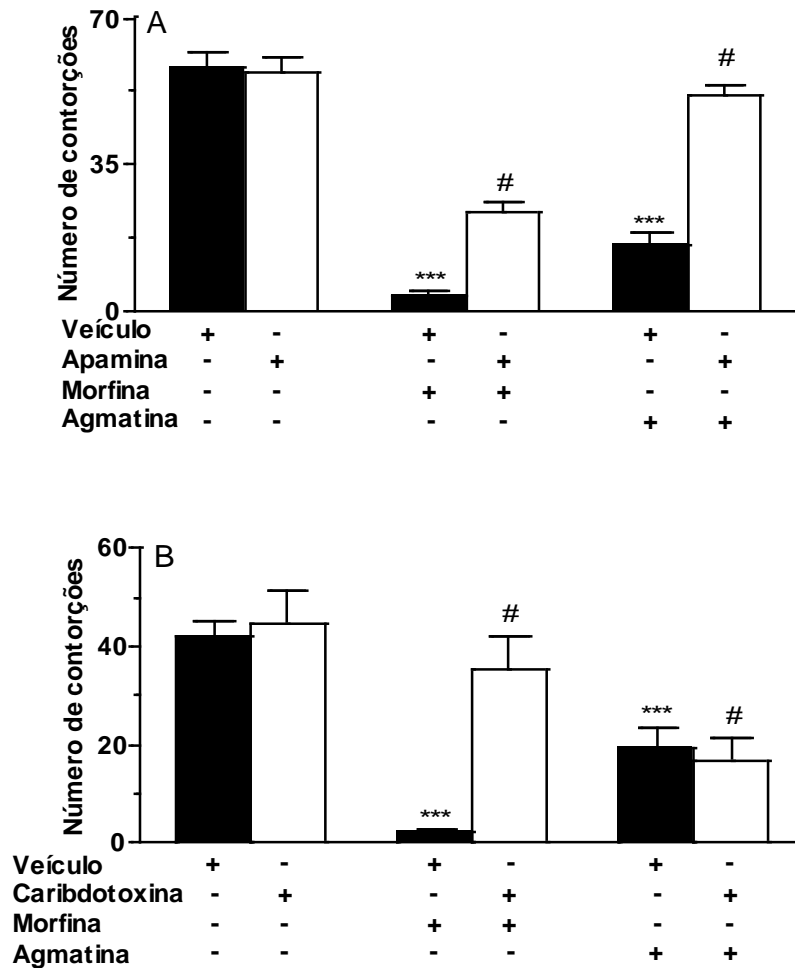
**Figura 10:** Influência do pré-tratamento dos camundongos com CaCl<sub>2</sub> (200 nmol/i.c.v.) ou EGTA (30 nmol/i.c.v.), sobre o efeito antinociceptivo da agmatina (10 mg/kg, i.p.) em relação à nocicepção induzida pelo ácido acético (0,6%). Cada grupo representa a média de 6-10 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. \*\*\* P < 0,001 difere significativamente dos grupos controles (veículo, CaCl<sub>2</sub> e EGTA); # P < 0,01 difere significativamente dos grupos dos animais tratados com os agonistas (agmatina e bupirona) versus agonistas + antagonista (CaCl<sub>2</sub>) e + P < 0,05 difere significativamente dos grupos dos animais tratados com bupirona versus bupirona + EGTA.

### 5.1.2.4 Envolvimento dos canais de potássio

As figuras 11 (A e B) e 12 (A) mostram que o pré-tratamento dos animais com glibenclamida (bloqueador dos canais de potássio dependentes de ATP, 80  $\mu\text{g}/\text{i.t.}$ ), TEA (bloqueador dos canais de potássio dependentes de voltagem, 0,1 $\mu\text{g}/\text{i.t.}$ ) e apamina (bloqueador dos canais de potássio ativados por cálcio de baixa condutância, 50 ng/i.t.) foram capazes de produzir uma reversão de maneira significativa da antinocicepção causada pela agmatina (10 mg/kg, i.p.) e pela morfina (2,5 mg/kg, s.c.) no modelo do ácido acético. No entanto, o pré-tratamento dos animais com caribdotoxina (bloqueador dos canais de potássio ativado por cálcio de alta condutância, 250 pg/i.t.) não foi capaz de reverter a antinocicepção causada pela agmatina (10 mg/kg, i.p.), mas reverteu completamente a antinocicepção causada pela morfina no modelo do ácido acético (Fig. 12B)



**Figura 11:** Influência do pré-tratamento dos camundongos com (A) glibenclamida (80  $\mu\text{g}/\text{i.t.}$ ) ou (B) tetraetilamônio (TEA, 0,1  $\mu\text{g}/\text{i.t.}$ ) sobre o efeito antinociceptivo da agmatina (10 mg/kg, i.p.) em relação à nocicepção induzida pelo ácido acético (0,6%). Cada grupo representa a média de 6-10 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. \*\*\*P < 0,001 difere significativamente dos grupos controles (veículo, glibenclamida e TEA); # P < 0,01 difere significativamente dos grupos dos animais tratados com os agonistas (agmatina e morfina) versus agonistas + antagonista (glibenclamida e TEA).

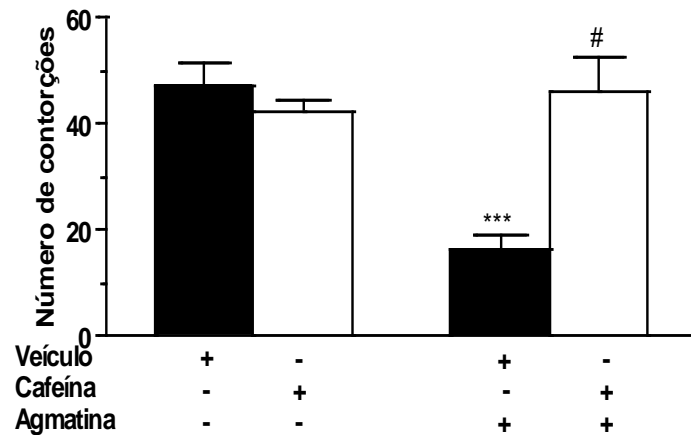


**Figura 12:** Influência do pré-tratamento dos camundongos com (A) apamina (50 ng/i.t) ou (B) caribdotoxina (250 pg/i.t) sobre o efeito antinociceptivo da agmatina (10 mg/kg, i.p.) em relação à nocicepção induzida pelo ácido acético (0,6%). Cada grupo representa a média de 6-10 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. \*\*\* P < 0,001 difere significativamente dos grupos controles (veículo, apamina e caribdotoxina); # P < 0,01 difere significativamente dos grupos dos animais tratados com os agonistas (agmatina e morfina) versus agonistas + antagonista (apamina e caribdotoxina).

### 5.1.2.5 Envolvimento do sistema adenosinérgico

Os resultados apresentados na figura 13 demonstram que o sistema adenosinérgico também está envolvido na antinocicepção causada pela agmatina, pois o pré-tratamento dos animais com cafeína (antagonista não seletivo dos receptores adenosinérgicos, 3 mg/kg, i.p.), produziu uma reversão completa da antinocicepção causada pela agmatina (10 mg/kg, i.p.) no modelo do ácido acético em camundongos.

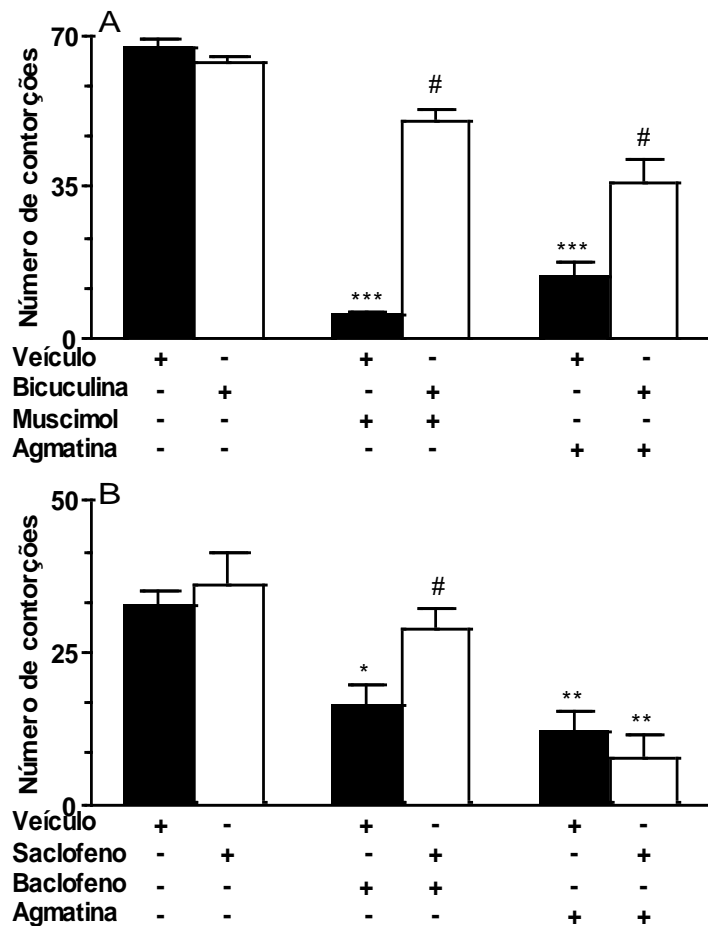




**Figura 13:** Influência do pré-tratamento dos camundongos com cafeína (3 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo da agmatina (10 mg/kg, i.p.) em relação à nocicepção induzida pelo ácido acético (0,6%). Cada grupo representa a média de 6-10 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. \*\*\* P < 0,001 difere significativamente dos grupos controles (veículo e cafeína); # P < 0,01 difere significativamente do grupo dos animais tratados com o agonista (agmatina) versus agonista + antagonista (cafeína).

### 5.1.2.6 Envolvimento dos receptores gabaérgicos

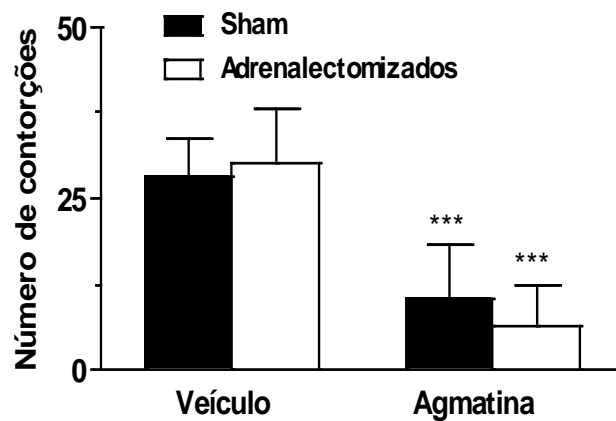
A figura 14A demonstra que o pré-tratamento dos animais com bicuculina (antagonista seletivo do receptor GABA<sub>A</sub>, 1 mg/kg, i.p.) reverteu a antinocicepção causada pela agmatina (10 mg/kg, i.p.) e pelo muscimol (agonista seletivo do receptor GABA<sub>A</sub>, 0,5 mg/kg, i.p.) no modelo do ácido acético. No entanto o saclofeno (antagonista seletivo do receptor GABA<sub>B</sub>, 10 mg/kg, i.p.), o qual foi capaz de reverter a antinocicepção causada pelo baclofeno (agonista seletivo do receptor GABA<sub>B</sub>, 1mg/kg, i.p., usado como controle positivo), não reverteu a nocicepção causada pela agmatina (Fig 14B).



**Figura 14:** Influência do pré-tratamento dos camundongos com (A) bicuculina (1 mg/kg, i.p.) ou (B) saclofeno (10 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo da agmatina (10 mg/kg, i.p.) ou do baclofeno (1 mg/kg, i.p.) em relação à nocicepção induzida pelo ácido acético (0,6%). Cada grupo representa a média de 6-10 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01 difere significativamente dos grupos controles (veículo e saclofeno); # P < 0,01 difere significativamente dos grupos dos animais tratados com os agonistas (agmatina e baclofeno) versus agonistas + antagonista (saclofeno).

### 5.1.2.7 Envolvimento da glândula adrenal

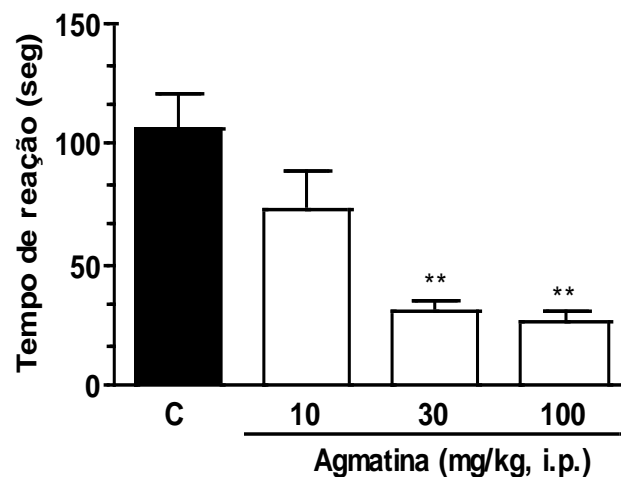
A figura 15 mostra que a adrenalectomia bilateral dos animais (7 dias antes) não alterou a antinocicepção causada pela agmatina (10 mg/kg, i.p.) no modelo do ácido acético.



**Figura 15:** Influência da adrenalectomia bilateral (7 dias antes) dos camundongos sobre o efeito antinociceptivo da agmatina (10 mg/kg, i.p.) em relação à nocicepção induzida pelo ácido acético (0,6%). Cada grupo representa a média de 8-12 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. \*\*\*  $P < 0,001$  difere significativamente dos grupos controles (veículo sham e veículo adrenalectomizados).

### 5.1.3 Nocicepção induzida pelo glutamato

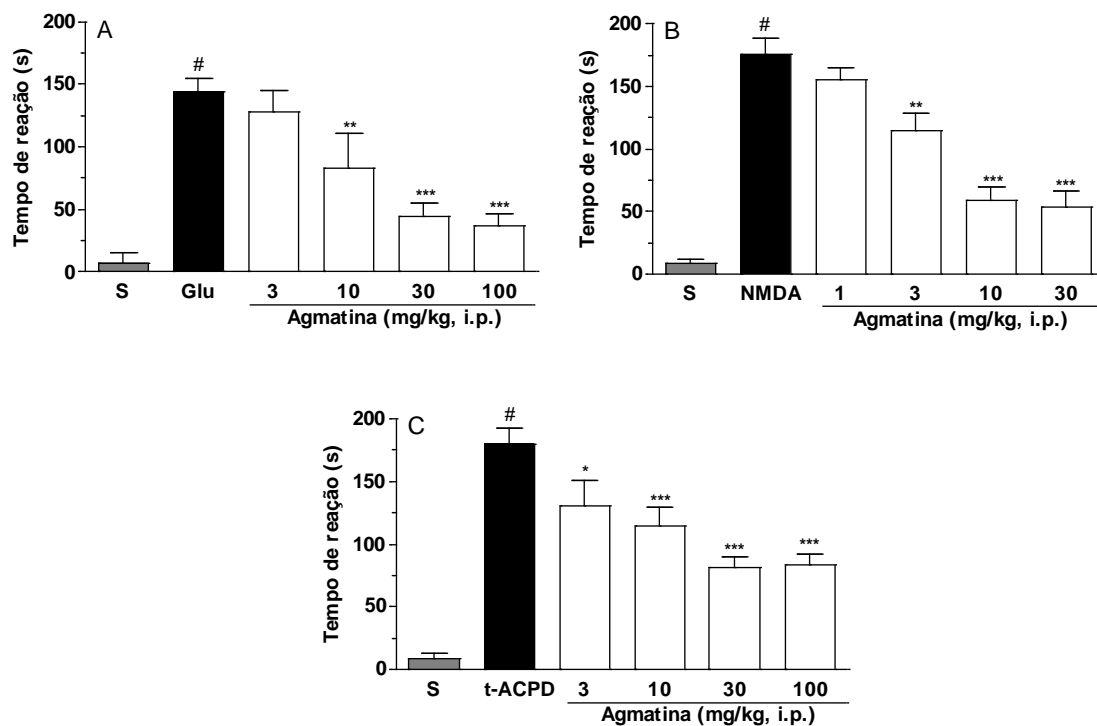
Os resultados apresentados na figura 16 mostram que a agmatina, quando administrada pela via i.p., causou uma inibição significativa e dependente da dose da nocicepção induzida pela injeção i.pl. de glutamato, com  $DI_{50}$  de 19,5 (15,3 - 24,8) mg/kg e inibição de  $76 \pm 4$  %.



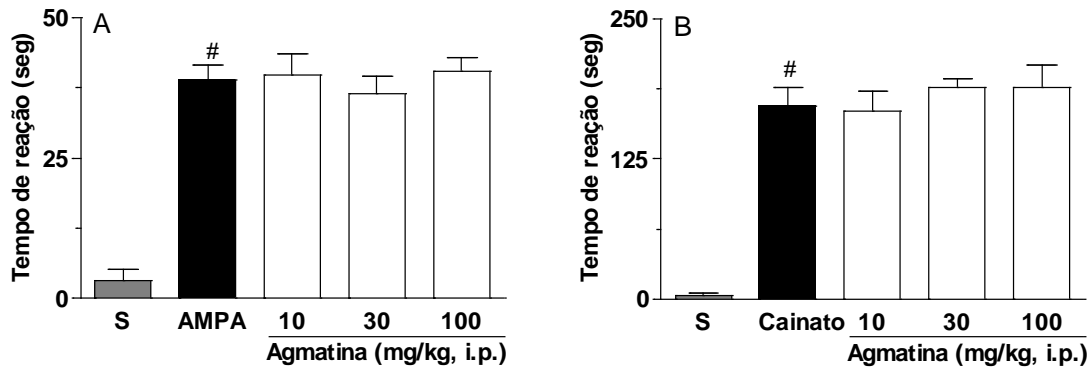
**Figura 16:** Efeito antinociceptivo da agmatina (10-100 mg/kg) administrada pela via i.p. em relação à nocicepção induzida pela injeção i.pl. de glutamato (20  $\mu$ mol/i.pl.) em camundongos. Cada grupo representa a média de 8-12 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. \*\*  $P < 0,01$  difere significativamente do grupo controle (C; barra cheia).

### 5.1.4 Nociceção induzida por agonistas glutamatérgicos

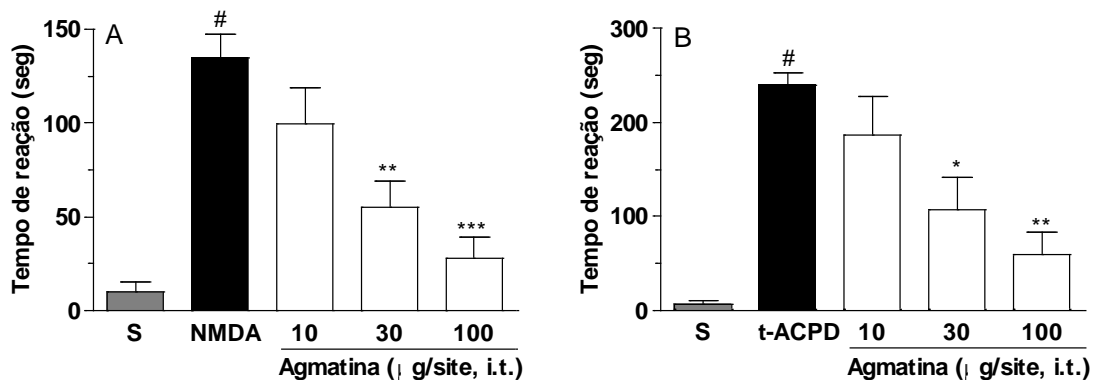
A figura 17 mostra que a administração de agmatina (1–100 mg/kg, i.p.), 30 min antes causou inibição dependente da dose das respostas nociceptivas induzidas pelas injeções i.t. de glutamato, NMDA e trans-ACPD, com valores de  $DI_{50}$  de 16,7 (11,0–25,2); 6,7 (4,7–9,7) e 27,0 (20,5–35,6) mg/kg e inibições de  $79 \pm 7$ ;  $73 \pm 8$  e  $59 \pm 4\%$ , respectivamente. No entanto, nas mesmas doses e esquema de tratamento, a agmatina não apresentou efeito significativo na nociceção causada pelo AMPA ou pelo cainato (Fig. 18). Além disso, como demonstrado na figura 19, o tratamento dos animais com agmatina pela via i.t. (10–100  $\mu\text{g/sítio}$ , 10 min antes) também causou uma inibição de forma dependente da dose da nociceção causada pela injeção i.t. de NMDA e trans-ACPD. Os valores calculados de  $DI_{50}$  foram 29,6 (21,1–41,5) e 36,0 (27,7–46,8)  $\mu\text{g/sítio}$  e inibições de  $86 \pm 9$  e  $77 \pm 10\%$ , respectivamente.



**Figura 17:** Efeito antinociceptivo da agmatina (1-100 mg/kg) administrada pela via i.p. em relação à nociceção induzida pela injeção i.t. de glutamato (A) (175 nmol/sítio), NMDA (B) (450 pmol/sítio) ou trans-ACPD (C) (50 nmol/sítio) em camundongos. Cada grupo representa a média de 8-12 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$  difere significativamente do grupo controle (barra cheia) e #  $P < 0,001$  difere significativamente do grupo salina (S) versus controle.



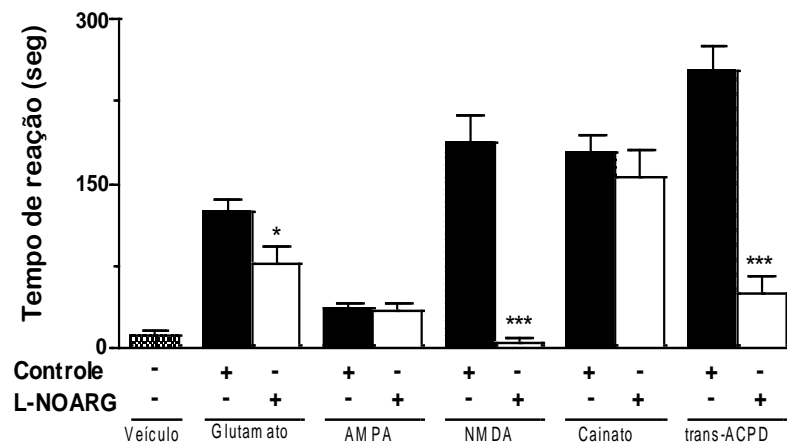
**Figura 18:** Efeito antinociceptivo da agmatina (10-100 mg/kg) administrada pela via i.p. em relação à nocicepção induzida pela injeção i.t. de AMPA (A) (135 pmol/sítio) ou cainato (B) (110 pmol/sítio) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6-10 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. #  $P < 0,001$  difere significativamente do grupo salina (S).



**Figura 19:** Efeito antinociceptivo da agmatina (10-100 µg/sítio) administrada pela via i.t. em relação à nocicepção induzida pela injeção i.t. de NMDA (A) (450 pmol/sítio) ou trans-ACPD (B) (50 nmol/sítio) em camundongos. Cada grupo representa a média de 8-12 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$  difere significativamente do grupo controle (barra cheia) e #  $P < 0,001$  difere significativamente do grupo salina (S).

#### 5.1.4.1 Efeito da L-NOARG na nocicepção induzida por agonistas glutamatérgicos

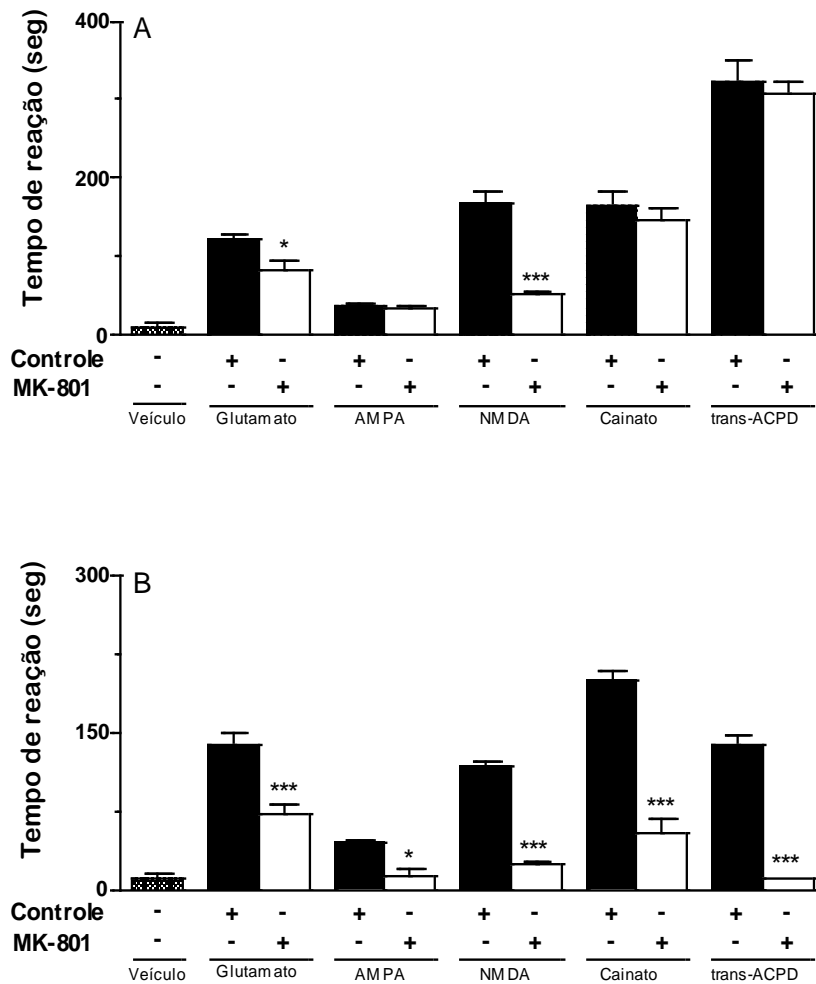
Como pode ser observado na figura 20, a L-NOARG (inibidor da síntese de NO, 75 mg/kg), quando administrada pela via i.p., causou uma inibição significativa das respostas nociceptivas induzidas pelas injeções i.t. de glutamato, NMDA e trans-ACPD, com inibições de  $41 \pm 13$ ; 100 e  $83 \pm 6\%$ , respectivamente. No entanto, o tratamento dos animais com L-NOARG não foi capaz de alterar a nocicepção causada pelo AMPA ou pelo cainato.



**Figura 20:** Efeito antinociceptivo da L-NOARG (75 mg/kg) administrada pela via i.p. em relação à nocicepção induzida pela injeção i.t. de glutamato (175 nmol/sítio), AMPA (135 pmol/sítio), NMDA (450 pmol/sítio), cainato (110 pmol/sítio) ou trans-ACPD (50 nmol/sítio) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6-10 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. \*  $P < 0,05$ ; \*\*\*  $P < 0,001$  difere significativamente do grupo controle (barras cheias).

#### 5.1.4.2 Efeito do MK-801 na nocicepção induzida por agonistas glutamatérgicos

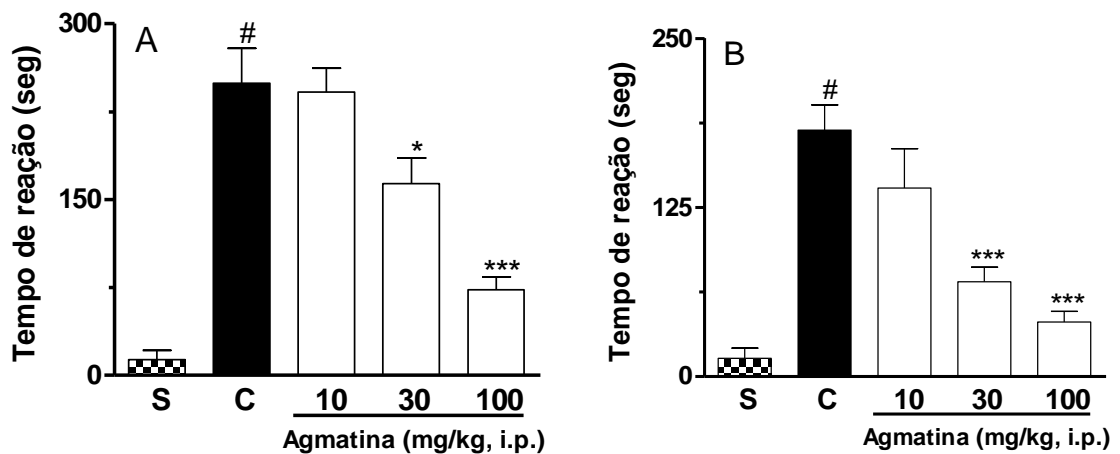
Os resultados apresentados na figura 21 demonstram que a administração de uma dose baixa do antagonista do receptor NMDA, MK-801 (0,05 mg/kg) foi capaz de inibir significativamente as respostas nociceptivas induzidas pelas injeções i.t. de glutamato e NMDA (inibições de  $35 \pm 11$  e  $72 \pm 2\%$ ) sem afetar a nocicepção causada pelo AMPA, cainato ou trans-ACPD. No entanto, quando administrado em uma dose alta e capaz de produzir hiperlocomoção nos animais, o MK-801 (0,5 mg/kg) inibiu as respostas nociceptivas causadas pelas injeções i.t. de glutamato, AMPA, NMDA, cainato e trans-ACPD, com inibições de  $49 \pm 8$ ,  $84 \pm 16$ ,  $84 \pm 3$ ,  $76 \pm 8$  e  $97 \pm 2\%$ , respectivamente.



**Figura 21:** Efeito antinociceptivo do MK-801 (A) (0,05 mg/kg) ou (B) (0,5 mg/kg) administrado pela via i.p. em relação à nocicepção induzida pela injeção i.t. de glutamato (175 nmol/sítio), AMPA (135 pmol/sítio), NMDA (450 pmol/sítio), cainato (110 pmol/sítio) ou trans-ACPD (50 nmol/sítio) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6-10 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. \* P < 0,05; \*\*\* P < 0,001 difere significativamente do grupo controle (barras cheias).

### 5.1.5 Nocicepção causada por citocinas pró-inflamatórias

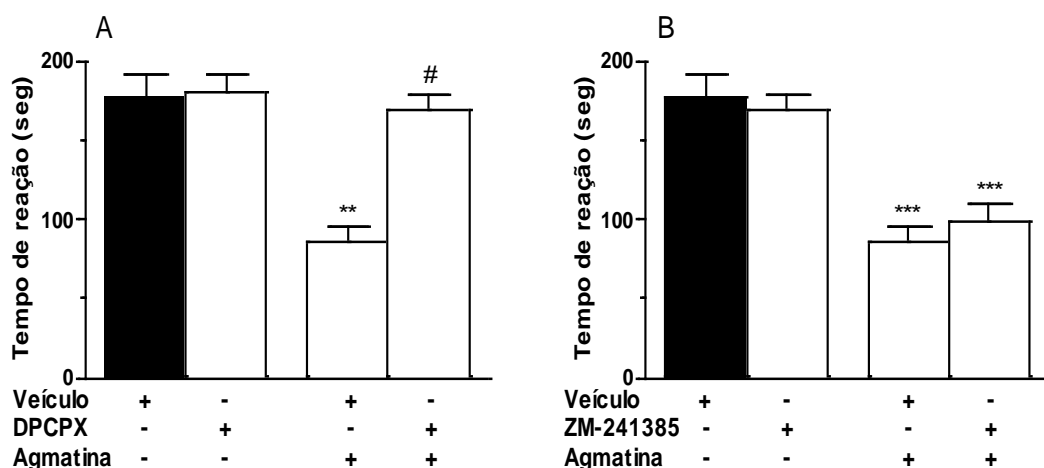
A figura 22 (A e B) mostra que o tratamento dos animais com agmatina pela via i.p. (10–100 mg/kg) também causou uma inibição significativa e dependente da dose da nocicepção causada pela injeção i.t. de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Os valores calculados de DI<sub>50</sub> foram 61,3 (47,7–78,6) e 30,4 (18,6–49,8) mg/kg e inibições de 75 $\pm$ 5 e 66 $\pm$ 6%, respectivamente.



**Figura 22:** Efeito antinociceptivo da agmatina (10-100 mg/kg) administrada pela via i.p. em relação à nocicepção induzida pela injeção i.t. de TNF- $\alpha$  (A) (0,1 pmol/sítio) e IL-1 $\beta$  (B) (1 pmol/sítio) em camundongos. Cada grupo representa a média de 8-12 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. \* P < 0,05; \*\*\* P < 0,001 difere significativamente do grupo controle (barras cheias) e # P < 0,001 difere significativamente do grupo salina (S).

#### 4.1.6 Envolvimento do sistema adenosinérgico

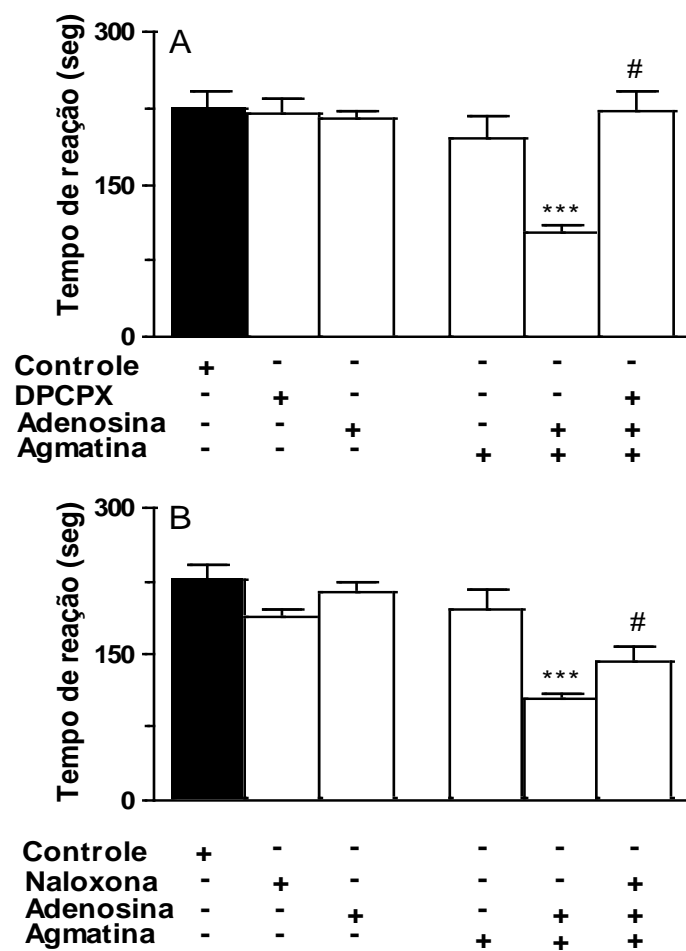
A figura 23A mostra que o pré-tratamento dos animais com DPCPX (antagonista seletivo dos receptores A<sub>1</sub>, 5 mg/kg, i.p.), mas não com ZM-241385 (antagonista seletivo dos receptores A<sub>2A</sub>, 3 mg/kg, i.p.), reverteu de forma significativa a nocicepção causada pela agmatina (10 mg/kg, i.p.) no modelo do glutamato (Fig. 23B).



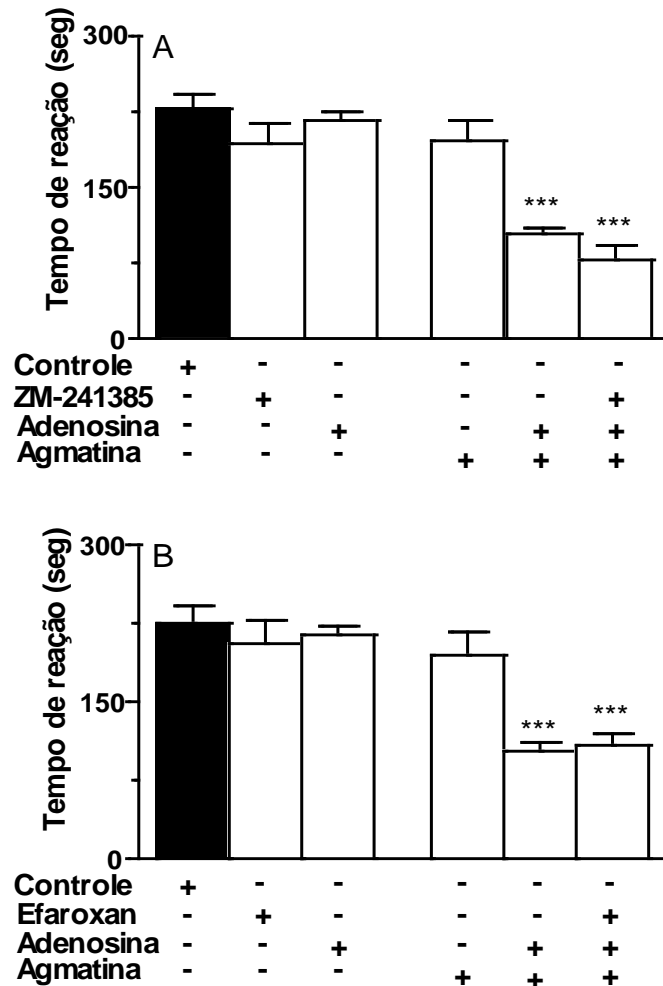
**Figura 23:** Influência do pré-tratamento dos camundongos com DPCPX (A) (5 mg/kg, i.p.) ou ZM-241385 (B) (3 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo da agmatina (10 mg/kg, i.p.) em relação à nocicepção induzida pelo glutamato (20  $\mu$ mol/i.pl.). Cada grupo representa a média de 6-10 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001 difere significativamente dos grupos controles (veículo, DPCPX e ZM-241385) e # P < 0,01 difere significativamente dos grupos dos animais tratados com o agonista (agmatina) versus agonistas + antagonistas (DPCPX e ZM-241385).



Os resultados apresentados na figura 24 demonstram que o tratamento dos animais com doses sub-ativas de adenosina (30 mg/kg, i.p.) e agmatina (10 mg/kg, i.p.) produziu efeito antinociceptivo sinérgico no modelo do glutamato. No entanto, este efeito antinociceptivo foi completamente revertido pelo pré-tratamento dos animais com DPCPX (5 mg/kg, i.p.) e parcialmente pelo pré-tratamento com naloxona (antagonista opióide não seletivo, 1 mg/kg, i.p.) (Fig 24). Contudo, o pré-tratamento dos animais com ZM-241385 (3 mg/kg, i.p.) ou com efaroxan (antagonista imidazólico I<sub>1</sub>, 1 mg/kg, i.p.) não modificou o efeito antinociceptivo sinérgico causado pela associação de adenosina (30 mg/kg, i.p.) e agmatina (10 mg/kg, i.p.) no modelo do glutamato (Fig. 25 A e B).



**Figura 24:** Influência do pré-tratamento dos camundongos com (A) DPCPX (5 mg/kg, i.p.) ou (B) naloxona (1 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo causado pela associação de doses sub-ativas de adenosina (30 mg/kg, i.p.) e agmatina (10 mg/kg, i.p.) em relação à nocicepção induzida pelo glutamato (10  $\mu$ mol/i.pl.). Cada grupo representa a média de 6-10 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. \*\*\* P < 0,001 difere significativamente dos grupos controles (veículo, ZM-241385 e efaroxan) e # P < 0,01 difere significativamente dos grupos dos animais tratados com o agonista (agmatina) versus agonistas + antagonistas (DPCPX ou naloxona)



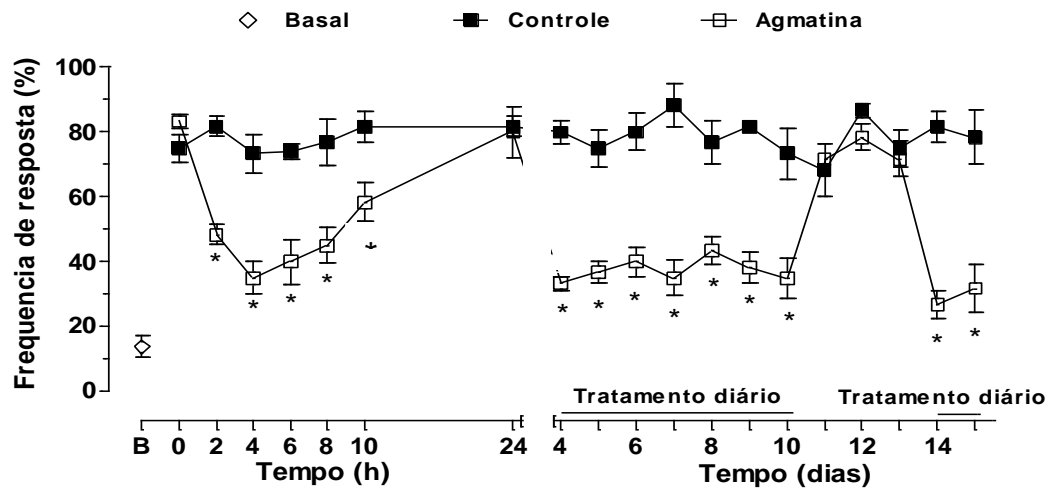
**Figura 25:** Influência do pré-tratamento dos camundongos com (A) ZM-241385 (3 mg/kg, i.p.) ou (B) efaroxan (1 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo causado pela associação de doses sub-ativas de adenosina (30 mg/kg, i.p.) e agmatina (10 mg/kg, i.p.) em relação à nocicepção induzida pelo glutamato (10  $\mu$ mol/i.pl.). Cada grupo representa a média de 6-10 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. \*\*\*  $P < 0,001$  difere significativamente dos grupos controles (veículo, ZM-241385 e efaroxan).

## 5.2 MODELOS DE NOCICEPÇÃO CRÔNICA

### 5.2.1. Inflamação induzida pelo CFA

Os resultados apresentados na figura 26 demonstram que a agmatina (30 mg/kg), administrada pela via i.p. (30 min antes), produziu uma inibição de maneira significativa e tempo dependente da hiperalgesia mecânica [avaliada com filamento de von Frey (0,6 g)] induzida pela injeção i.pl. de CFA na pata direita dos camundongos, com inibição máxima de  $52 \pm 7\%$  em 4 h. No entanto, a agmatina produziu inibição significativa 2 horas após sua administração i.p. Além disso, quando a agmatina foi administrada 2 vezes ao dia durante 7 dias, também houve uma redução significativa da hiperalgesia mecânica causada pelo CFA. Este efeito foi evidente até o décimo dia de tratamento (inibição de  $67 \pm 5\%$  no dia 7). Quando

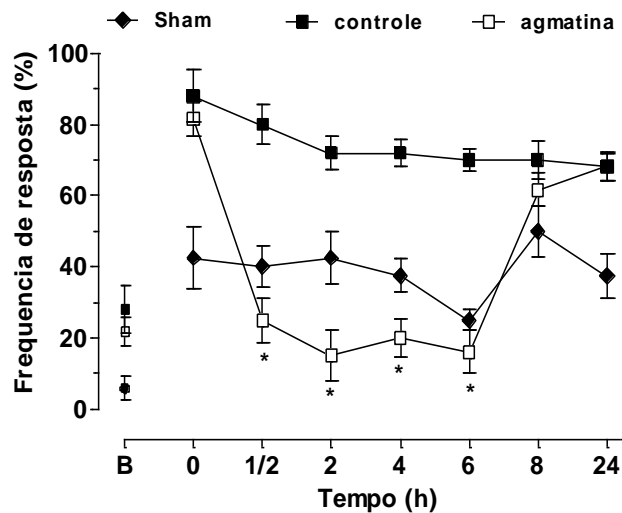
o tratamento foi interrompido por 3 dias, a hiperalgesia mecânica foi re-estabelecida aos níveis do grupo controle. No décimo quarto dia, o tratamento foi reiniciado e foi observado que a agmatina novamente reduziu de maneira significativa a alodínia mecânica assim como no tratamento agudo, indicando que a agmatina não produz tolerância.



**Figura 26:** Efeito antinociceptivo da administração aguda ou crônica de agmatina (30 mg/kg) em relação à hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA (20 µl/sítio) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6-10 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. # P < 0,05; \* P < 0,001 difere significativamente do grupo controle (quadrados cheios).

### 5.2.2 Neuropatia causada pela ligação parcial do nervo ciático (LPNC)

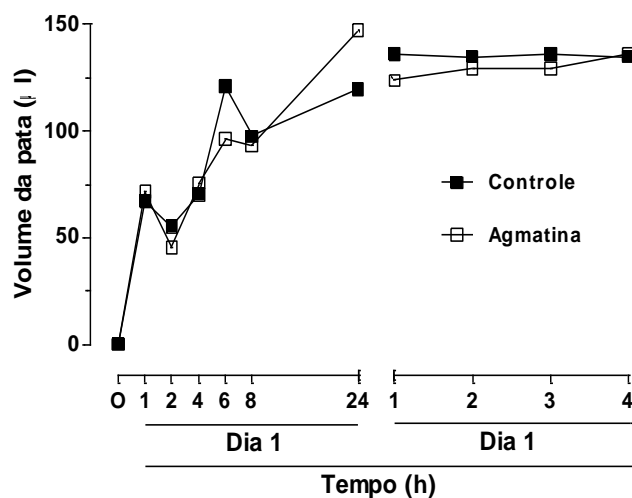
A neuropatia causada pela lesão do nervo ciático reduziu o limiar basal da hiperalgesia mecânica em resposta a aplicação do filamento de von Frey (0,6 g) quando comparado ao grupo não operado (sham). A figura 27 demonstra que a agmatina (30 mg/kg, i.p., 30 min antes) reduziu a hiperalgesia mecânica causada pela LPNC com inibição de  $81 \pm 8\%$  2 horas após o tratamento, efeito este que permaneceu significativo por mais de 6 horas após o tratamento dos animais com agmatina.



**Figura 27:** Efeito antinociceptivo da administração aguda de agmatina (30 mg/kg) em relação à hiperalgesia mecânica causada pelo ENC em camundongos. Cada grupo representa a média de 6-10 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. \*  $P < 0,001$  difere significativamente do grupo controle (quadrados cheios).

### 5.2.3 Edema de pata causado pela injeção de CFA

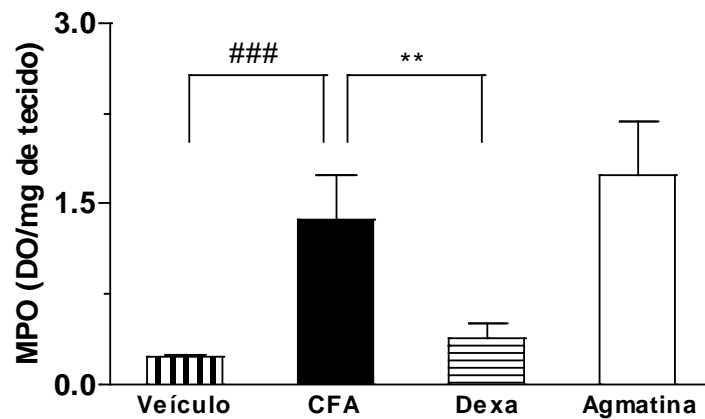
Os resultados apresentados na figura 28 demonstram que a injeção de CFA causou um aumento tempo dependente no volume da pata. No entanto, o tratamento dos animais com agmatina (30 mg/kg, i.p., 30 min antes) não reduziu o edema de pata causado pela injeção de CFA.



**Figura 28:** Efeito da administração de agmatina (30 mg/kg) em relação ao edema de pata induzido pela injeção i.p.l. de CFA (20 µl/sítio) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6-8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M..

### 5.2.4 Ensaio da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO)

A migração de neutrófilos foi avaliada indiretamente através do ensaio de atividade da enzima MPO. Como demonstrado na figura 29, a injeção de CFA causou um marcante aumento nos níveis da enzima MPO. No entanto, a administração de agmatina (30 mg/kg, i.p., 30 min antes) não reduziu a atividade da MPO nas patas que receberam CFA. O controle positivo, dexametasona (0,5 mg/kg, i.p., 4 h antes), reduziu de maneira significativa a atividade da MPO induzida pelo CFA nas patas de camundongos.

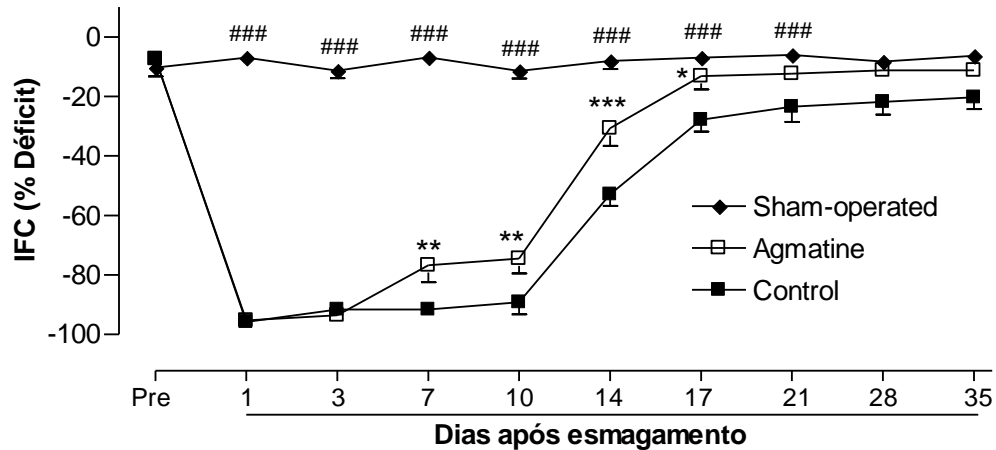


**Figura 29:** Efeito da administração de agmatina (30 mg/kg) ou dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.) em relação a atividade da enzima MPO induzida pela injeção i.pl. de CFA (20 µl/sítio) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6-10 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. ### P < 0,001 difere significativamente do grupo salina e \*\* P < 0,01 difere significativamente do grupo dexametasona.

### 5.2.5 Esmagamento do nervo ciático em ratos

#### 5.2.5.1 Avaliação da recuperação motora - Índice Funcional do Ciático (IFC)

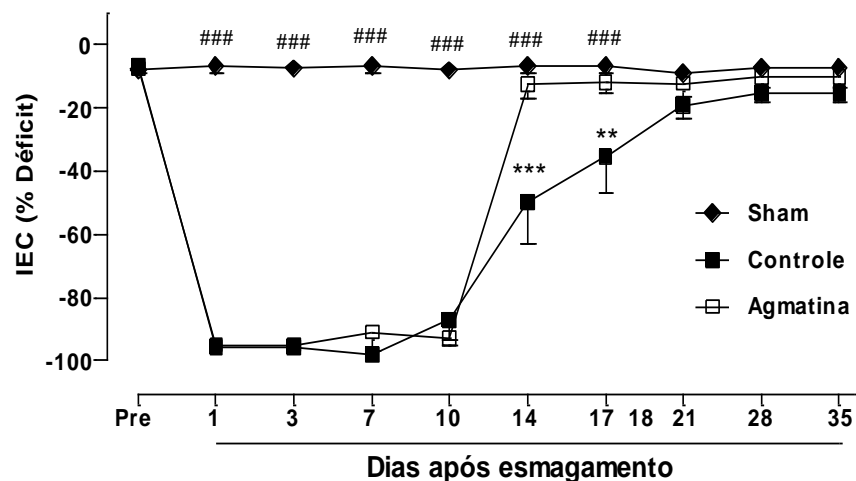
Os resultados apresentados na figura 30 indicam uma perda significativa da função motora do membro posterior ipsilateral dos animais do grupo controle por até três semanas após a cirurgia. O tratamento dos animais com agmatina (30 mg/kg), administrada pela via i.p. (2 x ao dia), produziu uma recuperação significativa da função motora dos animais que se iniciou no 7º dia de tratamento com agmatina. Este efeito se manteve significativo até o 17º dia após a cirurgia.



**Figura 30:** Efeito da agmatina (30 mg/kg, 2x/dia) administrada cronicamente pela via i.p. em relação à recuperação funcional (IFC) antes e após o ENC em ratos. Cada grupo representa a média de 8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001 difere significativamente do grupo controle (quadrados cheios) e ### P < 0,001 difere significativamente dos grupos sham versus controle

### 5.2.5.2 Avaliação da recuperação motora - Índice Estático do Ciático (IEC)

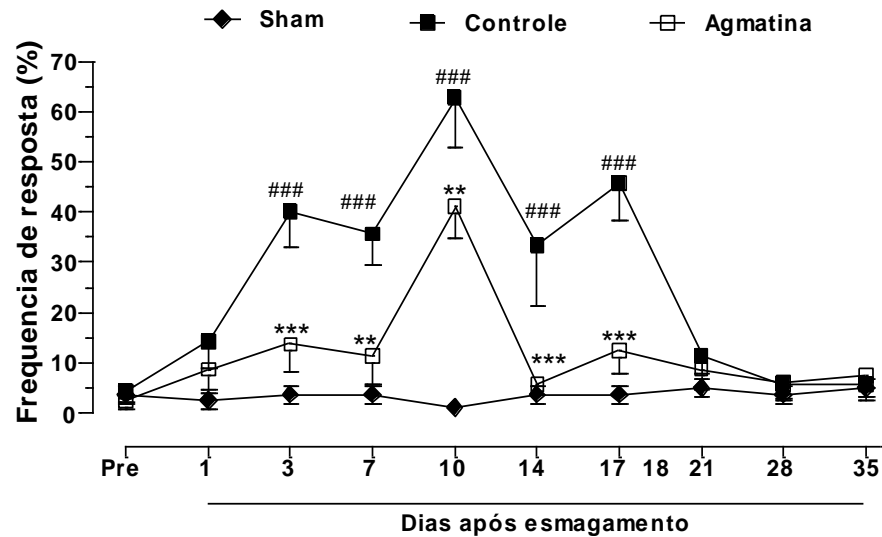
Como pode ser observado na figura 31 o ENC induz uma perda significativa da função motora do membro posterior ipsilateral dos animais do grupo controle até o 17º dia após a cirurgia, confirmando novamente assim a déficit motor induzido pelo ENC. Neste sentido, o tratamento dos animais com agmatina (30 mg/kg), administrada pela via i.p. (2 x ao dia), produziu uma recuperação significativa da função motora dos animais que se iniciou no 14º dia de tratamento com agmatina e se manteve significativo até o 17º dia após a cirurgia.



**Figura 31:** Efeito da agmatina (30 mg/kg, 2x/dia) administrada cronicamente pela via i.p. em relação à recuperação funcional (IEC) antes e após o ENC em ratos. Cada grupo representa a média de 8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001 difere significativamente do grupo controle (quadrados cheios) e ### P < 0,001 difere significativamente dos grupos sham versus controle.

### 5.2.5.3 Avaliação da função sensorial – hiperalgesia mecânica

A figura 32 demonstra que a agmatina (30 mg/kg, i.p., 2x/dia) reduziu a hiperalgesia mecânica causada pelo ENC com inibição de  $91 \pm 6\%$ , 14 dias após a cirurgia. Este efeito permaneceu significativo até o 17º após a lesão por esmagamento.



**Figura 32:** Efeito antinociceptivo da administração crônica de agmatina (30 mg/kg, 2x/dia) em relação à hiperalgesia mecânica causada pelo ENC em ratos. Cada grupo representa a média de 8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001 difere significativamente do grupo controle (quadrados cheios) e ### P < 0,001 difere significativamente dos grupos sham versus controle.

## 5.3 ANÁLISES HISTOLÓGICAS E IMUNOHISTOLÓGICAS

### 5.3.1 Análise histológica e morfométrica

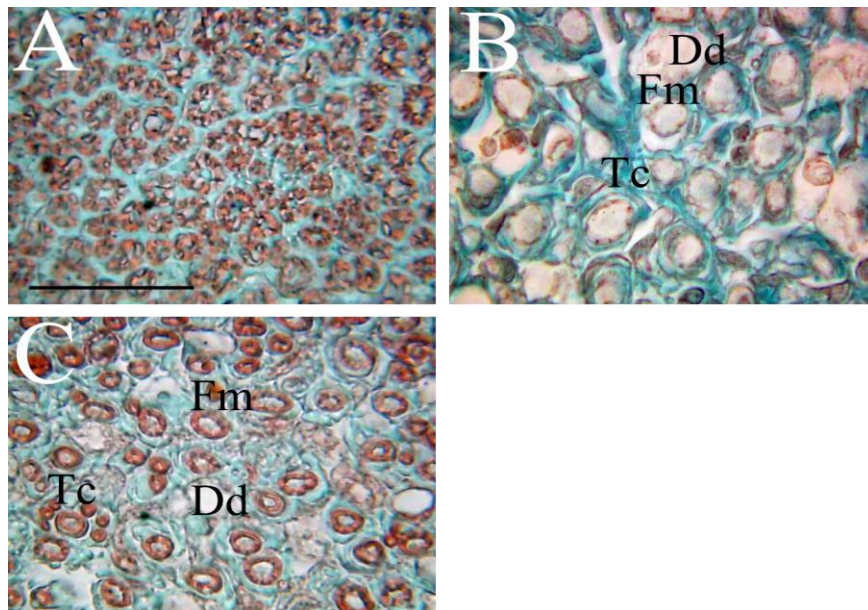
Os dados morfométricos revelaram que o ENC produziu uma diminuição da densidade de fibras mielinizadas em comparação ao grupo sham. Foi observado que o grupo dos animais tratados com agmatina (30 mg/kg, i.p., 2x/dia) apresentou densidade significativamente maior de fibras mielinizadas quando comparado ao grupo controle (Fig. 33 e 34 A).

As figuras 33 e 34 B demonstram que o grupo controle apresentou redução significativa da espessura da bainha de mielina em relação ao grupo sham. O grupo dos animais tratados com agmatina apresentou uma espessura maior da bainha de mielina quando comparado ao grupo controle.

O tratamento dos animais com agmatina também aumentou de maneira significativa a porcentagem de área de fibras mielinizadas em relação ao grupo controle (Fig. 33 e 34 C).

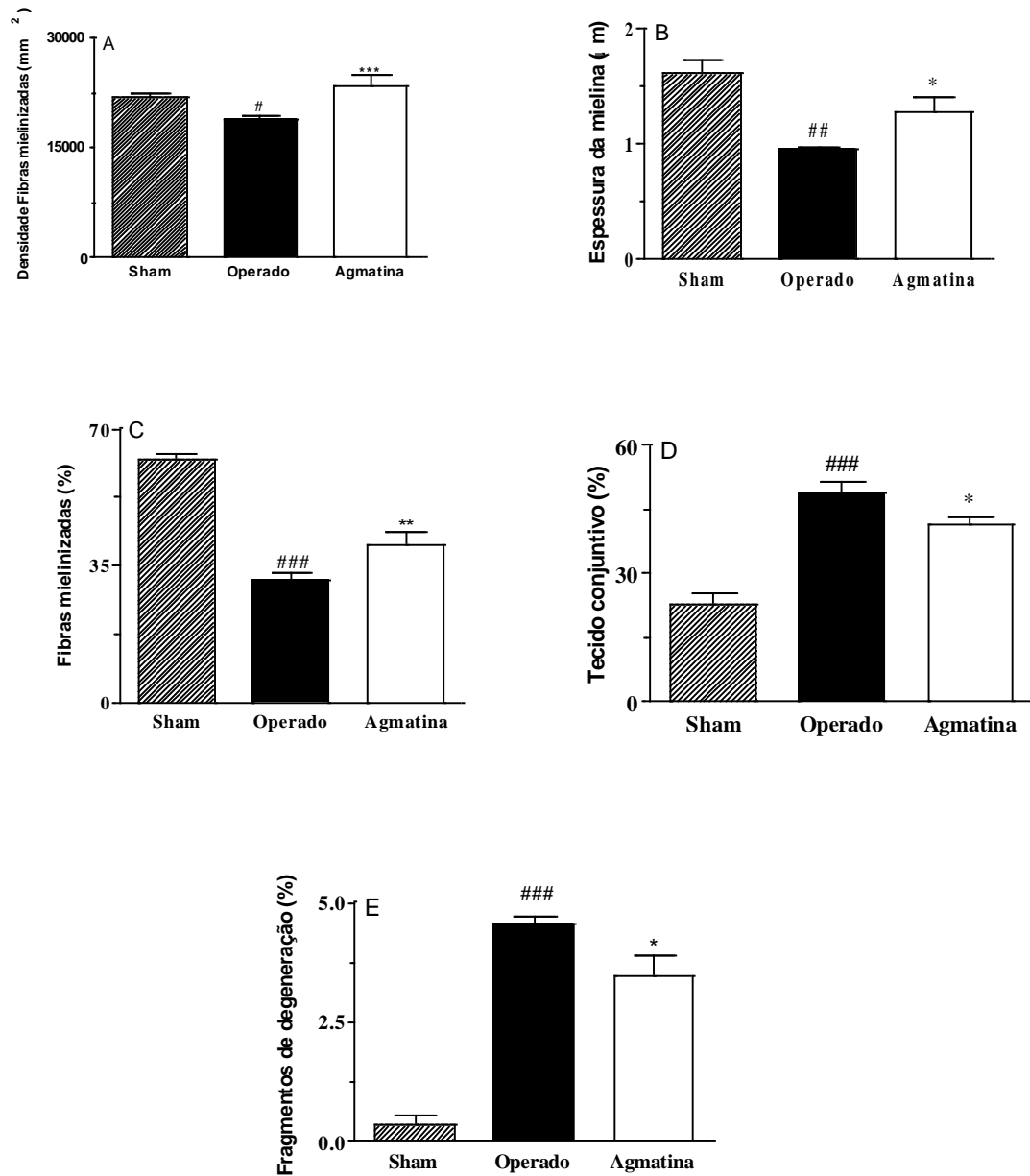
Na análise da porcentagem de área de tecido conjuntivo, o grupo controle exibiu uma maior área de tecido conjuntivo quando comparado com o grupo sham. O grupo dos animais tratados com agmatina apresentou redução significativa da área de tecido conjuntivo quando comparado ao grupo controle (Fig. 33 e 34 D).

Em relação ao parâmetro referente à análise da porcentagem de fragmentos de degeneração, o grupo controle apresentou porcentagem maior quando comparado ao grupo sham. O grupo dos animais tratados com agmatina apresentou redução significativa da área relacionada aos fragmentos de degeneração quando comparado ao grupo controle (Fig. 33 e 34 E).



**Figura 33** Imagens de secções transversas da porção distal do nervo ciático de ratos em aumento de 1000x (A) nervos normais do grupo Sham. Observar as fibras mielinizadas grandes e pequenas, o escasso espaço de tecido conjuntivo endoneural entre as fibras mielinizadas; (B) grupo operado mostrando a predominância de fibras mielinizadas de pequeno diâmetro, além do aumento do tecido conjuntivo endoneural entre as fibras do nervo e a presença de fragmentos de degeneração; (C) grupo tratado com agmatina mostrando, notar que as fibras mielinizadas são similares ao grupo Sham. A presença de fibras pequenas e grandes com grande espessura da bainha de mielina; além disso, o aumento do tecido conjuntivo endoneural entre as fibras mielinizadas e a presença de fragmentos de degeneração menor do que no grupo operado. (Fm) indica fibras mielinizadas, (Tc) tecido conjuntivo endoneural, (Dd), Fragmentos de Degeneração. As secções foram coradas com Cason e óleo vermelho, Barra da escala: 10µm.





**Figura 34:** Parâmetros morfométricos da regeneração das fibras nervosas do nervo ciático de ratos. Os gráficos mostram (A) densidade das fibras de mielina; (B) média da espessura da bainha de mielina; (C) porcentagem da área de fibras mielinizadas; (D) porcentagem da área de tecido conjuntivo e (E) fragmentos de degeneração. Cada grupo representa a média de 5 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  \*\*\*  $P < 0,001$  difere significativamente do grupo operado e #  $P < 0,05$ ; ##  $P < 0,01$ ; ###  $P < 0,001$  difere significativamente dos grupos sham versus operado.

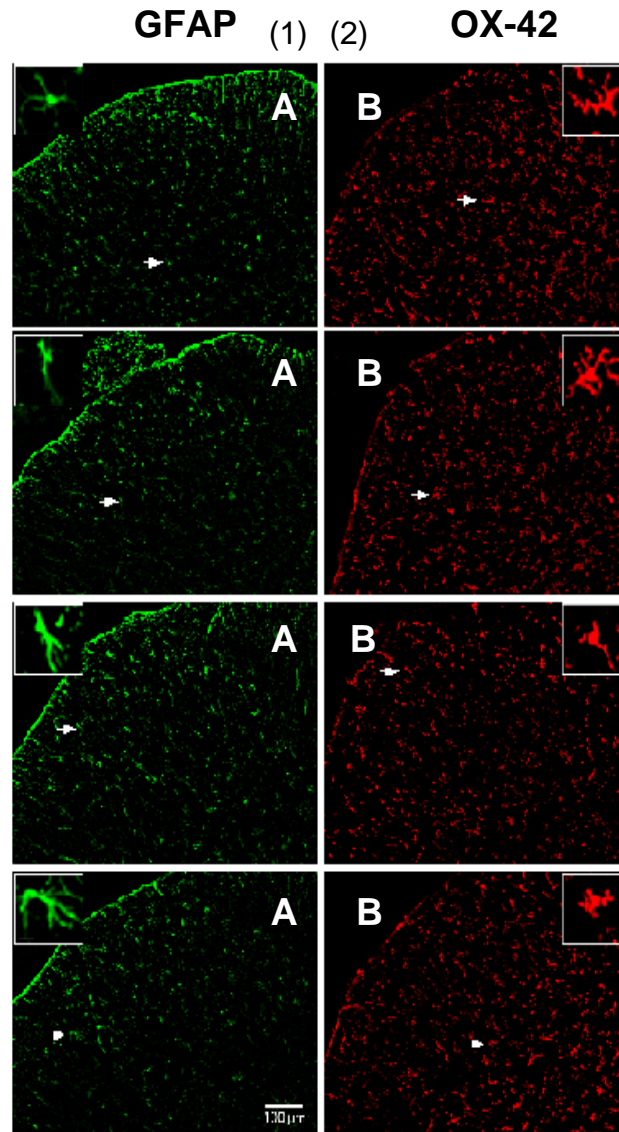
### 5.3.2 Análise imunohistoquímica

As figuras 35 e 36 mostram que o tratamento dos ratos com agmatina (30 mg/kg, i.p. 2x/dia) diminuiu o número de células positivas para GFAP, mas não de OX-42. No entanto, o mesmo tratamento dos animais com agmatina diminuiu a intensidade de fluorescência tanto para GFAP e OX-42 (Figs. 35 e 37). Além disso, o tratamento com agmatina alterou aspectos

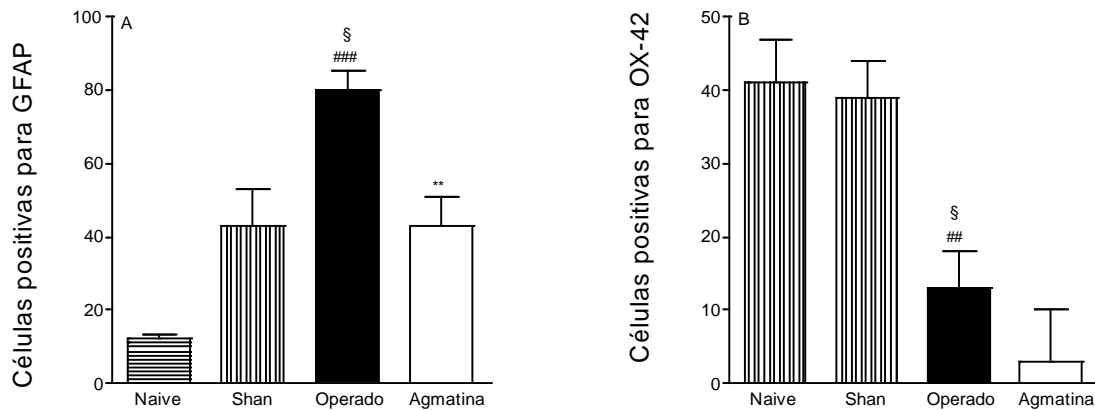
morfológicos nos astrócitos, pois reduziu o perímetro celular e aumentou a proporção entre a circunferência e o perímetro da célula (*aspect ratio*) (Figs. 38 e 39). Contudo, em relação à morfologia da microglia, nenhum parâmetro foi alterado pelo tratamento com agmatina (Fig. 40.).

A imunoreatividade para GFAP e OX-42 foi avaliada na medula espinhal lombar, nas lâminas 1 e 2 (Fig. 41), de ratos naive, sham e operados, para estimar a ativação astrocitária e microglial, respectivamente. A imunoreatividade para GFAP e OX-42 foi homoganeamente distribuída através da massa branca e cinzenta na medula espinhal. Após 35 dias da lesão por esmagamento, foi verificada uma robusta ativação astrogliar demonstrada por um aumento no número de células positivas para GFAP e pelo aumento da intensidade de fluorescência para GFAP. Por outro lado, o número de células positivas para OX-42 e a média da intensidade de fluorescência para OX-42 foram significativamente reduzidos, sugerindo assim uma diminuição na ativação microglial após 35 dias da lesão por esmagamento do nervo. Os ratos do grupo sham apresentaram um aumento moderado no número de células positivas para GFAP. Este resultado pode indicar que, o procedimento cirúrgico por si só neste modelo e por um período prolongado, promove um aumento na imunoreatividade para GFAP.

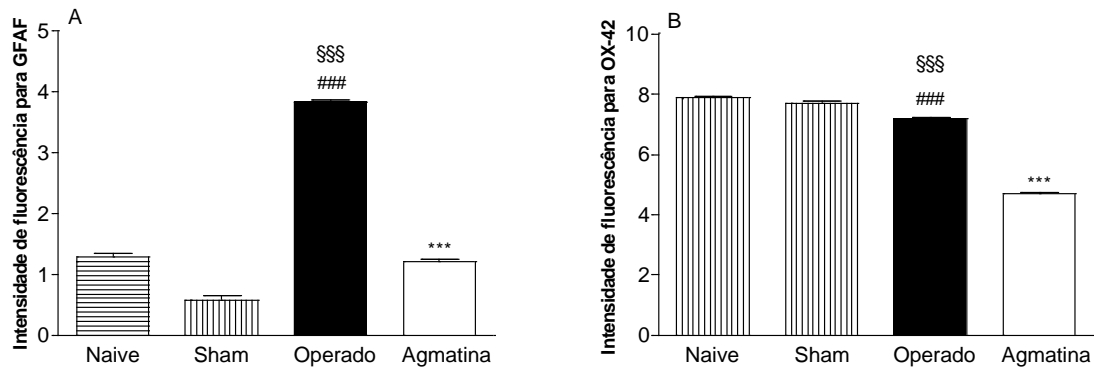
As análises morfológicas também foram realizadas para avaliar ativação astrocitária e microglial após a lesão por esmagamento do nervo (Figs 38, 39 e 40). A lesão por esmagamento induziu mudanças severas da morfologia tanto em astrócitos quanto em microglias as quais apresentaram o fenótipo ativado. Astrócitos e microglia apresentaram processos celulares encurtados como demonstrado pelo resultado do “*aspect ratio*” (Fig. 39). Os astrócitos também exibiram aumento no perímetro, o qual pode ser observado pela sua aparência inchada e estado ativado (Fig.38). A lesão por esmagamento do nervo produziu padrão morfológico diferenciado na microglia com significante redução no perímetro e diâmetro de Feret's, sugerindo que estas células adquiriram um padrão morfológico com marcante hipertrofia (Fig 38 e 40). Pensando que o número de células positivas para OX-42 e a intensidade de fluorescência diminuíram causado por uma diminuição da ativação microglial, as alterações morfológicas observadas 35 dias depois da lesão no nervo sugerem que estas células ainda possuem alguma ativação. Juntas, as mudanças morfológicas observadas nos astrócitos depois da lesão no nervo estão associadas com o alto estado ativado destas células na medula espinhal. Por outro lado, as microglias parecem estar menos ativadas que os astrócitos. No entanto, a agmatina parece modular a diminuição da lesão do nervo ciático em ratos.



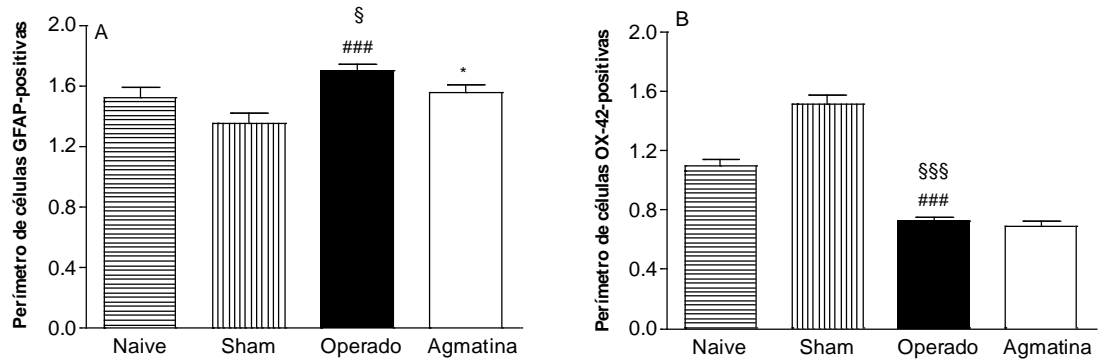
**Figura 35:** Imunomarcacão para astrócitos (A) e microglias (B) normais ou reativas. Os CDMELs de ratos (A<sub>1</sub> e B<sub>1</sub>) naïves, (A<sub>2</sub> e B<sub>2</sub>) falso-operados (sham), (A<sub>3</sub> e B<sub>3</sub>) submetidos ao ENC e (A<sub>4</sub> e B<sub>4</sub>) submetidos ao ENC e tratados com agmatina (30 mg/kg, i.p. 2x/dia), foram preparados para imunohistoquímica de fluorescência 35 dias após as cirurgias. (escala 100 μm).



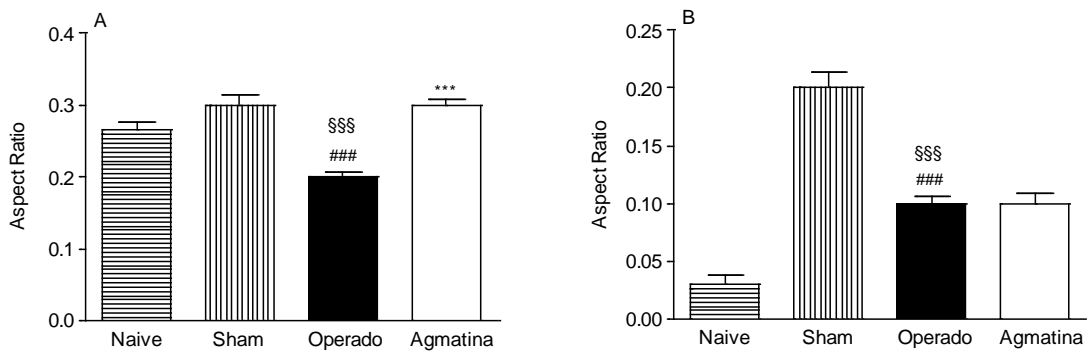
**Figura 36:** Efeito da agmatina (30 mg/kg, 2x/dia) administrada cronicamente pela via i.p. em relação número de células positivas para (A) astrócitos e (B) microglias. Cada grupo representa a média de 6 fatias por animal e as barras verticais indicam os E.P.M. \*\* P < 0,01 difere significativamente do grupo operado; ## P < 0,01; ### P < 0,001 difere significativamente dos grupos sham versus operado e § P < 0,05 difere significativamente dos grupos naive versus operado.



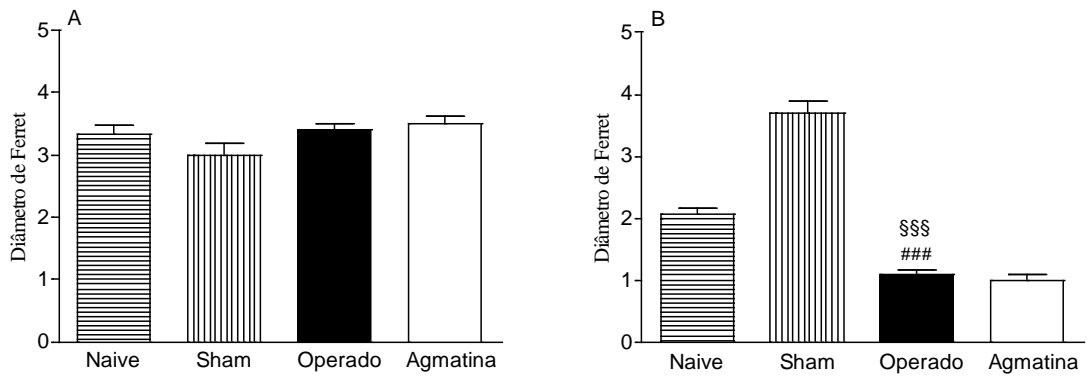
**Figura 37:** Efeito da agmatina (30 mg/kg, 2x/dia) administrada cronicamente pela via i.p. em relação a atividade celular de (A) astrócitos e (B) microglias. Cada grupo representa a média de 6 fatias por animal e as barras verticais indicam os E.P.M. \*\* P < 0,01 difere significativamente do grupo operado; ## P < 0,01; ### P < 0,001 difere significativamente dos grupos sham versus operado e § P < 0,05 difere significativamente dos grupos naive versus operado.



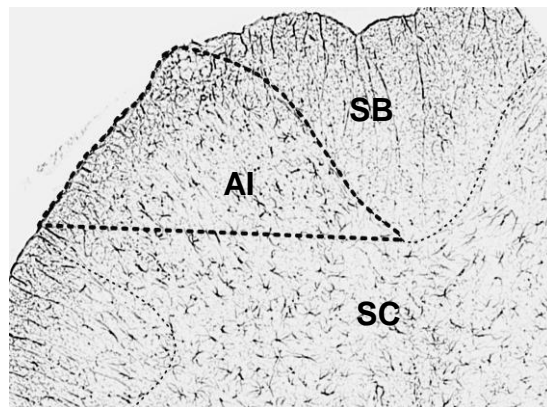
**Figura 38:** Efeito da agmatina (30 mg/kg, 2x/dia) administrada cronicamente pela via i.p. em relação ao perímetro celular de (A) astrócitos e (B) microglias. Cada grupo representa a média de 6 fatias por animal e as barras verticais indicam os E.P.M. \*  $P < 0,05$  difere significativamente do grupo operado; ###  $P < 0,001$  difere significativamente dos grupos sham versus operado e §§§  $P < 0,001$ ; §  $P < 0,05$  difere significativamente dos grupos naive versus operado.



**Figura 39:** Efeito da agmatina (30 mg/kg, 2x/dia) administrada cronicamente pela via i.p. em relação a proporção de aspecto (*aspect ratio*) de (A) astrócitos e (B) microglias. Cada grupo representa a média de 6 fatias por animal e as barras verticais indicam os E.P.M. \*\*\*  $P < 0,001$  difere significativamente do grupo operado; ###  $P < 0,001$  difere significativamente dos grupos sham versus operado e §§§  $P < 0,001$  difere significativamente dos grupos naive versus operado.



**Figura 40:** Efeito da agmatina (30 mg/kg, 2x/dia) administrada cronicamente pela via i.p. em relação a diâmetro de Ferret de (A) astrócitos e (B) microglias. Cada grupo representa a média de 6 fatias por animal e as barras verticais indicam os E.P.M. ### P < 0,001 difere significativamente dos grupos sham versus operado e \$\$\$ P < 0,001 difere significativamente dos grupos naive versus operado.



**Figura 41.** A linha tracejada representa a área utilizada para determinar o número de células positivas para GFAP e OX-42 e determinar a intensidade de fluorescência (AI, área de interesse; SC, substância cinzenta; SB, substância branca). A área compreende o corno dorsal da medula espinal lombar nas lâminas 1 e 2 ipsilateralmente à lesão.

## 6. DISCUSSÃO

Diversos estudos têm sugerido que a agmatina modula a liberação de transmissores e hormônios, possivelmente atuando como um neurotransmissor ou neuromodulador no sistema nervoso de mamíferos e exercendo assim um papel de fundamental importância em diversos processos fisiológicos (para revisão ver REIS e REGUNATHAN, 2000; RAASCH et al., 2001). A agmatina possui várias ações importantes relacionadas à dor, como sua capacidade de potencializar a analgesia causada pela morfina em vários modelos de nocicepção, inclusive àquela causada por inflamação e por lesão neuronal isquêmica, além de reduzir a tolerância, dependência e os sintomas de retirada induzidos pelo álcool e pela morfina (KOLESNIKOV et al., 1996; LI et al., 1999; ARICIOGLU-KARTAL e REGUNATHAN, 2002; ARICIOGLU et al., 2004). Tem sido demonstrado ainda, que a agmatina reduz a resposta nociceptiva causada por inflamação, lesão de nervo espinhal e neuropatia (HORVÁTH et al., 1999; FAIRBANKS et al., 2000; ARICIOGLU-KARTAL et al., 2003a; HOU et al., 2003; KARADAG et al., 2003; ÖNAL et al., 2003; YU et al., 2003; KEKESI et al., 2004). Em relação à neuropatia, tem sido demonstrado que a agmatina é capaz de reverter a alodínia e a hiperalgesia em três modelos de dor neuropática: ligação de nervo espinhal ou ciático e na neuropatia diabética induzida pela estreptozotocina em ratos (FAIRBANKS et al., 2000; KARADAG et al., 2003; ÖNAL et al., 2003; YU et al., 2003). Recentemente, nosso grupo demonstrou que a agmatina apresenta importante efeito antinociceptivo em vários modelos de nocicepção química em camundongos, e que sua ação antinociceptiva envolve, pelo menos em parte, a modulação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos,  $I_1$ -imidazólico, serotoninérgicos dos subtipos 5-HT<sub>3</sub> e 5-HT<sub>2A</sub>, receptores opióides e a via da L-arginina-óxido nítrico (SANTOS et al., 2005). No entanto, dados da literatura demonstram que a agmatina bloqueia os receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA e inibe a NOS, sistemas de neurotransmissores amplamente envolvidos na transmissão da dor (RAASCH et al., 2001).

No presente estudo foi possível obter avanços significativos relacionados aos mecanismos de ação responsáveis pela atividade antinociceptiva da agmatina. Sendo assim, neste trabalho demonstrou-se que a administração sistêmica de agmatina foi capaz de produzir significativo efeito antinociceptivo quando analisada em diferentes modelos de nocicepção em camundongos e ratos. Os dados mais relevantes deste estudo foram que (1) a agmatina administrada sistemicamente (i.p.) causou inibição de forma significativa e

dependente da dose do número das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos; (2) a ação antinociceptiva da agmatina quando analisada neste modelo foi significativamente revertida pelo pré-tratamento dos animais com naltrindol, norbinaltrofimina, naloxona metiodida, toxina pertussis,  $\text{CaCl}_2$ , glibenclamida, TEA, apamina, bicuculina e cafeína, mas não pela caribdotoxina e pela adrenalectomia dos animais; (3) a agmatina, quando administrada pela via i.p., inibiu de maneira dependente da dose a resposta nociceptiva causada pela injeção intratecal de glutamato, NMDA ou trans-ACPD; (4) sendo que o tratamento dos animais com agmatina pela via i.t. também inibiu de maneira dependente da dose a nocicepção produzida pela injeção intratecal de NMDA ou trans-ACPD; (5) a administração de agmatina pela via i.p. produziu antinocicepção de forma significativa e dependente da dose em relação a nocicepção causada pela injeção i.t. de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) em camundongos; (6) a agmatina administrada pela via i.p., inibiu de forma significativa e dependente da dose a nocicepção causada pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos; (7) além disso, a antinocicepção causada pela agmatina no modelo do glutamato foi significativamente revertida pelo pré-tratamento dos animais com DPCPX, mas não pelo ZM-241385; (8) a agmatina e a adenosina apresentaram efeito antinociceptivo sinérgico no modelo do glutamato em camundongos, sendo este efeito revertido pela naloxona e pelo DPCPX, mas não pelo ZM-241385 e pelo efaroxan; (9) O tratamento sistêmico (i.p.) agudo em camundongos com agmatina reduziu de maneira significativa a hiperalgesia mecânica causada pela LPNC; (10) o tratamento agudo ou crônico com agmatina pela via i.p. inibiu a hiperalgesia mecânica causada pelo CFA injetado na pata de camundongos; (11) Entretanto, a agmatina não reduziu o edema causado pela injeção de CFA ou inibiu a atividade da enzima mieloperoxidase; (12) O tratamento crônico sistêmico (i.p.) com agmatina foi eficaz quando avaliado sob parâmetros de recuperação da função motora em ratos submetidos ao ENC; (13) além disso, neste mesmo modelo e esquema de tratamento, a agmatina inibiu a hiperalgesia mecânica dos ratos submetidos ao ENC; (14) Quando analisada sob parâmetros histomorfométricos: o tratamento crônico com agmatina promoveu um aumento da densidade de fibras mielinizadas, espessura da bainha de mielina e porcentagem de fibras mielinizadas e diminuição da área de tecido conjuntivo; (15) Adicionalmente, a agmatina diminuiu a ativação de astrócitos e microglias no corno dorsal da medula espinhal causada pelo ENC em ratos.

Desta forma, os resultados apresentados neste trabalho indicam que a administração de agmatina pela via i.p. em doses que não produzem qualquer disfunção motora ou efeito colateral detectável, causa uma antinocicepção significativa e dependente da dose quando avaliada no modelo de nocicepção visceral induzida pelo ácido acético. O modelo de



contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos é descrito como um modelo de nocicepção inflamatória visceral sendo amplamente utilizado como ferramenta para detecção e avaliação de novos agentes com propriedades analgésicas e antiinflamatórias. Além disso, a injeção de ácido acético na cavidade peritoneal de camundongos promove a liberação de diversos mediadores conhecidos da resposta inflamatória, tais como as prostaglandinas, bradicinina, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , entre outros (VINEGAR et al., 1979; TJØLSEN e HOLE, 1997; RIBEIRO et al., 2000; IKEDA et al., 2001). Estes dados estão de acordo com os dados da literatura que mostram que a agmatina injetada pela via i.p. atravessa rapidamente a barreira hematoencefálica de camundongos de maneira dependente da concentração, sendo que a concentração cerebral de agmatina após sua administração pela via i.p., na dose de 50 mg/kg, foi maior em 1 h do que em 3 h após o tratamento dos animais (PILETZ et al., 2003).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou recentemente que o sistema opióide está envolvido na ação antinociceptiva da agmatina, pois observou-se que a naloxona, antagonista não seletivo dos receptores opióides, inibiu completamente o efeito antinociceptivo da agmatina e da morfina (SANTOS et al., 2005). Atualmente está bem estabelecido que o sistema opióide produz antinocicepção por ativar seus receptores tanto em nível central quanto periférico, sendo que os efeitos da ativação dos receptores opióides periféricos foi observado em modelos de inflamação, neuropatia, dor visceral e dor óssea (LABUZ et al., 2007). Assim, no presente trabalho foi demonstrado que o naltrindol e a nor-binaltorfimina, respectivos antagonistas dos receptores opióides dos subtipos  $\delta$  e  $\kappa$ , também inibiram de maneira significativa o efeito antinociceptivo da agmatina no modelo do ácido acético. Além disso, a naloxona metiodida, antagonista do receptor  $\mu$ -opióide que não atravessa a BHE, também inibiu a antinocicepção causada pela agmatina no modelo do ácido acético. No entanto, foi demonstrado por Li e colaboradores (1999), que a agmatina não inibe o binding de [ $^3$ H]naloxona nos receptores opióides. Com base nesses dados, pode-se sugerir que a agmatina deve exercer um efeito antinociceptivo devido à liberação de opióides endógenos, e não por interagir diretamente com receptores opióides. Contudo, esta hipótese merece estudos e análises posteriores.

A participação da proteína  $G_{i/o}$  na ação antinociceptiva da agmatina é confirmada pelo fato que o pré-tratamento dos animais com toxina pertussis, em dose capaz de inibir a proteína  $G_{i/o}$ , foi capaz de reverter completamente o efeito antinociceptivo da agmatina e da morfina no modelo do ácido acético em camundongos. Dados da literatura mostram claramente que a toxina pertussis causa inativação da proteína  $G_{i/o}$  por ribosilação da sua subunidade catalítica (DE BOCK et al., 2003; WEN et al., 2003 SAVINAINEN e

LAITINEN, 2004). A ativação da proteína  $G_{i/o}$  está associada ao bloqueio dos canais de cálcio dependente de voltagem e ativação dos canais de potássio, resultando em hiperpolarização da membrana neuronal (PERTWEE, 1999; SCHULTZ e GROSS, 2001). Com isso, estes resultados estão em concordância com a hipótese de que a antinocicepção produzida pela agmatina, de maneira semelhante àquela observada para alguns agonistas (por exemplo, morfina, clonidina, adenosina, anandamida, entre outros) envolve um mecanismo relacionado à ativação da proteína  $G_{i/o}$  sensível à toxina pertussis (DE BOCK et al., 2003; WEN et al., 2003 SAVINAINEN e LAITINEN, 2004).

Recentemente, a literatura especializada tem dado destaque à importância dos canais de cálcio dependente de voltagem (CCDVs) no controle e transmissão da dor (SAEGUSA et al., 2002). Além disso, bloqueadores de diferentes tipos de CCDVs foram eficazes em inibir a nocicepção em modelos de dor inflamatória e neuropática (VANEGAS e SCHAIBLE, 2000; SAEGUSA et al., 2001; 2002). O influxo de íons  $Ca^{2+}$  através dos CCDVs controla inúmeras funções celulares, pois é capaz de converter sinais elétricos em sinais bioquímicos intracelulares responsáveis pelo controle de inúmeras atividades neuronais, tais como liberação de neurotransmissores e expressão gênica (HOFMANN et al., 1999; CATTERALL, 2000). Neste sentido, o presente estudo confirmou que os íons cálcio estão envolvidos, pelo menos em parte, na ação antinociceptiva da agmatina, pois o pré-tratamento dos animais com  $CaCl_2$  foi capaz de reverter completamente o efeito antinociceptivo da agmatina e da buspirona, utilizada como controle positivo, estendendo e confirmando os dados da literatura que demonstram que agmatina é capaz de bloquear diferentes tipos de canais de cálcio dependentes de voltagem (WENG et al., 2003; ZHENG et al., 2004).

Os resultados apresentados neste trabalho também demonstram que a ativação dos canais de potássio dependentes de ATP, e dos canais de potássio dependentes de voltagem e/ou ativados por cálcio de baixa condutância, mas não aqueles ativados por cálcio de alta condutância, estão envolvidos na antinocicepção causada pela agmatina. Isto porque o pré-tratamento dos animais com glibenclâmida, apamina ou TEA reverteu o efeito antinociceptivo causado pela agmatina no modelo do ácido acético. Entretanto, a caribdotoxina, um bloqueador dos canais de potássio ativados por cálcio de alta condutância, falhou em afetar a ação antinociceptiva da agmatina. Estes dados estão de acordo com o fato que a antinocicepção causada pela agmatina depende de uma interação com a proteína  $G_{i/o}$  sensível ao tratamento “in vivo” com toxina pertussis, pois a ativação da proteína  $G_{i/o}$  além de inibir a atividade da adenilato ciclase, promove a abertura de dois diferentes tipos de canais de potássio retificadores de corrente: canais de potássio dependentes de ATP e os canais de potássio retificadores de corrente regulados por proteína G (GIRK) (CHILDERS E

DEADWYLER, 1996).

Sabe-se que a agmatina é capaz de estimular a liberação de neurotransmissores e hormônios no SNC, sendo que muitos destes sistemas desempenham papel importante na modulação da transmissão da dor (REIS e REGUNATHAN, 2000; RAASCH et al., 2001; BERKELS et al., 2004). Dentre os sistemas de interesse, destaca-se o sistema adenosinérgico. Assim, a possível participação do sistema adenosinérgico na ação antinociceptiva da agmatina foi confirmada pelo pré-tratamento dos animais com cafeína, tendo em vista que a cafeína foi capaz de reverter completamente o efeito antinociceptivo da agmatina e da adenosina no modelo do ácido acético em camundongos. As ações da adenosina são mediadas por sua interação com diferentes receptores de membrana acoplados as proteínas G (PGs), designados: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub> (FREDHOLM et al., 2001; RIBEIRO et al., 2003). Os receptores A<sub>1</sub> são os mais abundantes no SNC (FASTBOM et al., 1987), com localização preferencial nas sinapses, tanto pré- quanto pós-sináptica (REBOLA et al., 2003; TETZLAFF et al., 1987). Os receptores A<sub>2A</sub> estão localizados principalmente nos gânglios da base, apresentando uma densidade menor nas outras áreas do encéfalo (SVENNINGSSON et al., 1999). Contudo, estes receptores são também encontrados no córtex e sistema límbico, onde estão localizados pré-sinápticamente (CUNHA et al., 1994; REBOLA et al., 2002; 2003). Os receptores A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub> são menos abundantes no SNC e a falta de ligantes seletivos faz com que eles sejam menos estudados (FREDHOLM et al., 2005). Assim, o papel da adenosina no SNC é frequentemente considerado como mediado pelo balanço entre a ativação de receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> (FREDHOLM et al., 2005). A modulação dos receptores adenosinérgicos tem sido reconhecida como fundamental na homeostasia do SNC e está envolvida na regulação de importantes mecanismos centrais como memória e cognição, regulação do ciclo sono-vigília, ansiedade e da dor (FREDHOLM et al., 2005; RIBEIRO et al., 2003). Além disso, também existem evidências da participação do sistema adenosinérgico na etiologia e possível tratamento de algumas doenças neurodegenerativas e psiquiátricas, como a doença de Parkinson, de Huntington, de Alzheimer, depressão e esquizofrenia (BLUM et al., 2003; KASTER et al., 2004; SIMOLA et al., 2006; LARA et al., 2006).

A ligação da adenosina em receptores A<sub>1</sub> pós-sinápticos causa um efluxo de potássio, hiperpolarizando a membrana celular. Tanto a interação da adenosina em receptores A<sub>1</sub> pré e pós-sinápticos causa uma diminuição da ativação dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA). Esses efeitos limitam o influxo neuronal de cálcio e contribuem para a neuroproteção e analgesia (MENDONÇA e RIBEIRO, 2000). Desta forma, com os resultados obtidos neste estudo, podemos sugerir que a agmatina deve produzir antinocicepção, em parte, por promover a liberação de adenosina endógena. Contudo, uma

discussão mais aprofundada a respeito do envolvimento do sistema adenosinérgico na ação antinociceptiva da agmatina será abordada posteriormente.

O ácido  $\gamma$ -amino-butírico (GABA) medeia a maioria das ações inibitórias do sistema nervoso central e periférico, e por este motivo está amplamente envolvido na transmissão e controle da informação nociceptiva. Os efeitos da transmissão gabaérgica são mediados pela ativação de receptores ionotrópicos (GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>C</sub>) e pela ativação dos receptores metabotrópicos (GABA<sub>B</sub>). Sendo assim, o presente estudo sugere que os receptores GABA<sub>A</sub> estão envolvidos, pelo menos em parte, na ação antinociceptiva da agmatina, pois o pré-tratamento dos animais com bicuculina foi capaz de reverter completamente o efeito antinociceptivo da agmatina e do muscimol. No entanto a antinocicepção produzida pela agmatina parece não envolver a participação dos receptores GABA<sub>B</sub>, pois o pré-tratamento dos animais com saclofeno, antagonista seletivo dos receptores gabaérgicos do subtipo GABA<sub>B</sub>, não alterou a antinocicepção causada pela agmatina, mas foi efetivo em reverter completamente a antinocicepção causada pelo baclofeno (agonista GABA<sub>B</sub>) no modelo do ácido acético. Além disso, a ação antinociceptiva da agmatina parece não ser modulada pelos glicocorticóides endógenos, pois a adrenalectomia bilateral dos animais uma semana antes dos experimentos, não modificou sua ação analgésica quando analisada no mesmo modelo.

Nossos resultados demonstram ainda que a administração intraperitoneal de agmatina produziu uma inibição significativa e de forma dependente da dose da resposta nociceptiva causada pela injeção i.pl. de glutamato em camundongos. Recentemente, Beirith e colaboradores (2002) verificaram que a resposta nociceptiva induzida pela injeção intraplantar de glutamato parece envolver sítios de ação periférica, espinal e supraespinal, sendo amplamente mediada tanto por receptores NMDA quanto não-NMDA, bem como pela liberação de NO ou por substâncias relacionadas ao NO. Estas observações juntamente com os dados anteriores do nosso trabalho confirmam o envolvimento da ação da agmatina no sistema glutamatérgico.

Os resultados do presente trabalho também demonstram que a administração sistêmica de agmatina produz inibição dependente da dose da nocicepção causada pela injeção intratecal de glutamato, NMDA ou trans-ACPD em camundongos, no entanto, sem afetar a nocicepção causada pelo AMPA ou pelo cainato. De acordo com estes resultados, foi demonstrado anteriormente que a agmatina, em concentrações acima de 500  $\mu$ M, reduz o *binding* do [<sup>3</sup>H]MK-801 em preparação de membrana de córtex frontal de cérebro de rato (GIBSON et al., 2002). Além do mais, baseado nos valores de DI<sub>50</sub> a agmatina foi cerca de 3 a 4 vezes mais potente em inibir a nocicepção causada pela injeção intratecal de NMDA do que aquela causada pelo glutamato ou pelo trans-ACPD e também foi cerca de 5 e 10 vezes

mais potente em inibir a nocicepção causada pela injeção intratecal de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , respectivamente. A agmatina em concentrações acima de 100  $\mu$ M inibe todas as isoformas da NOS (GALEA et al., 1996). Baseado nos dados descritos anteriormente e nos resultados obtidos neste trabalho, pode-se sugerir que a ação antinociceptiva da agmatina pode ocorrer pela interação com sistemas de modulação central, ambos receptores glutamatérgicos e síntese de NO. Tal possibilidade pode explicar, ao menos em parte, alguns dos efeitos da agmatina, como aqueles já relatados nos vários modelos de nocicepção, inclusive nos modelos de dor inflamatória e neuropática. (FAIRBANKS et al., 2000; ONAL e SOYKAN, 2001; ONAL et al., 2003; SANTOS et al., 2005). Além disso, nosso grupo demonstrou anteriormente que a antinocicepção causada pela agmatina em camundongos também envolve a via da L-arginina-óxido-nítrico entre outros sistemas de neurotransmissores, como o opióide, serotoninérgico,  $\alpha_2$ -adrenergico e imidazólico (SANTOS et al., 2005). Assim, os resultados do presente estudo estendem dados anteriores (FAIRBANKS et al., 2000) e ainda demonstram que a agmatina, quando administrada centralmente, pela via intratecal, causa uma inibição significativa e dependente da dose da nocicepção induzida pela injeção intratecal de NMDA e pelo trans-ACPD (agonista dos receptores metabotrópico de glutamato).

É importante mencionar que a administração sistêmica, pela via intraperitoneal, de agmatina foi capaz de reduzir a resposta nociceptiva, em camundongos, causada pela injeção intratecal de vários agonistas glutamatérgicos. Este efeito foi similar ao perfil de inibição observado pelo conhecido antagonista dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do subtipo NMDA, MK-801. Além disso, o MK-801 quando administrado em uma alta dose, capaz de produzir efeito colateral como hiperlocomoção, foi eficaz em inibir a nocicepção causada por todos os agonistas glutamatérgicos testados. Neste sentido, Coderre e Van Empel (1994) demonstraram que muitos destes antagonistas, como o MK-801, produz significativo efeito antinociceptivo, mas também são capazes de produzir efeito indesejável como distúrbios de coordenação motora. Assim, ao contrário do observado para o MK-801, a agmatina mesmo administrada em altas doses produziu antinocicepção de forma significativa e específica contra a nocicepção causada pela injeção intratecal de glutamato, NMDA e trans-ACPD sem causar alteração da atividade motora do animal. Nossos resultados também demonstram que a administração sistêmica de L-NOARG, um conhecido inibidor da síntese de NO, foi capaz de inibir a resposta nociceptiva causada pela injeção i.t. de glutamato, NMDA e trans-ACPD. Desta forma, a agmatina promoveu uma antinocicepção em um perfil muito semelhante àquele observado a um conhecido inibidor da síntese de NO, bem como do antagonista do receptor NMDA.

Além disso, baseado nos valores de  $DI_{50}$ , foi demonstrado que a agmatina foi aproximadamente 2,5 a 4,0 vezes mais potente em inibir a resposta nociceptiva causada pelo glutamato e NMDA quando comparado com o trans-ACPD. Adicionalmente, a eficácia da agmatina foi menor em relação a nocicepção induzida pelo trans-ACPD quando comparada com àquela causada pelo glutamato e NMDA. Juntos, estes resultados sugerem a participação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos bem como dos metabotrópicos no efeito antinociceptivo da agmatina. Contudo, a antinocicepção causada pela agmatina contra a nocicepção induzida pelo trans-ACPD pode ser explicada, pelo menos em parte, pelo fato de que a agmatina pode inibir diretamente a atividade da NOS (HILL, 2001). Assim, a ação antinociceptiva da agmatina na nocicepção causada pelo trans-ACPD é mediada provavelmente por uma modulação no processo de síntese de NO dependente da subsequente ativação do grupo I ou II dos mGluRs (HILL, 2001; OZAWA et al., 1998). De fato, o perfil antinociceptivo observado para a agmatina é muito similar àquele previamente observado para ambos MK-801 e L-NOARG e está de acordo ao fato da agmatina ser capaz de bloquear tanto o receptor NMDA quanto de inibir a NOS (FERREIRA et al., 1999; GALEA et al., 1996; RAASCH et al., 2001; REIS e REGUNATHAN, 2000; YANG et al., 1999).

Nossos resultados também demonstram que a administração de agmatina pela via i.p. produz uma inibição de maneira significativa e dependente da dose da nocicepção induzida pela injeção intratecal das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em camundongos. Citocinas, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), induzem comportamento nociceptivo, na ausência de estimulação periférica, quando injetados por via intratecal (ROBERTSON et al., 1997; TADANO et al., 1999). Isto pode estar relacionado com a indução da liberação de glutamato e substância P (SP) na medula espinhal estimulados por estas citocinas (TADANO et al., 1999). Além disso, o glutamato e a SP liberados centralmente é capaz de ativar células da glia promovendo a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ , ambos mediadores nociceptivos (para revisão ver WIESELER-FRANK et al., 2004). Neste sentido, Kleinschnitz e colaboradores (2004) demonstraram que os receptores NMDA modulam a expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em dois modelos de lesão nervo periférico (esmagamento e constrição do nervo ciático). Desta forma, a agmatina pode estar prevenindo a ação das citocinas pró-inflamatórias no modelo de nocicepção, pela inibição da liberação de SP e glutamato dos aferentes primários causado por estas citocinas, ou então inibindo a ativação dos neurônios de projeção de glutamato, através da inibição dos receptores do subtipo NMDA (REIS e REGUNATHAN, 2000; RAASCH et al., 2001; REGUNATHAN e PILETZ, 2003; ASKALANY et al., 2005; WANG et al., 2006).

A participação do sistema adenosinérgico na ação antinociceptiva da agmatina foi melhor examinada neste trabalho através do modelo de nocicepção induzida pelo glutamato injetado intraplantar. Assim, no presente trabalho foi verificado que a ação antinociceptiva da agmatina neste modelo envolve o sistema adenosinérgico através da ativação dos receptores do subtipo  $A_1$  da adenosina, pois o DPCPX, antagonista seletivo dos receptores adenosinérgicos do subtipo  $A_1$ , reverteu completamente o efeito antinociceptivo da agmatina no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato. No entanto, a antinocicepção causada pela agmatina no modelo do glutamato não foi revertida pelo pré-tratamento dos animais com o ZM-241385, antagonista seletivo dos receptores adenosinérgicos do subtipo  $A_{2A}$ . O glutamato e seus receptores compreendem o sistema de neurotransmissores excitatórios mais importantes do sistema nervoso de mamíferos. Sabe-se que a liberação excessiva de glutamato pode levar a morte de neurônios por um processo conhecido como excitotoxicidade. No entanto, sabe-se que a transmissão glutamatérgica pode ser modulada por vários sistemas de neurotransmissores, inclusive pelo sistema adenosinérgico, que por sua ação modulatória sob este sistema, apresenta importante efeito neuroprotetor (para maior revisão ver FERRÉ et al, 2005; CUNHA, 2005). Neste sentido, dados já mencionados neste trabalho, demonstram que a agmatina apresenta importante efeito antinociceptivo em camundongos, em parte por modular o sistema glutamatérgico e até mesmo o adenosinérgico.

Estes achados corroboram com dados da literatura que demonstram que a adenosina produz antinocicepção em nível espinhal principalmente pela ativação do seu receptor do subtipo  $A_1$ . No entanto, a ativação do receptor  $A_{2A}$  e  $A_3$  periféricamente aumenta a resposta nociceptiva em diversos modelos, enquanto a ativação do receptor  $A_1$  periférico promove efeito antinociceptivo, assim como sua ativação em nível espinhal (para revisão ver SAWYNOK, 1998). Além disso, está bem estabelecido que o receptor  $A_1$  desempenha papel fundamental na neuroproteção, pois diminui a liberação de glutamato e hiperpolariza neurônios. Assim a ativação do receptor  $A_1$  diminui o dano cerebral, enquanto seu bloqueio exacerba o dano em animais experimentais (para revisão ver CUNHA, 2005).

No presente trabalho foi demonstrado também que o tratamento dos animais com doses sub-ativa de agmatina e adenosina, em associação, produziu significativo efeito antinociceptivo no modelo de nocicepção causado pelo glutamato em camundongos. Este efeito sinérgico observado foi revertido pelo pré-tratamento dos animais com DPCPX, mas não pelo ZM-241385. Assim, pode-se observar no presente trabalho que o efeito antinociceptivo sinérgico causado pela associação de doses sub-ativas de agmatina e adenosina, também envolve o receptor adenosinérgico do tipo  $A_1$  e em parte a ativação do sistema opióide sensível ao tratamento dos animais com naloxona. Desta forma, em nossos

experimentos, o efeito observado para a associação de agmatina e adenosina foi sinérgico. Assim, o efeito antinociceptivo observado pode ser mediado por sistemas de receptores de maneira independente. Entretanto, o fato de que receptores envolvidos no sistema de transmissão nociceptiva estão localizados principalmente no corno dorsal da medula espinhal e que existe uma interação entre os receptores A<sub>1</sub> com os receptores opióides, aumenta a possibilidade de uma interação funcional entre estes sistemas de neurotransmissores (HWANG et al., 2005). Além disso, estes dois sistemas de receptores envolvem um mecanismo de sinalização intracelular semelhante que pode contribuir para os efeitos observados. Neste sentido, dados da literatura apontam uma interação entre estas duas famílias de receptores em relação ao controle da dor, principalmente pela liberação de adenosina endógena que ocorre na presença de morfina (SAWYNOK et al., 1989; PEART e GROSS 2005). No entanto, Lavand'homme e Eisenach (1999) demonstraram que tanto a adenosina exógena quanto a endógena aumenta o efeito anti-hiperalgesia espinhal da morfina em um modelo de dor neuropática em ratos. Além disso, recentemente dados da literatura demonstraram que o efeito anti-hiperalgesia da morfina em modelos de ligação de nervo espinhal em ratos, ocorre pela ativação do receptor  $\mu$ -opióide que promove subsequente liberação de adenosina a qual atua nos receptores do subtipo A<sub>1</sub>. Estes dados em conjunto podem explicar, ao menos em parte, a participação dos sistemas adenosinérgico e opióide na ação antinociceptiva da agmatina. Sendo assim, a agmatina pode causar a liberação de opióides endógenos e estes por sua vez, causar a liberação de adenosina que interagem com seus receptores do subtipo A<sub>1</sub>. A adenosina agindo em receptores A<sub>1</sub> pré-sinápticos inibe o influxo de cálcio e conseqüentemente a liberação de glutamato, contribuindo para analgesia.

A dor crônica difere substancialmente da dor aguda em relação ao tempo de persistência e também em relação a mudanças adaptativas, tais como neuroplasticidade, a qual tem sido descrita em vários níveis do sistema nervoso (BESSON, 1999). Uma das hipóteses da transmissão da dor prévia a lesão neuronal é uma ativação espontânea e persistente de neurônios não-lesionados do DRG. Esta ativação promove a liberação de mediadores nociceptivos e citocinas pró-inflamatórias, as quais sensibilizam neurônios não lesados que participam do processo de perpetuação da dor (CUI et al., 2000). A sensibilização das fibras neuronais aferentes primárias por citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , ou ainda pelo glutamato após lesão neuronal periférica parece ser mediada por uma cascata de sinalização complexa que envolve a produção de inúmeros outros mediadores como óxido nítrico, bradicinina e prostaglandina E<sub>2</sub> (SOMMER e KRESS, 2004). Para avaliar os efeitos da agmatina em modelos de dor persistente, foi analisado o efeito antinociceptivo da agmatina na dor inflamatória causada pela injeção intraplantar de CFA ou



em um modelo de dor neuropática causada pelo LPNC. Uma característica destes modelos de nocicepção é que eles apresentam hiperalgesia e alodinia a estímulos mecânicos e térmicos aplicados no sítio da lesão. Ambos os modelos de dor persistente usados no presente trabalho produzem sensibilização central em resposta a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios, os quais aumentam a sensibilidade das vias sensoriais periféricas e centrais (BASBAUM, 1999; MINAMI et al., 2006).

No presente trabalho foi verificado que o tratamento agudo de camundongos com agmatina foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica causado pelo LPNC. Além disso, o efeito anti-hiperalgesia da agmatina durou por mais de 6 h. Um considerável número de estudos tem demonstrado que a agmatina reduz as respostas nociceptivas causadas por processos inflamatórios, lesão da medula espinhal ou neuropatia (FAIRBANKS et al., 2000; ARICIOGLU-KARTAL et al., 2003b; KARADAG et al., 2003). Em relação a dor neuropática, o presente trabalho estende e confirma dados da literatura, pois demonstra que a agmatina reverte de maneira significativa a dor neuropática causada pelo LPNC. Os resultados do presente trabalho também demonstram pela primeira vez que o tratamento sistêmico (i.p.) agudo ou prolongado dos camundongos com agmatina preveniu a hiperalgesia mecânica causado pelo CFA na pata dos animais. Além disso, a ação anti-hiperalgesia da agmatina foi observada após 30 min do tratamento e prolongou-se por mais de 8 h. Interessantemente, este efeito anti-hiperalgesia causado pela agmatina não foi suscetível a tolerância. Esta conclusão deriva de dados que demonstram que i) a retirada de agmatina foi seguida por retorno completo da hiperalgesia basal e ii) a um novo tratamento intraperitoneal com agmatina, duas vezes por dia, produziu efeito com ação similar. Sabe-se que inflamação de tecidos periféricos produz comportamento nociceptivo persistente em animais que se parecem com dores inflamatórias observadas clinicamente (MYERS et al., 2006). Está bem estabelecido que a nocicepção persistente causada por injeção intraplantar de CFA resulta em prolongada inflamação que pode ser observada dentro de poucas horas, um efeito este que é mediado por diversos mediadores inflamatórios como citocinas, glutamato, NO, prostanóides, histamina, serotonina e agentes imunológicos (RAGHAVENDRA et al., 2004; CHU et al., 2005). Além disso, este processo também envolve sensibilização central devido a liberação destes múltiplos mediadores inflamatórios e nociceptivos, os quais contribuem para o aumento da sensibilidade de ambos aferentes sensoriais periféricos no sítio da lesão e no sistema nervoso central (TRACEY e WALKER, 1995; BASBAUM, 1999; ZIMMERMANN, 2001). Entretanto, o efeito anti-hiperalgesia da agmatina não parece estar associado com uma ação antiinflamatória local. Esta noção é reforçada pelos resultados que demonstram que a agmatina não é capaz de reduzir o edema de pata induzido pelo CFA ou a atividade da

enzima mieloperoxidase.

Tendo em vista os mecanismos de neuroplasticidade relacionados a regeneração do nervo, buscou-se analisar o efeito da agmatina sobre a regeneração de nervo periférico. Tal hipótese baseia-se no fato de que a agmatina influencia na atividade de alguns dos mediadores nociceptivos (como glutamato, SP e NO) e citocinas pró-inflamatórias (como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) envolvidas nestes processos neuro-adaptativos (CUI et al., 2000). As lesões por esmagamento do nervo ciático são modelos bem estabelecidos de regeneração nervosa experimental em estudos que investigam o impacto de vários tratamentos farmacológicos (AL MOUTAERY et al., 1998; GUDEMEZ et al., 2002). Uma lesão do tipo axoniotmese, ou lesão de segundo grau de Sunderland, é caracterizada por um colapso dos axônios e degeneração *Walleriana* distal, entretanto, com a preservação da continuidade da bainha endoneural. Após este tipo de lesão, pode ser esperada uma regeneração espontânea ao longo do coto distal com um bom retorno funcional (SEDDON, 1943, SUNDERLAND, 1990). Como o padrão restaurado de inervação é semelhante ao original, o estudo desta lesão nervosa fornece um bom modelo para estabelecer a fisiopatologia da recuperação funcional do nervo. Os resultados do presente trabalho também demonstram que a agmatina influencia o processo de regeneração do nervo ciático após lesão mecânica em ratos. Os resultados mais relevantes são que (1) o processo da regeneração do nervo ciático foi acelerado quando observado nos parâmetros sensórios-motores denominados Índice Funcional do Ciático (IFC) e Índice Estático do Ciático (IEC); (2) e também sobre análises morfométricas: (densidade de fibras mielinizadas, espessura da bainha de mielina, porcentagem de fibras mielinizadas, porcentagem de fragmentos de degeneração e porcentagem de área de tecido conjuntivo) e (3) houve ainda uma redução significativa na dor neuropática (hiperalgesia mecânica) após o início do tratamento. Além disso, estes dados reafirmam dados anteriores que demonstram que o tratamento com agmatina acelera a regeneração de nervo periférico em um modelo de lesão de nervo facial (BERENHOLZ et al., 2005)

Os sete primeiros dias depois da lesão por esmagamento do nervo, o tempo parece ser crucial na recuperação funcional por causa de eventos celulares que acontecem durante o processo inicial de degeneração *Walleriana*. Do dia 2 ao 3 após a lesão ocorre uma importante infiltração de macrófagos no nervo em degeneração, atraídos por citocinas, como a proteína quimioatraente de monócitos 1, fator inibitório de leucemia (LIF) e interleucinas secretadas por células de Schwann reativas (TOFARIS et al., 2002). A alta taxa da multiplicação celular das células de Schwann é alcançada 3 dias após a lesão e continua, mas com uma frequência menor por 2 a 3 semanas para alcançar um aumento 3 vezes no número das células (SALONEN et al., 1988). Embora ambos dados morfológicos e funcionais

tenham sido utilizados para avaliar a regeneração neuronal após lesão por esmagamento, a correlação entre estes dois tipos de análise não é geralmente utilizada em conjunto (DELLON e MACKINNON, 1989; KANAYA et al., 1996; SHEN e ZHU, 1995).

Em relação aos parâmetros morfométricos quantitativos observados 5 semanas após o esmagamento do nervo ciático, foi observado que a densidade de fibras mielinizadas, a espessura da bainha de mielina e a porcentagem de área com fibras mielinizadas no grupo de animais que sofreu o esmagamento foi menor do que o grupo *sham* (falso-operados), entretanto, a porcentagem de área com tecido conjuntivo e a área com fragmentos de degeneração foram maiores no grupo de animais operados do que no grupo *sham*. Em relação aos resultados obtidos para o grupo dos animais tratados com agmatina, observou-se a melhora em quase todos os parâmetros morfométricos analisados. A recuperação destes parâmetros pode explicar, ao menos em parte, os resultados apresentados para a reação sensório-motora observada com o tratamento dos ratos com agmatina. Têm sido sugerido que a bainha de mielina juntamente com o diâmetro do axônio são indicativos da qualidade do regeneração nervosa, indicando assim o grau de maturação das novas fibras (DE MEDINACELI, 1995). Diante do pressuposto levantou-se aqui a hipótese que o tratamento realizado com agmatina favorece a regeneração do nervo e também a condução dos impulsos nervosos pelo aumento da espessura da bainha de mielina. Recentemente, Micu e colaboradores (2006) demonstraram que o receptor glutamatérgico NMDA medeia o acúmulo e íons  $Ca^{2+}$  na mielina do SNC em resposta a isquemia *in vitro*. Assim, a ação da agmatina direta sob os receptores NMDA pode interferir no processo de degeneração do nervo após a lesão por esmagamento e explicar assim, ao menos em parte, seus efeitos neste modelo.

Desta forma, as células gliais tem aparecido recentemente como fatores chaves nos mecanismos moduladores nas dores crônicas. Neste sentido, sabe-se que astrócitos e microglias respondem a liberação e também liberam diversas moléculas sinalizadoras deste processo, como o glutamato e as citocinas inflamatórias (MILLIGAN e WATKINS, 2009). Para avaliar os efeitos da agmatina sob a ativação destas células gliais, verificamos a ação da agmatina sob alguns aspectos característicos da ativação astrocitária e microglial quando observados 5 semanas após o esmagamento do nervo ciático. Assim, O tratamento dos animais com agmatina diminuiu o número de células positivas para GFAP, mas não de OX-42. No entanto, diminuiu a intensidade de fluorescência tanto para GFAP e OX-42. Estes dados sugerem a ativação de astrócitos e microglias está reduzida na medula espinhal, após o tratamento com agmatina.

Além disso, o tratamento com agmatina promoveu mudanças morfológicas em

astrócitos, os quais apresentaram diminuição do perímetro e aumento da proporção de aspecto (*aspect ratio*, proporção entre circunferência e perímetro). Estes dados sugerem que os astrócitos re-estabeleceram, ao menos em parte, sua morfologia original, como observada nos animais naive ou sham e por esta razão, tornaram-se menos ativos após o tratamento com agmatina. No entanto, o tratamento com agmatina parece não ter influenciado as mudanças morfológicas ocorridas nas microglias após a lesão causada pelo ENC. Desta forma, o tratamento crônico com agmatina produziu significativa redução da ativação astrocitária e microglial na medula espinhal de ratos com lesão por esmagamento de nervo.

Atualmente, é incorreto considerar somente a atividade neuronal na criação e manutenção de dores crônicas e neuropáticas. Desta forma, a ativação glial na medula espinhal parece ser um mecanismo relacionado aos mecanismos envolvidos em neuropáticas de diferentes etiologias (para revisão ver MILLIGAN e WATKINS, 2009). Tem sido demonstrado recentemente que astrócitos e microglias desempenham importantes papéis na transmissão da dor, podendo modular a função sináptica e a excitabilidade neural por diferentes mecanismos (HALASSA et al., 2007; POCOCK e KETTENMANN, 2007). Ambas células gliais são mediadores da resposta imune inata no SNC (NGUYEN et al., 2002). As células gliais excedem os neurônios em número e compreendem os astrócitos, microglias residentes, microglia perivascular e oligodentrócitos, os quais possuem distintas funções no controle do processamento da dor (EMERY et al., 2006).

Os astrócitos são as células gliais mais abundantes no SNC. Seu próximo contato com os neurônios permite a ativação astrocitária por diversos neurotransmissores, além disso, os astrócitos expressam vários receptores de membrana funcionais (PORTER e McCARTHY, 1997). Entre estes pode-se destacar os receptores glutamatérgicos ionotrópicos NMDA e não-NMDA, bem como receptores purinérgicos e receptores de SP. Na ativação astrocitária, o sinal extracelular promove a ativação das vias de sinalização intracelular ERK/MAPK-1 (proteína quinase ativada por mitógeno 1) e JNK/MAPK-8 (c-Jun-N-terminal quinase). Este processo leva a síntese de mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , prostaglandinas E<sub>2</sub> (PE<sub>2</sub>) e NO (para revisão ver MILLIGAN e WATKINS, 2009). Os padrões temporais da ativação enzimática e da liberação de citocinas pró-inflamatórias são diferentes para astrócitos e microglias (ZHUANG et al., 2005). Além disso, a ativação astrocitária crônica após lesão de nervo envolve a ativação de ERK e subsequente *down-regulation* dos transportadores de glutamato GLT-1/SLCIA-2 (transportador de glutamato 1) e GLAST/SLCIA-3 (transportador de glutamato e aspartato) (para revisão ver MILLIGAN e WATKINS, 2009). Durante condições de neuropatia crônica, os astrócitos permanecem ativados em resposta aos mediadores pró-inflamatórios derivados das microglias ativadas

inicialmente (JI e SUTER, 2007).

As microglias residentes, reconhecidas classicamente como “macrófagos” do SNC são células hematopoiéticas que invadem o SNC durante o período embrionário e nunca são re-substituídas. Por outro lado, as microglias perivasculares são substituídas continuamente durante a vida adulta por precursores hematopoiéticos (HICKEY e KIMURA, 1988), sendo que sua produção aumenta durante processo inflamatório no SNC ou lesão de nervo periférico. No entanto, o exato papel de cada sub-população de microglia no SNC saudável ou com determinada patologia permanece desconhecido (para revisão ver MILLIGAN e WATKINS, 2009). Sabe-se que as microglias perivasculares alteram a barreira hematoencefálica e causam efeito anti-inflamatório em resposta a condições inflamatórias. Já as microglias residentes são reconhecidas por exercer ações tanto pró- quanto anti-inflamatórias (ROMERO-SANDOVAL et al., 2008). Geralmente as microglias atuam como a primeira linha de defesa contra invasão de algum patógeno, reconhecendo, sequestrando e processando antígenos. Entretanto, as microglias (tanto perivascular como as residentes) expressam diversos neurotransmissores que também são encontrados em astrócitos e neurônios (POCOK e KETTENMANN, 2007).

Assim, a ativação de células microgliciais produz subsequente liberação de diversas substâncias e ativação de astrócitos e neurônios vizinhos (MILLIGAN e WATKINS, 2009). Durante condições neuropáticas, a ativação de células gliais promove a liberação dos mesmos sinais neuroexcitatórios que são liberados em condições imunológicas. De fato, os eventos fisiológicos que envolvem o início e a manutenção da dor neuropática em modelos animais envolvem sinais neuroexcitatórios que incluem o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (WATKINS e MILLIGAN, 2001; MARCHAND et al, 2005). Além disso, todos os sinais neuroexcitatórios ou neuromodulatórios que as células gliais liberam (como SP, aminoácidos excitatórios, NO e ATP) ou aqueles ou por quais as células gliais expressam receptores, desempenham papel fundamental em estados de dor neuropática (McMAHON et al., 2005). A excitabilidade dos neurônios responsivos a dor aumenta rapidamente em resposta a exposição a estes produtos gliais, os quais apresentam efeito direto em neurônios (BESSON, 1999). Como discutido anteriormente, um dos eventos que ocorre seguindo a lesão em nervo periférico é o aumento do Ca<sup>2+</sup> intracelular, levando a subsequente ativação das vias de p38, MAPK e ERK na microglia. A ativação destas vias promove a ativação de vários fatores de transcrição, como o NF- $\kappa$ B e secreção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e PGE<sub>2</sub>, e do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF).

Uma possibilidade pela qual as citocinas pró-inflamatória liberadas contribuem para a dor é por atuar em seus receptores que são expressos em neurônios em regiões responsivas a

dor na medula espinhal. Por exemplo, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  liberados de astrócitos aumentam a excitabilidade neuronal e a força sináptica por aumentar a condutividade dos receptores glutamatérgicos AMPA e NMDA, bem como, por aumentar o número destes receptores na membrana dos neurônios (STELLWAGEN e MALENKA, 2006). Além disso, a IL-1 $\beta$  aumenta o influxo de íons Ca<sup>2+</sup> através dos receptores NMDA em neurônios da medula espinhal (VIVIANI et al, 2003). Recentemente, Zhang e colaboradores (2008) demonstraram que a IL-1 $\beta$  promove uma fosforilação da subunidade NR-1 do receptor NMDA, causando assim a sua ativação. A abertura do receptor NMDA leva a um aumento do influxo de Ca<sup>2+</sup> (WOOLF e MANNION, 1999) e aumento na produção de NO e PGE<sub>2</sub>, os quais então envolvidos na amplificação da excitabilidade dos neurônios de projeção da dor (BESSON, 1999). Em contrapartida, como mencionado anteriormente, o glutamato e a SP são capazes de ativar células gliais promovendo a subsequente liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  (para revisão ver WIESELER-FRANK et al., 2004).

Assim, estes dados em conjunto podem explicar, ao menos em parte, a participação dos astrócitos e microglias na ação antinociceptiva da agmatina. Desta forma, os dados de imunohistóquímica observados para a agmatina no modelo de lesão por ENC em ratos reafirmam e a hipótese anterior de que a agmatina pode prevenir a ação das citocinas pró-inflamatórias, pela inibição da liberação de SP e glutamato dos aferentes primários causado por estas citocinas, além de inibir a ativação dos neurônios de projeção de glutamato, através da inibição dos receptores do subtipo NMDA. No entanto, a ação da agmatina parece estar mais relacionada a uma diminuição da atividade de astrócitos do que de microglias quando analisada após 35 dias da lesão por esmagamento.

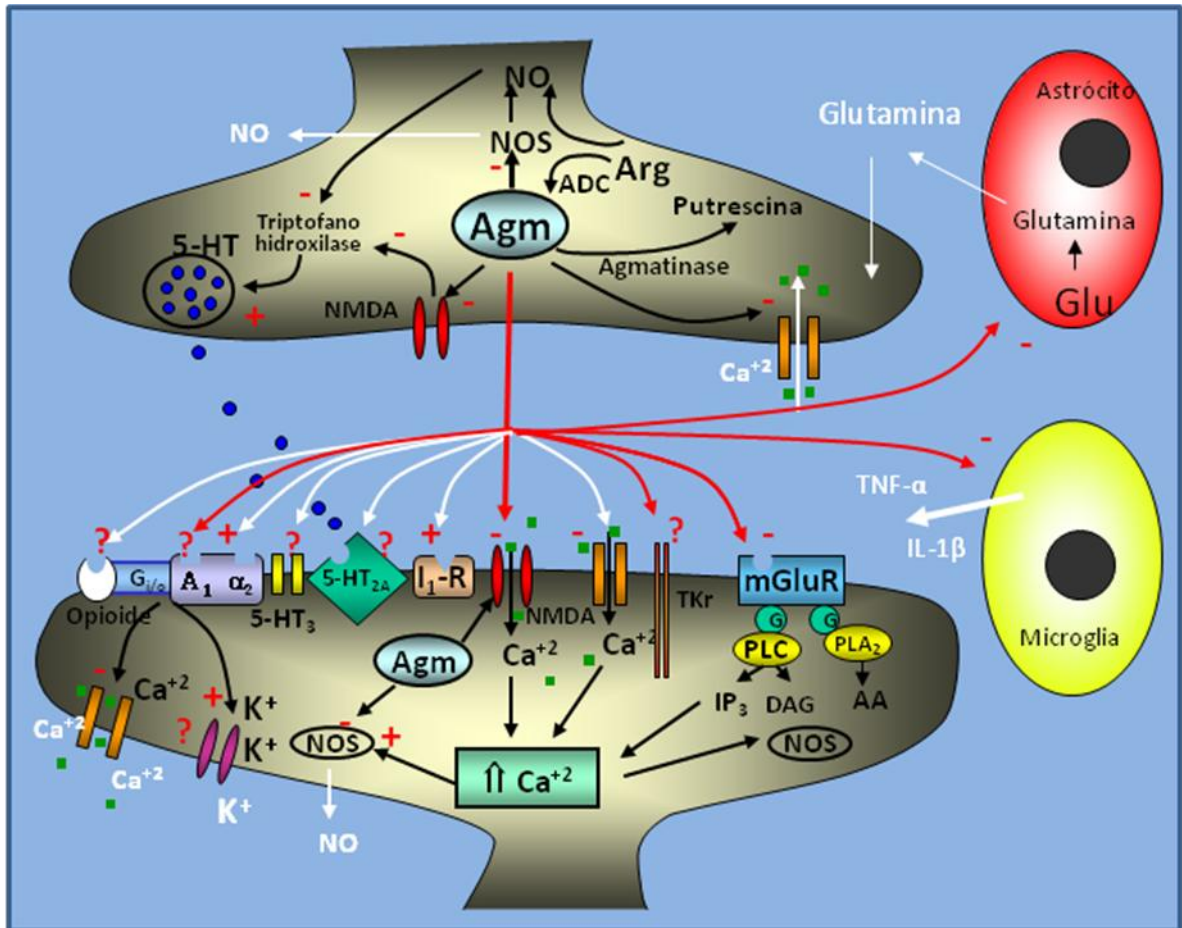


Figura 41. Mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva da agmatina. + significa estimula e - significa inibe.

## 7. CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados do presente trabalho fornecem evidências de que a agmatina, administrada pela via intraperitoneal, exerce uma antinocicepção pronunciada, de ação central, rápida e duradoura contra a nocicepção química induzida pelo ácido acético e glutamato em doses nas quais não interfere na atividade locomotora dos camundongos.

Vários mecanismos, adicionais aos já demonstrados anteriormente por nosso ou outro grupo, parecem estar envolvidos na ação antinociceptiva da agmatina tais como sua habilidade de bloquear os receptores NMDA e modular a atividade dos receptores metabotrópicos, a qual se deve indiretamente, pois a agmatina inibe o processo de síntese de NO dependente da subsequente ativação do grupo I ou II dos mGluRs;

O envolvimento do sistema opióide (através dos receptores  $\kappa$  e  $\delta$  localizados centralmente ou periféricamente e dos receptores  $\mu$  localizados periféricamente), os quais parecem participar de forma indireta, pelo fato de que a agmatina atuando sobre os receptores NMDA e NOS poderia causar a liberação de opióides endógenos;

O envolvimento do sistema adenosinérgico (através dos receptores  $A_1$ ), os quais também parecem participar de forma indireta, pelo fato de que a agmatina atuando sobre os receptores NMDA e NOS poderia causar a liberação de opióides endógenos e estes por sua vez promover a liberação de adenosina endógena;

O envolvimento da proteína  $G_{i/o}$ , dos canais de cálcio e dos canais de potássio; pelo fato de que a agmatina ativando receptores acoplados a proteína  $G_{i/o}$ , de maneira direta ou indireta, promove a abertura dos canais de potássio e o bloqueio dos canais de cálcio;

A participação do sistema gabaérgico (através dos receptores  $GABA_A$ ); no entanto, estudos complementares são necessários afim de esclarecer com precisão de que maneira ocorre esta interação;

No entanto, os canais de potássio ligados aos canais de cálcio de alta condutância, os receptores  $GABA_B$  ou  $A_{2A}$ , bem como a os glicocorticóides endógenos parecem não estar envolvidos na ação antinociceptiva da agmatina;



Nossos resultados também demonstram que a administração sistêmica de agmatina, produz efeito antinociceptivo e dose dependente em camundongos contra a resposta nociceptiva causada pela administração citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ );

Além disso, este trabalho fornece evidência convincente de que a agmatina exerce uma ação antinociceptiva de ação rápida contra a nocicepção causada pelo CFA e pelo LPNC. Entretanto, um mecanismo relacionado com a inibição do processo inflamatório local parece não contribuir para a ação antinociceptiva da agmatina;

Também foi observado que a agmatina é capaz de acelerar o processo de regeneração do nervo ciático, pois o tratamento dos ratos diariamente exibiu melhora das funções sensório-motoras avaliadas e também em relação aos parâmetros morfométricos quantitativos observados. Além disso, a capacidade da agmatina de interferir no processo de ativação das células gliais, principalmente nos astrócitos, após um a lesão neuropática, parece contribuir para seus efeitos observados em relação a recuperação da função sensório-motora de ratos;

Desta forma, o desenvolvimento de substâncias capazes de modular sistemas de neurotransmissores ou neuromoduladores endógenos envolvidos no controle da dor, sem efeitos colaterais importantes, torna-se de extrema importância, pois poderiam representar moléculas candidatas para uso clínico capazes de diminuir o sofrimento de milhares de pessoas que sofrem pela falta de uma terapia realmente eficiente contra os diversos tipos de dores observadas em humanos, principalmente àquelas crônicas e neuropáticas. Assim, a agmatina ou seus derivados poderiam vir a ser usados no futuro para o controle destes diferentes tipos de dor em humanos.

## 8. REFERÊNCIAS

- Afrah AW, Stiller CO, Olgart L, Brodin E, Gustafsson H. 2001. Involvement of spinal N-methyl-D-aspartate receptors in capsaicin-induced in vivo release of substance P in the rat dorsal horn. **Neurosci. Lett.** 316: 83-86.
- Al Moutaery K, Arshaduddin M, Tariq M, Al Deeb S. 1998. Functional recovery and vitamin E level following sciatic nerve crush injury in normal and diabetic rats. **Int. J. Neurosci.** 96: 245-254.
- Alberti K, Woods H, Whalley M. 1973. Mechanism of action of the monoguanidine hypoglaemic agents, galegine and agmatina. **Eur. J. Clin. Invest.** 3: 208.
- Aricioglu F, Altunbas H. 2003. Is agmatine an endogenous anxiolytic/antidepressant agent? **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 1009: 136-140.
- Aricioglu-Kartal F, Regunathan S. 2002. Effect of chronic morphine treatment on the biosynthesis of agmatine in rat brain and others tissues. **Life Sci.** 71: 1695-1701.
- Aricioglu-Kartal F, Korcegez E, Bozkurt A, Ozyalcin S. 2003a. Effect of agmatine on acute and mononeuropathic pain. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 1009: 105-115.
- Aricioglu-Kartal, F., Korcegez, E., Bozkurt, A., Ozyalcin, S., 2003b. Effect of agmatine on acute and mononeuropathic pain. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 1009: 105-115.
- Aricioglu F, Paul IA, Regunathan S. 2004. Agmatine reduces only peripheral-related behavioral signs, not the central signs, of morphine withdrawal in nNOS deficient transgenic mice. **Neurosci.** 354: 153-157.
- Arteni NS, Lavinsky D, Rodrigues AL, Frison VB, Netto CA. 2002. Agmatine facilitates memory of an inhibitory avoidance task in adult rats. **Neurobiol. Learn. Mem.** 78: 465-469.
- Askalany AR, Yamakura T, Petrenko AB, Kohno T, Sakimura K, Baba H. 2005. Effect of agmatine on heteromeric N-methyl-D-aspartate receptor channels. **Neurosci. Res.** 52: 387-392.
- Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. 1989. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. **Plast. Reconstr. Surg.** 83: 129-138.
- Basbaum AI. 1999. Spinal mechanisms of acute and persistent pain. **Reg. Anesth. Pain Med.** 24: 59-67.
- Beirith A, Santos ARS, Calixto JB. 2002. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Res.** 924: 219-228.
- Beirith A, Santos ARS, Calixto JB. 2003. The role of neuropeptides and capsaicin-sensitive fibres in glutamate-induced nociception and paw oedema in mice. **Brain Res.** 969: 110-116.

- Bell J, Malmberg RT. 1990. Analysis of a cDNA encoding arginine decarboxylase from oat reveals similarity to the E. coli arginine decarboxylase and evidence protein processing. **Mol. Genet.** 224: 431-436.
- Bennett GJ, Xie YK. 1988. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain.** 33: 87-107
- Berendse HW, Groenewegen HJ. 1991. Restricted cortical termination fields of the midline and intralaminar thalamic nuclei in the rat. **Neuroscience.** 42: 73-102.
- Berenholz L, Segal S, Gilad VH, Klein C, Yehezkeili E, Eviatar E, Kessler A, Gilad GM. 2005. Agmatine treatment and vein graft reconstruction enhance recovery after experimental facial nerve injury. **J. PNS.** 10: 319-328.
- Berkels R, Taubert D, Grundemann D, Schomig E. 2004. Agmatine signaling: odds and threads. **Cardiovasc. Drug Rev.** 22: 7-16.
- Besson JM, Chaouch A. 1987. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiol. Rev.** 67: 67-186.
- Besson JM. 1997. The complexity of physiopharmacologic aspects of pain. **Drugs.** 53: 1-9.
- Besson JM. 1999. The neurobiology of pain. **Lancet.** 353: 1610-1615.
- Blum D, Hourez R, Galas M, Popoli P, Schiffmann SN. 2003. Adenosine receptors and Huntington's disease: implications for pathogenesis and therapeutics. **Lancet Neurol.** 2: 366-374.
- Boronat MA, Olmos G, Garcia-Sevilla JA. 1998. Attenuation of tolerance to opioid-induced antinociception and protection against morphine-induced decrease of neurofilament proteins by idazoxan and I2-imidazoline ligands. **Br. J. Pharmacol.** 125: 175-185.
- Bortolanza LB, Ferreira J, Hess SC, Delle Monache F, Yunes RA, Calixto JB, 2002. Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. **Eur. J. Pharmacol.** 25: 203-208.
- Bowsher D. 1993. Pain syndromes and their treatment. **Curr. Opin. Neurol. Neurosurg.** 6: 257-263.
- Budni J, Gadotti VM, Kaster MP, Santos ARS, Rodrigues ALS. 2007. Role of different types of potassium channels in the antidepressant-like effect of agmatine in the mouse forced swimming test. **Eur. J. Pharmacol.** 575: 87-93.
- Campana WM. 2007. Schwann cells: Activated peripheral glia and their role in neuropathic pain. **Brain Behav. Immun.** 21: 522-527.
- Campbell WW. 2008. Evaluation and management of peripheral nerve injury. **Clin Neurophysiol.** 119: 1951-1965.
- Carginin-Ferreira E, Sarasquete C. 2008. **Histofisiología de Moluscos Bivalvos Marinos.** Madrid: CSIC.

Carlton SM, Coggeshall RE. 1999. Inflammation-induced changes in peripheral glutamate receptor populations. **Brain Res.** 820: 63-70.

Carraway MS, Welty-Wolf KE, Miller DL, Ortel TL, Idell S, Ghio AJ, Petersen LC, Piantadosi CA. 2003. Blockade of tissue factor: treatment for organ injury in established sepsis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 167: 1200-1209.

Catterall WA. 2000. Structure and function of neuronal Ca<sup>2+</sup> channels and their role in neurotransmitter release. **Cell. Calcium.** 24: 307-323.

Chizh BA, 2002. Novel approaches to targeting glutamate receptors for the treatment of chronic pain: review article. **Amino Acids.** 23: 169-176.

Childers SR, Deadwyler SA. 1996. Role of cyclic AMP in the actions of cannabinoid receptors. **Biochem. Pharmacol.** 52: 819-827.

Chong MS, Bajwa ZH. 2003. Diagnosis and treatment of neuropathic pain. **J. Pain Symptom Manage.** 25: 4-11.

Chu YC, Guan Y, Skinner J, Raja SN, Johns RA, Tao YX. 2005. Effect of genetic knockout or pharmacologic inhibition of neuronal nitric oxide synthase on complete Freund's adjuvant-induced persistent pain. **Pain.** 119, 113-123.

Coggeshall RE, Carlton SM. 1997. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. **Brain Res. Rev.** 24: 28-66.

Courteix C, Privat AM, Pélissier T, Hernandez A, Eschalier A, Fialip J. 2007. Agamintine induces antihyperalgesic effects in diabetic rats and a superadditive interaction with *R*(-)-3-(2-carboxypiperazine-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid, a *N*-methyl-D-aspartate-receptor antagonist. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 322: 1237-1245.

Coderre TJ, Van Empel I, 1994. The utility of excitatory amino acid (EAA) antagonists as analgesic agents: I. Comparison of the antinociceptive activity of various classes of EAA antagonists in mechanical, thermal and chemical nociceptive tests. **Pain** 59: 345-352.

Craig AD, Dostrovsky JO. 1999. Medulla to thalamus. In: Wall PD, Melzack R. **Textbook of pain.** Churchill Livingstone: Londres. 1-8.

Cui JG, Holmin S, Mathiesen T, Meyerson BA, Linderoth B. 2000. Possible role of inflammatory mediators in tactile hypersensitivity in rat models of mononeuropathy. **Pain.** 88: 239-248.

Cunha RA, Johansson B, Van Der Ploeg I. 1994. Evidence for functionally important adenosine A<sub>2A</sub> receptors in the rat hippocampus. **Brain Res.** 649: 208-216.

Cunha RA. 2005. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A<sub>1</sub> receptor activation to A<sub>2A</sub> receptor blockade. **Purinergic Signal.** 1: 111-134.

- De Block F, Kurz J, Azad SC, Parsons CG, Hapfelmeier G, Zieglgansberger W, Rammes G. 2003. Alpha2-adrenoreceptor activation inhibits LTP and LTD in the basolateral amygdala: involvement of  $G_{i/o}$ -protein-mediated modulation of  $Ca^{2+}$ -channels and inwardly rectifying  $K^+$ -channels in LTD. **Eur. J. Neurosci.** 17: 1411-1424.
- Dellon AL, Mackinnon SE. 1989. Sciatic nerve regeneration in the rat. Validity of walking track assessment in the presence of chronic contractures. **Microsurgery.** 10: 220-225.
- De Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. 1982. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. **Exp. Neurol.** 77: 634-643.
- Demehri S, Homayoun H, Honar H, Riazi K, Vafaie K, Roushanzamir F, Dehpour AR. 2003. Agmatine exerts anticonvulsant effect in mice: modulation by alpha2-adrenoceptors and nitric oxide. **Neuropharmacology.** 45: 534-542
- De Vos H, Convents A, De Keyser J, De Backer JP, Van Megen IJ, Ebinger G, Vauquelin G. 1991. Autoradiographic distribution of alpha 2 adrenoceptors, NAIBS, and 5-HT<sub>1A</sub> receptors in human brain using [<sup>3</sup>H]idazoxan and [<sup>3</sup>H]rauwolscine. **Brain Res.** 566: 13-20.
- De Vos H, Bricca G, De Keyser J, De Backer JP, Bousquet P, Vauquelin G. 1994. Imidazoline receptors, non-adrenergic idazoxan binding sites and alpha2-adrenoceptors in the human central nervous system. **Neuroscience.** 59: 589-598.
- Dickenson AH. 1995. Spinal cord pharmacology of pain. **Br. J. Anaesth.** 75: 193-200.
- Dickenson AH, Chapman V, Green GM. 1997. The pharmacology of excitatory and inhibitory amino acid-mediated events in the transmission and modulation of pain in the spinal cord. **Gen. Pharmacol.** 28: 633-638.
- Dray A. 1997. Peripheral Mediators of Pain. In: Dickenson, A., Besson, J., -M., editors. **The Pharmacology of Pain.** Vol.130/I., Springer: Verlag, Berlin. 21-41
- Dray A, Urban I, Dickenson A, 1994. Pharmacology of chronic pain. **Trends Pharmacol. Sci.** 15: 190-197.
- Dudkowska M, Lai J, Gardini G, Stachurska A, Grzelakowska-Sztabert B, Colombatto S, Manteuffel-Cymborowska M. 2003. Agmatine modulates the in vivo biosynthesis and interconversion of polyamines and cell proliferation. **Biochim. Biophys. Acta.** 1619: 159-166.
- Eglen RM, Hudson AL, Kendall DA, Nutt DJ, Morgan NG, Wilson VG, Dillon MP. 1998. 'Seeing through a glass darkly': casting light on imidazoline 'I' sites. **Trends Pharmacol. Sci.** 19: 381-390.
- Emery B, Butzkueven H, Snell C, Binder M, Kilpatrick TJ. 2006. Oligodendrocytes exhibit selective expression of suppressor of cytokine signaling genes and signal transducer and activator of transcription 1 independent inhibition of interferon-gamma-induced toxicity in response to leukemia inhibitory factor. **Neuroscience.** 137: 463-472.
- Evans DM, Ralston SH. 1996. Nitric oxide and bone. **J. Bone Miner. Res.** 11: 300-305.

Fairbanks CA, Schreiber KL, Brewer KL, Yu CG, Stone LS, Kitto KF, Nguyen HO, Grocholski BM, Shoeman DW, Kehl LJ, Regunathan S, Reis DJ, Yeziarski RP, Wilcox GL. 2000. Agmatine reverses pain induced by inflammation, neuropathy, and spinal cord injury. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 97: 10584-10589.

Fastbom J, Pazos A, Palacios JM. 1987. The distribution of adenosine A<sub>1</sub> receptors and 5'-nucleotidase in the brain of some commonly used experimental animals. **Neuroscience.** 22: 813-826.

Ferreira J, Santos ARS, Calixto JB. 1999. The role of systemic, spinal and supraspinal L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway in thermal hyperalgesia caused by intrathecal injection of glutamate in mice. **Neuropharmacology.** 38: 835-842.

Ferreira J, Campos MM, Pesquero JB, Araujo RC, Calixto JB. 2001. Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. **Neuropharmacology.** 41: 1006-1012.

Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Klotz K, Linden L. 2001. International Union of Pharmacology XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. **Pharmacol. Rev.** 53: 527-552.

Fredholm BB, Chen JF, Cunha RA, Svenningsson P, Vaugeois JM. 2005. Adenosine and brain function. **Int. Rev. Neurobiol.** 63: 191-270.

Feng Y, Halaris AE, Piletz JE. 1997. Determination of agmatine in brain and plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.** 691: 277-286.

Ferré S, Diamond I, Goldberg SR, Yao L, Hourani SMO, Huang ZL, Urade Y, Kitchen I. 2007. Adenosine A<sub>2A</sub> receptors in ventral striatum, hypothalamus and nociceptive circuitry. Implications for drug addiction, sleep and pain. **Prog. Neurobiol.** 83: 332-347.

Fundytus ME. 2001. Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain. **CNS Drugs.** 15: 29-58.

Galea E, Regunathan S, Eliopoulos V, Feinstein DL, Reis DJ. 1996. Inhibition of mammalian nitric oxide synthases by agmatine, an endogenous polyamine formed by decarboxylation of arginine. **Biochem. J.** 316: 247-249.

Gao Y, Li F, Wu N, Su RB, Liu Y, Lu XQ, Liu Y, Li J. 2008. Effect of agmatine on DAMGO-induced  $\mu$ -opioid receptor down-regulation and internalization via activation of IRAS, a candidate for imidazoline I(1) receptor. **Eur. J. Pharmacol.** 599: 18-23.

Gardini G, Cravanzola C, Autelli R, Testore G, Cesa R, Morando L, Solinas SP, Muzio G, Grillo MA, Colombatto S. 2003. Agmatine inhibits the proliferation of rat hepatoma cells by modulation of polyamine metabolism. **J. Hepatol.** 39: 793-799.

Gibson DA, Harris BR, Rogers DT, Littleton JM. 2002. Radioligand binding studies reveal agmatine is a more selective antagonist for a polyamine-site on the NMDA receptor than arcaine or ifenprodil. **Brain Res.** 952: 71-77.

- Gilad GM, Gilad VH, Rabey JM. 1996. Arginine and ornithine decarboxylation in rodent brain: coincidental changes during development and after ischemia. **Neurosci. Lett.** 216: 33-36.
- Gilad GM, Gilad VH. 2000. Accelerated functional recovery and neuroprotection by agmatine after spinal cord ischemia in rats. **Neurosci. Lett.** 296: 97-100.
- Glavin GB, Carlisle MA, Smyth DD. 1995. Agmatine, an endogenous imidazoline receptor agonist, increases gastric secretion and worsens experimental gastric mucosal injury in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 274: 741-744.
- Goudet C, Magnaghi V, Landry M, Nagy F, Gereau RW 4th, Pin JP. 2008. Metabotropic receptors for glutamate and GABA in pain. **Brain Res. Rev.** No prelo.
- Gründemann D, Hahne C, Berkels R, Schomig E. 2003. Agmatine is efficiently transported by non-neuronal monoamine transporters extraneuronal monoamine transporter (EMT) and organic cation transporter 2 (OCT-2). **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 304: 810-817.
- Gudemez E, Ozer K, Cunningham B, Siemionow K, Browne E, Siemionow M. 2002. Dehydroepiandrosterone as an enhancer of functional recovery following crush injury to rat sciatic nerve. **Microsurgery.** 22: 234-41.
- Guirimand F, Le Bars D. 1996. Physiologie de la nociception. **Ann. Fr. Anesth. Réanim.** 15: 1048-1079.
- Guyton AC. 1992. Sensações somáticas: II. Dor, cefaléia e sensações térmicas. In: Guyton AC. **Tratado de fisiologia médica.** Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 458-467.
- Haenisch B, von Kügelgen I, Bönish H, Göthert M, Sauerbruch T, Schepke M, Marklein G, Höfling K, Schröder D, Molderings GJ. 2008. Regulatory mechanisms underlying agmatine homeostasis in humans. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.** 295: 1104-1110.
- Halaris A, Piletz JE. 2001. Imidazoline receptors: Possible involvement in the pathophysiology and treatment of depression. **Hum. Psychopharmacol.** 16: 65-69.
- Halassa MM, Fellin T, Hatdon PG. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. **Trends Mol. Med.** 13: 54-63.
- Haydon PG. 2001. GLIA: listening and talking to the synapse. **Nat. Rev. Neurosci.** 2: 185-193.
- Head GA. 2003. Agmatine and Imidazoline Systems: Fourth International Symposium. **Drugs.** 6: 544-547.
- Hickey WF, Kimura H. 1988. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen *in vivo*. **Science.** 239: 290-292.
- Hill RG. 2001. Molecular basis for the perception of pain. **Neuroscientist.** 7: 282-292.
- Hofmann F, Lacinova L, Klugbauer N. 1999. Voltage-dependent calcium channel: from structure to function. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.** 139: 33-87.

- Hong S, Kim CY, Lee JE, Seong GJ. 2009. Agmatine protects culture retinal ganglion cells from necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis. **Life Sci.** 84: 28-32.
- Horváth G, Kékesi G, Dobos I, Szikszay M, Klimscha W, Benedek G. 1999. Effect of intrathecal agmatine on inflammation-induced thermal hyperalgesia in rats. **Eur. J. Pharmacol.** 368: 197-204.
- Hou SW, Qi JS, Zhang Y, Qiao JT. 2003. Spinal antinociceptive effect of agmatine and tentative analysis of involved receptors: study in an electrophysiological model of rats. **Brain Res.** 968: 277-280.
- Hylden JL, Wilcox GL. 1980. Intrathecal morphine in mice: a new technique. **Eur. J. Pharmacol.** 67: 313-316.
- Hwang JH, Hwang GS, Cho SK, Han SM. 2005. Morphine Can Enhance the Antiallodynic Effect of Intrathecal R-PIA in Rats with Nerve Ligation Injury. **Anesth. Analg.** 100: 461-468.
- Ikeda Y, Ueno A, Naraba H, Oh-ishi S. 2001. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sci.** 69: 2911-2919.
- Jackson DL, Graff CB, Richardson JD, Hargreaves KM. 1995. Glutamate participates in the peripheral modulation of thermal hyperalgesia in rats. **Eur. J. Pharmacol.** 284: 321-325.
- Ji RR, Suter MR. 2007. p38 MAPK, microglial signalling and neuropathic pain. **Mol. Pain.** 3: 33-33.
- Jones BE, Yang TZ. 1985. The efferent projections from the reticular formation and the locus coeruleus studied by anterograde and retrograde axonal transport in the rat. **J. Comp. Neurol.** 242: 56-92.
- Julius D, Basbaum AI. 2001. Molecular mechanisms of nociception. **Nature.** 413: 203-210.
- Kalra SP, Pearson E, Sahu A, Kalra PS. 1995. Agmatine, a novel hypothalamic amine, stimulates pituitary luteinizing hormone release in vivo and hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone release in vitro. **Neurosci. Lett.** 194: 165-168.
- Kamisaki Y, Ishikawa T, Takao Y, Omodani H, Kuno N, Itoh T. 1990. Binding of [<sup>3</sup>H]p-aminoclonidine two sites, distribution of  $\alpha_2$ -adrenoceptors and imidazoline binding sites in rat brain. **Brain Res.** 514: 15-21.
- Kanaya F, Firrell JC, Breidenbach WC. 1996. Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration. **Plast. Reconstr. Surg.** 98: 1264-1271.
- Kaster MP, Rosa AO, Rosso MM, Goulart EC, Santos ARS, Rodrigues ALS. 2004. Adenosine administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptors. **Neurosci. Lett.** 355: 21-24.
- Karadag HC, Ulugol A, Tamer M, Ipci Y, Dokmeci I. 2003. Systemic agmatine attenuates tactile allodynia in two experimental neuropathic pain models in rats. **Neurosci. Lett.** 339: 88-90.



Kekesi G, Dobos I, Benedek G, Horvath G. 2004. The Antinociceptive potencies and interactions of endogenous ligands during continuous intrathecal administration: adenosine, agmatine, and endomorphin-1. **Anesth. Analg.** 98: 420-426.

Kiernan JA. 2004. **Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice.** London. Oxford: Butterworth-Heinemann.

King PR, Gundlach AL, Louis WJ. 1995. Quantitative autoradiographic localization in rat brain of alpha 2-adrenergic and non-adrenergic I-receptor binding sites labeled by [<sup>3</sup>H]rilmenidine. **Brain Res.** 675: 264-278.

Kleinschnitz C, Brinkhoff J, Zelenka M, Sommer C, Stoll G. The extent of cytokine induction in peripheral nerve lesions depends on the mode of injury and NMDA receptor signaling. **J. Neuroimmunol.** 149: 77-83, 2004.

Kolesnikov Y, Jain S, Pasternak GW. 1996. Modulation of opioid analgesia by agmatine. **Eur. J. Pharmacol.** 296: 17-22.

Koster R, Anderson M, de Beer EJ. 1959. Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc.** 18: 412.

Kribben B, Heller J, Trebicka J, Sauerbruch T, Bruss M, Gothert M, Molderings GJ. 2004. Agmatine (decarboxylated arginine), a modulator of liver cell homeostasis and proliferation. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.** 369: 160-165.

Kuzirian A, Meyhofer E, Hill L, Neary JT, Alkon DL. 1986. Autoradiographic measurement of tritiated agmatine as an indicator of physiologic activity in Hermissenda visual and vestibular neurons. **J. Neurocytol.** 15: 629-643.

Labuz D, Mousa SA, Schäfer, Stein C, Machelska. Relative contribution of peripheral versus central opioid receptors to antinociception. **Brain Res.** 1160: 30-38.

Landini G: Particle 8 Plus Image J plugin. The University of Birmingham, England, UK, 2008 [<http://www.dentistry.bham.ac.uk/landinig/software/software.html>].

Lara DR, Dall'igna OP, Ghisolfi ES, Brunstein MG. 2006. Involvement of adenosine in the neurobiology of schizophrenia and its therapeutic implications. **Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry.** 30: 617-629.

Lavand'Homme P, De Kock M. 1998. Practical guidelines on the postoperative use of patient-controlled analgesia in the elderly. **Drugs Aging.** 13: 9-16.

Lavinsky D, Arteni NS, Netto CA. 2003. Agmatine induces anxiolysis in the elevated plus maze task in adult rats. **Behav. Brain Res.** 141: 19-24.

Li G, Regunathan S, Barrow CJ, Eshragi J, Cooper R, Reis DJ. 1994. Agmatine: An endogenous clonidine-displacing substance in the brain. **Science.** 263: 966-969.

Li J, Li X, Pei G, Qin BY. 1999. Effects of agmatine on tolerance to and substance dependence on morphine in mice. **Zhongguo Yao Li Xue Bao.** 20: 232-238.

- Li YF, Gong ZH, Cao JB, Wang HL, Luo ZP, Li J. 2003. Antidepressant-like effect of agmatine and its possible mechanism. **Eur. J. Pharmacol.** 469: 81-88.
- Liang JH, Li JX, Wang XH, Chen B, Lu Y, Zhang P, Han R, Ye XF. 2004. L-type calcium channel blockers enhance 5-HTP-induced antinociception in mice. **Acta Pharmacol. Sin.** 25: 644-650.
- Liu H, Wang H, Sheng M, Jan LY, Jan YN, Basbaum AI. 1994. Evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptors in the spinal cord dorsal horn. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 91: 8383-8387.
- López JF, Akil H, Watson SJ. 1999. Role of biological and psychological factors in early development and their impact on adult life: neural circuits mediating stress. **Biol. Psychiatry.** 46: 1461-1471.
- Loeser JD, Melzack R. 1999. Pain: an overview. **Lancet.** 353: 1607-1609.
- Loeser JD, Treede RD. 2008. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain.** 137: 473-477.
- Lutfy K, Cai SX, Woodward RM, Weber E. 1997. Antinociceptive effects of NMDA and non-NMDA receptor antagonists in the tail flick test in mice. **Pain.** 70: 31-40.
- Ma QP, Woolf CJ. 1996. Progressive tactile hypersensitivity: an inflammation-induced incremental increase in the excitability of the spinal cord. **Pain.** 67: 97-106.
- Marchand F, Perretti M, McMahon SB. 2005. Role of the immune system in chronic pain. **Nat. Rev. Neurosci.** 6: 521-530.
- Mannion RJ, Doubell TP, Coggeshall RE, Woolf CJ. 1996. Collateral sprouting of uninjured primary afferent A-fibers into the superficial dorsal horn of the adult rat spinal cord after topical capsaicin treatment to the sciatic nerve. **J. Neurosci.** 16: 5189-5195.
- Mao J, Price DD, Mayer DJ, Lu J, Hayes RL. 1992. Intrathecal MK801 and local nerve anesthesia synergistically reduce nociceptive behaviours in rats with experimental peripheral mononeuropathy. **Brain Res.** 576: 254-262.
- Malmberg RL, Cellino ML. 1994. Arginine decarboxylase of oats is activated by enzymatic cleavage into two polypeptides. **J. Biol. Chem.** 269: 2703-2706.
- Malmberg AB, Basbaum AI. 1998. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioural and neuroanatomical correlates. **Pain.** 76: 215-222.
- McMahon SB, Cafferty WB, Marchand F. 2005. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. **Exp. Neurol.** 192: 444-462.
- Meldrum BS. 2000. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **J. Nutr.** 130: 1007-1015.
- Mendonça A, Ribeiro J.A. 2000. Long-term potentiation observed upon blockade of adenosine A<sub>1</sub> receptors in rat hippocampus is N-methyl-D-aspartate receptor-dependent. **Neurosci. Lett.** 291: 81-84.

- Michel MC, Ernsberger P. 1992. Keeping an eye on the I site: imidazoline-preferring receptors. **Trends Pharmacol. Sci.** 35: 324-330.
- Micu I, Jiang Q, Coderre E, Ridsdale A, Zhang L, Woulfe J, Yin X, Trapp BD, McRory JE, Rehak R, Zamponi GW, Wang W, Stys PK. 2006. NMDA receptors mediate calcium accumulation in myelin during chemical ischaemia. **Nature.** 439: 988-992.
- Milligan ED, Watkins LR., 2009. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nat. Rev. Neurosci.** 10, 23-35.
- Millan MJ. 1999. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.** 57: 1-164.
- Millan MJ. 2002. Descending control of pain. **Prog. Neurobiol.** 66: 355-474.
- Minami M, Katayama T, Satoh M. 2006. Brain cytokines and chemokines: roles in ischemic injury and pain. **J. Pharmacol. Sci.** 100: 461-470.
- Molderings GJ, Kribben B, Heinen A, Schroder D, Bruss M, Gothert M. 2004. Intestinal tumor and agmatine (decarboxylated arginine): low content in colon carcinoma tissue specimens and inhibitory effect on tumor cell proliferation in vitro. **Cancer.** 101: 858-868.
- Morgan AD, Campbell UC, Fons RD, Carroll ME. 2002. Effects of agmatine on the escalation of intravenous cocaine and fentanyl self-administration in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 72: 873-880.
- Moore KA, Kohno T, Karchewski LA, Scholz J, Baba H, Woolf CJ. 2002. Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. **J. Neurosci.** 22: 6724-6731.
- Myers RR, Campana WM, Shubayev VI. 2006. The role of neuroinflammation in neuropathic pain: mechanisms and therapeutic targets. **Drug Discov. Today** 11: 8-20.
- Neher R, Neher E. 2004. Optimizing imaging parameters for the separation of multiple labels in a fluorescence image. **J. Microsc.** 213: 46-62.
- Neugebauer V. 2002. Metabotropic glutamate receptors – important modulators of nociception and pain behavioral. **Pain.** 98: 1-8.
- Nguyen MD, Julien JP, Rivest S. 2002. Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration. **Nat. Rev. Neurosci.** 3: 216-227.
- Nguyen HOX, Goracke-Postle CJ, Kaminski LL, Overland AC, Morgan AD, Fairbanks CA. 2003. Neuropharmacokinetic and dynamic studies of agmatine (descarboxylated arginine). **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 1009: 82-105.
- Nicholas AP, Pieribone VA, Hokfelt T. 1993. Distributions of mRNA for alpha2-adrenergic receptor subtypes in rat brain: an in situ hybridization study. **J. Comp. Neurol.** 328: 575-594.
- Nicholas AP, Hokfelt T, Pieribone VA. 1996. The distribution and significance of CNS adrenoceptors examined with in situ hybridization. **Trends Pharmacol. Sci.** 17: 245-255.

Olmos G, DeGregorio-Rocasolano N, Paz Regalado M, Gasull T, Assumpcio Boronat M, Trullas R, Villarroel A, Lerma J, Garcia-Sevilla JA. 1999. Protection by imidazol(ine) drugs and agmatine of glutamate-induced neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells through blockade of NMDA receptor. **Br. J. Pharmacol.** 127: 1317-1326.

Oka T, Hori T. 1999. **Brain cytokines and pain.** Basel: Birkhauser Verlag. 1999. p.183-204.

Olsson Y. 1990. Microenvironment of the peripheral nervous system under normal and pathological conditions. **Crit. Rev. Neurobiol.** 5: 265-311.

Önal A, Soykan N. 2001. Agmatine produces antinociception in tonic pain in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 69: 93-97.

Önal A, Delen Y, Ulker S, Soykan N. 2003. Agmatine attenuates neuropathic pain in rats: possible mediation of nitric oxide and noradrenergic activity in the brainstem and cerebellum. **Life Sci.** 73: 413-428.

Otake K, Ruggiero DA, Regunathan S, Wang H, Milner TA, Reis DJ. 1998. Regional localization of agmatine in the rat brain: an immunocytochemical study. **Brain Res.** 787: 1-14.

Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. 1998. Glutamate receptors in mammalian central nervous system. **Prog. Neurobiol.** 54: 581-618.

Pertwee, RG. 1999. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. **Curr. Med. Chem.** 6: 635-664.

Paszczuk AF, Gadotti VM, Tibola D, Quintão NL, Rodrigues AL, Calixto JB, Santos AR. 2007. Anti-hypernociceptive properties of agmatine in persistent inflammatory and neuropathic models of pain in mice. **Brain Res.** 23: 124-133.

Peart JN, Gross GJ. 2005. Cross-talk between adenosine and opioid receptors. **Drug News Perspect.** 18: 237-242.

Piletz JE, May PJ, Wang G, Zhu H. 2003. Agmatine crosses the blood-brain barrier. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 1009: 64-74.

Pitcher GM, Ritchie J, Henry JL. 1999. Paw withdrawal threshold in the von Frey hair test is influenced by the surface on which the rat stands. **J. Neurosci. Methods.** 87: 185-193.

Pleuvry BJ, Lauretti GR. 1996. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. **Pharmacol. Ther.** 71: 313-324.

Pocock JM, Kettenmann H. Neurotransmitter receptors on microglia. **Trends Neurosci.** 10: 23-35.

Porter JT, McCarthy KD. 1997. Astrocytic neurotransmitter receptors *in situ* and *in vivo*. **Prog. Neurobiol.** 51: 439-455.

Qiu WW, Zheng RY. 2006. Neuroprotective effects of imidazoline2 and its endogenous ligand agmatine. **Neurosci. Bull.** 22: 187-191.

- Raasch W, Regunathan S, Li G, Reis DJ. 1995a. Agmatine, the bacterial amine, is widely distributed in mammalian tissues. **Life Sci.** 56: 2319-2330.
- Raasch W, Regunathan S, Li G, Reis DJ. 1995b. Agmatine is widely and unequally distributed in rat organs. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 763: 330-334.
- Raasch W, Muhle H, Dominiak P. 1999. Modulation of MAO activity by imidazoline and guanidine derivatives. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 881: 313-331.
- Raasch W, Schafer U, Chun J, Dominiak P. 2001. Biological significance of agmatine, an endogenous ligand at imidazoline binding sites. **Br. J. Pharmacol.** 133: 755-780.
- Raghavendra V, Tanga FY, De Leo JA. 2004. Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. **Eur. J. Neurosci.** 20: 467-473.
- Raja SN, Meyer RA, Ringkamp M, Campbell JN. 1999. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: Wall PD, Melzack R. **Textbook of pain.** Churchill Livingstone: London. 1-8.
- Rasband WS: Image J. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 2008 [<http://rsb.info.nih.gov/ij/>].
- Rebola N, Oliveira CR, Cunha RA. 2002. Transducing system operated by adenosine A<sub>2A</sub> receptors to facilitate acetylcholine release in the rat hippocampus. **Eur. J. Pharmacol.** 454: 31-38.
- Rebola N, Pinheiro PC, Oliveira CR, Malva JO, Cunha RA. 2003. Subcellular localization of adenosine A<sub>1</sub> receptors in nerve terminals and synapses of the rat hippocampus. **Brain Res.** 987: 49-58.
- Regunathan S, Piletz JE, 2003. Regulation of inducible nitric oxide synthase and agmatine synthesis in macrophages and astrocytes. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 1009: 20-29.
- Regunathan S, Feinstein DL, Raasch W, Reis DJ. 1995. Agmatine (decarboxylated arginine) is synthesized and stored in astrocytes. **Neuroreport.** 6: 1897-1900.
- Regunathan S, Youngson C, Raasch W, Wang H, Reis DJ. 1996. Imidazoline receptors and agmatine in blood vessels: a novel system inhibiting vascular smooth muscle proliferation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 276: 1272-1282.
- Regunathan S, Feinstein DL, Reis DJ. 1999. Anti-proliferative and anti-inflammatory actions of imidazoline agents. Are imidazoline receptors involved? **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 881: 410-419.
- Regunathan S, Dozier D, Takkalapalli R, Phillips WJ. 2009. Agmatine levels in the cerebrospinal fluid of normal humans volunteers. **J. Pain Palliat Care Pharmacother.** 23: 35-39.
- Reinecke K, Lucius R, Reinecke A, Rickert U, Herdegen T, Unger T. 2003. Angiotensin II accelerates functional recovery in the rat sciatic nerve in vivo: role of the AT<sub>2</sub> receptor and the transcription factor NF-kappaB. **FASEB J.** 17: 2094-2096.

- Reis DJ, Regunathan S. 2000. Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? **Trends Pharmacol. Sci.** 21: 187-193.
- Reis DJ, Yang XC, Milner TA. 1998. Agmatine containing axon terminals in rat hippocampus form synapses on pyramidal cells. **Neurosci. Lett.** 250: 185-188.
- Ribeiro RA, Vale MV, Thomazzi S.M, Paschoalato ABP, Poole S, Ferreira SH, Cunha FQ. 2000. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Eur. J. Pharmacol.** 387: 111-118.
- Ribeiro JA, Sebastião AM, Mendonça A. 2003. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. **Prog. Neurobiol.** 68: 377-392.
- Riedel W, Neeck G. 2001 Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Z. Rheumatol.** 60: 404-415.
- Robertson B, Xu XJ, Hao JX, Wiesenfeld-Hallin Z, Mhlanga J, Grant G, Kristensson K, 1997. Interferon-gamma receptors in nociceptive pathways: role in neuropathic pain-related behaviour. **Neuroreport.** 8: 1311-1316.
- Robinson LR. 2000. Traumatic injury to peripheral nerves. **Muscle Nerve.** 23: 863-873.
- Robinson LR. 2004. Traumatic injury to peripheral nerves. **Suppl. Clin. Neurophysiol.** 57: 173-86.
- Ruggiero DA, Regunathan S, Wang H, Milner TA, Reis DJ. 1995. Distribution of imidazoline receptor binding protein in the central nervous system. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 763: 208-221.
- Saegusa H, Kurihara T, Zong S, Kazuno A, Matsumada Y, Nonaka T, Han W, Toriyama H, Tanabe T. 2001. Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking N-type  $Ca^{2+}$  channel. **EMBO J.** 20: 2349-2356.
- Saegusa H, Matsuda Y, Tanabe T. 2002. Effects of ablation of N-and R-type  $Ca^{2+}$  channels on pain transmission. **Neurosci. Res.** 43: 1-7.
- Salonen V, Aho H, Røyttä M, Peltonen J. 1988. Quantitation of Schwann cells and endoneurial fibroblast-like cells after experimental nerve trauma. **Acta Neuropathol.** 75: 331-336.
- Santos ARS, Vedana EMA, De Freitas GAG. 1998. Antinociceptive effect of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. **Inflamm. Res.** 47: 302-307.
- Santos ARS, Miguel OG, Yunes RA, Calixto JB. 1999. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-N-propyllobelidiol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 289: 417-426.
- Santos ARS, Gadotti VM, Oliveira GL, Tibola D, Paszcuk AF, Neto A, Spindola HM, Souza MM, Rodrigues ALS, Calixto JB. 2005. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. **Neuropharmacology.** 48: 1021-1034.

- Saper CB, Akil H, Watson SJ. 1986. Lateral hypothalamic innervation of the cerebral cortex: immunoreactive staining for a peptide resembling but immunochemically distinct from pituitary/arcuate alpha-melanocyte stimulating hormone. **Brain Res. Bull.** 16: 107-120.
- Sastre M, Regunathan S, Galea E, Reis DJ. 1996. Agmatinase activity in rat brain: a metabolic pathway for the degradation of agmatine. **J. Neurochem.** 67: 1761-1765.
- Sastre M, Regunathan S, Reis DJ. 1997. Uptake of agmatine into rat brain synaptosomes: possible role of cation channels. **J. Neurochem.** 69: 2421-2426.
- Savinainen JR, Laitinen JT. 2004. Detection of cannabinoid CB1, adenosine A<sub>1</sub>, muscarinic acetylcholine, and GABA(B) receptor-dependent G protein activity in transducin-deactivated membranes and autoradiography sections of rat retina. **Cell. Mol. Neurobiol.** 24: 243-256.
- Sawynok J. 1998. Adenosine receptors activation and nociception. **Eur. J. Pharmacol.** 317: 1-11.
- Sawynok J, Sweeney MI, White TD. 1989. Adenosine release may mediate spinal analgesia by morphine. **Trends Pharmacol. Sci.** 10: 186-189.
- Scheidt C, Santos ARS, Ferreira J, Malheiros A, Cechinel-Filho V, Yunes RA, Calixto JB, 2002. Evidence for the involvement of glutamatergic receptors in the antinociception caused in mice by the sesquiterpene drimaniol. **Neuropharmacology.** 43: 340-347.
- Schultz JJ, Gross GJ. 2001. Opioids and cardioprotection. **Pharmacol. Ther.** 89: 123-137.
- Schwartz D, Peterson OW, Mendonca M, Satriano J, Lortie M, Blantz RC. 1997. Agmatine affects glomerular filtration via a nitric oxide synthase-dependent mechanism. **Am. J. Physiol.** 272: 597-601.
- Seddon H. 1943. Three types of nerve injury. **Brain** 66, 237-288.
- Shelley A, Cross MD. 1994. Pathophysiology of pain. **Mayo Clin. Proc.** 69: 375-383.
- Shen N, Zhu J. 1995. Application of sciatic functional index in nerve functional assessment. **Microsurgery.** 16: 552-555.
- Shigemoto R, Ohishi H, Nakanishi S, Mizuno N. 1992. Expression of the mRNA for the rat NMDA receptor (NMDAR1) in the sensory and autonomic ganglion neurons. **Neurosci. Lett.** 144: 229-232.
- Simola N, Fenu S, Baraldi PG, Tabrizi MA, Morelli M. 2006. Dopamine and adenosine receptor interaction as basis for the treatment of Parkinson's disease. **J. Neurol. Sci.** 248: 48-52.
- Smith KL, Jessop DS, Finn DP. 2009. Modulation of stress by imidazoline binding sites: implications for psychiatric disorders. **Stress.** 12: 97-114.
- Sommer C, Kress M. 2004. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Neurosci. Lett.** 361: 184-187.

- Souza DG, Coutinho SF, Silveira MR, Cara DC, Teixeira MM. 2000. Effects of a BLT receptor antagonist on local and remote reperfusion injuries after transient ischemia of the superior mesenteric artery in rats. **Eur. J. Pharmacol.** 403: 121–128.
- Stanec S, Tonkovic I, Stanec Z, Tonkovic D, Dzepina I. 1997. Treatment of upper limb nerve war injuries associated with vascular trauma. **Injury.** 28: 463–468.
- Stellwagen D, Malenka RC. 2006. Synaptic scaling mediated by glial TNF- $\alpha$ . **Nature.** 440: 1054-1059.
- Sunderland S. 1990. The anatomy and physiology of nerve injury. **Muscle Nerve.** 13: 771–784.
- Svenningsson P, Le Moine C, Fisone G, Fredholm BB. 1999. Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A<sub>2A</sub> receptors. **Prog. Neurobiol.** 59: 355-396.
- Tabor CW, Tabor H. 1984. Polyamines. **Annu. Rev. Biochem.** 53: 749-790.
- Tadano T, Namioka M, Nakagawasai O, Tan-No K, Matsushima K, Endo Y, Kisara K, 1999. Induction of nociceptive responses by intrathecal injection of interleukin-1 in mice. **Life Sci.** 65: 255–261.
- Tetzlaff W, Schbert P, Kretzberg GW. 1987. Synaptic and extrasynaptic localization of adenosine binding sites in the rat hippocampus. **Neuroscience.** 21: 869-875.
- Tjølsen A, Hole K. 1997. Animal Models of Analgesia. In: Dickenson, A., Besson, J., **The Pharmacology of Pain.** Vol.130/I., Springer: Verlag, Berlin. 1-20.
- Tofaris, GK, Patterson, PH, Jessen, KR, Mirsky, R. 2002. Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF. **J. Neurosci.** 22: 6696–6703.
- Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzgerald LM, Lee N, Adams MD, Venter JC, et al. 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature.** 388: 539-547.
- Tracey DJ, Walker JS. 1995. Pain due to nerve damage: are inflammatory mediators involved? **Inflamm. Res.** 44: 407–411.
- Vanegas H, Schaible HG. 2000. Effects of antagonists to high-threshold calcium channels upon spinal mechanisms of pain, hyperalgesia and allodynia. **Pain.** 85: 8-19.
- Varejão ASP, Meek MF, Ferreira AJ, Patricio JA, Cabrita AM. 2001. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. **J. Neurosci. Methods.** 108: 1–9.
- Varejão AS, Cabrita AM, Meek MF, Bulas-Cruz J, Melo-Pinto P, Raimondo S, Geuna S, Giacobini-Robecchi MG. 2004. Functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. **J. Neurotrauma.** 21: 1652-1670.



Vaz ZR, Cechinel Filho V, Yunes RA, Calixto JB. 1996. Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxyline derivative, on chemical and thermal models of nociception in mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 278: 304-312.

Vinegar R, Truax JF, Selph JL, Jonhston PR. 1979. Antagonism of pain and Hyperalgesia. Anti-inflammatory Drugs. In: Vane, JR, Ferreira, SH, editors. **Handbook of Experimental Pharmacology**. Vol. 50/II., Springer: Verlag, Berlin. 208-222.

Viviani B, Bartesaghi S, Gardoni F, Vezzani A, Behrens MM, Bartfai T, Binaglia M, Corsini E, Di Luca M, Galli CL, Marinovich M. 2003. Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. **J. Neurosci.** 23: 8692-8700.

Wall PD. 1999. Introduction to the fourth edition. In: Wall PD, Melzack R. **Textbook of pain**. Churchill Livingstone: Londres. 1-8.

Wang H, Regunathan S, Youngson C, Bramwell S, Reis DJ. 1995. An antibody to agmatina localizes the amine in bovine adrenal chromaffin cells. **Neurosci. Lett.** 183: 17-21.

Wang WP, Iyo AH, Miguel-Hidalgo J, Regunathan S, Zhu MY. 2006. Agmatine protects against cell damage induced by NMDA and glutamate in cultured hippocampal neurons. **Brain Res.** 1084: 210-216.

Watkins, L. R. e Maier, S. F. Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. **Nat. Rev. Drug Discov.** 2: 973-985.

Watkins, L. R., Milligan, E. D. e Maier, S. F. Glial activation: a driving force for pathological pain. **Trends Neurosci**, v.24, n.8, Aug, p.450-5, 2001.

Wen ZH, Chang YC, Wong CS. 2003. Implications of intrathecal pertussis toxin animal model on the cellular mechanisms of neuropathic pain syndrome. **Acta Anaesthesiol. Sin.** 41: 187-196.

Weng XC, Gai XD, Zheng JQ, Li J. 2003. Agmatine blocked voltage-gated calcium channel in cultured rat hippocampal neurons. **Acta Pharmacol. Sin.** 24: 746-750.

Westerga J, Gramsbergen A. 1990. The development of locomotion in the rat. **Brain Res. Dev. Brain Res.** 57: 163-174.

Wiech K, Kiefer RT, Topfner S, Preissl H, Braun C, Unertl K, Flor H, Birbaumer N. 2004. A placebo-controlled randomized crossover trial of the N-methyl-Daspartic acid receptor antagonist, memantine, in patients with chronic phantom limb pain. **Anesth. Analg.** 98: 408-413.

Wiesinger H. 2001. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. **Prog. Neurobiol.** 64: 365-391.

Wieseler-Frank J, Maier SF, Watkins LR. Glial activation and pathological pain. **Neurochem. Int.** 45: 389-395, 2004.

- Woolf CJ. 1994. A new strategy for the treatment of inflammatory pain prevention or elimination of central sensitization. **Drugs**. 47: 1–9.
- Woolf CJ, Mannion RJ. 1999. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms and management. **Lancet**. 353: 1959-1964.
- Woolf, C.J., Salter, M.W., 2000. Neuronal plasticity: Increasing the gain in pain. **Science**. 288, 1765-1769.
- Wu WH, Morris DR. 1973. Biosynthetic arginine decarboxylase from *Escherichia coli*: purification and properties. **J. Biol. Chem**. 248: 1687-1695.
- Yamamoto S, Nakao H, Yamasaki K, Takashina K, Suemoto Y, Shinoda S. 1988. Activities and properties of putrescine-biosynthetic enzymes in *Vibrio parahaemolyticus*. **Microbiol. Immunol**. 32: 675-687.
- Yang XC, Reis DJ. 1999. Agmatine selectively blocks the N-methyl-D-aspartate subclass of glutamate receptor channels in rat hippocampal neurons. **J. Pharmacol. Exp. Ther**. 288: 544-549.
- Yesilyurt O, Uzday IT, 2001. Agmatine potentiates the analgesic effect of morphine by an alpha(2)-adrenoceptor-mediated mechanism in mice. **Neuropsychopharmacology**. 25: 98-103.
- Yoshimura, M., Yonehara, N., 2006. Alteration in sensitivity of ionotropic glutamate receptors and tachykinin receptors in spinal cord contribute to development and maintenance of nerve injury-evoked neuropathic pain. **Neurosci. Res**. 56, 21-28.
- Yu CG, Fairbanks CA, Wilcox GL, Yeziarski RP. 2003. Effects of agmatine, interleukin-10, and cyclosporin on spontaneous pain behavior after excitotoxic spinal cord injury in rats. **J. Pain**. 4: 129-140.
- Zhang RX, Li A, Liu B, Wang L, Ren K, Zhang H, Berman BM, Lao L. 2008. IL-1ra alleviates inflammatory hyperalgesia through preventing phosphorylation of NMDA receptor NR-1 subunit in rats. **Pain**. 135: 232-239.
- Zheng JQ, Weng XC, Gai XD, Li J, Xiao WB. 2004. Mechanism underlying blockade of voltage-gated calcium channels by agmatine in cultured rat hippocampal neurons. **Acta Pharmacol. Sin**. 25: 281-285.
- Zhu MY, Wang WP, Huang J, Regunathan S. 2007. Chronic treatment with glucocorticoids alters rat hippocampal and prefrontal cortical morphology in parallel with endogenous agmatine and arginine decarboxylase levels. **J. Neurochem**. 103: 1811-1820.
- Zhuang ZY, Gerner P, Woolf CJ, Ji RR. 2005. ERK is sequentially activated in neurons, microglia and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. **Pain**. 114: 149-159.
- Zimmermann M. 1983. Ethical Guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**. 16: 109-110.
- Zimmermann, M., 2001. Pathobiology of neuropathic pain. **Eur. J. Pharmacol**. 429, 23-37.

Zomkowski AD, Hammes L, Lin J, Calixto JB, Santos ARS, Rodrigues ALS. 2002. Agmatine produces antidepressant-like effects in two models of depression in mice. **Neuroreport**. 13: 387-391.

Zomkowski AD, Rosa AO, Lin J, Santos, ARS, Calixto JB. Rodrigues ALS. 2004. Evidence for serotonin receptor subtypes involvement in agmatine antidepressant like-effect in the mouse forced swimming test. **Brain Res**. 1023: 253-263.

Zomkowski ADE, Santos ARS, Rodrigues ALS. 2005. Evidence for the involvement of the opioid system in the agmatine antidepressant-like effect in the forced swimming test. **Neurosci. Lett**. 381, 279–283.

## 9. ANEXOS

available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)[www.elsevier.com/locate/brainres](http://www.elsevier.com/locate/brainres)
**BRAIN  
RESEARCH**

## Research Report

# Contribution of spinal glutamatergic receptors to the antinociception caused by agmatine in mice

Vinicius M. Gadotti<sup>a</sup>, Daiane Tibola<sup>a</sup>, Ana Flavia Paszcuk<sup>a</sup>, Ana Lúcia S. Rodrigues<sup>b</sup>, João B. Calixto<sup>c</sup>, Adair R.S. Santos<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil

<sup>b</sup>Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil

<sup>c</sup>Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, 88015-420, SC, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Accepted 22 March 2006

Available online 12 June 2006

#### Keywords:

Agmatine  
Glutamate receptor  
Metabotropic receptor  
NMDA receptor  
Nociception  
Intrathecal injection  
Mice

### ABSTRACT

This study was designed to evaluate the role of spinal glutamatergic receptors in the antinociception elicited by agmatine in mice. Intraperitoneal (i.p.) administration of agmatine (1.0–100.0 mg/kg) dose dependently inhibited the nociceptive response induced by intrathecal (i.t.) injection of glutamate, *N*-methyl-*D*-aspartate (NMDA) and (±)-1-aminocyclopentane-trans-1,3-dicarboxylic acid (trans-ACPD), with mean ID<sub>50</sub> values of 16.7, 6.8 and 27.0 mg/kg, respectively. However, agmatine completely failed to affect the nociception induced by α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) or kainic acid (kainate). Agmatine injected by i.t. route (10–100 μg/site) also produced dose-related inhibition of NMDA- and trans-ACPD-induced biting response with mean ID<sub>50</sub> values of 29.6 and 36.0 μg/site, respectively. The nitric oxide synthase inhibitor N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine (L-NOARG) (75.0 mg/kg, i.p.) also consistently inhibited glutamate-, NMDA- and trans-ACPD-induced nociception (41 ± 13, 100 and 83 ± 6%, of inhibition, respectively) but had no effect on the same response caused by AMPA and kainate agonists. The selective NMDA receptor antagonist (5*S*,10*R*)-(+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5*H*-dibenzo[*a,d*] (MK-801) at a low dose (0.05 mg/kg, i.p.) inhibited the nociceptive response caused by both glutamate and NMDA agonists (inhibitions of 35 ± 1 and 72 ± 2%, respectively). At a high dose, MK-801 (0.5 mg/kg, i.p.) significantly inhibited the biting response induced by i.t. administration of all the glutamatergic agonists tested: glutamate, AMPA, NMDA, kainate and trans-ACPD, with inhibitions of 49 ± 8, 84 ± 16, 84 ± 3, 76 ± 8 and 97 ± 2%, respectively. Together, these results provide experimental evidence indicating that agmatine given systemically and spinally produce marked antinociception at spinal sites in mice. Furthermore, an interaction with glutamate receptors, namely NMDA and trans-ACPD, metabotropic and NMDA-ionic origin, by a mechanism similar to that of nitric oxide (NO) inhibitors, seems to account for the agmatine antinociceptive action.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

\* Corresponding author. Fax: +55 48 33319672.

E-mail addresses: [arssantos@ccb.ufsc.br](mailto:arssantos@ccb.ufsc.br), [arssantos@uol.com.br](mailto:arssantos@uol.com.br) (A.R.S. Santos).

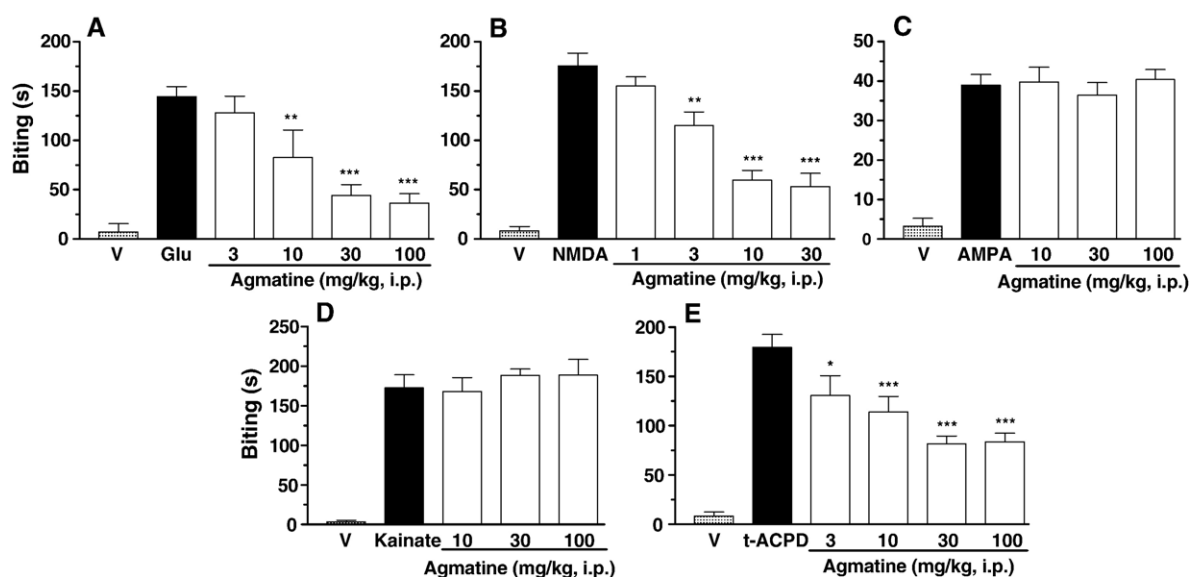
## 1. Introduction

Glutamate receptors (GluRs) mediate most of the excitatory neurotransmission in the mammalian central nervous system (CNS). GluRs are divided into two major classes, ionotropic and metabotropic receptors. The ionotropic receptors (iGluRs) incorporate ion channels that are permeable to cations and are further subdivided into three subgroups: AMPA, kainate and NMDA receptors (Ozawa et al., 1998). The metabotropic receptors (mGluRs) are coupled to GTP-binding proteins (G protein), and operate either by releasing second messengers in the cytoplasm or by influencing ion channel through interaction with G protein subunits within the membrane (Meldrum, 2000). Evidence accumulated in the last several decades indicate that glutamate exerts a prominent action in normal and under certain pathophysiological nociceptive processes (Chizh, 2002). Likewise, glutamate receptors play an important role in modulating nociceptive processing at both spinal and peripheral levels (Fairbanks et al., 2000; Raasch et al., 2001). In this way, it is now well established that substances capable of blocking GluRs exhibit pronounced antinociceptive and analgesic effects in several mammalian species including humans (Chizh, 2002; Lutfy et al., 1997; Neugebauer, 2002; Santos et al., 2005; Wiech et al., 2004). However, the use of clinically available GluRs (e.g., NMDA receptor antagonist) antagonists for the treatment of pain is so far problematic due to their common central side-effects (Chizh, 2002; Millan, 1999). For this reason, it is believed that new drugs that block GluRs (e.g., some modulatory sites at the NMDA receptor [glycine<sub>B</sub> and NR2B-subtype selective antagonist], as well as kainate and metabotropic glutamate receptors) may have potential clinical indications for the treatment of some painful states, including the chronic neuropathic and inflammatory pain (Chizh, 2002; Millan, 1999). Many of these drugs have demonstrated efficacy in animal models of chronic pain, and some of them appear to

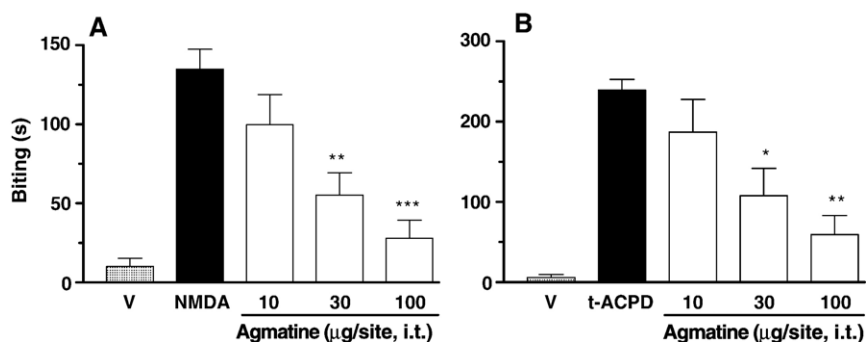
have a reduced side-effect liability compared to clinically tested NMDA receptor antagonists (Chizh, 2002; Fundytus, 2001; Millan, 1999).

Agmatine is an amine formed by decarboxylation of L-arginine known to exert an important neuromodulatory action at the nociceptive neurotransmitters pathways. Evidence now indicates that agmatine, or its derivative could be of potential interest for the management of certain pain disorders (Raasch et al., 2001; Reis and Regunathan 2000; Santos et al., 2005). Studies have also shown that agmatine influences the activity of several neurotransmitters, such as glutamatergic transmission by inhibiting glutamate binding to NMDA receptors (Reis and Regunathan 2000; Yang et al., 1999). Agmatine is also known to be able to inhibit the activity of all isoforms of nitric oxide synthase (NOS) (Raasch et al., 2001; Reis and Regunathan 2000). It is well established that agmatine, according to the route of administration and/or models of pain used, elicits either antinociceptive or anti-hypersensitivity (anti-allodynic and/or anti-hyperalgesic) effects in mice or rats (Nguyen et al., 2003). We have recently reported that agmatine causes dose-related antinociception when assessed in several models of chemical-induced nociception namely acetic acid-, formalin-, capsaicin-, and glutamate-induced nociception in mice through a mechanism, that involves, at least in part, its ability to inhibit nitric oxide synthesis as well as its interaction with  $\alpha_2$ -adrenergic, I<sub>1</sub>-imidazolic, serotonergic (through 5-HT<sub>1A/B</sub> e 5-HT<sub>3</sub> receptors) and opioid systems (Santos et al., 2005).

Therefore, considering the importance of glutamate receptors in the process of pain production and maintenance, this study was designed to investigate the role played by the spinal iGluRs and mGluRs pathways in the antinociception caused by agmatine against the biting response induced by intrathecal (i.t.) injection of glutamate or its selective agonists in mice. Additionally, we sought to compare the antinociceptive effect



**Fig. 1** – Effect of systemic agmatine (1.0–100.0 mg/kg, i.p.) on the biting response caused by i.t. injection of glutamate (A), NMDA (B), AMPA (C), kainate (D) and trans-ACPD (E) in mice. Each column represents the mean of 6 to 10 animals, and vertical lines indicate the SEM. Asterisks denote the significance levels \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  compared to control group values (closed columns) (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).



**Fig. 2** – Effect of spinally agmatine (10.0–100.0 µg/site, i.t.) on the biting response caused by i.t. injection of NMDA (A) and trans-ACPD (B) in mice. Each column represents the mean of 6 to 10 animals, and vertical lines indicate the S.E.M. Asterisks denote the significance levels \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  compared to control group values (closed columns) (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).

of agmatine with that produced by L-NOARG, a NOS inhibitor, and MK-801, a non-competitive NMDA receptor antagonist in the excitatory amino acids (EAAs)-induced nociception in mice.

## 2. Results

### 2.1. Effect of agmatine on spinal excitatory amino acids (EAAs)-induced biting response

Agmatine (1.0–100.0 mg/kg, i.p.), given 0.5 h before, produced pronounced and dose-related inhibition of the nociceptive responses induced by spinal injections of glutamate, NMDA and trans-ACPD, with mean  $ID_{50}$  values of 16.7 (11.0–25.2), 6.7 (4.7–9.7) and 27.0 (20.5–35.6) mg/kg and inhibitions of  $79 \pm 7$ ,  $73 \pm 8$  and  $59 \pm 4\%$ , respectively. In contrast, at the same doses and treatment scheme, agmatine had no significant effect against AMPA- and kainate-mediated biting responses (Figs. 1A–E). The treatment of animals with agmatine by i.t. route (10–100 µg/site., 10 min beforehand) also produced marked and dose-related inhibition of NMDA- and trans-ACPD-induced biting response. The calculated mean  $ID_{50}$  values

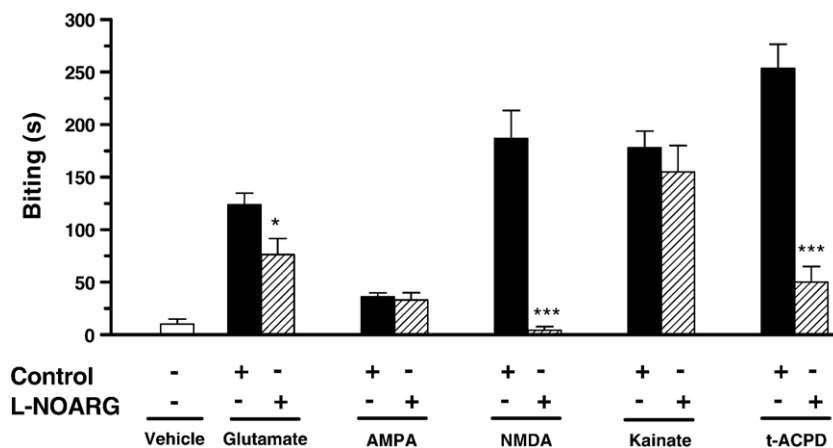
were 29.6 (21.1–41.5) and 36.0 (27.7–46.8) µg/site and inhibitions of  $86 \pm 9$  and  $77 \pm 10\%$ , respectively (Figs. 2A and B).

### 2.2. Effect of L-NOARG on spinal excitatory amino acids (EAAs)-induced biting response

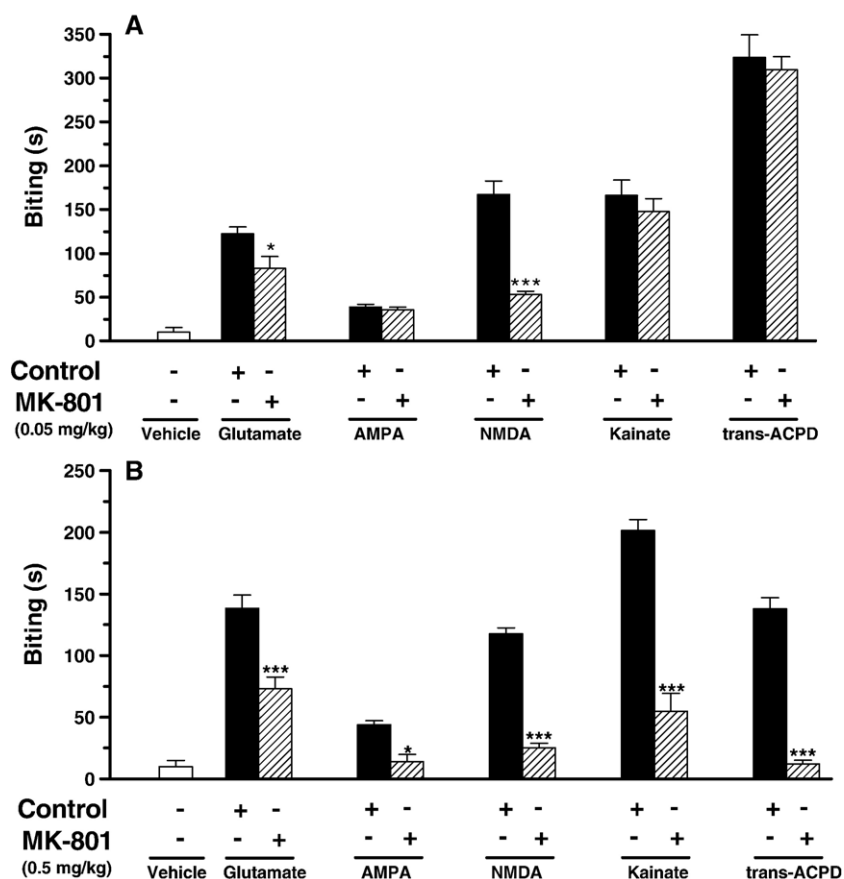
The results depicted in Fig. 3 show that the treatment with L-NOARG (75.0 mg/kg, i.p.) 0.5 h prior caused significant inhibition of glutamate-, NMDA- and trans-ACPD-induced biting responses, with inhibitions of  $41 \pm 13$ , 100 and  $83 \pm 6\%$ , respectively. Moreover, as reported for agmatine, L-NOARG did not inhibit the nociception induced by AMPA and kainate (Fig. 3).

### 2.3. Effect of MK-801 on spinal excitatory amino acids (EAAs)-induced biting response

Fig. 4A shows that MK-801, given by i.p. route at a low dose (0.05 mg/kg), significantly inhibited the nociceptive response induced by the i.t. injection of glutamate and NMDA, without affecting that caused by AMPA, kainate and trans-ACPD (inhibitions of  $35 \pm 11$  and  $72 \pm 2\%$ ), respectively. In contrast, the results depicted in Fig. 4B show that MK-801, administered



**Fig. 3** – Effect of systemic L-NOARG (75.0 mg/kg, i.p.) on the biting response caused by i.t. injection of glutamate, AMPA, NMDA, kainate and trans-ACPD in mice. Each column represents the mean of 6 to 10 animals, and vertical lines indicate the S.E.M. Asterisks denote the significance levels in comparison with control group values (\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).



**Fig. 4 – Effect of systemic MK-801 in a low dose (0.05 mg/kg, i.p., panel A) and in a high dose (0.5 mg/kg, i.p., panel B) on the biting response caused by i.t. injection of glutamate, AMPA, NMDA, kainate and trans-ACPD in mice. Each column represents the mean of 6 to 10 animals and vertical lines indicate the S.E.M. Asterisks denote the significance levels in comparison with control group values (closed columns) \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ .**

at a high dose (0.5 mg/kg) (although hyperlocomotion, results not shown), it significantly inhibited glutamate-, AMPA-, NMDA-, kainate- and trans-ACPD-induced biting responses (inhibitions of  $49 \pm 8$ ,  $84 \pm 16$ ,  $84 \pm 3$ ,  $76 \pm 8$  and  $97 \pm 2\%$ , respectively).

### 3. Discussion

The results of the present study demonstrate that systemic or spinal administration of agmatine, a putative endogenous neurotransmitter, elicits a dose-dependent inhibition of the EAAs-induced nociception, characterized by the inhibition of biting response in mice. A considerable number of experimental evidences now suggest that agmatine can modulate transmitter/hormone release and possibly act as a neurotransmitter/modulator in the brain. In this regard, agmatine at concentrations over 500  $\mu\text{M}$  reduced the binding of [ $^3\text{H}$ ]MK-801 to a membrane preparation from rat cerebral cortex (Gibson et al., 2002). Furthermore, agmatine at concentrations over 100  $\mu\text{M}$  inhibited all isoforms of NOS (Galea et al., 1996). Based on these previous findings, we asked whether or not agmatine could exert its systemic antinociceptive effects by interacting with a central receptor system modulating glutamatergic receptors and inhibiting the NO synthesis. Such

possibility could explain, at least partially, some of the agmatine effects, such as those previously reported in several models of nociception, including inflammatory and neuropathic models of pain (Fairbanks et al., 2000; Onal and Soykan, 2001; Onal et al., 2003; Santos et al., 2005). In addition, we have already reported in a previous work that the antinociception caused by agmatine in mice also involves the L-arginine-nitric oxide pathway among others systems of neurotransmitters, such as opioid, serotonergic,  $\alpha_2$ -adrenergic and imidazoline receptors (Santos et al., 2005).

The results of the present study extend previous data (Fairbanks et al., 2000) and clearly show, for the first time, that agmatine given centrally (by intrathecal route) causes significant and dose-related inhibition of NMDA- and trans-ACPD-induced biting response. In addition, the systemic injection of agmatine reduces the mice behavioral biting response induced by intrathecal injection of some EAAs in a very similar profile that of observed by the well-known NMDA receptor antagonist, MK-801. In addition, MK-801 given in a high dose that causes significant side effect (like hyperlocomotion) was effective in inhibiting the nociception caused by all glutamatergic agonists studied. In this regard, Coderre and Van Empel (1994) showed that the doses of many EAAs antagonists, such as MK-801, which produce significant antinociceptive effects also result in disturbances of motor coordination. Therefore, it



seems feasible that the motor-impairing effects of NMDA receptor antagonists could influence the antinociceptive effect of the drugs. Alternatively, the motor-impairing effect of NMDA receptor antagonists is produced concomitantly with antinociception, and the two effects cannot be separated, suggesting that NMDA receptor antagonists may have a limited therapeutic range (Coderre and Van Empel, 1994). Of note, in contrast to that reported for MK-801, even at the higher doses agmatine produces significant and specific antinociceptive action against glutamate-, NMDA- and trans-ACPD-induced biting responses without causing any detectable motor dysfunction.

The current results also show that the antinociception caused by systemic administration of agmatine against the biting response induced by glutamate, NMDA and trans-ACPD, occurs in a profile very similar to that of L-NOARG. Notably, based in the  $ID_{50}$  values, agmatine was found about 2.5- and 4-fold more active in inhibiting biting response caused by glutamate and NMDA as compared to trans-ACPD. On the other hand, the efficacy of agmatine was significantly reduced against trans-ACPD-mediated biting response compared with that caused by glutamate and NMDA. Together, these results suggest the relevance of ionotropic and metabotropic glutamatergic receptors (mGluRs) in the antinociceptive effect of agmatine. In addition, the antinociception caused by agmatine against trans-ACPD-induced biting response can be explained, at least in part, by the fact that agmatine inhibits directly the activity of NOS (Hill, 2001). Thus, the antinociceptive action of agmatine on trans-ACPD-induced biting response is probably mediated by interaction with NO production induced by subsequent activation of the Group I or II of mGluRs (Hill, 2001; Ozawa et al., 1998). Furthermore, the profile of the antinociceptive effects of agmatine is very similar to those previously reported for both MK-801 and L-NOARG and is in line with the notion that agmatine is capable of blocking the NMDA receptor activation allied with inhibition of NOS (Ferreira et al., 1999; Galea et al., 1996; Raasch et al., 2001; Reis and Regunathan 2000; Yang et al., 1999).

The release of glutamate is the most important event controlling the excitation of neurons within the dorsal horn of the spinal cord as a result of impulses arriving in nociceptor fibers. Glutamate acts through AMPA receptors to produce a rapid depolarization, which remove the ion  $Mg^{+2}$  of the NMDA receptor channel pore. It is well established that activation of the NMDA receptor leads to a longer lasting depolarization and post-receptor events involving the activation of protein kinases, mobilization of intracellular  $Ca^{2+}$ , induction of immediate early genes and further production of nociceptive and/or inflammatory mediators, such as prostaglandins (PG) and nitric oxide (NO) (Hill, 2001). Thus, these mediators could activate the afferent terminal producing additional nociceptive transmitters release and consequently nociceptive pathways activation (Hill, 2001; Millan, 1999). In addition, large number of evidence suggest that NO exerts a critical role in the development of hyperexcitability, resulting in hyperalgesia or allodynia, by increasing of nociceptive transmitters at their central terminals (Riedel and Neeck, 2001). In this regard, experimental evidences also suggest that N-methyl-D-aspartate (NMDA) subtype of ionotropic glutamatergic receptors are involved in the central sensitization and in the secondary

hyperalgesia (Dickenson, 1995; Dickenson, 1997; Dray et al., 1994; Millan, 1999; Woolf, 1994).

In summary, our results demonstrate that systemic and spinal administration of agmatine exerts dose-related antinociceptive effects against ionotropic (NMDA) and metabotropic (sensitive to trans-ACPD) glutamatergic receptors-induced biting response in mice. These findings not only confirm but also greatly extend previous evidence from the literature which demonstrates that agmatine possess antinociceptive properties, acting both peripherally and centrally (Onal and Soykan, 2001; Piletz et al., 2003; Santos et al., 2005). Collectively, these results reinforce the notion that agmatine or its derivatives might be used in the future for the management of different human pain states, mainly the neuropathic pain which still remains without a safe and effective therapy. The precise mechanisms through which agmatine interacts with glutamatergic receptors are presently not completely known. Therefore, additional experiments should be designed to solve this issue.

---

## 4. Experimental procedures

### 4.1. Animals

Experiments were performed in Swiss mice of either sex (25–35 g), housed in single-sex cages (20 animals per cage) under a 12-h light/12-h dark cycle (lights on at 6:00) in controlled temperature ( $22 \pm 2$  °C) with free access to food and water. Animals (male and female mice were homogeneously distributed among groups) were used only once throughout the experiments. Mice were acclimatized to the laboratory for at least 1 h before testing that was carried out between 9:00 and 16:00 h. The experiments were performed after approval of the protocol by the local Institutional Ethics Committee and were carried out in accordance with the current guidelines for the care of laboratory animals and the ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals (Zimmermann et al., 1983). The number of animals and intensities of noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of the drug treatments. The observers were not blind to the experimental conditions.

### 4.2. Spinal excitatory amino acids (EAAs)-induced biting response

To test the hypothesis whether or not the spinal glutamatergic receptors might be involved in the antinociception caused by agmatine, we assessed the effect of agmatine (1.0–100.0 mg/kg), L-NOARG (75.0 mg/kg, used as positive control) and MK-801 (used as positive control) at a low dose (0.05 mg/kg) or at a high dose (0.5 mg/kg), given intraperitoneally 0.5 h before test, on the excitatory amino acids (EAAs)-induced biting response in mice. Moreover, to directly investigate the role of spinal glutamate pathways in the antinociception caused by agmatine, the effect of agmatine administered intrathecally (10–100  $\mu$ g/site, 10 min beforehand) against NMDA- or trans-ACPD-induced pain was assessed. Animals received an i.t. injection of 5  $\mu$ l of the EAAs or vehicle solution. Injections were given to

waking animals using the method described by Hylden and Wilcox (1980) (Hylden and Wilcox, 1980). The animals were restrained manually, and a 30-gauge needle attached to a 25- $\mu$ l microsyringe, was inserted through the skin and between the vertebrae into the subdural space of the L<sub>5</sub>-L<sub>6</sub> spinal segments. Injections were given over a period of 5 seconds and the nociceptive response was elicited by glutamate (an excitatory amino acid, 175 nmol/site), AMPA (a selective agonist of AMPA-subtype of glutamatergic ionotropic receptors, 135 pmol/site), NMDA (a selective agonist of NMDA-subtype of glutamatergic ionotropic receptors, 450 pmol/site), kainate (a selective agonist of kainate-subtype of glutamatergic ionotropic receptors, 110 pmol/site) or trans-ACPD (an agonist of metabotropic glutamate receptors, 50 nmol/site, i.t.) (Scheidt et al., 2002). The amount of time (s) that animal spent biting was timed with a chronometer and was considered as indicative of nociception. In this regard, a bite is defined as a single head movement directed at the flanks or hindlimbs, resulting in contact of the animal's snout with the target organ. The behavioral nociception was evaluated immediately following local post-injections of each agonist: trans-ACPD: 15 min; NMDA: 5 min; kainate: 4 min; glutamate: 3 min; and AMPA: 1 min (Scheidt et al., 2002).

#### 4.3. Drugs

The compounds used were agmatine sulphate, N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine (L-NOARG) and L-glutamic acid hydrochloride (glutamate) (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA); kainic acid (kainate), ( $\pm$ )-1-Aminocyclopentane-trans-1,3-dicarboxylic acid (trans-ACPD),  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid (AMPA), N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) and (5S,10R)-(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d] (MK-801) (Tocris, Cookson Inc., Ellisville, USA). All drugs were dissolved immediately before administration in a saline solution (0.9%). The choice of the doses of each drug was based on literature data (Ferreira et al., 1999; Santos et al., 2005; Scheidt et al., 2002) or on preliminary experiments carried out in our laboratory (results not shown).

#### 4.4. Statistical analysis

The results are presented as mean  $\pm$  SEM, except the ID<sub>50</sub> values (i.e., the dose of agmatine necessary to reduce the nociceptive response by 50% relative to the control value), which are reported as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits. The ID<sub>50</sub> value was determined by linear regression from individual experiments using linear regression GraphPad software (GraphPad software, San Diego, CA, USA). Comparisons between experimental and control groups were performed by ANOVA followed by Newman-Keuls' test when appropriated. P values less than 0.05 (P < 0.05) were considered as indicative of significance.

### Acknowledgments

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

and by Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência (PRONEX), Brazil. V.M. Gadotti is a PhD student in Neurosciences, A.F. Paszcuk is an MS student in Pharmacology, and D. Tibola is Pharmacy undergraduate student. They thank CAPES and CNPq for fellowship support.

### REFERENCES

- Chizh, B.A., 2002. Novel approaches to targeting glutamate receptors for the treatment of chronic pain: review article. *Amino Acids* 23, 169–176.
- Coderre, T.J., Van Empel, I., 1994. The utility of excitatory amino acid (EAA) antagonists as analgesic agents: I. Comparison of the antinociceptive activity of various classes of EAA antagonists in mechanical, thermal and chemical nociceptive tests. *Pain* 59, 345–352.
- Dickenson, A.H., 1995. Spinal cord pharmacology of pain. *Br. J. Anaesth.* 75, 193–200.
- Dickenson, A.H., 1997. Mechanism of central hypersensitivity: excitatory amino acid mechanism and their control. In: Dickenson, A., Besson, J.-M. (Eds.), *The Pharmacology of Pain. Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 130. Springer-Verlag, Berlin, pp. 167–210.
- Dray, A., Urban, L., Dickenson, A., 1994. Pharmacology of chronic pain. *Trends Pharmacol. Sci.* 15, 190–197.
- Fairbanks, C.A., Schreiber, K.L., Brewer, K.L., Yu, C.G., Stone, L.S., Kitto, K.F., Nguyen, H.O., Grocholski, B.M., Shoeman, D.W., Kehl, L.J., Regunathan, S., Reis, D.J., Yeziarski, R.P., Wilcox, G.L., 2000. Agmatine reverses pain induced by inflammation, neuropathy, and spinal cord injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 10584–10589.
- Ferreira, J., Santos, A.R.S., Calixto, J.B., 1999. The role of systemic, spinal and supraspinal L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway in thermal hyperalgesia caused by intrathecal injection of glutamate in mice. *Neuropharmacology* 38, 835–842.
- Fundytus, M.E., 2001. Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain. *CNS Drugs* 15, 29–58.
- Galea, E., Regunathan, S., Eliopoulos, V., Feinstein, D.L., Reis, D.J., 1996. Inhibition of mammalian nitric oxide synthases by agmatine, an endogenous polyamine formed by decarboxylation of arginine. *Biochem. J.* 316, 247–249.
- Gibson, D.A., Harris, B.R., Rogers, D.T., Littleton, J.M., 2002. Radioligand binding studies reveal agmatine is a more selective antagonist for a polyamine-site on the NMDA receptor than arcaïne or ifenprodil. *Brain Res.* 952, 71–77.
- Hill, R.G., 2001. Molecular basis for the perception of pain. *Neuroscientist* 7, 282–292.
- Hylden, J.L., Wilcox, G.L., 1980. Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur. J. Pharmacol.* 67, 313–316.
- Lutfy, K., Cai, S.X., Woodward, R.M., Weber, E., 1997. Antinociceptive effects of NMDA and non-NMDA receptor antagonists in the tail flick test in mice. *Pain* 70, 31–40.
- Meldrum, B.S., 2000. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J. Nutr.* 130, 1007–1015.
- Millan, M.J., 1999. The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.* 57, 1–164.
- Neugebauer, V., 2002. Metabotropic glutamate receptors: important modulators of nociception and pain behavior. *Pain* 98, 1–8.
- Nguyen, H.O.X., Goracke-Postle, C.J., Kaminski, L.L., Overland, A.C., Morgan, A.D., Fairbanks, C.A., 2003. Neuropharmacokinetic and dynamic studies of agmatine (descarboxylated arginine). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1009, 82–105.
- Onal, A., Soykan, N., 2001. Agmatine produces antinociception in tonic pain in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 69, 93–97.

- Onal, A., Delen, Y., Ulker, S., Soykan, N., 2003. Agmatine attenuates neuropathic pain in rats: possible mediation of nitric oxide and noradrenergic activity in the brainstem and cerebellum. *Life Sci.* 73, 413–428.
- Ozawa, S., Kamiya, H., Tsuzuki, K., 1998. Glutamate receptors in mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 54, 581–618.
- Piletz, J.E., May, P.J., Wang, G., Zhu, H., 2003. Agmatine crosses the blood–brain barrier. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1009, 64–74.
- Raasch, W., Schafer, U., Chun, J., Dominiak, P., 2001. Biological significance of agmatine, an endogenous ligand at imidazoline binding sites. *Br. J. Pharmacol.* 133, 755–780.
- Reis, D.J., Regunathan, S., 2000. Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 187–193.
- Riedel, W., Neeck, G., 2001. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. *Z. Rheumatol.* 60, 404–415.
- Santos, A.R.S., Gadotti, V.M., Oliveira, G.L., Tibola, D., Paszcuk, A.F., Neto, A., Spindola, H.M., Sousa, M.M., Rodrigues, A.L.S., Calixto, J.B., 2005. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. *Neuropharmacology* 48, 1021–1034.
- Scheidt, C., Santos, A.R.S., Ferreira, J., Malheiros, A., Cechinel-Filho, V., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 2002. Evidence for the involvement of glutamatergic receptors in the antinociception caused in mice by the sesquiterpene drimaniol. *Neuropharmacology* 43, 340–347.
- Wiech, K., Kiefer, R.T., Topfner, S., Preissl, H., Braun, C., Unertl, K., Flor, H., Birbaumer, N., 2004. A placebo-controlled randomized crossover trial of the N-methyl-D-aspartic acid receptor antagonist, memantine, in patients with chronic phantom limb pain. *Anesth. Analg.* 98, 408–413.
- Woolf, C.J., 1994. A new strategy for the treatment of inflammatory pain prevention or elimination of central sensitization. *Drugs* 47, 1–9.
- Yang, X.C., Reis, D.J., 1999. Agmatine selectively blocks the N-methyl D-aspartate subclass of glutamate receptor channels in rat hippocampal neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288, 544–549.
- Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109–110.

available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)[www.elsevier.com/locate/brainres](http://www.elsevier.com/locate/brainres)**BRAIN  
RESEARCH****Research Report****Anti-hypernociceptive properties of agmatine in persistent inflammatory and neuropathic models of pain in mice**

Ana Flávia Paszcuk<sup>a</sup>, Vinicius M. Gadotti<sup>b</sup>, Daiane Tibola<sup>b</sup>, Nara L.M. Quintão<sup>a</sup>,  
Ana Lúcia S. Rodrigues<sup>c</sup>, João B. Calixto<sup>a</sup>, Adair R.S. Santos<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, 88049-000, SC, Brazil

<sup>b</sup>Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil

<sup>c</sup>Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Accepted 19 April 2007

Available online 24 April 2007

## Keywords:

Agmatine

Antinociception

Inflammatory chronic pain

Neuropathic pain

Cytokines

## ABSTRACT

The present study examined the anti-hypernociceptive effects of agmatine (AGM) in acute and chronic models of behavioural pain in mice. Agmatine (30 mg/kg, i.p. 30 min early), produced time-dependent inhibition of mechanical hypernociception induced by Complete Freund's Adjuvant (CFA) injected in the mice paw (inhibition of 52±7%) after 4 h. Given chronically (twice a day) during 10 days, AGM significantly reversed the mechanical hypernociception caused by CFA (inhibition of 43±6% to 67±5%). Moreover, AGM also significantly reduced the mechanical hypernociception caused by partial sciatic nerve ligation (PSNL) during 6 h, with inhibition of 81±8%. In thermal hypernociception (cold stimuli) caused by PSNL the antinociceptive effect of AGM was prolonged by 4 h with inhibition of 97±3% observed 1 h after the treatment. Nevertheless, AGM failed to inhibit the paw oedema caused by CFA and the myeloperoxidase enzyme activity. Of note, AGM (10–100 mg/kg, i.p., 30 min before) also elicited a pronounced inhibition of the biting response induced by TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in mice, with mean ID<sub>50</sub> values of 61.3 mg/kg (47.7–78.6 mg/kg) and 30.4 mg/kg (18.6–49.8 mg/kg) and inhibitions of 75±5% and 66±6%, respectively. Together, present and previous findings show that AGM given systemically is effective in inhibiting mechanical and thermal hypernociception present in chronic inflammatory processes caused by CFA and also the neuropathic pain caused by PSNL.

© 2007 Published by Elsevier B.V.

**1. Introduction**

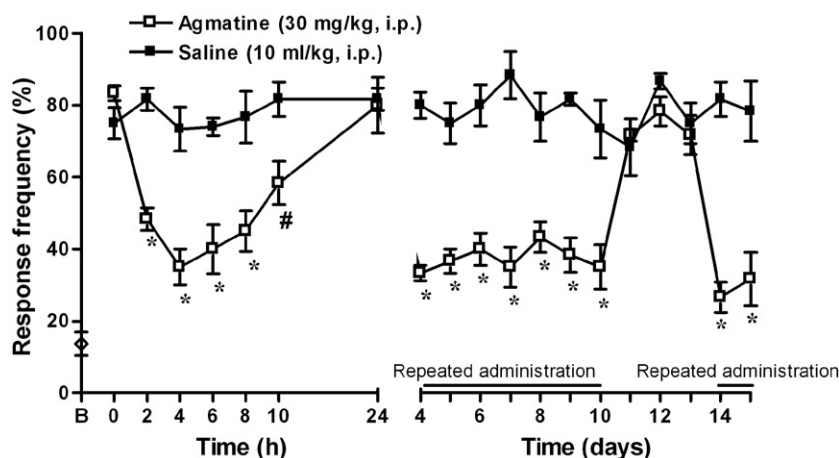
The sensation of pain is an essential early warning device that alerts us to the presence in the environment of damaging stimuli (Woolf and Salter, 2000). Inflammatory pain is initiated by tissue damage/inflammation while neuropathic pain is

associated with the nervous system lesions. Both pain processes are characterized by states of hypersensitivity at the site of damage and in adjacent normal tissue (Woolf and Salter, 2000). Prolonged inflammation or nerve injury in humans often leads to a sensory nociceptor sensitization referred as hyperalgesia (enhanced withdrawal response to

\* Corresponding author. Fax: +55 48 3721 9672.

E-mail addresses: [arssantos@ccb.ufsc.br](mailto:arssantos@ccb.ufsc.br), [arssantos@ig.com.br](mailto:arssantos@ig.com.br) (A.R.S. Santos).



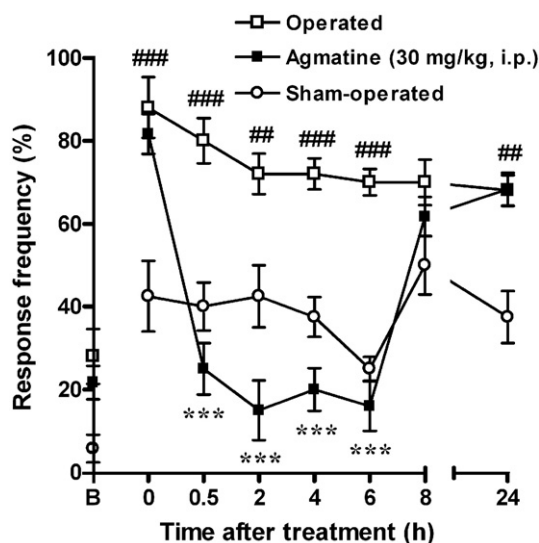


**Fig. 1** – Effect of acute or chronic administration of agmatine on mechanical allodynia induced by CFA injection. The mechanical allodynia was attenuated in the ipsilateral hindpaw in mice treated with agmatine (30 mg/kg, i.p.) before CFA injection. Each point represents the mean of 6–8 animals and vertical lines show the SEM. Symbols denote the significance levels in comparison to control values: # $P < 0.05$ ; \* $P < 0.001$ . B: baseline withdrawal threshold.

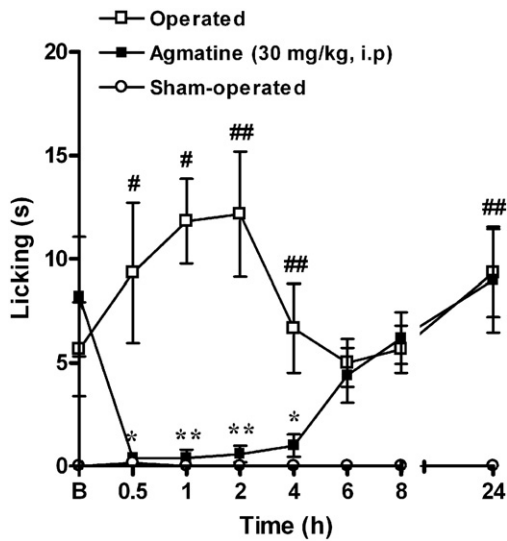
normally nocuous stimulation) or allodynia (reduced withdrawal thresholds for normally innocuous stimulation). These terms are uncritically used to describe the decrease of nociceptive threshold response in experimental animals. Therefore, this nociceptive response in this study is considered as “hypernociception” to designate hyperalgesia and allodynia (Woolf and Mannion, 1999; Cunha et al., 2005; Verri et al., 2006). In some cases, the symptoms of the acute inflammation persists like vasodilatation, the exudation of protein-rich fluid (plasma) and a migration of cells (primarily neutrophils) into the site of injury and, in some cases, activation of the coagulation cascade (Carraway et al., 2003). Neuropathic pain is a kind of chronic pain that can persist for days, months, or even years after nerve injury (Zimmermann, 2001). The mechanisms underlying the neuropathic pain are currently not fully understood, but studies in animals with peripheral nerve damage provide evidence for a role of NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptors in neuropathic pain states (Mao et al., 1992; Yoshimura and Yonehara, 2006). NMDA receptors contribute to normal and abnormal excitatory transmission and have special roles related to synaptic plasticity (Dickenson et al., 1997).

Agmatine, an endogenous substance found in various mammalian organs, has been shown to exert some neuromodulatory functions in the central nervous system (CNS), where it is proposed to play a role as a neurotransmitter/neuromodulator (Li et al., 1994; Reis and Regunathan, 2000; Raasch et al., 2001). Recently, several biological functions for agmatine have been suggested, including its neuroprotective, cognitive, anxiolytic, anticonvulsant, antidepressant and anti-tumor cell proliferation properties (Olmos et al., 1999; McKay et al., 2002; Aricioglu-Kartal and Altunbas, 2003; Aricioglu-Kartal et al., 2003a; Lavinsky et al., 2003; Zomkowski et al., 2002, 2005; Feng et al., 2005; Regunathan, 2006; Wolf et al., 2007; Zhu et al., 2006). In addition, several studies have reported that agmatine can block spinal nociceptive reflexes and also prevents inflammation-, spinal cord injury- and nerve injury-induced pain (Fairbanks et al., 2000; Aricioglu-Kartal et al., 2003b;

Karadag et al., 2003). We have previously reported that agmatine produces dose-related antinociception in several models of chemical pain through a complex mechanism that likely involves an interaction with opioid, serotonergic (i.e., through 5-HT<sub>2A</sub> and 5HT<sub>3</sub> receptors), nitergic and glutamatergic systems, as well as via an interaction with  $\alpha_2$ -adrenoceptors and imidazoline I<sub>1</sub> receptors (Santos et al., 2005; Gadotti et al., 2006).

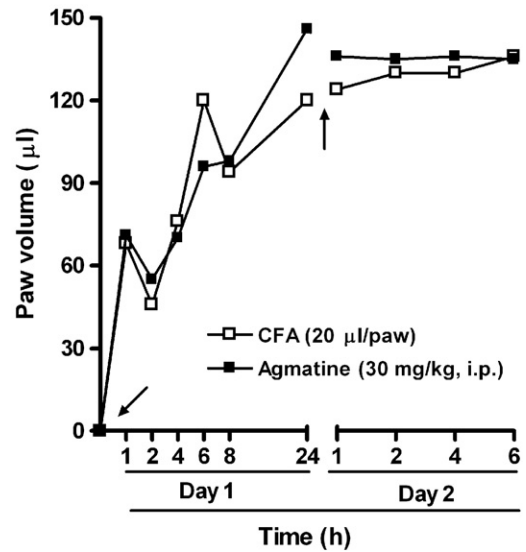


**Fig. 2** – Effect of treatment with agmatine on mechanical allodynia induced by partial sciatic nerve injury in mice. The mechanical allodynia was attenuated in mice treated with agmatine (30 mg/kg, i.p.), given 5 days after the partial sciatic nerve injury. Each point represents the mean of 6–8 animals and vertical lines show the SEM. Significantly different to operated mouse group, \*\*\* $P < 0.001$ , and significantly different to sham-operated mouse (#) values, ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ . B: baseline withdrawal threshold.



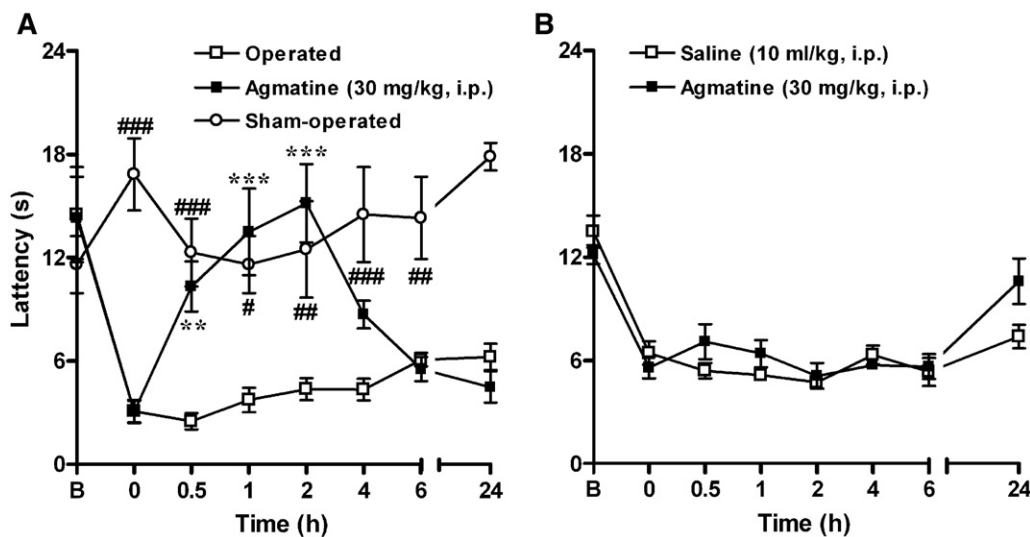
**Fig. 3** – Effect of treatment with agmatine on thermal allodynia (cold stimuli) induced by partial sciatic nerve injury in mice. The thermal allodynia (cold stimuli) was attenuated in mice treated with agmatine (30 mg/kg, i.p.), given 5 days after the partial sciatic nerve injury. Each point represents the mean of 6–8 animals and vertical lines show the SEM. Significantly different to operated mouse group, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ , and significantly different to sham-operated mouse (#) values, # $P < 0.05$ ; ## $P < 0.01$ . B: baseline withdrawal threshold.

It has been also reported that agmatine can generate a voltage and concentration-dependent inhibition of NMDA receptor channel (Yang and Reis, 1999; Askalany et al., 2005; Wang et al., 2006), other ligand-gated cationic channels, such as 5-HT<sub>3</sub> and nicotinic acetylcholine receptors (Loring, 1990; Santos et al., 2005). In addition, agmatine is known to

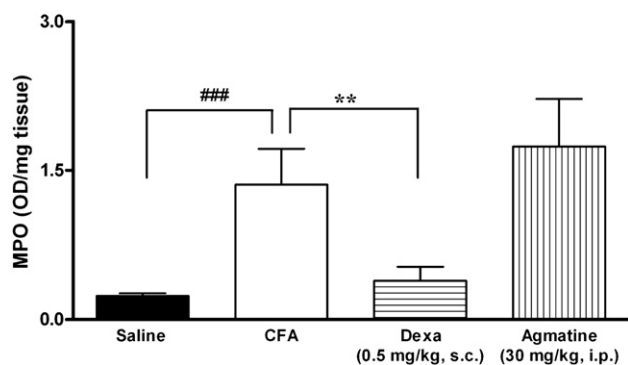


**Fig. 5** – Effect of treatment with agmatine on paw oedema induced by CFA injection. Effect of systemic treatment (i.p.) with agmatine (30 mg/kg), 30 min before and 24 h after injection of CFA on the paw oedema formation. Each point represents the mean of 6–8 animals and vertical lines show the SEM.

inhibit all isoforms of nitric oxide synthase (NOS), which are both largely involved in neuropathic pain states, as above mentioned (Galea et al., 1996; Regunathan and Piletz, 2003; for review see Reis and Regunathan, 2000; Raasch et al., 2001; Regunathan, 2006). A growing amount of experimental data indicates that NMDA receptors may be involved in the mechanism of pain and inflammation, and NMDA receptor antagonists might exhibit clinically



**Fig. 4** – Effect of treatment with agmatine on thermal allodynia (hot stimuli) induced by partial sciatic nerve injury in mice and CFA injection. Treatment with agmatine (30 mg/kg, i.p.), given 5 days after the partial sciatic nerve injury (A) and 24 h after the paw injection of CFA (B) on paw thermal stimulation. Each point represents the mean of 6–8 animals and vertical lines show the SEM. Significantly different to operated mouse group, \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ , and significantly different to sham-operated mouse (#) values, # $P < 0.05$ ; ## $P < 0.01$ ; ### $P < 0.001$ . B: baseline withdrawal threshold.



**Fig. 6 – Effect of treatment with agmatine on MPO activity induced by CFA injection.** The pre-treatment with agmatine (30 mg/kg, i.p.) and dexamethasone (Dexa – 0.5 mg/kg, s.c.) on the MPO activity induced by CFA injection. Each point represents the mean of 6–8 animals and vertical lines show the SEM. Asterisks denote the significance levels in comparison to saline (#) values: ### $P < 0.001$  and significantly different to control values, \*\* $P < 0.01$ .

potential relevance in the management of pathological pain states (Woolf and Thompson, 1991). In a similar way, NOS inhibitors exert antinociceptive effects in animal models of pain. Since agmatine is known to inhibit both NMDA receptors and NOS, the present study was designed to investigate further whether or not agmatine produces antinociceptive effects in inflammatory and neuropathic pain models of chronic pain.

Of interest, the results of the present study showed for the first time that acute or prolonged systemic treatment of animals with agmatine are effective in preventing the persistent mechanical hypernociception, but not thermal hypernociception (hot stimuli), caused by CFA in mice paw. These hypernociceptive responses could be involved with a cytokine cascade, since agmatine was able to diminish the cytokine-induced nociceptive behaviours in mice.

## 2. Results

### 2.1. CFA-induced persistent hypernociception

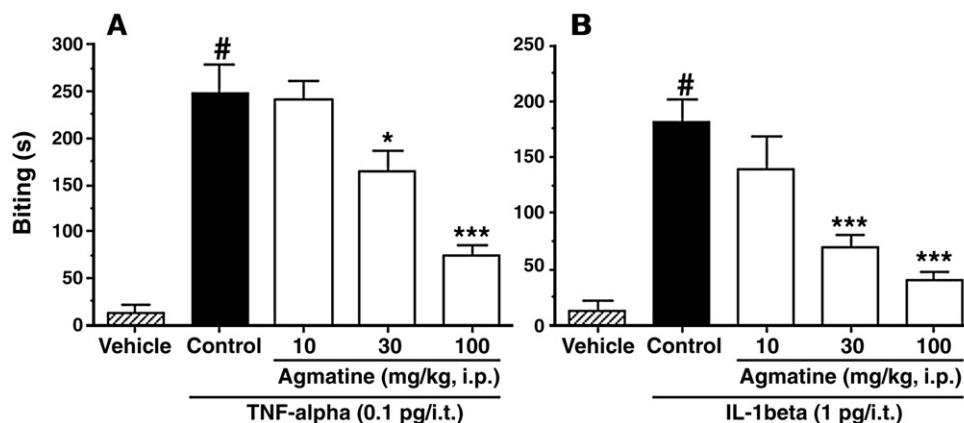
The results depicted in Fig. 1 shows that agmatine, given by i.p. route (30 min earlier), produced a significant and time-dependent inhibition of the mechanical hypernociception induced by i.p. injection of CFA in the right paw, with maximal inhibition of  $52 \pm 7\%$ . Agmatine produced marked antinociception as early as 2 h after i.p. administration, an action that remained significant up to 8 h after its administration. When agmatine was sub-chronically administered (twice a day) during 7 days, it also significantly reduced the mechanical hypernociception induced by CFA. This effect was evident until day 10 of treatment (inhibition of  $67 \pm 5\%$  at the day 7). When the treatment was interrupted for 3 days, the mechanical hypernociception was re-established. On the 14th day, the treatment was restarted and it was observed that agmatine once again significantly reduced the mechanical hypernociception like in the acute treatment, indicating that agmatine did not develop tolerance.

### 2.2. Mononeuropathy caused by partial sciatic nerve ligation (PSNL)

The partial sciatic nerve ligation, a neuropathic pain model, reduced the basal threshold of mechanical hypernociception in response to FVF (0.6 g) application when compared to non-operated group. Fig. 2 shows that agmatine reduced the hypernociceptive response produced by PSNL, with  $81 \pm 8\%$  of inhibition in 2 h after treatment, an action that remained significant up to 6 h after its administration.

### 2.3. Cold hypernociception caused by partial sciatic nerve ligation

The results presented in Fig. 3 shows that agmatine (30 mg/kg, i.p. 30 min beforehand), caused a significant inhibition of the cold hypernociception caused by PSNL, with inhibition of  $97 \pm 3\%$ , observed at 2 h after treatment.



**Fig. 7 – Effect of treatment with agmatine on Pro-inflammatory cytokines-induced biting response.** Effect of systemic treatment (i.p.) with agmatine (10–100 mg/kg, i.p.), 30 min before on the nociceptive response elicited by TNF- $\alpha$  (0.1 pmol/site, i.t.; A) or IL-1 $\beta$  (1 pmol/site, i.t.; B). Each point represents the mean of 6–10 animals and vertical lines show the SEM. Significantly different to control groups, \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . # $P < 0.001$  compared to vehicle group.

#### 2.4. Hot hypernociception caused by partial sciatic nerve ligation and CFA injection

Fig. 4 demonstrates that both PSNL and CFA injections were able to diminish the thermal latency (A and B, respectively). In this regard, the treatment of animals with agmatine (30 mg/kg, i.p.) increased in  $75 \pm 4\%$  the thermal latency only in animals with PSNL, but produced no effect in CFA-induced thermal hypernociception.

#### 2.5. Paw oedema caused by injection of CFA

The results depicted in Fig. 5 show that the i.p. injection of CFA caused a time-dependent increase in the paw volume. However, the pre-treatment (30 min before CFA injection) and post-treatment (24 h after CFA injection) of animals with agmatine (30 mg/kg, i.p.) did not significantly reduce the CFA-induced paw oedema.

#### 2.6. Neutrophil myeloperoxidase (MPO) assay

The migration of neutrophil to the mice paws in response to CFA injection was assessed indirectly by means of MPO assay. As shown in Fig. 6, injection of CFA induced a marked increase in MPO levels. The administration of agmatine (30 mg/kg, i.p.) did not significantly reduce the MPO activity in the paws that received CFA. The positive control drug, dexamethasone (0.5 mg/kg, s.c., 4 to 8 h before), significantly reduced the MPO activity induced by CFA in the mice paws.

#### 2.7. Pro-inflammatory cytokine-induced biting response

The results presented in Fig. 7 show that agmatine (10–100 mg/kg, i.p., 30 min before) dose-dependently inhibited the hypernociceptive responses induced by intrathecal injection of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Fig. 7A) and by interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) (Fig. 7B) with calculated mean ID<sub>50</sub> values of 61.3 mg/kg (47.7–78.6 mg/kg) and 30.4 mg/kg (18.6–49.8 mg/kg) and inhibitions of  $75 \pm 5\%$  and  $66 \pm 6\%$ , respectively.

### 3. Discussion

Chronic pain differs substantially from acute pain in terms of its persistence and also in relation to some adaptive changes, such as neuroplasticity that have been described at various levels of the nervous system (Besson, 1999). To assess the effects of agmatine in persistent models of pain, we analysed the anti-hypernociceptive effect of agmatine in inflammatory pain induced by intraplantar injection of CFA or in neuropathic pain induced by PSNL. A characteristic feature of these models of nociception is that they display hypernociceptive responses to mechanical and thermal stimuli applied to the site of the injury. Both models of persistent pain used in the present study produce central sensitization in response to the release of several pro-inflammatory mediators, which increase the sensitivity of peripheral and central sensory pathways (Basbaum, 1999; Minami et al., 2006).

In the present work, we confirm and largely extend previous data from literature by showing for the first time

that acute treatment of mice with agmatine was able to reduce in a great manner the mechanical and thermal (cold and hot stimuli) hypernociception induced by PSNL. Moreover, the anti-hypernociception action of agmatine lasted for up to 6 h when analysed in the mechanical hypernociception caused by CFA and PSNL. Experimental models of mononeuropathy produced by sciatic nerve injury in rat or mice are able to mimic important symptoms observed in patients with peripheral neuropathy and are extensively employed in behavioural research (Bennett and Xie, 1988). On the other hand, neuropathic pain is a complex syndrome that is originated and modulated by both peripheral and central nervous systems (Zimmermann, 2001). One of the hypotheses of pain onset after a neuronal injury is a spontaneous and persistent activation of the injured nervous or the dorsal horn ganglia (DRG). This activation promotes the release of nociceptive mediators and pro-inflammatory cytokines, which sensitizes non-injured neurons that participates in the process of pain perpetuation (Cui et al., 2000). The sensitization of primary afferent nerve fibres by pro-inflammatory cytokines, such as IL- $1\beta$  and TNF- $\alpha$ , or glutamate after peripheral nerve injury seems to be mediated by a complex signaling cascade involving the secondary production of among others, nitric oxide, bradykinin and PGE<sub>2</sub> (Sommer and Kress, 2004). A considerable number of studies have shown that agmatine reduces pain responses caused by inflammatory processes, spinal cord injury or neuropathy (Fairbanks et al., 2000; Aricioglu-Kartal et al., 2003b; Karadag et al., 2003). Regarding the neuropathic pain, the present study confirms and extends data from literature by showing that agmatine significantly reversed neuropathic pain caused by PSNL. In addition, it has been demonstrated that agmatine is also able to reverse the hypernociceptive responses in three experimental neuropathic pain models, the spinal and sciatic nerve ligation and the streptozotocin-induced diabetic neuropathic pain in rats (Fairbanks et al., 2000; Karadag et al., 2003; Önal et al., 2003).

Of interest, the results of the present study also showed for the first time, that acute or prolonged systemic (i.p.) treatments of animals with agmatine are effective in preventing the persistent mechanical hypernociception, but not thermal hypernociception (hot stimuli), caused by CFA in the mice paw. Moreover, the anti-hypernociceptive action of agmatine was evident early and lasted for up to 8 h. Interestingly, the anti-hypernociceptive response caused by agmatine was not susceptible to tolerance. This conclusion derives from data showing that (i) the withdrawal of agmatine was followed by complete return to baseline allodynia, and (ii) a new intraperitoneal treatment with agmatine, twice a day, produced very similar and pronounced anti-hypernociceptive effects. It is known that inflammation of peripheral tissue produces persistent behavioural pain in animals that mimics clinical inflammatory pain states (Myers et al., 2006). It is well recognized that the persistent hypernociception caused by intraplantar injection of CFA results in a long-lasting inflammatory pain that develops within few hours, an effect that is mediated by several inflammatory mediators such as cytokines, glutamate, nitric oxide, prostanoids, histamine, serotonin and immunological agents (Raghavendra et al., 2004; Chu et al., 2005). Moreover, it also involves central sensitization due to the release of these multiple inflammatory and pain



mediators, that in turn account for the increase in sensitivity of both peripheral sensory afferents at the site of the injury, and in the CNS (for review, see Tracey and Walker, 1995; Basbaum, 1999; Zimmermann, 2001). However, the anti-hypernociceptive action of agmatine does not appear to be associated with a local anti-inflammatory action. This notion is further reinforced by the results showing that agmatine was not able to reduce CFA-induced oedema or myeloperoxidase activity.

Our findings are distinct from the results obtained by Horvath et al. (1999) that demonstrate that intrathecal agmatine attenuates the thermal hypernociception induced by i.pl. injection of carrageenan. In this model, carrageenan evokes a very characteristic inflammatory and nociceptive response, which is mediated by different groups of endogenous substances that stimulate chemosensitive nociceptors, thus playing a major part in the development of inflammatory pain (Posadas et al., 2004). In contrast, the i.pl. injection of CFA produces mechanical and thermal hypernociceptive response in both ipsilateral and contralateral hindpaws, developing within few hours and persisting for months. These effects are initiated by peripheral nociceptor activation, besides the release of inflammatory mediators, such as cytokines and prostanooids, culminating in central sensitization of nociceptive pathways (Samad et al., 2001), which is associated with a striking modification in the activity of superficial (I and II) and deep (V and VI) laminal dorsal horn neurons receiving noxious inputs (Chan et al., 2000). These literature results suggest that agmatine acts in a different manner to reduce the thermal hypernociception in carrageenan model. In our study, it is important to mention the long-lasting effect observed in the CFA model produced by the systemically administered agmatine supports the concept that agmatine is transported to the CNS to exert its prolonged effect.

Cytokines, such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IFN- $\gamma$ , are capable of inducing nociceptive behaviour when injected intrathecally, in the absence of peripheral nociceptive stimulation (Robertson et al., 1997; Tadano et al., 1999). This may be related to the induction of glutamate and substance P (SP) release from nerve terminals, through direct activation of these by pro-inflammatory cytokines (Tadano et al., 1999). In line with this, Kleinschultz et al. (2004) have recently demonstrated that NMDA receptors modulate the expression of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , in two models of peripheral nerve injury. Furthermore, in the present study, we have shown for the first time that agmatine systemically administered to mice inhibited the behavioural nociceptive responses caused by spinally injected pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . Thus, agmatine could be either preventing pro-inflammatory cytokines from inducing the release of SP and glutamate from primary afferents, or even inhibiting the activation of projection neurons by glutamate, through the inhibition of NMDA receptors. In addition, many recent studies have shown that agmatine influences glutamatergic transmission by inhibiting glutamate binding to NMDA receptors apart to inhibit all isoforms of NOS (Reis and Regunathan, 2000; Raasch et al., 2001; Regunathan and Piletz, 2003; Askalany et al., 2005; Wang et al., 2006). In addition, glutamate receptors mediate most of the excitatory neurotransmission in the mammalian CNS and play an important role in modulating nociceptive processing at

both spinal and peripheral levels (Fundytus, 2001). Indeed, we showed in a previous work that agmatine could exert its systemic anti-hypernociceptive effects by interacting with a central receptor system modulating glutamatergic receptors and inhibiting the NO synthesis (Gadotti et al., 2006). Such possibility could explain, at least partially, some of the agmatine effects, such as those previously reported in several models of nociception, including inflammatory and neuropathic models of pain (Horvath et al., 1999; Fairbanks et al., 2000; Önal and Soykan, 2001; Önal et al., 2003). Additionally, we demonstrated that agmatine, administered systemically (i.p. or p.o.), is able to inhibit the visceral inflammatory pain caused by acetic acid, formalin, capsaicin and glutamate in mice (Santos et al., 2005). We also reported that the antinociception caused by agmatine in mice involves the L-arginine-nitric-oxide pathway among others systems of neurotransmitters, including opioid, serotonergic,  $\alpha_2$ -adrenergic, imidazoline receptors and glutamatergic (Santos et al., 2005).

In summary, the present findings confirm and largely extend results from literature by demonstrating that agmatine inhibits neuropathic pain. Moreover, this work provides convincing evidence that agmatine exerts a rapid and pronounced anti-hypernociception against mechanical and thermal hypernociception caused by CFA and PNL. The precise mechanisms by which agmatine causes anti-hypernociception are not completely known, but its ability to inhibit all isoforms of NOS and modulate the NMDA-glutamatergic receptor may be responsible, at least in part, for its anti-hypernociceptive action. However, a mechanism related to inhibition of local inflammatory process does not seem to contribute to the anti-hypernociceptive properties of agmatine.

## 4. Experimental procedures

### 4.1. Animals

Experiments were carried out by using male and female Swiss mice weighing 20–30 g and kept in a controlled temperature room (22 $\pm$ 2 °C), under a 12-h light–dark cycle. Food and water were freely available. Animals were acclimatized to the laboratory for at least 1 h before testing and were used once throughout the experiments. The experiments were performed after approval of the protocol by the Institutional Ethics Committee and were carried out in accordance with the current guidelines for the care of laboratory animals and the ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals as specified by Zimmermann (1983). The number of animals and intensity of noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of the drug treatment.

### 4.2. Partial sciatic nerve ligation (PSNL)

Mice were anaesthetised intraperitoneally (i.p.) with chloral hydrate 7% (0.6 ml/kg). A partial ligation of the sciatic nerve was performed by tying the distal 1/3 to 1/2 of the dorsal portion of the sciatic nerve, according to the procedure described in mice by Malmberg and Basbaum (1998). In sham operated mice, sciatic nerve was exposed without ligation. The wound was closed and covered with iodine solution. The operated mice

received agmatine (30 mg/kg, i.p.) or vehicle (10 ml/kg, i.p.) and sham-operated animals received only vehicle (10 ml/kg, i.p.) 5 days after surgery. The mechanical and thermal (cold and hot stimuli) hypernociceptive responses were recorded immediately before (0) and after (0.5, 1, 2, 4, 6, 8 and 24 h) treatment.

#### 4.3. CFA-induced inflammation

Mice were lightly anaesthetised by inhalation with oxygen (3%) and isoflurane (2%) and were injected with 20  $\mu$ l of Complete Freund's Adjuvant (CFA) (*Mycobacterium tuberculosis*; Sigma, St. Louis, MO, USA) subcutaneously in the plantar surface of the right hindpaw (i.pl.) (Ferreira et al., 2001). The control groups received 20  $\mu$ l of PBS in the ipsilateral paw. The dose of CFA produces significant hindpaw swelling and hypernociception. To assess the effects of acute treatment of the agmatine against CFA-induced chronic inflammatory pain, animals received agmatine (30 mg/kg, i.p.) 24 h following CFA intraplantar injection. Development of mechanical and thermal (hot stimuli) hypernociception was evaluated at 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 24 h after treatment to verify the time-course effect of agmatine in inhibiting the hypernociceptive responses. To investigate the effects of the long-term treatment on mechanical hypernociception, agmatine (30 mg/kg, i.p.) was administered intraperitoneally to mice, twice a day (every 12 h). The hypernociceptive response was evaluated 4 h after the first treatment (time with maximal inhibition observed in the acute treatment). The repeated treatment was extended from 4th to the 10th day after CFA injection, and it was interrupted for 3 days. Next, the treatment was re-initiated to assess the development of possible tolerance effect of agmatine (Bortolanza et al., 2002).

#### 4.4. Measurement of mice paw oedema

The animals received a 20- $\mu$ l i.pl. injection in one hind paw (right paw) of CFA. The contralateral paw (left paw) received 20  $\mu$ l of saline and was used as the control. Oedema was measured with a plethysmometer (Ugo Basile, Comerio, VA, Italy) and was expressed in milliliters as the difference between the right and left paws. To verify the possible preventive effect of agmatine against CFA-induced paw oedema, animals received agmatine (30 mg/kg, i.p.) 30 min before CFA intraplantar injection and the increase in paw volume was evaluated at 1, 2, 4, 6, 8 and 24 h after CFA injection. In order to assess the curative effect of agmatine, these same mice were treated with agmatine (30 mg/kg, i.p.) 24 h after CFA paw injection, and the paw volume was assessed 1, 2, 4 and 6 h after agmatine administration.

#### 4.5. Neutrophil myeloperoxidase (MPO) assay

Neutrophil recruitment to the mice paw was measured by means of tissue MPO activity, determined according to the method described previously (Souza et al., 2000). Animals were treated with agmatine (30 mg/kg, i.p.) or vehicle (10 ml/kg, i.p.) and after 30 min received an i.pl. injection of CFA (20  $\mu$ l) in the right paw and were sacrificed 3 h after CFA injection. Saline-treated paws were used as a control. At the time of sacrifice, the s.c. tissue of the paws was removed, homoge-

nized at 5% (w/v) in EDTA/NaCl buffer (pH 4.7) and centrifuged at 10,000 rpm for 15 min at 4 °C. The pellet was re-suspended in 0.5% hexadecyltrimethyl ammonium bromide buffer (pH 5.4), and the samples were frozen and thawed three times in liquid nitrogen. Upon thawing, the samples were re-centrifuged (10,000 rpm, 15 min, 4 °C), and 25  $\mu$ l of the supernatant was used for the MPO assay. The enzymatic reaction was assessed with 1.6 mM tetramethylbenzidine, 80 mM sodium phosphate buffer pH 7.2, and 0.3 mM hydrogen peroxide. The absorbance was measured at 650 nm, and the results are expressed as OD per milligram of tissue.

#### 4.6. Pro-inflammatory cytokine-induced biting response

To test the hypothesis that modulation of central inflammatory cytokines might be involved in agmatine anti-hypernociception, we investigate if agmatine is able to inhibit inflammatory TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ -induced biting response in mice. Animals received an intrathecal injection of 5  $\mu$ l of TNF- $\alpha$  (0.1 pmol/site) or IL-1 $\beta$  (1 pmol/site) or vehicle solution. Injections were given to waking animals using the method described previously (Hylden and Wilcox, 1980). The animals were restrained manually, and a 30-gauge needle, attached to a 25- $\mu$ l micro-syringe, was inserted through the skin and between the vertebrae into the subdural space of the L5–L6 spinal segments. Injections were given over a period of 5 s. Mice were treated with agmatine (10–100 mg/kg) or vehicle (10 ml/kg) by i.p. route 30 min before cytokines injection. Drugs were dissolved immediately before administration in a saline solution (0.9%). Animals were observed individually for 15 min following intrathecal injection. The amount of time that animal spent biting was timed with a chronometer and was considered as indicative of nociception. In this regard, a bite is defined as a single head movement directed at the flanks or hind limbs, resulting in contact of the animal's snout with the target organ. The doses of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  and time of evaluation used in this study had been previously determined in our laboratory (data not shown).

#### 4.7. Behavioural pain-related parameters

##### 4.7.1. Mechanical hypernociception

The mechanical hypernociception was measured as described previously by Bortolanza et al. (2002). The withdrawal response frequency to 10 applications of 0.6 g von Frey filaments (VFH, Stoelting, Chicago, USA) were the nociceptive percentile value. Mice were further acclimatized in individual clear boxes (9  $\times$  7  $\times$  11 cm<sup>3</sup>) on an elevated wire mesh platform to allow access to the ventral surface of the hind paws. The frequency of withdrawal was determined before and after PSLN or CFA injection.

##### 4.7.2. Measurement of thermal hypernociception (cold stimuli)

To measure the cold hypernociception the mice were individually placed into glass cylinders of 20 cm in diameter, and the cold allodynia was evaluated through the application of 20  $\mu$ l of acetone on the right paw of the animals that had suffered PSLN. The amount of time spent licking and/or biting the paw was timed with a chronometer during 5 min and was considered as indicative of nociception (Eliav et al., 1999).

4.7.3. *Measurement of thermal hypernociception (hot stimuli)*  
Thermal hyperalgesia was measured by using the paw-withdrawal latency according to the method described by Hargreaves et al. (1988), with minor modifications. Mice were placed in clear plastic chambers ( $7 \times 9 \times 11 \text{ cm}^3$ ) on an elevated surface and allowed to acclimatize to their environment for 1 h before testing. The heat stimulus was directed to the plantar surface of each hindpaw in the area immediately proximal to the toes. The infrared intensity was adjusted to obtain basal paw-withdrawal latencies of  $\sim 5 \text{ s}$ . An automatic 20-s cut-off was used to prevent tissue damage.

#### 4.8. Statistical analysis

All results are presented as mean  $\pm$  SEM of 6–8 animals, except the  $\text{ID}_{50}$  values (i.e., the dose of agmatine necessary to reduce the nociceptive response by 50% relative to the control value), which are reported as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits. The  $\text{ID}_{50}$  value was determined by linear regression from individual experiments using linear regression GraphPad software (GraphPad software, San Diego, CA, USA). Comparisons between experimental and control groups were performed by one way ANOVA followed by Newman–Keuls test and two-way ANOVA followed by Dunnett's test. *P*-values less than 0.05 ( $P < 0.05$ ) were considered significant.

#### 4.9. Drugs and reagents

The following drugs were used: agmatine, dexamethasone, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), hexadecyltrimethyl ammonium bromide (HTAB), tetramethylbenzidine, hydrogen peroxide, 2,2,2-tribromoethanol and pro-inflammatory cytokines (tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin- $1\beta$ ) all came from Sigma Chemical Company (St Louis, MO, USA).  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , NaCl and glucose were supplied by Merck (Haar, Germany).

## Acknowledgments

This study was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Apoio a Ciência e Tecnologia do Estado de Santa Catarina (FAPESC), Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência (PRONEX), (Brazil). A.F.P. is MSc student in Pharmacology receiving grants from CNPq, N.L.M.Q. and V.M.G. are PhD student in Pharmacology and Neuroscience receiving grants from CNPq and CAPES, respectively.

## REFERENCES

- Aricioglu-Kartal, F., Altunbas, H., 2003. Is agmatine an endogenous anxiolytic/antidepressant agent? *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1009, 136–140.
- Aricioglu-Kartal, F., Kan, B., Yillar, O., Korcegez, E., Berkman, K., 2003a. Effect of agmatine on electrically and chemically induced seizures in mice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1009, 141–146.
- Aricioglu-Kartal, F., Korcegez, E., Bozkurt, A., Ozyalcin, S., 2003b. Effect of agmatine on acute and mononeuropathic pain. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1009, 105–115.
- Askalany, A.R., Yamakura, T., Petrenko, A.B., Kohno, T., Sakimura, K., Baba, H., 2005. Effect of agmatine on heteromeric N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Neurosci. Res.* 52, 387–392.
- Basbaum, A.I., 1999. Spinal mechanisms of acute and persistent pain. *Reg. Anesth. Pain Med.* 24, 59–67.
- Bennett, G.J., Xie, Y.K., 1988. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33, 87–107.
- Besson, J.M., 1999. The neurobiology of pain. *Lancet* 353, 1610–1615.
- Bortolanza, L.B., Ferreira, J., Hess, S.C., Delle Monache, F., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 2002. Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 25, 203–208.
- Carraway, M.S., Welty-Wolf, K.E., Miller, D.L., Ortel, T.L., Idell, S., Ghio, A.J., Petersen, L.C., Piantadosi, C.A., 2003. Blockade of tissue factor: treatment for organ injury in established sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167, 1200–1209.
- Chan, C.F., Sun, W.Z., Lin, J.K., Lin-Shiau, S.Y., 2000. Activation of transcription factors of nuclear factor kappa B activator protein-1 and octamer factors in hyperalgesia. *Eur. J. Pharmacol.* 42, 61–68.
- Chu, Y.C., Guan, Y., Skinner, J., Raja, S.N., Johns, R.A., Tao, Y.X., 2005. Effect of genetic knockout or pharmacologic inhibition of neuronal nitric oxide synthase on complete Freund's adjuvant-induced persistent pain. *Pain* 119, 113–123.
- Cui, J.G., Holmin, S., Mathiesen, T., Meyerson, B.A., Linderoth, B., 2000. Possible role of inflammatory mediators in tactile hypersensitivity in rat models of mononeuropathy. *Pain* 88, 239–248.
- Cunha, T.M., Verri Jr., W.A., Silva, J.S., Poole, S., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2005. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 1755–1760.
- Dickenson, A.H., Chapman, V., Green, G.M., 1997. The pharmacology of excitatory and inhibitory amino acid-mediated events in the transmission and modulation of pain in the spinal cord. *Gen. Pharmacol.* 28, 633–638.
- Eliav, E., Herzberg, U., Caudle, R.M., 1999. The kappa opioid agonist GR89696 blocks hyperalgesia and allodynia in rat models of peripheral neuritis and neuropathy. *Pain* 79, 255–264.
- Fairbanks, C.A., Schreider, K.L., Brewer, C.G., Stone, L.S., Kitto, K.F., Nguyen, H.O., Grocholki, D.W., Shoeman, D.W., Kehl, L.J., Regunathan, S., Reis, D.J., Yeziarski, R.P., Wilcox, G.L., 2000. Agmatine reverses pain induced by inflammation, neuropathy, and spinal cord injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 10584–10589.
- Feng, Y., LeBlanc, M.H., Regunathan, S., 2005. Agmatine reduces extracellular glutamate during pentylentetrazole-induced seizures in rat brain: a potential mechanism for the anticonvulsive effects. *Neurosci. Lett.* 390, 129–133.
- Ferreira, J., Campos, M.M., Pesquero, J.B., Araujo, R.C., Calixto, J.B., 2001. Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. *Neuropharmacology* 41, 1006–1012.
- Fundytus, M.E., 2001. Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain. *CNS Drugs* 15, 29–58.
- Gadotti, V.M., Tibola, D., Paszcuk, A.F., Rodrigues, A.L.S., Calixto, J.B., Santos, A.R.S., 2006. Contribution of spinal glutamatergic



- receptors to the antinociception caused by agmatine in mice. *Brain Res.* 1093, 116–122.
- Galea, E., Regunathan, S., Eliopoulos, U., Feinstein, D.L., Reis, D.J., 1996. Inhibition of mammalian nitric oxide synthases by agmatine, an endogenous polyamine formed by decarboxylation of arginine. *Biochem. J.* 316, 247–249.
- Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C., Joris, J., 1988. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32, 77–88.
- Horvath, G., Kekesi, G., Dobos, I., Szikszay, M., Klimscha, W., Benedek, G., 1999. Effect of intrathecal agmatine on inflammation-induced thermal hyperalgesia in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 368, 197–204.
- Hyliden, J.L., Wilcox, G.L., 1980. Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur. J. Pharmacol.* 67, 313–316.
- Karadag, H.C., Ulugol, A., Tamer, M., Ipci, Y., Dokmeci, I., 2003. Systemic agmatine attenuates tactile allodynia in two experimental neuropathic pain models in rats. *Neurosci. Lett.* 339, 88–90.
- Kleinschnitz, C., Brinkhoff, J., Zelenka, M., Sommer, C., Stoll, G., 2004. The extent of cytokine induction in peripheral nerve lesions depends on the mode of injury and NMDA receptor signaling. *J. Neuroimmunol.* 149, 77–83.
- Lavinsky, D., Arteni, N.S., Netto, C.A., 2003. Agmatine induces anxiolysis in the elevated plus maze task in adult rats. *Behav. Brain Res.* 141, 19–24.
- Li, G., Regunathan, S., Barrow, C.J., Eshraghi, J., Cooper, R., Reis, D.J., 1994. Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. *Science* 263, 966–969.
- Loring, R.H., 1990. Agmatine acts as an antagonist of neuronal nicotinic receptors. *Br. J. Pharmacol.* 99, 207–211.
- Malmberg, A.B., Basbaum, A.I., 1998. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioural and neuroanatomical correlates. *Pain* 76, 215–222.
- Mao, J., Price, D.D., Mayer, D.J., Lu, J., Hayes, R.L., 1992. Intrathecal MK801 and local nerve anesthesia synergistically reduce nociceptive behaviours in rats with experimental peripheral mononeuropathy. *Brain Res.* 576, 254–262.
- McKay, B.E., Lado, W.E., Martin, L.J., Galic, M.A., Fournier, N.M., 2002. Learning and memory in agmatine-treated rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 72, 551–557.
- Minami, M., Katayama, T., Satoh, M., 2006. Brain cytokines and chemokines: roles in ischemic injury and pain. *J. Pharmacol. Sci.* 100, 461–470.
- Myers, R.R., Campana, W.M., Shubayev, V.I., 2006. The role of neuroinflammation in neuropathic pain: mechanisms and therapeutic targets. *Drug Discov. Today* 11, 8–20.
- Olmos, G., DeGregorio-Rocasolano, N., Paz Regalado, M., Gasull, T., Assumpcio Boronat, M., Trullas, R., Villarrol, A., Lerma, J., Garcia-Sevilla, J.A., 1999. Protection by imidazole(ine) drugs and agmatine of glutamate-induced neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells through blockade of NMDA receptor. *Br. J. Pharmacol.* 127, 1317–1326.
- Önal, A., Soykan, N., 2001. Agmatine produces antinociception in tonic pain in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 69, 93–97.
- Önal, A., Dlen, Y., Ülker, S., Soykan, N., 2003. Agmatine attenuates neuropathic pain: Possible mediation of nitric oxide and noradrenergic activity in the brainstem and cerebellum. *Life Sci.* 73, 413–428.
- Posadas, I., Bucci, M., Roviezzo, F., Rossi, A., Parente, L., Sautebin, L., Cirino, G., 2004. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br. J. Pharmacol.* 142, 331–338.
- Raasch, W., Schafer, U., Chun, J., Dominiak, P., 2001. Biological significance of agmatine, an endogenous ligand at imidazole binding sites. *Br. J. Pharmacol.* 133, 755–780.
- Raghavendra, V., Tanga, F.Y., DeLeo, J.A., 2004. Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. *Eur. J. Neurosci.* 20, 467–473.
- Regunathan, S., 2006. Agmatine: biological role and therapeutic potentials in morphine analgesia and dependence. *AAPS J.* 21, 479–484.
- Regunathan, S., Piletz, J.E., 2003. Regulation of inducible nitric oxide synthase and agmatine synthesis in macrophages and astrocytes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1009, 20–29.
- Reis, D.J., Regunathan, S., 2000. Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 187–193.
- Robertson, B., Xu, X.J., Hao, J.X., Wiesenfeld-Hallin, Z., Mhlanga, J., Grant, G., Kristensson, K., 1997. Interferon-gamma receptors in nociceptive pathways: role in neuropathic pain-related behaviour. *NeuroReport* 8, 1311–1316.
- Samad, T.A., Moore, K.A., Sapirstein, A., Billet, S., Allchorne, A., Poole, S., Bonventre, J.V., Woolf, C.J., 2001. Interleukin-1 $\beta$ -mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature* 410, 471–475.
- Santos, A.R.S., Gadotti, V.M., Oliveira, G.L., Tibola, D., Paszcuk, A.F., Neto, A., Spindola, H.M., Souza, M.M., Rodrigues, A.L.S., Calixto, J.B., 2005. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. *Neuropharmacology* 48, 1021–1034.
- Sommer, C., Kress, M., 2004. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci. Lett.* 361, 184–187.
- Souza, D.G., Coutinho, S.F., Silveira, M.R., Cara, D.C., Teixeira, M.M., 2000. Effects of a BLT receptor antagonist on local and remote reperfusion injuries after transient ischemia of the superior mesenteric artery in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 403, 121–128.
- Tadano, T., Namioka, M., Nakagawasaki, O., Tan-No, K., Matsushima, K., Endo, Y., Kisara, K., 1999. Induction of nociceptive responses by intrathecal injection of interleukin-1 in mice. *Life Sci.* 65, 255–261.
- Tracey, D.J., Walker, J.S., 1995. Pain due to nerve damage: are inflammatory mediators involved? *Inflamm. Res.* 44, 407–411.
- Verri Jr., W.A., Cunha, T.M., Parada, C.A., Poole, S., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2006. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacol. Ther.* 112, 116–138.
- Yang, X.C., Reis, D.J., 1999. Agmatine selectively blocks the NMDA subclass of glutamate receptor channels in cultured mouse hippocampal neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288, 544–549.
- Yoshimura, M., Yonehara, N., 2006. Alteration in sensitivity of ionotropic glutamate receptors and tachykinin receptors in spinal cord contribute to development and maintenance of nerve injury-evoked neuropathic pain. *Neurosci. Res.* 56, 21–28.
- Wang, W.P., Iyo, A.H., Miguel-Hidalgo, J., Regunathan, S., Zhu, M.Y., 2006. Agmatine protects against cell damage induced by NMDA and glutamate in cultured hippocampal neurons. *Brain Res.* 1084, 210–216.
- Wolf, C., Bruess, M., Haenisch, B., Goethert, M., von Kuegelgen, I., Molderings, G.J., 2007. Molecular basis for the antiproliferative effect of agmatine in tumor cells of colonic, hepatic and neuronal origin. *Mol. Pharmacol.* 71, 276–283.
- Woolf, C.J., Mannion, R.J., 1999. Neuropathic pain: etiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* 353, 1959–1964.
- Woolf, C.J., Salter, M.W., 2000. Neuronal plasticity: Increasing the gain in pain. *Science* 288, 1765–1769.
- Woolf, C.J., Thompson, S.W.N., 1991. The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation: Implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain* 44, 293–299.
- Zhu, M.Y., Wang, W.P., Bissette, G., 2006. Neuroprotective effects of agmatine against cell damage caused by glucocorticoids in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience* 141, 2019–2027.

- 
- Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animal. *Pain* 16, 109–111.
- Zimmermann, M., 2001. Pathobiology of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 429, 23–37.
- Zomkowski, A.D., Hammes, L., Lin, J., Calixto, J.B., Santos, A.R.S., Rodrigues, A.L.S., 2002. Agmatine produces antidepressant-like effects in two models of depression in mice. *NeuroReport* 13, 387–391.
- Zomkowski, A.D., Santos, A.R.S., Rodrigues, A.L.S., 2005. Evidence for the involvement of the opioid system in the agmatine antidepressant-like effect in the forced swimming test. *Neurosci. Lett.* 381, 279–283.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)