

ULBRA - UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E TOXICOLOGIA
APLICADA



AVALIAÇÃO NEUROCOMPORTAMENTAL E GENOTÓXICA DA AMANTADINA

**Dissertação para obtenção
do título de Mestre em
Genética e Toxicologia
Aplicada**

VANESSA KAEFER

Orientadora: Dr^a Jaqueline Nascimento Picada

Co-orientadora: Dr^a Patrícia Pereira

CANOAS
2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Este trabalho foi desenvolvido nas instalações da ULBRA Canoas/RS, no Laboratório de Genética Toxicológica e Laboratório de Farmacologia e Toxicologia.

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, pela vida, saúde e oportunidades. Obrigada por tudo!

A toda minha família, meu pai *Romeo*, irmão *Fabiano* e principalmente a minha mãe *Alaide* pelos incentivos diários, dedicação, compreensão, paciência, apoio, carinho e amor. Minha gratidão eterna!

Ao meu noivo, *Eduardo*, pela compreensão nos dias difíceis, paciência, carinho e amor.

Aos meus colegas da *Farmácia Panvel*, pela compreensão, ajuda, carinho e amizade.

A professora Dr^a. *Jaqueline Nascimento Picada* pela orientação, apoio, profissionalismo, paciência e amizade. Obrigada por tudo!

A professora Dr^a. *Patrícia Pereira* pela co-orientação, apoio, profissionalismo e amizade.

As colegas de mestrado, pela amizade, carinho e incentivos diários.

Aos estagiários do laboratório de genética e toxicologia, pela ajuda nas tarefas, apoio e amizade.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

Obrigada!!!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	06
LISTA DE TABELAS.....	07
ABREVIATURAS.....	08
RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	11
I - INTRODUÇÃO.....	13
1. Amantadina	13
1.1 Características farmacocinéticas.....	13
1.2 Atividades farmacodinâmicas.....	15
1.3 Mecanismos de ação da amantadina.....	18
1.3.1. Ação dopaminérgica.....	19
1.3.2. Ação sobre receptores NMDA.....	22
2. Avaliação das atividades neurocomportamentais.....	24
2.1. Memória.....	24
2.1.1. Tarefa de esquiva inibitória.....	27
2.1.2. Campo aberto.....	28
2.2. Comportamento estereotipado.....	29
3. Avaliação da atividade genotóxica.....	31
3.1 Teste cometa.....	32
3.2 Teste de micronúcleos.....	34
II - OBJETIVOS.....	38
1. Objetivo geral.....	38

2. Objetivo específico.....	38
III - CAPÍTULO I	
“Effects of amantadine on neurobehavior and genotoxic parameters in mice”	39
IV - DISCUSSÃO.....	79
V – CONCLUSÕES.....	86
1. Conclusão geral.....	86
2. Conclusões específicas	86
VI – PERSPECTIVAS.....	88
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

LISTA DE FIGURAS

I – INTRODUÇÃO

Figura 1 - Estrutura química da amantadina	13
Figura 2 - Síntese da dopamina	16
Figura 3 - Sistema dopaminérgico	20
Figura 4 - Sinapse glutamatérgica	23
Figura 5 - Imagens células cometa	34
Figura 6 - Origem do micronúcleo	35
Figura 7 - Eritrócitos policromáticos e normocromáticos	36

II – CAPÍTULO I

Figure 1 - Chemical structure of amantadine	67
Figure 2 - Capillary Electrophoresis of the amantadine	68
Figure 3 - Schedule for treatment of animals	69
Figure 4 - Effect of administration of saline or AMA in open field	
A- Latency	70
B- Crossings	70
C- Rearings	71
D- Bolus	71
Figure 5 - Effect of habituation on mice 24 h after training in the open field	72
Figure 6 - Effect of pretraining of vehicle or AMA on inhibitory avoidance	73
Figure 7 – Behavior stereotypy	74

LISTA DE TABELAS**I – INTRODUÇÃO**

Tabela 1 - Características farmacocinéticas da amantadina	14
---	----

II - CAPÍTULO I

Table 1 - Comet assay in the blood from mice treated with a single dose of AMA or saline.	75
Table 2 - Comet assay in the blood, brain and liver from mice treated by three days with AMA or saline	76
Table 3 - Micronucleus test in bone marrow of mice treated by three days with AMA or saline.	78

ABREVIATURAS

AMA	Amantadina
APO	Apomorfina
DA	Dopamina
DP	Doença de Parkinson
EC	Ensaio Cometa
EI	Esquiva inibitória
ENC	Eritrócitos normocromáticos
EPC	Eritrócitos policromáticos
L-DOPA	Levodopa
LTM	Memória de longa duração
MN	Micronúcleo
NMDA	N-metil-D-aspartato
SNC	Sistema Nervoso Central
STM	Memória de curta duração
TDA	Transportador dopaminérgico

RESUMO

Amantadina (AMA) é um fármaco com ampla utilização terapêutica. Seu mecanismo de ação ainda não está totalmente esclarecido, mas sabe-se que AMA atua promovendo o aumento da síntese e liberação de dopamina e como antagonista de receptores NMDA. Tendo em vista que há poucos estudos sobre a ação genotóxica da AMA, este trabalho pretendeu avaliar seus possíveis efeitos genotóxicos, utilizando o teste cometa e o teste de micronúcleos *in vivo*. Em adição, foram avaliados os efeitos da AMA sobre a memória e o comportamento estereotipado. As doses de AMA usadas neste estudo foram obtidas a partir da dose máxima tolerada (DMT 60 mg/kg) em camundongos machos CF-1. Os resultados indicaram que AMA 15 mg/kg não afetou a memória associativa (avaliada na tarefa de esquiva inibitória), nem a memória não-associativa (avaliada no teste de habituação ao campo aberto). Na dose 30 mg/kg, não afetou a locomoção ou exploração dos animais no campo aberto, porém, na sessão treino da esquiva inibitória, houve um aumento significativo na latência em relação ao grupo que recebeu salina, sem afetar a retenção das memórias de curta e longa duração (STM e LTM). Na dose mais alta (60 mg/kg), AMA prejudicou a locomoção e exploração no campo aberto, além de aumentar a latência na sessão treino na tarefa de esquiva inibitória, possivelmente devido a algum efeito neurotóxico. Assim, a performance dos animais na sessão teste, para avaliar a STM e a LTM pela esquiva inibitória, e habituação no campo aberto, foi afetada por efeitos neurocomportamentais induzidos por AMA 60 mg/kg, especialmente a diminuição da locomoção e exploração, na sessão treino. Após três dias de administração de AMA 15 mg/kg houve indução de comportamento estereotipado no último dia de observação, possivelmente devido à sensibilização de receptores dopaminérgicos. Contudo, AMA na dose de 60 mg/kg reduziu o comportamento estereotipado do primeiro ao terceiro dia, sugerindo melhora neste comportamento, indicando que esta droga pode estar atuando em múltiplos sistemas de neurotransmissão, ou ainda, provocando um possível aumento da recaptação de dopamina como demonstrado em estudos anteriores. Os resultados do teste cometa em sangue periférico indicaram que AMA causou danos ao DNA após a administração das doses 30 e 60 mg/kg, porém, 24h após a administração, os danos já haviam sido reparados. No fígado, somente houve aumento significativo do DI (índice de dano) e DF (frequência de dano) na

concentração 60 mg/kg comparados com o grupo salina. No tecido cerebral, AMA na dose de 30 e 60 mg/kg induziu danos ao DNA, indicando possível atividade neurotóxica. Porém, AMA não aumentou a frequência de micronúcleos em medula óssea e, portanto, não foi capaz de induzir mutações cromossômicas, após três dias de tratamento consecutivos. O conjunto dos resultados indica que AMA na menor dose testada não causou danos ao DNA e nem prejuízo na memória, locomoção, exploração e motivação, porém nas doses maiores induziu danos ao DNA, inclusive no tecido cerebral, bem como alterações neurocomportamentais, sugerindo efeitos neurotóxicos.

ABSTRACT

The amantadine (AMA) is a drug of broad clinical utility. Its mechanism of action is not yet fully clarified, but it is known that AMA promotes the increased synthesis and release of dopamine and acts as antagonist of NMDA receptor. There are few studies on the genotoxic effect of amantadine, so the aim of the present study was to investigate the possible genotoxic effects of amantadine using the comet assay and micronucleus assay *in vivo*. In addition, were assessed the effects of AMA on memory and stereotyped behavior. The doses of AMA used in this study were chosen from the maximum tolerated dose (MTD 60 mg/kg) in male mice CF-1. The present findings indicated that AMA 15 mg/kg did not affect the associative memory (inhibitory avoidance task) as well as nonassociative memory (habituation task). At the dose 30 mg/kg did not affect the locomotion or exploration of animals in the open field, but in the training session of inhibitory avoidance there was a significant increase in latency, when compared to saline group, however, without affecting the retention of short-term memory (STM) or long-term memory (LTM). At the highest dose (60 mg/kg), AMA impaired locomotion and exploration in the open field, besides increasing the latency in the training session in the inhibitory avoidance task, possibly due to some neurotoxic effect. Thus, the performance of animals in the test session, to assess the STM and LTM by inhibitory avoidance task, and habituation in an open field, was affected by neurobehavioral effects induced by AMA 60 mg/kg, especially the reduction of locomotion and exploration in training session. There was an induction of stereotyped behavior after the third injection of 15 mg/kg, possibly due to the sensitization of dopamine receptors. Conversely, AMA at dose 60 mg/kg reduced the stereotyped behavior of the first to third day, suggesting improvement in this behavior, indicating that this drug may be acting on multiple systems of neurotransmission, or causing a possible increase in recapture of dopamine as shown in previous studies. The results of the comet assay in peripheral blood test indicated that AMA caused DNA damage after administration of doses 30 and 60 mg/kg, but 24 hours after administration the DNA damage had been repaired. In the liver, there was only a significant increase in DI (index of damage) and DF (frequency of damage) at the dose 60 mg/kg compared to the saline group. In the brain tissue, AMA at dose 30 and 60 mg/kg induced DNA damage, indicating possible neurotoxic

activity. However, AMA did not increase the frequency of micronuclei in bone marrow and therefore was unable to induce chromosome mutations, after three consecutive days of treatment. These findings indicate that AMA at lowest dose tested did not induce DNA damage as well as it did not impair memory, locomotion, exploration and motivation in mice, but at higher doses induced DNA damage, including on the brain tissue and neurobehavioral impairment, suggesting neurotoxic effects.

I - INTRODUÇÃO

1. Amantadina

A amantadina (AMA - cloridrato de 1-adamantanamina, Figura 1) é um fármaco originalmente utilizado como agente antiviral, no tratamento e profilaxia da influenza A (DAVIES *et al.*, 1964; DOLIN *et al.*, 1982), mas que posteriormente começou a ser também utilizado em pacientes com doença de Parkinson (SCHWAB *et al.*, 1969; PINTER *et al.*, 1999), especialmente como adjuvante, a fim de diminuir os efeitos adversos ocasionados por outras drogas (BLANCHET *et al.*, 2003). A AMA é utilizada também no tratamento de doenças cerebrais, demência, esclerose múltipla, dor crônica e também está sendo associada a outros fármacos em pacientes com dependência química de cocaína, durante o processo de desintoxicação (GUALTIERI *et al.*, 1989; KEMP e GORA, 1993; FISHER *et al.*, 2000; FLEMING, 2001; MEYTHALER *et al.*, 2002).

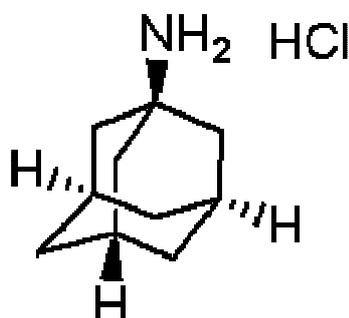


Figura 1: Estrutura química da amantadina

1.1 Características farmacocinéticas

AMA é prontamente absorvida no trato gastrointestinal, sendo que picos de concentração plasmática são obtidos após 4 horas e o equilíbrio ocorre entre 2 a 3 dias de administração (VERHAGEN *et al.*, 2002). AMA apresenta volume de distribuição muito grande sendo que os níveis salivares e da secreção nasal aproximam-se daquelas observadas

no soro. Nos tecidos de animais são encontradas concentrações maiores de AMA que aquelas encontradas no soro. O fármaco é excretado em grande parte na forma não-metabolizada, na urina por filtração glomerular e provavelmente secreção tubular, mas pequenas quantidades de metabólitos acetilados também podem ser detectadas na urina (DELEU *et al.*, 2002; GOODMAN e GILMAN, 2003; KORNHUBER *et al.*, 2006). Outras características farmacocinéticas e também físico-químicas do fármaco são descritas na tabela 1.

As concentrações plasmáticas de AMA (1,0 – 5,0 µg/ml) têm sido associadas a reações neurotóxicas graves, incluindo delírio, convulsões, coma e arritmias cardíacas (MARTINDALE, 1999, GOODMAN e GILMAN, 2003; GIRONELL *et al.*, 2006). As concentrações terapêuticas da AMA foram estudadas por KORNHUBER *et al.* (1995). Verificou-se no estudo que a concentração de AMA no cérebro é maior que no soro e no fluido cerebrospinal, provavelmente pela acumulação intralisossomal.

Tabela 1. Características farmacocinéticas da amantadina.

Fórmula molecular	$C_{10}H_{17}N \cdot HCl$
Peso molecular	187,71
Solubilidade	50 mg/ml (H ₂ O); Solúvel em etanol e clorofórmio.
Características	Pó branco e cristalino
Biodisponibilidade oral e excreção urinária	50 a 90%
Ligação a proteínas plasmáticas	67%
Volume de distribuição	4,4 ± 0,2 l/kg (pacientes com função renal normal) 5,1 ± 0,2 l/kg (pacientes com doença renal)
Tempo de Meia- vida	11 a 15 horas (pacientes com função renal normal - variação: 7 a 37 horas) 24 horas (pacientes com doença renal; 7 a 10 dias em pacientes com doença renal crônica)
Tempo para concentrações máximas	1 – 4 horas

Pico de concentração plasmática	Aproximadamente 0,3 µg/ml. No equilíbrio a concentração é de 0,2 a 0,9 µg/ml
Concentrações máximas	Média de 0,5 a 0,8 µg/ml, posologia de 100mg administrados 2 x dia

(AOKI e SITAR, 1988, GOODMAN e GILMAN, 2003).

1.2 Atividades farmacodinâmicas

Há vários estudos destacando o uso de AMA com levodopa (L-DOPA), a fim de melhorar a ação desta, diminuindo os efeitos adversos decorrentes de sua utilização (BRAVI *et al.*, 1994, FREDRIKSSON *et al.*, 2001).

A introdução da L-DOPA foi um marco importante no tratamento da doença de Parkinson. Porém, o uso crônico da L-DOPA ocasiona vários problemas ao paciente e limita a eficiência do tratamento (BRAVI, *et al.*, 1994). Foi sugerido que alterações no sistema dopaminérgico, produzidos pelo tratamento crônico com L-DOPA, são responsáveis, em parte, pelas respostas de flutuações e podem ser inibidas por antagonistas de receptores NMDA (N-metil-D-aspartato). De fato, BRAVI *et al.* (1994), usando ratos com lesão unilateral do sistema nigro-estriatal, mostraram que um antagonista de receptor NMDA, o MK-801, prolonga a duração da L-DOPA. Assim, foi sugerido o uso de AMA com L-DOPA, para diminuir as flutuações que ocorrem durante o tratamento, aumentando a ação da L-DOPA.

Para KUBICHA *et al.* (1998), o tratamento de ratos com lesão unilateral do sistema nigro-estriatal com AMA (50 mg/kg), que é um antagonista de receptor NMDA, aumentou a ação da L-DOPA (25 mg/kg), sugerindo que AMA pode ter efeitos benéficos sobre flutuações quando há tratamento crônico com L-DOPA.

Foi sugerido por FISHER *et al.* (2000) que a habilidade da AMA e memantina em potencializar as ações antiparkinsonianas da L-DOPA está baseada em facilitar a descarboxilação da L-DOPA no cérebro (Figura 2).

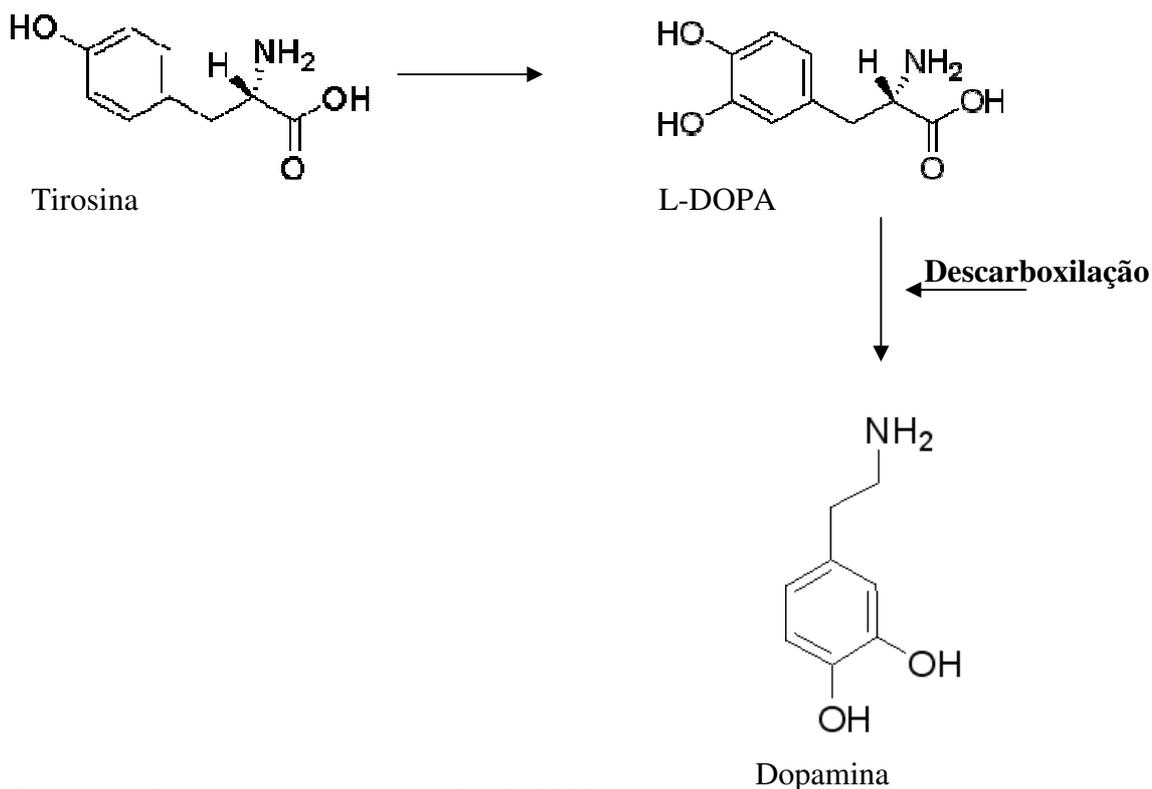


Figura 2. Síntese da dopamina (KOLB, 2002).

A AMA foi avaliada em pacientes esquizofrênicos, a fim de verificar se o seu uso poderia diminuir os efeitos colaterais extrapiramidais ocasionados por medicamentos neurolépticos. Após tratamento de seis semanas, os pacientes que utilizaram AMA tiveram uma melhora nos teste de aquisição de memória, em comparação com aqueles tratados com benzotropina (anticolinérgico) (MCEVOY *et al.*, 1987).

Com relação ao envolvimento de eventos imunológicos no processo de neurodegeneração, WANDINGER *et al.* (1999) investigaram a capacidade de produção de citocinas como interleucina-2, interferon- γ e interleucina-10, utilizando cultura de células de sangue de pacientes com doença de Parkinson. Antes do tratamento com AMA, a produção de interleucina-2 e interferon- γ estavam diminuídas em pacientes com doença de Parkinson, comparados com pacientes com depressão maior e pacientes normais (grupo controle). Após tratamento, a deficiência de secreção *in vitro* de interleucina-2 foi corrigida para concentrações normais em metade dos pacientes com uso de AMA, sendo o aumento de interleucina-2 relacionado com o aumento da secreção do interferon- γ . Foi sugerido que

anormalidades imunológicas ocorrem durante a evolução da doença de Parkinson e que o potencial terapêutico da AMA se deve também aos seus efeitos imunomodulatórios em alterar a função das células T em pacientes com a enfermidade.

KRAUS *et al.* (2005) avaliaram a atividade da AMA em doenças traumáticas cerebrais. A primeira hipótese sugerida foi a de que a AMA melhoraria a função e aumentaria a atividade do córtex-frontal. A concentração utilizada foi de 400 mg/dia, administradas em um grupo de pacientes e comparadas com o grupo placebo. Pelos resultados obtidos observou-se uma melhora na função cerebral e aumento significativo do metabolismo de glicose no córtex pré-frontal, avaliados por PET (tomografia por emissão de pósitrons).

NICKELS *et al.* (1994) também estudaram a atividade da AMA sobre lesões cerebrais e verificaram que os pacientes tratados com AMA tiveram melhora na função cognitiva e/ou física. Houve melhora na concentração, orientação, alerta, entre outros, sugerindo que AMA pode desempenhar um papel importante na recuperação da lesão cerebral generalizada. Efeitos colaterais foram observados em alguns pacientes, incluindo apreensão, alucinações e hipomania.

ROGÓZ *et al.* (2002) verificaram se o uso de antidepressivos e antagonistas de receptores NMDA produzem efeitos sinérgicos, através do teste de nado forçado em ratos. Os resultados indicaram que antagonistas de receptores NMDA, como AMA, memantina e neramexana, reduziram o tempo de imobilidade no teste de nado forçado, com eficácia comparável a antidepressivos tricíclicos. AMA aumentou de forma sinérgica o efeito do antidepressivo imipramina no teste de nado forçado em ratos. A administração de AMA, memantina ou neramexana associado com venlafaxina, diminuiu o tempo de imobilidade. Os efeitos sinérgicos não mudaram a atividade locomotora e a atividade exploratória no teste de campo aberto (“open-field”). Tais resultados sugerem que a co-administração de antidepressivos com antagonistas de receptores NMDA podem aumentar a atividade dos antidepressivos. Este achado é importante principalmente para pacientes que são resistentes a drogas, podendo obter efeitos antidepressivos com baixos efeitos colaterais, já que não seria necessário o aumento de doses para a obtenção do resultado desejado (ROGÓZ *et al.*, 2002).

ROGÓZ *et al.* (2007) também avaliaram a ação da AMA em pacientes com depressão e resistência a drogas. No estudo avaliou-se o uso de AMA e imipramina como antidepressivo.

Observou-se no estudo que os dois fármacos podem ser efetivos no tratamento da depressão unipolar. Este achado também foi verificado por DZIEDZICKA-WASYLEWSKA *et al.* (2004), acrescentando que imipramina e AMA induziram a auto-regulação de receptores de dopamina D2 e D3 no cérebro de ratos, sugerindo possível benefício para o tratamento de pacientes resistentes a drogas com depressão unipolar.

O efeito da AMA na excitabilidade do córtex motor em humanos foi avaliado por REIS *et al.* (2006), utilizando a estimulação magnética transcraniana. Foram administrados nos pacientes 50 ou 100 mg em dose única ou em duas vezes. Observou-se que baixa dose de AMA é suficiente para promover a modulação da excitabilidade do córtex motor. Há modulação glutamatérgica ou uma interação poli-sináptica de circuitos glutamatérgicos e gabaérgicos. Embora AMA tenha vários mecanismos de ação, o antagonismo dos receptores NMDA parece ser o mais relevante efeito na excitabilidade cortical.

Estudos *in vivo* têm mostrado efeitos neurotóxicos induzidos por antagonistas competitivos e não competitivos de receptores NMDA, incluindo MK-801, fenciclidina, entre outros (McCULLOCH e IVERSEN, 1991, OLNEY *et al.*, 1991). Os efeitos citotóxicos são caracterizados pela formação de múltiplos vacúolos citoplasmáticos de tamanhos heterogêneos. Estas mudanças podem ocasionar danos funcionais e processo de necrose. Os mecanismos moleculares do potencial neurotóxico dos antagonistas de receptores NMDA necessitam ser elucidados. Baixas doses de NMDA, antagonista do receptor de glutamato, induzem alterações morfológicas em neurônios cerebrais. Altas doses podem provocar a morte das células neuronais. As possíveis alterações morfológicas como necrose em cérebro humano *posmortem*, foi pesquisada através de exames histopatológicos em regiões cerebrais. Não foram observadas alterações no cérebro de pacientes que usavam AMA em comparação com o grupo controle (não-tratado) (KORNHUBER *et al.*, 1999).

1.3. Mecanismos de ação da amantadina

Com relação à ação anti-viral, AMA age contra a replicação dos vírus da influenza A em baixas concentrações, inibindo uma etapa inicial da replicação viral, provavelmente o desnudamento do vírus; para algumas cepas, exerce um efeito sobre uma etapa posterior à

montagem viral, provavelmente mediada por uma alteração no processamento da hemaglutinina (ROIN e WINTERS, 1990; HAY, 1992; GOODMAN e GILMAN, 2003; INZELBERG *et al.*, 2006).

Na doença de Parkinson, AMA é utilizada geralmente como terapia inicial. Além disso, pode ser útil como adjuvante em pacientes em uso de L-DOPA devido às flutuações relacionadas com a dose (KORNHUBER *et al.*, 1995; MARTINDALE, 1999; SNOW *et al.*, 2000; PACI *et al.*, 2001; MORESCO *et al.*, 2002; OWEN e WHITTON, 2006). Porém o mecanismo de ação que envolve a atividade antiparkinsoniana não está bem esclarecido. Foi sugerido que o fármaco pode atuar no sistema dopaminérgico promovendo a liberação ou a recaptação da dopamina. As propriedades anticolinérgicas também podem contribuir para suas ações terapêuticas (BROWN e REDFERN, 1976; TOIDE, 1990; MIZOGUCHI *et al.*, 1994; PEETERS *et al.*, 2002; GOODMAN e GILMAN, 2003; REIS *et al.*, 2006).

1.3.1. Ação dopaminérgica

A dopamina é um neurotransmissor, precursor natural da adrenalina e da noradrenalina. Tem como função a atividade estimulante do SNC. A dopamina está associada a doença de Parkinson e à Esquizofrenia. Em termos patológicos, a doença de Parkinson é definida como um distúrbio neurodegenerativo (HIRSCH *et al.*, 1988), caracterizado por uma despigmentação da substância negra e pela presença de corpos de Lewy. Ocorre uma diminuição das concentrações de dopamina no núcleo caudado, no putâmen e no globo pálido, estruturas estas que formam o sistema dopaminérgico (Figura 3) (DELEU *et al.*, 2002; GOODMAN e GILMAN, 2003; CARROLL *et al.*, 2006).

TOIDE (1990) investigou o efeito da AMA sobre os neurônios dopaminérgicos em cérebro de ratos. AMA mostrou diferentes efeitos em relação à concentração de dopamina (DA), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA) em diferentes regiões do cérebro. Na concentração de 40 mg/kg, AMA aumentou os níveis de dopamina em 16% e DOPAC em 24 % no córtex frontal. Também aumentou em 44% os níveis de HVA no córtex frontal, que está associado com a memória. Mas no córtex frontal diminuiu 30% a atividade da tirosina hidroxilase. Estas mudanças foram diferentes quando comparadas ao do

corpo estriado e núcleo caudado. No estriado, AMA nas concentrações de 10, 20 e 40 mg/kg, aumentou os níveis de DA e diminuiu em 30% o acúmulo de L-DOPA no córtex frontal, sugerindo um mecanismo de *feedback* negativo de auto-regulação da dopamina. Estes resultados indicam então que AMA pode acelerar a neurotransmissão dopaminérgica por aumento da dopamina livre no córtex frontal possibilitando melhora na demência.

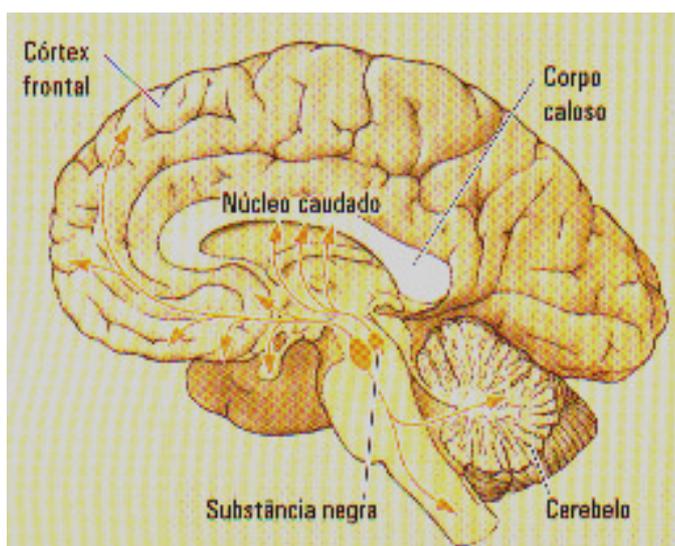


Figura 3. O sistema dopaminérgico (KOLB, 2002).

Para PEETERS *et al.* (2002), os mecanismos bioquímicos envolvidos no efeito de AMA e nas conseqüências de sua administração repetitiva na modulação da transmissão estriatal da dopamina necessitam ainda serem esclarecidos. Após 4 dias de tratamento com AMA, foi observado aumento de 40% de dopamina comparando-se aos animais tratados com veículo. A administração de AMA não afetou diretamente o comportamento dos animais. Porém, os animais tratados por 4 dias com AMA apresentaram atividade locomotora exacerbada e estereotipismo reduzido, após administração de uma dose de apomorfina. Adicionalmente, o estudo indicou que administração repetitiva de AMA induz uma modificação transitória da função dos receptores de dopamina no estriado, que é correlacionada com alterações de reposta comportamental pela estimulação de dopamina. Como os efeitos da administração da AMA diferiram daqueles observados com agonistas de receptor de dopamina ou outros antagonistas de receptores de NMDA, sugeriu-se que

múltiplos mecanismos bioquímicos contribuem para a modulação da transmissão de dopamina pela AMA.

O transportador dopaminérgico (TDA) modula a concentração sináptica de dopamina nos terminais pré-sinápticos dos neurônios dopaminérgicos através do mecanismo elétrico acoplado ao Na^+ e Cl^- (BOULTON e EISENHOFER, 1998). Na DP, há redução na densidade de TDA no neocórtex devido à perda dos terminais dopaminérgicos (STORCH *et al.*, 2004, SHIH *et al.*, 2006).

A atividade da AMA no TDA é controversa. Estudos *in vitro* mostram que AMA pode inibir a recaptação de dopamina, mas outros pesquisadores relatam que altas concentrações de AMA podem diminuir esta atividade (BALDESSARINI *et al.*, 1972, HERBIN, 1972; BROWN e REDFERN, 1976, GIANUTSOS *et al.*, 1985). Nas doses clínicas, é aparentemente pouco provável que a estimulação central causada por AMA possa inibir a atividade do TDA (PAGE *et al.*, 2000).

O efeito do tratamento de curta e longa duração com AMA foi investigado por PAGE *et al.* (2000) na atividade sobre TDA no córtex de rato. A dopamina foi medida nas sinapses córtex após tratamento com AMA (40mg/kg) por 2, 7 e 14 dias. Após 7 dias de tratamento, AMA aumentou a aparente velocidade máxima do TDA em 30% sem modificar a afinidade aparente, enquanto que não houve mudanças no tratamento com 2 e 14 dias. O estudo demonstrou que o tratamento com AMA em longo prazo aumenta a atividade do TDA, provavelmente um mecanismo compensatório para aumentar a dopamina livre na fenda sináptica.

Outro mecanismo pelo qual se pode aumentar a concentração extracelular de dopamina é o bloqueio neuronal do transportador de dopamina (TDA). A atividade do TDA é regulada por fosforilação e pode-se propor que receptores iônicos de glutamato presentes no terminal pré-sináptico diretamente modulam esta fosforilação. Também, indiretamente os receptores de dopamina pré-sinápticos controlam a atividade do TDA em resposta ao aumento de concentração de dopamina na fenda sináptica. A existência do controle glutamatérgico em neurônios dopaminérgicos no córtex é bem documentada (CEPEDA e LIVINE, 1998) e, portanto, pode-se propor o controle direto da fosforilação de TDA por receptores de

glutamato. Por causa do antagonismo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, AMA pode interferir com glutamato endógeno mediante fosforilação de TDA.

Alternativamente, o aumento de dopamina não recapturada após tratamento com AMA constitui um mecanismo compensatório para preservar a concentração da dopamina sináptica fisiológica. Esta hipótese foi sugerida por GORDON *et al.*, (1996) que demonstrou que o tratamento com AMA por 21 dias aumenta a expressão do TDA em membranas estriatais dos ratos. Sabe-se que auto-receptores de dopamina fornecem um importante mecanismo de *feedback* inibitório por neurônios de dopamina em resposta a mudanças de níveis extracelulares de dopamina. Sugere-se que aumento de dopamina não recapturada, observada após tratamento com AMA, resulta pela indireta modulação da atividade de TDA por receptor de dopamina D2 em resposta o aumento de dopamina livre.

1.3.2. Ação sobre receptores NMDA

O glutamato é o maior transmissor excitatório no SNC, muito importante no controle da atividade locomotora. Muitos estudos têm demonstrado interações entre sistemas glutamatérgicos e dopaminérgicos no cérebro (PEETERS *et al.*, 2002). Os receptores glutamatérgicos são divididos em dois grupos: ionotrópicos e metabotrópicos (GASIC e HOLMANN, 1994). Os receptores NMDA (Figura 4) existem normalmente em várias regiões do cérebro, incluindo os gânglios de base, e respondem a determinados neurotransmissores excitatórios como o glutamato. Em determinadas situações, essa transmissão excitatória torna-se exagerada, podendo levar a dano celular em um processo denominado excitotoxicidade (DANYSZ *et al.*, 2000).

AMA atua como antagonista não-competitivo de receptores excitatórios N-metil-D-aspartato (NMDA), um dos tipos de receptor para glutamato (KORNHUBER *et al.*, 1991, LUPP *et al.*, 1992; BLANPIED *et al.*, 1997). Portanto, AMA poderia atuar reduzindo a hiperatividade de projeção glutamatérgica do núcleo subtalâmico sobre o segmento interno do globo pálido, aspecto crucial na fisiopatologia da DP. O bloqueio dos receptores NMDA é capaz de facilitar a transmissão de dopamina no estriado (FERRAZ, 1999).

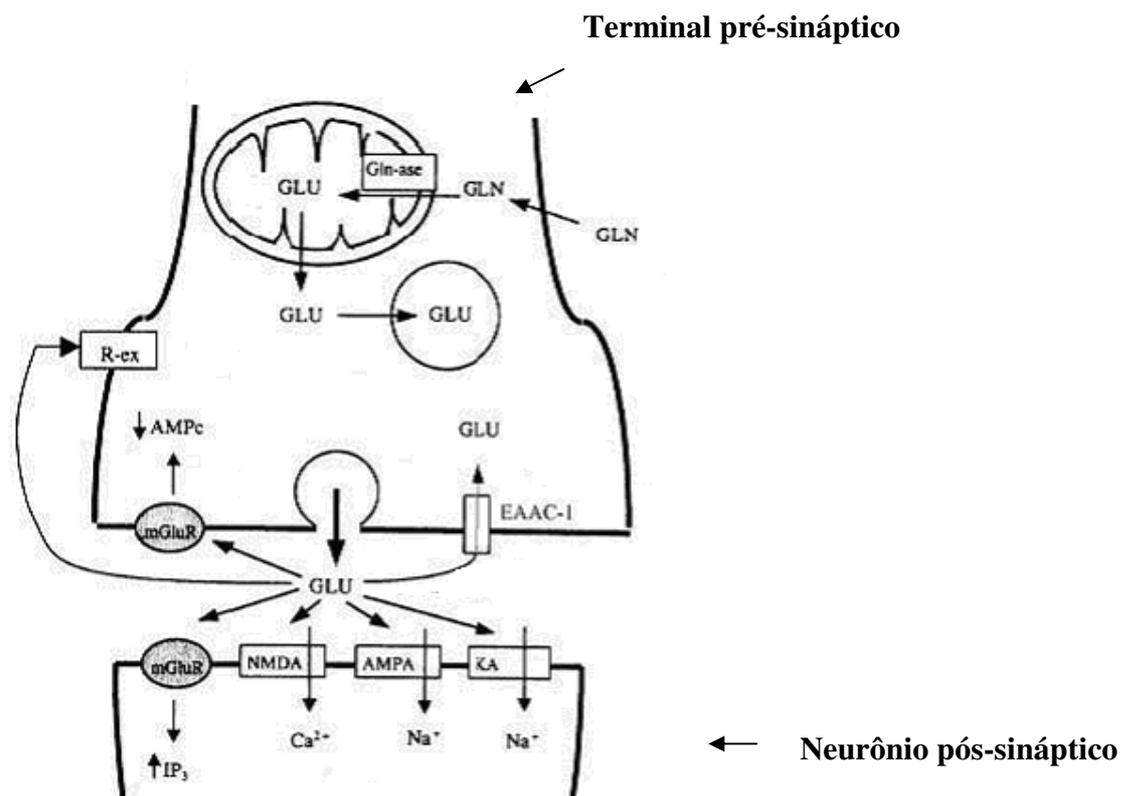


Figura 4. Sinapse glutamatérgica, adaptado de SEGOVIA *et al.* (2001). Existem três principais subtipos de receptores de glutamato, cada um dos quais liga glutamato e é ativado seletivamente por agonistas diferentes (BEAR *et al.*, 2002).

Antagonistas de NMDA e derivados da AMA têm mostrado proteger os neurônios dopaminérgicos e prevenir perda neuronal em modelos experimentais de excitotoxicidade (BORMANN, 1989, GREENAMYRE e O'BRIEN, 1991). Estudos indicam que antagonistas de NMDA podem modular o sistema dopaminérgico através da modificação de receptores D2 observados em animais tratados com antagonistas de receptores NMDA, incluindo AMA e MK-801 (MICHELETTI *et al.*, 1993; LANNES e MICHELETTI, 1997; MORESCO *et al.*, 2002).

É variada a afinidade dos antagonistas de receptores NMDA pelo receptor. Bloqueadores de alta afinidade como fenciclidinas (PCP), dizocilpina (MK-801), piperidina

(TCP) e metazocina (SKF), têm melhor eficácia terapêutica, porém os efeitos adversos estão presentes nas doses terapêuticas (DOUGLASS e WITKIN, 1999).

Alguns estudos em humanos mostraram que os efeitos adversos produzidos pela administração de bloqueadores de alta afinidade dos receptores NMDA foram: efeitos psicomiméticos, efeitos semelhantes à esquizofrenia, incluindo alucinação, paranóia, emoção retraída e retardo motor, observados após administração de fenciclidinas. Assim, propõe-se que o uso de antagonistas de NMDA de baixa afinidade, podem ter melhor efeito terapêutico do que aqueles de alta afinidade. Baseado na sua rápida cinética no canal iônico, antagonistas de baixa afinidade podem impedir menos a transmissão fisiológica excitatória de aminoácidos do que antagonistas de alta afinidade, contudo, com menos efeitos adversos nas doses terapêuticas (ROGAWSKI, 1993; CHEN *et al.*, 1996, DOUGLASS e WITKIN, 1999).

AMA e memantina apresentam um baixo risco de induzir sintomas psicotomiméticos e efeitos neurotóxicos comparados com antagonistas de receptores de NMDA de alta afinidade (KORNHUBER *et al.*, 1994; KORNHUBER *et al.*, 1995; KORNHUBER e QUACK, 1995).

Em relação à atividade neuroprotetora, é proposto o benefício do antagonismo dos receptores NMDA em pacientes parkinsonianos, quando há um desequilíbrio dopamina/glutamato. Estas drogas aumentam a síntese e a liberação de dopamina (PEETERS *et al.*, 2002). Em estudos pré-clínicos, antagonistas de NMDA tem demonstrado ser eficaz como ansiolíticos, antidepressivos, antiepilépticos, anti-isquêmicos e moduladores de aprendizado e memória (ROGAWSKI, 1993; PARSONS *et al.*, 1998).

2. Avaliação de atividades neurocomportamentais

2.1. Memória

A memória é um processo dinâmico que pode ser dividido em três etapas principais: (1) aquisição da informação, (2) consolidação e armazenamento, que é o processo de filtração e fixação progressiva da informação inicialmente adquirida, (3) evocação, que é o processo de resgate ou expressão dos eventos consolidados (IZQUIERDO, 1989; IZQUIERDO e MEDINA, 1997; IZQUIERDO *et al.*, 1998a; CAHILL *et al.*, 2001).

A conseqüência dos três processos envolvidos na memória seria a aprendizagem (aquisição de novas memórias) e formação de um novo comportamento, ou modificação de um pré-existente. Os indivíduos apresentam capacidade de adaptação e modificação de seu comportamento quando expostos às novas experiências e a capacidade de aprender e recordar eventos depende de modificações induzidas no sistema nervoso pela percepção desses eventos (IZQUIERDO, 1989; THOMPSON e KIM, 1996; MARKOWITSCH, 1997; IZQUIERDO *et al.*, 1998b).

A memória pode ser classificada de acordo com o tempo de armazenagem: (1) memória de curta duração (STM- *Short-term memory*) e, (2) memória de longa duração (LTM- *Long-term memory*). As STM são aquelas retidas dentro de alguns segundos até algumas horas após o aprendizado e as LTM são aquelas cuja consolidação é mais demorada e persiste por dias, anos ou mesmo uma vida inteira (IZQUIERDO *et al.*, 1999; IZQUIERDO e MCGAUGH, 2000; PICADA *et al.*, 2003b).

Acredita-se que o substrato neural das memórias, tanto de curta quanto de longa duração, resida em alterações nas conexões sinápticas entre neurônios de regiões cerebrais específicas e a natureza de tais modificações induzidas pela aquisição de novas memórias tem atraído muita atenção nas últimas décadas (IZQUIERDO e MEDINA, 1997; ROESLER *et al.*, 2000). Estudos dos mecanismos neurais das LTM demonstram que sua formação é um processo gradual que envolve substratos neuroanatômicos, celulares e moleculares específicos.

As memórias de longa duração não ficam estabelecidas em sua forma estável ou permanente imediatamente depois de sua aquisição. O processo que leva à sua fixação definitiva da maneira em que mais tarde poderão ser evocadas nos dias ou anos seguintes denomina-se consolidação. O período que ocorre a consolidação das memórias de longa duração é, portanto, lábil e suscetível a numerosas influências, muitas das quais podem ser negativas (IZQUIERDO, 2002).

As memórias de longa duração podem ser divididas em associativas e não associativas, dependendo do mecanismo requerido para a sua formação. As memórias associativas são baseadas na aquisição prévia de uma associação entre um evento específico e um estímulo. A tarefa de esquiva inibitória é um exemplo de aprendizado associativo (IZQUIERDO e MEDINA, 1997). Já as memórias não associativas (habituação) são adquiridas quando a

exposição repetida ou contínua a um novo estímulo modifica o comportamento inicial (VIANNA *et al.*, 2000).

A memória de curta duração é bastante resistente a muitos dos agentes que afetam os mecanismos da consolidação da memória de longa duração (IZQUIERDO, 2002).

Estudos em modelos animais têm mostrado que a formação da memória envolve uma série de alterações bioquímicas em várias áreas do SNC, entre as quais destaca-se o hipocampo. Os eventos bioquímicos envolvidos na formação da memória incluem, inicialmente, a ativação de receptores glutamatérgicos dos tipos NMDA e metabotrópico (mGluRs), e a ativação de cascatas bioquímicas nos neurônios. Entre as proteínas cerebrais envolvidas nessas cascatas, destacam-se a proteína quinase A (PKA), a proteína quinase C (PKC), a proteína quinase dependente de GMPc (PKG) e a cálcio-calmodulina quinase II (CaMKII), (IZQUIERDO E MEDINA, 1997).

No estudo proposto por TAHAR *et al.* (2004) foi investigada a contribuição da neurotransmissão glutamatérgica na capacidade da aquisição de aprendizado, adaptação-motora em humanos, sendo que um grupo recebeu AMA (200mg/dia) e outro placebo. Observou-se que o grupo de indivíduos que utilizaram AMA teve um nível menor de adaptação motora, comparado com o grupo controle, mas a diferença não foi significativa. Por fim, o estudo indica que a função normal dos receptores NMDA é necessária para a aquisição da adaptação motora.

As habilidades motoras, uma vez aprendidas, precisam de um tempo para ser consolidadas e tornarem-se resistentes a interferências. Evidências clínicas e comportamentais sugerem que receptores NMDA são requeridos para a aquisição do aprendizado motor e comportamental. Contudo, o envolvimento de receptores NMDA na consolidação motora, importante para a estabilização da forma recente de memória motora, ainda não está bem definida em humanos. TAHAR *et al.* (2005) estudaram o efeito da AMA na consolidação da memória motora em humanos. Foram testados dois grupos de indivíduos, sendo um grupo tratado com 200 mg/dia de AMA e outro grupo placebo. Observou-se que AMA não prejudicou a consolidação do aprendizado motor nos indivíduos que já tinham aprendido. Assim, embora requerido em alguns estágios (por exemplo: aquisição) de processos de

memória motora, os resultados sugeriram que a ativação do receptor NMDA não pode ser essencial para a consolidação da adaptação motora em humanos.

2.1.1. Tarefa de esquiva inibitória

A tarefa de esquiva inibitória (EI) envolve a formação de uma memória declarativa na qual o animal aprende a inibir uma resposta (descer de uma plataforma, entrar em outro compartimento) para não receber um estímulo de aversão (um choque elétrico, por exemplo). Esta memória corresponde àquela que é observada em humanos, quando evitam colocar os dedos na tomada ou entrar em uma rua perigosa. A esquiva inibitória é uma memória episódica (lembra-se do episódio que gerou a aprendizagem: por exemplo, o dia em que os dedos foram colocados na tomada) e também semântica (aprende-se a evitar todas ou, pelo menos, a maioria das circunstâncias perigosas: um conhecimento episódico adquire valor semântico) (IZQUIERDO, 1989).

Na EI o animal aprende a relacionar a descida de uma plataforma com um leve choque aplicado nas patas (IZQUIERDO, 1989; ROESLER *et al.*, 1998, 2000). Com isso, numa segunda exposição à caixa de esquiva inibitória ele evita um comportamento inato de descer da plataforma para explorar a caixa. O aprendizado da EI envolve vários estímulos, incluindo percepção espacial e visual, sensibilidade à dor, acompanhados de um componente emocional amplamente modulado pela amígdala e por hormônios relacionados ao estresse. A EI é uma tarefa ideal para estudar processos de memórias iniciados durante e após o treino, pois em geral, (1) pode ser aprendida com uma única sessão de treino; (2) não é um aprendizado inato; (3) a farmacologia envolvida na sua modulação é bastante conhecida (PICADA *et al.*, 2002, 2003b).

O método principal de estudo consiste em administrar uma substância minutos antes ou logo após a sessão treino. O animal é colocado sobre uma plataforma e o tempo de permanência (latência) é contado até que ele desça com todas as 4 patas a uma grade onde ele recebe um choque. Nas sessões de teste, o animal é recolocado na plataforma, porém não recebe choque, sendo que o tempo de latência em que o animal permanece na plataforma é cronometrado e usado como medida de retenção. A primeira sessão teste ocorre 1,5h após o

treino, a fim de medir a STM, e a segunda 24 h após o treino, para medir a LTM. A retenção (memória) de curta e de longa duração da tarefa de EI pode ser prejudicada ou melhorada pela substância administrada; os efeitos observados nos dois tipos de memória são independentes, portanto, uma substância pode bloquear uma das memórias sem afetar a outra ou ainda apresentar efeitos de melhora numa e de prejuízo na outra (IZQUIERDO *et al.*, 1999; IZQUIERDO e MCGAUGH, 2000, PEREIRA *et al.*, 2001).

2.1.2. Campo aberto

Na exploração ao campo aberto, os animais são colocados em um campo aberto, um compartimento que é semelhante a uma caixa de madeira (50 X 50 X 30 cm), com uma parede de vidro frontal, e o piso marrom dividido com linhas pretas em 12 quadrados iguais. O animal é observado durante 5 minutos nos quais ele pode explorar livremente a caixa. São contados o número de cruzamentos das linhas pretas (“crossings”), o número de vezes em que o animal levanta as duas patas dianteiras (“rearings”), o tempo de latência para o início da locomoção e o número de bolos fecais, durante 5 minutos, e estas contagens são utilizadas como medida de locomoção, exploração, motivação e ansiedade, respectivamente (ROESLER *et al.*, 1998, 2000; PEREIRA *et al.*, 2005; MACHADO *et al.*, 2006).

A reação de orientação compreende um certo grau de alerta e o direcionamento da cabeça, dos olhos ou (se for um cachorro, por exemplo) do nariz e das orelhas em direção à fonte do estímulo. Se o estímulo for um ambiente novo, o animal reage com respostas exploratórias e de orientação geral. A repetição do estímulo leva à supressão gradual da reação de orientação; isto é chamado habituação. É a forma mais simples de aprendizado e deixa memória; esta se revela justamente pela diminuição gradual da resposta com a repetição do estímulo (IZQUIERDO, 2002).

A habituação a um novo ambiente é uma das mais elementares tarefas de aprendizagem não associativa e não aversiva (ROESLER *et al.*, 1998, 2000), ou seja, resulta da simples repetição de um estímulo, sem associá-lo com nenhum outro.

A habituação no campo aberto é medida pela diminuição da atitude exploratória que está associada ao número de “crossings” e “rearings” numa sessão teste realizada 24 horas após a primeira exposição ao campo aberto (sessão treino) (VIANNA *et al.*, 2000).

2.2. Comportamento estereotipado

O comportamento estereotipado é descrito como um comportamento no qual um indivíduo exhibe atividade motora repetitiva, rítmica e invariável, e sem uma finalidade ou propósito real. Geralmente as informações sobre a base neurobiológica do comportamento estereotipado são obtidas pelo estudo em modelos animais do comportamento induzido por fármacos ou associado a um determinado ambiente (POWELL *et al.*, 1999; PRESTI *et al.*, 2002).

Este comportamento pode ser induzido em diversas espécies de mamíferos pela administração de agonistas dopaminérgicos, como apomorfina (APO), e fármacos que indiretamente afetam a transmissão dopaminérgica, como anfetaminas (PICADA *et al.*, 2003b; DEUTSCHLANDER, 2006).

Uma injeção direta de dopamina ou de agonista dopaminérgico no estriado induz comportamento estereotipado em ratos. Este comportamento pode ser inibido por antagonistas dopaminérgicos, como haloperidol, ou pela inibição da síntese de dopamina, usando a α -metil-p-tirosina, ou ainda pela destruição de neurônios que contêm dopamina com a neurotoxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) (POWELL *et al.*, 1999; PRESTI *et al.*, 2002).

A apomorfina, sendo um agonista dopaminérgico, é freqüentemente utilizada em estudos do comportamento associados ao sistema dopaminérgico. O comportamento estereotipado induzido por APO já está bem estabelecido. Dois dos diferentes comportamentos estereotipados induzidos por APO descritos em ratos, um caracterizado pela ação repetitiva do animal de farejar e o outro de lambe e/ou roer, estão sendo atribuídos ao polimorfismo dos receptores e transportadores dopaminérgicos, além de fatores ambientais (DAVIES *et al.*, 1974; DALLEY *et al.*, 2002; GERMEJER *et al.*, 2002).

A sensibilização do comportamento estereotipado ocorre quando há uma intensificação deste comportamento devido à administração de uma dose alta ou de doses repetidas de uma

droga psico-estimulante. Este aumento da resposta parece estar relacionado a alterações na via dopaminérgica, possivelmente associadas à ativação do receptor glutamatérgico NMDA, no desenvolvimento da sensibilização. Antagonistas do receptor NMDA parecem modular indiretamente a transmissão dopaminérgica e bloquear a expressão de sensibilização dependente de contexto (ambiente) induzida por APO e anfetaminas (BATTISTI *et al.*, 2000; PEETERS *et al.*, 2002). Contudo não está clara a importância da ativação dos receptores NMDA na expressão de aumento de respostas de sensibilização nos animais (BATTISTI *et al.*, 2000). Em vários estudos avaliando atividade locomotora ou respostas de estereotipismo, antagonistas de receptores NMDA não bloquearam a expressão de sensibilização de anfetamina e cocaína (KARLER *et al.*, 1990; WOLF *et al.*, 1998).

Em humanos, o comportamento estereotipado ocorre em distúrbios neurológicos e psiquiátricos como na esquizofrenia e na compulsão-obsessiva, na doença de Parkinson, no autismo, entre outras, e está tipicamente associado com um aumento na atividade dopaminérgica (PEETERS *et al.*, 2002).

Algumas linhas indicam que o comportamento estereotipado é expresso como consequência do aumento da atividade neuronal gânglio cortico-basal, circuito *feedback* cortical. Estudos mostram que a manipulação farmacológica do estriado, pode induzir exacerbação ou atenuação do comportamento estereotipado (BEDINGFIELD *et al.*, 1997, PRESTI *et al.*, 2003, 2004). Têm-se focado primeiramente o sistema de glutamato e dopamina na mediação do estereotipismo, e tem-se demonstrado que ambos agonistas de receptores de glutamato (ionotrópicos ou metabotrópicos) e de agonistas dos receptores de dopamina (D1/D2 ou D1-seletivo) induzem ou exacerbam a expressão do comportamento estereotipado (CANALES e GRAYBIEL, 2000).

Efeitos comportamentais da AMA, especialmente comportamentos anormais em camundongos e ratos, foram avaliados e comparados com aqueles produzidos por antidepressivos tricíclicos, metanfetamina e L-DOPA (FUJIWARA *et al.*, 1985). AMA (50mg/kg) tende a diminuir a locomoção e “rearings” (ação de levantar as patas dianteiras) de ratos e camundongos. Nesta concentração há piloereção e hiperirritabilidade, e na dose de 80mg/kg há prejuízo na atividade de coordenação motora em ratos. AMA inibe a

metanfetamina, indutora de hiperatividade, mas o efeito da apomorfina (indutora de comportamento estereotipado) não foi afetado em ratos.

No estudo realizado por STARR e STARR (1995), AMA nas concentrações de 5 a 40 mg/kg produziu uma moderada sedação nos animais, com redução na locomoção e outras espécies do comportamento nato (ex.: cheirar), porém com poucos sinais de hiperatividade, estereotipismo, ataxia ou perda do tônus muscular.

O comportamento estereotipado pode ser estudado em modelos que utilizam camundongos, no qual é definido por movimentos rápidos e repetitivos da cabeça e/ou membros dianteiros, dentro do período de um minuto de observação. Geralmente, o animal é colocado numa caixa, após administração de uma substância, e observado durante 1 minuto, com intervalos de 10 minutos entre cada observação por 1 hora. O número de animais por caixa pode ser escolhido para otimizar o padrão específico do comportamento identificado como estereotipado (BATTISTI *et al.*, 2000, PICADA *et al.*, 2002).

3. Avaliação da atividade genotóxica

Os testes regulatórios de genética toxicológica se constituem em uma série de testes de mutageneidade, bem definidos, selecionados para detectar agentes químicos e físicos capazes de induzir mutações. Uma mutação é definida como uma mudança na seqüência do DNA, que leva a uma alteração herdável da função gênica. Uma vez que as mutações são freqüentemente associadas com o desenvolvimento de câncer e defeitos ao nascimento, informações sobre o potencial mutagênico de um agente químico industrializado ou naturalmente presente no ambiente são essenciais para as agências regulatórias, no que se refere ao estabelecimento de risco para o homem. Os testes de mutageneidade mais utilizados são aqueles que detectam mutações em células germinativas ou somáticas, por exemplo, mutação gênica, associada às alterações na seqüência de nucleotídeos do DNA, ou ao nível cromossômico, como aberrações e micronúcleos (WATERS *et al.*, 1999; MACGREGOR *et al.*, 2000; DEARFIELD *et al.*, 2002; MEDINA, 2006).

Uma vez lesado seu DNA, as células respondem utilizando diferentes estratégias de ação, tais como morte por necrose ou apoptose, modulação da expressão gênica controlando o

ciclo celular, e reparação do material genético por via livre ou sujeita a erro, sendo a segunda responsável pela fixação das mutações. Normalmente é a combinação destes fatores que compõem a resposta a danos genéticos. Os ensaios em células de mamíferos são frequentemente citados como sendo os mais relevantes para a análise do potencial genotóxico de agentes químicos e físicos (TICE *et al.*, 1994; MULLER e SOFUNI, 2000). Os organismos preferidos para a análise *in vivo* da atividade genotóxica são os roedores (TICE *et al.*, 2000).

3.1 Teste Cometa

O teste cometa (ou SCGE – *single cell gel electrophoresis*) é uma técnica rápida e sensível para mensurar e analisar lesões e detectar efeitos de reparo no DNA de células expostas a agentes genotóxicos (FAIRBAIRN *et al.*, 1995; LIU *et al.*, 2001; SMITH *et al.*, 2008); não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo teste cometa são passíveis de correção. Assim sendo, o teste pode ser também utilizado para estudos de reparo do DNA, trazendo informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada, embora não possibilite inferir no processo de reparo (RIBEIRO *et al.*, 2003).

O teste cometa apresenta algumas vantagens sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, como: (a) versatilidade em relação ao tipo de célula a ser analisada, sendo que o método já foi adaptado a qualquer tipo de célula, além de ser aplicado a diversos organismos; (b) necessidade de somente um pequeno número de células; (c) não ser necessário células em divisão (COLLINS *et al.*, 1997; TICE *et al.*, 2000; SEKIHASHI *et al.*, 2002; VALVERDE *et al.*, 2002).

Os danos que são mais facilmente mensurados pelo teste são quebras no DNA (simples e duplas), danos álcali-lábeis, ligações cruzadas e quebras resultantes de reparo por excisões não concluídas (SINGH *et al.*, 1988; FAIRBAIRN *et al.*, 1995; HARTMANN e SPEIT, 1997; TICE *et al.*, 2000). Em testes utilizando animais, é possível avaliar o potencial genotóxico de uma substância em células de órgãos e/ou tecidos alvos específicos (SASAKI *et al.*, 1998, 1999, 2002), como por exemplo, a atividade genotóxica de uma neurotoxina no cérebro

(MORRIS *et al.*, 1999; SHEN *et al.*, 2001; MARTIN e LIU, 2002; HARTMANN *et al.*, 2003).

Existem basicamente dois tipos de protocolos para este teste: (a) versão neutra, que detecta quebra dupla no DNA; e (b) versão alcalina, que detecta quebras simples e duplas de cadeia, diretas ou induzidas por lesões nas bases do DNA (como oxidação, metilação, etc), cujo procedimento transforma essas anomalias em lesões álcali-lábeis (FAIRBAIRN *et al.*, 1995). Esta técnica tem sido modificada também para detectar adutos no DNA (dímeros de timina, danos oxidativos), usando anticorpos específicos (SAUVAIGO *et al.*, 1998) ou enzimas de reparo do DNA (COLLINS *et al.*, 1995; SPEIT e HARTMANN, 1999).

A técnica consiste em submeter às células, embebidas em gel de agarose sobre uma lâmina, a uma eletroforese que faz migrar pela corrente elétrica os segmentos de DNA livres, resultantes de quebras, para fora do núcleo. Após a eletroforese, as células que apresentam um núcleo redondo são identificadas como normais, sem dano reconhecível ao DNA. As células lesadas são identificadas visualmente por uma espécie de cauda, como de um cometa, formada pelos fragmentos de DNA (Figura 5). Estes fragmentos podem se apresentar em diferentes tamanhos e ainda estar associados ao núcleo por uma cadeia simples (FAIRBAIRN *et al.*, 1995).

A identificação do dano pode ser feita por diferentes maneiras, uma forma é medir o comprimento do DNA migrante com a ajuda de uma ocular micrométrica, outra é classificar visualmente as células com dano em diferentes classes (0-4), podendo obter um valor arbitrário, que expresse o dano geral que uma população de células sofreu (COLLINS *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 2000; BOEIRA *et al.*, 2001).

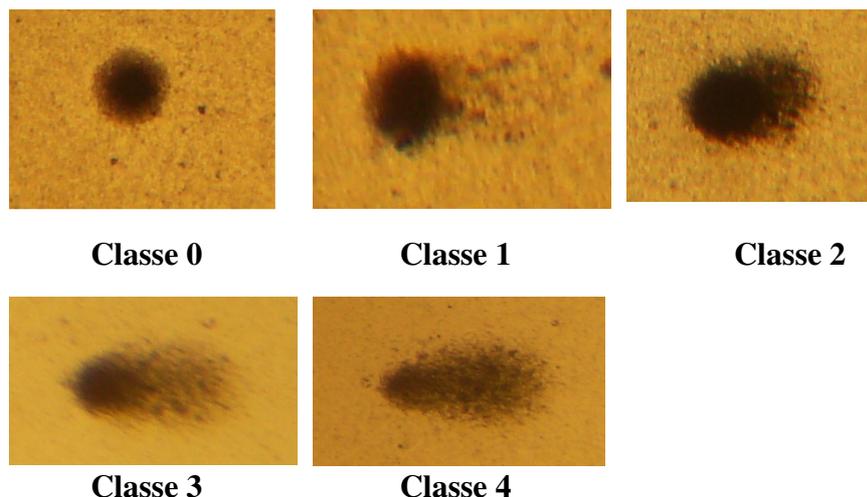


Figura 5. Imagens representativas de células cometa, das classes 0 a 4.

As principais limitações deste teste são: 1) não é um teste de mutagênese, pois o dano pode ser reparado; 2) por ser muito sensível, deve se ter cautela, além de um bom controle para a análise das conclusões; 3) o tempo decorrido entre exposição ao mutágeno e a preparação das lâminas, até a lise, deve ser curto (24 h no máximo), pois o reparo começa imediatamente (SILVA *et al.*, 2003).

Por sua simplicidade e relativo baixo custo o teste cometa é promissor para a avaliação de produtos químicos em larga escala. Além disso, o teste pode ser utilizado para distinguir entre danos genotóxicos ou citotóxicos, *in vitro*, ou entre cancerígenos de ação genotóxica ou não genotóxica, *in vivo* (TICE *et al.*, 2000).

3.2 Teste de Micronúcleos

O teste de micronúcleos em medula óssea de roedores *in vivo* é amplamente aceito pelas agências internacionais e instituições governamentais, como parte da bateria de testes recomendada para se estabelecer a avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial (HAYASHI *et al.*, 1994; SASAKI *et al.*, 1999).

O teste de micronúcleo é um bioensaio que analisa a presença de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros (Figura 6) que não se integraram ao conjunto de cromossomos de uma célula, formando, deste modo, um pequeno núcleo em separado chamado de micronúcleo (MN). A observação de MNs no interior das células é utilizada para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal). Esses agentes aumentam a frequência de micronúcleos (MN) em eritrócitos policromáticos (EPC) na medula óssea de roedores tratados (HAYASHI *et al.*, 1994; SALAMONE, 1994).

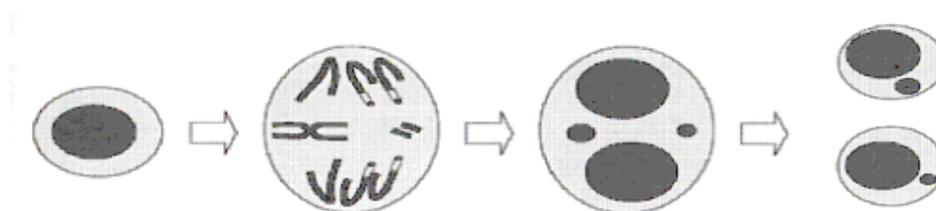


Figura 6. Origem do micronúcleo, a partir de um fragmento cromossômico acêntrico ou de um cromossomo inteiro (FENECH, 2000).

Os micronúcleos aparecem nas células filhas, em decorrência de danos induzidos nas células parenterais. Os fragmentos cromossômicos que resultam de quebras, podem não ser incorporados no núcleo principal das células filhas após a mitose. Uma membrana nuclear se formará em volta do fragmento, o qual será visível como um pequeno (micro) núcleo separado do núcleo principal da célula. Os micronúcleos podem, também, ser formados a partir de um cromossomo inteiro, quando ocorre dano no aparelho mitótico da célula, ou no próprio cromossomo. Nesta situação, o micronúcleo irá conter o centrômero do cromossomo, o qual pode ser detectado utilizando-se sondas específicas. Durante a diferenciação, o núcleo principal é expelido do eritrócito nucleado, enquanto os micronúcleos ficam retidos (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Os eritrócitos, células abundantes na medula óssea e sangue periférico de mamíferos, são particularmente apropriados para este teste por sua alta rotatividade, ausência de núcleo e

possibilidade de diferenciar eritrócitos jovens pela presença de RNA. O eritrócito recém formado contém RNA ribossomal, responsável pela síntese das hemoglobinas (MACGREGOR *et al.*, 1987; HEDDLE *et al.*, 1991). Devido a isso ele pode ser corado diferencialmente com corante para ácidos nucleicos, como por exemplo o Giemsa, sendo dessa forma denominados de eritrócitos policromáticos (EPC) (Figura 7). Este tipo celular jovem pode permanecer estável por mais ou menos 24 horas após a expulsão do núcleo nas células dos mamíferos. Já os eritrócitos maduros são denominados de normocromáticos (ENC), por apresentarem quase apenas hemoglobina. As características básicas do teste são: 1) o efeito do agente químico é observado em eritrócitos policromáticos anucleados, 2) o eritrócito policromático tem um tempo de vida relativamente curto, de modo que qualquer micronúcleo que ele contenha deve ter sido gerado como resultado de danos cromossômicos induzidos recentemente, 3) os micronúcleos são facilmente identificados e a sua distribuição é bem definida, e 4) a frequência de micronúcleo induzida em eritrócito policromático é dependente do tempo de amostragem.

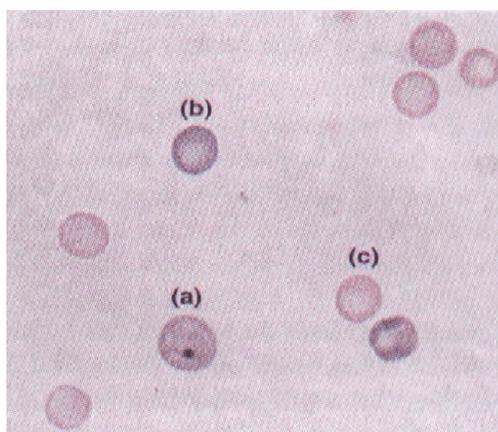


Figura 7. Eritrócito policromático (EPC) micronucleado (a), sem micronúcleo (b) e eritrócito normocromático (ENC) sem micronúcleo (c) (RIBEIRO, 2003).

Resultados positivos no teste de micronúcleos indicam que a substância em estudo induz dano cromossômico estrutural e/ou numérico nos eritroblastos da espécie em estudo e

forneem fortes evidências de genotoxicidade sistêmica da substância química avaliada (SPEIT e HARTMANN, 1999; SINGH, 2000; NADIN *et al.*, 2001; PICADA *et al.*, 2003a).

Os resultados negativos suportam a conclusão de que a substância teste não é genotóxica *in vivo*, avaliando-se o sistema testado (MACGREGOR *et al.*, 1987; MAVOURNIN *et al.*, 1990; HEDDLE *et al.*, 1991; HAYASHI *et al.*, 1994; SALAMONE *et al.*, 1994).

II - OBJETIVOS

A amantadina é um fármaco com uma ampla utilização terapêutica, apresentando ações antivirais, no tratamento da doença de Parkinson, no tratamento de dor crônica, entre outras. Porém, seus efeitos sobre parâmetros neurocomportamentais, mutagênicos e genotóxicos ainda não foram totalmente esclarecidos, o que motivou o estudo deste fármaco.

1. Objetivo geral

Avaliar as atividades genotóxicas e neurocomportamentais da amantadina em camundongos.

2. Objetivos específicos

Detectar os possíveis efeitos mutagênicos e genotóxicos da amantadina, pela avaliação de indução de mutações cromossômicas, através do teste de micronúcleos em medula óssea, e de danos ao DNA no sangue, fígado e tecido cerebral, através do teste cometa.

Verificar o efeito da amantadina através do teste do comportamento estereotipado.

Avaliar a modulação pela amantadina da atividade locomotora, exploratória, e da motivação e ansiedade, através do teste do campo aberto; o efeito sobre a aprendizagem não associativa, através do teste de habituação no campo aberto e o efeito sobre a memória de curta e de longa duração, através do teste de esQUIVA inibitória.

III - CAPÍTULO I

EFFECTS OF AMANTADINE ON NEUROBEHAVIOR AND GENOTOXIC PARAMETERS IN MICE

Artigo que será submetido à revista científica **Life Science**.

Effects of amantadine on neurobehavior and genotoxic parameters in mice

Vanessa Kaefer^{ab}, Juliane Garcia Semedo^a, Vivian Francília Silva Kahl^a, Rafael Gomes Von Borowsky^b, Janaína Giancesini^b, Tarso Benigno Ledur Kist^c, Patrícia Pereira^b, Jaqueline Nascimento Picada^{a*}

^a Laboratório de Genética Toxicológica Aplicada, Universidade Luterana do Brasil – ULBRA, Av. Farroupilha, nº 8001, Bairro São José, Canoas/RS, CEP: 92425-900.

^b Laboratório de Farmacologia e Toxicologia, ULBRA, Canoas, RS, Brasil.

^c Laboratório de Métodos, Departamento de Biofísica, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

*Corresponding author. Fax: + (51) 34779214

E-mail address: jnpicada@cpovo.net (Jaqueline Nascimento Picada)

ABSTRACT

Amantadine (AMA) is a drug of broad clinical application. Initially it was used for treatment and prophylaxis of influenza A, but later some beneficial effects were observed on Parkinson's disease, multiple sclerosis, among others activities. The aim of the present study was to investigate the neurobehavioral effects of AMA as stereotyped behavior, the effects on memory and its possible genotoxic activities. Adult male CF-1 mice were treated with a systemic injection of AMA (15, 30 or 60 mg/kg) 20 min before behavioral testing. The present findings indicate that AMA can induce impaired neurobehavioral effects depending on the tested dose. At higher doses (30 and 60 mg/kg) AMA increased the latency time in the training session by the inhibitory avoidance task. At 60 mg/kg AMA induced impairing effects in locomotion and exploration in the open field and hence AMA impaired habituation. A stereotyped behavior after each administration of the dose 60 mg/kg by 3-day trial reduced from first to third day. AMA (30 and 60 mg/kg) increased DNA damage in brain, assessed by comet assay, suggesting possible neurotoxic activity, however it was not able to induce chromosomal mutagenesis, as evaluated by micronucleus assay in bone marrow from treated mice. Furthermore, at a lower dose (15 mg/kg) AMA did not induce DNA damage and was not able to impair memory, locomotion, exploration, or motivation in mice.

Keywords: amantadine, stereotyped behavior, comet assay, genotoxic effect

1. INTRODUCTION

Amantadine (AMA – hydrochloride-1-adamantanamine, Fig. 1) is a drug of broad clinical usefulness. Originally it was used in the treatment and prophylaxis of influenza A (1976) as antiviral agent (Davies et al., 1964; Dolin et al., 1982), but later some beneficial effects were observed on Parkinson's disease (Pinter et al., 1999), dementia, multiple sclerosis, chronic pain, and cocaine withdrawal (Fisher et al., 2000; Fleming, 2001; Meythaler et al., 2002).

A complete understanding of the neurochemical process involved in the antiparkinsonian activity of AMA was not achieved yet and different hypotheses have been proposed. Possible mechanisms include increased synthesis and release of dopamine, reduced synaptic reuptake or anticholinergic effects (Kornhuber et al., 1995; Gordon et al., 1996; Page et al., 2000). AMA is a non-competitive antagonist of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor and is suggested to modulate indirectly dopamine transmission (Peeters et al., 2002). It is usually proposed that AMA enhances the dopaminergic neurotransmission through antagonism of glutamatergic inhibitory inputs on presynaptic dopaminergic neurons (Takahashi et al., 1996; Page et al., 2000).

Studies *in vivo* have described neurotoxic effects induced by competitive and uncompetitive NMDA receptor antagonists including MK-801, phencyclidine (PCP), ketamine and nitrous oxide (Olney et al., 1991). Low doses of NMDA induce morphological alterations in neurons of the cingulate gyrus and retrosplenial cortex of the rat. Neuronal cell death may result at higher doses (Kornhuber et al., 1999).

Several studies show that drugs acting on CNS may have genotoxic target-tissue activity. For example, apomorphine (a dopamine receptor agonist) showed genotoxic effect on brain tissue more pronounced than in blood (Picada et al., 2003b). Similarly, gamma-decanolactone induced DNA damage on brain tissue as measure in comet assay and impairment of nonassociative, nonaversive learning performed on open field (Pereira et al., 2007). Given the pharmacological properties and clinical relevance of AMA as NMDA receptor antagonist, it is important to investigate the neurobehavioral and possible neurotoxic properties of AMA *in vivo*. The aim of the present study was to evaluate the effects of the systemic administration of AMA on associative memory, habituation, stereotypy, locomotion, exploration, motivation and anxiety in mice, besides the possible genotoxic effects, using the comet assay in blood, liver and brain tissues. In addition, the mutagenic activity was investigated by bone marrow micronucleus assay in the same animals.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Animals

Male CF-1 mice (2-3 months of age; 33- 40 g) were obtained from the Lutheran University of Brazil (ULBRA). Mice were housed in plastic cages, with “ad libitum” access to water and food, under a 12-h light/dark interval, and at a constant temperature of 23°C. All experimental procedures were performed in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior (SBNeC) recommendations for animal care. Behavioral procedures were conducted during the light phase of the cycle between 9:00 and 18:00h.

2.2 Drug

Amantadine hydrochloride (CAS Registry Number [768-94-5]) was purchased from Acros Organics (Belgium) (Fig 1). An analysis by capillary electrophoresis was performed to verify the purity of the sample, as following: an amount of 0.60 mg of sample was dissolved in 500 μ L of ethanol, followed by the addition of 250 μ L of distilled water and then 250 μ L of sodium tetraborate 100 mM with pH 9.2. An aliquot of this standard was then derivatized with fluorescamine 20 mM in acetone. Separation buffer was sodium tetraborate 20 mM with pH 9.2. The separation was done on a capillary electrophoresis equipment model PNA5ssc (ISB, Porto Alegre, RS, Brazil) operated at room temperature (25 °C), using 15kV and with a fused silica capillary 60 cm long, 50 μ m internal diameter, and 375 μ m external diameter. Hydrodynamic injection was used for 20 s at a 10 cm level difference. Detection was made with a LED induced fluorescence detector with excitation at 385 nm. There are no other primary amines present, as contaminants or as degradation products carrying primary amine groups (Fig. 2).

2.3 Animal treatment

The used doses of AMA were defined after the determination of the maximum tolerated dose (DMT) in mice, being 60 mg/kg (DMT), 30 mg/kg (50% of DMT) and 15 mg/kg (25% of DMT). Animals were given an intraperitoneal (i.p) injection of vehicle (NaCl 0.9% saline solution) or AMA (15, 30 or 60 mg/kg), in a volume of 1.0 ml/kg body weight. All solutions were prepared immediately prior to administration.

For the behavioral procedures, 80 male mice were divided in 4 groups with N=20 animals. The group 1 was treated with saline, the groups 2, 3 and 4 were treated with AMA

dissolved in saline, in the dose of 15, 30 and 60 mg/kg, respectively. For the stereotyped behavior, fifty-four male mice were used, 9 mice for each test group: saline, apomorphine (20 mg/kg) or AMA (15, 30 or 60 mg/kg) for three days. For the genotoxic and mutagenic activities these animals were divided in 4 groups with N = 6 - 7 (saline, AMA: 15, 30 or 60 mg/kg) and a group cyclophosphamide (N = 5; treated: 2 x 25 mg/kg) was included as a positive control for mutagenic activity.

2.4 Behavioral procedures

2.4.1 Inhibitory avoidance

The procedures were the following as described in Picada et al. (2002). AMA was administered through intraperitoneal 20 minutes before the session training. The animal was put on a platform (10 x 10 cm) inside of a box of inhibitory avoidance and the time of permanence (latency) was timed until that the animal went down with all the 4 paws in a grid where received a shock (0.4 mA) for 2 seconds. A ceiling of 180 s was imposed on this measure (Pereira et al., 2001). In the test sessions, the animal was put back in the platform 1,5 h after the training, in order to measure the STM (short – term memory), and 24h after the training, to measure LTM (long – term memory) (Izquierdo et al., 1999; Izquierdo and McGaugh, 2000). This experimental protocol allowed determining the interference of the amantadine about the acquisition of the memory.

2.4.2 Open field behavior

AMA was administered through intraperitoneal injection 20 minutes before the session training. The mice were put in an open field, in other words, a compartment that is similar to a wood box (50 x 50 x 30 cm), with a frontal glass wall, and the brown floor with a pattern of twelve squares marked by black lines (arrays of 3 x 4). Animals were placed in the rear left square, and allowed to freely explore the field for 5 min. The number of crossings of the black lines, rearings performed, latency to start locomotion and bolus were counted and used as measures of locomotion, exploration, motivation and anxiety (Roesler et al., 2000; Pereira et al., 2005; Machado et al., 2006).

2.4.3 Habituation

Long-term retention of habituation to a novel environment can be considered a nonassociative, nonaversive type of learning, which can be measured by the decrease in the exploratory activity as assessed by the number of rearings performed in a test session carried out 24 h after the first exploration session (Vianna et al., 2000; Picada et al., 2002). The animals used in the evaluation of open field behavior were re-exposed (test session) for 5 min to the open field 24 h after the first exposure (training session), and the number of rearings performed was recorded. The decrease in the number of rearings performed between the first and second exploration sessions was considered as a measure of habituation.

2.5 Stereotyped behaviors

Twenty minutes after the administration of saline, AMA or apomorphine, mice were placed three per cage and evaluated for stereotyped behavior by an experimenter blind to the

treatment group as described in a previous report (Picada et al., 2003b). The treatment was repetitive by three consecutive days. Animals were observed for 1 min at 10 min intervals during 1 h. Stereotypy was defined as rapid, repetitive head and forelimb movements. Behaviors scored were sniffing, grooming, head-bobbing, nail biting, and circling (Machado et al., 2006).

2.6 Genotoxic/ mutagenic activities

The sampling-time schedule used to evaluate the induction of genotoxicity by comet assay and mutagenicity by micronucleus assay is showed in Fig 3.

2.6.1 Comet assay

It the alkaline version of the comet assay was used, as described in Tice et al. (2000) with minor modifications (Picada et al., 2003a). Each piece of brain and liver were placed in 0.5 ml of cold phosphate-buffered saline (PBS) and minced into fine pieces in order to obtain a cellular suspension; blood samples were placed in 15 μ L anti coagulant (heparin sodium 25.000 UI- Liqueimine[®]). These cells from brain, liver and from the peripheral blood (5-10 μ L) were embedded in 95 μ L of 0.75% low melting point agarose (Gibco BRL). The mixture (cell/ agarose) was added to a fully frosted microscope slide coated with a layer of 300 μ L of normal melting agarose (1%) (Gibco BRL). After solidification, the slides were placed in lysis buffer (2.5 M NaCl, 100mM EDTA and 10mM Tris, pH 10.0, with freshly added 1% Triton X-100 (Sigma) and 10% DMSO) for 48 h at 4 °C. Subsequently, the slides were incubated in freshly made alkaline buffer (300 mM NaOH and 1mM EDTA, pH > 13) for 20 min, at 4 °C. An

electric current of 300 mA and 25 V (0.90 V/cm) was applied for 15 min to induce DNA electrophoresis. The slides were then neutralized (0.4 M Tris, pH 7.5), stained with silver as described by Nadin et al. (2001), and analyzed using a microscope.

Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicate slides) were analyzed from each animal. Cells were also scored visually according to tail size into five classes ranging from undamaged (0), to maximally damaged (4), resulting in a single DNA damage score for each animal, and consequently each studied group. Therefore, the damage index (DI) can range from 0 (completely undamaged, 100 cells x 0) to 400 (with maximum damage, 100 x 4). The damage frequency (%) was calculated based on number of cells with tail versus those with no tails (Hartmann et al., 2003; Vercelino et al., 2008).

2.6.2 Micronucleus assay

The micronucleus assay was performed according to the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program (Mavournin et al., 1990). Bone marrow from both femurs was suspended in fetal calf serum and smears on clean glass slides were made according to Picada et al. (1997). Slides were air-dried, fixed in methanol, stained in 10% Giemsa and coded for a “blind” analysis. To avoid false negative results and as a measure of toxicity on bone marrow, the polychromatic erythrocytes: normochromatic erythrocytes (PCE/NCE) ratio was scored in 1000 cells. The incidence of micronuclei (MN) was observed in 2000 PCE for each animal (Picada et al., 1997; Krishna and Hayashi, 2000).

2.7 Statistics

Data from open field are expressed as mean \pm S.E.M. These data were examined by One-Way Analysis of Variance (ANOVA) followed by Duncan's test. The habituation test are expressed as mean \pm S.E.M. Comparisons between the number of rearings performed in training and test sessions within the same group in the habituation experiment were done with a paired *t*-test. The analyses of the step-down inhibitory avoidance task were non-parametric, because this procedure involved a cutoff score. The data were expressed as medians (interquartile ranges) and analyzed by Kruskal-Wallis test, followed by the Mann-Whitney test when necessary. The statistical evaluation of data from stereotypy behavior, comet assay and micronucleus assay was carried out using the Dunnett's test. In all comparisons, $p \leq 0.05$ was considered as indicating statistical significance.

3. RESULTS

The results of mice behavior for a 5 min exploration time in an open field are shown in Fig. 4. There were no significant differences among groups regarding the latency to start locomotion, suggesting that AMA did not affect motivation of the animals in this task. However, AMA at the dose 60 mg/kg, but not 15 or 30 mg/kg, decreased the number of crossings performed (mean \pm S.E.M = 25.5 ± 7.19 ; $*p \leq 0.05$), decreased the rearings (mean \pm S.E.M = 4.15 ± 1.73 ; $*p \leq 0.05$) and decreased the number of bolus (mean \pm S.E.M = 0.7 ± 0.2 ; $*p \leq 0.05$).

The group saline showed a significantly lower number of rearings, during the test session in the open field to evaluate habituation (Fig. 5), 24 h later the training session

(training: mean \pm S.E.M = 34.15 ± 5.0 ; test: mean \pm S.E.M = 24.25 ± 4.61 ; * $p \leq 0.05$). The group treated with amantadine 60 mg/kg showed a significantly higher number of rearings during the test session as compared to the training session (training: mean \pm S.E.M = 4.15 ± 1.73 ; test: mean \pm S.E.M = 29.75 ± 4.58 ; ** $p \leq 0.01$). There were no significant differences among groups at the dose 15 and 30 mg/kg (comparisons between training and test sessions within each group by paired t-tests).

Short- and long-term retention of inhibitory avoidance was evaluated in different animals. Fig. 6 shows the short-term (1.5 h) and long-term (24 h) retention of inhibitory avoidance in mice given an i.p. injection of saline or AMA (15, 30 or 60 mg/kg) 20 min before the training. There were significant differences among groups in training performed at the dose 30 and 60 mg/kg, showing a significant increase in latency to the step-down (* $p \leq 0.01$), when compared with saline. Thus, alterations in the short and long-term retention test performance were observed, however without significant differences. Animals treated with AMA at the dose of 15 mg/kg showed normal inhibitory avoidance learning ability.

Systemic administration of amantadine induced stereotypy in mice. Fig.7 shows the stereotypy in percentage of time on mice treated with saline (negative control), apomorphine (positive control), or amantadine (15, 30 or 60 mg/kg) for three days. The mean \pm S.D showed significant difference between the group treated with apomorphine, the group AMA at 60 mg/kg (all days) and the group AMA at 15 mg/kg (last day) in comparison with saline group. Similar as apomorphine, AMA at 60 mg/kg reduced the stereotyped behavior through the days. Conversely, at 15 mg/kg there was an increase of stereotyped behavior on the third day.

Table 1 shows the effects of AMA on damage index (DI) and damage frequency (DF), as measured by DNA damage in peripheral blood after 5 h or 24 h from the first dose. There

were induction of DNA damage in blood from animals treated with AMA 30 and 60 mg/kg sampling 5 h, however after 24 h there were no significant increase in DF or DI in comparison to saline group.

The genotoxic effects after three consecutive doses of AMA are showed in table 2. Only in the group 60 mg/kg was observed an increase on DI ($*p \leq 0.05$) in the blood 53 h after the first administration of AMA. At 72 h the animals were sacrificed and samples of blood, brain and liver were collected. In blood there was no increase in DI or DF in all treated groups in relation to saline group. However, in brain was observed a significant increase on DI and DF in both 30 and 60 mg/kg treated-groups ($**p \leq 0.01$), while in the liver only the 60 mg/kg group showed significant increase in DI ($**p \leq 0.01$) and DF ($*p \leq 0.05$) as compared to the saline group.

As shown in Table 3, a similar PCE/NCE ratio was detected in all groups, indicating no toxicity in bone marrow of the mice treated with amantadine. There was no significant difference in frequency of micronucleus in all groups, suggesting that AMA did not induce mutagenic activity. As expected cyclophosphamide ($*p \leq 0.05$) positive control group increased the frequency of micronucleus.

4. DISCUSSION

This study employed animal models for locomotor activity and associative and non-associative memories to assess the effects of AMA on behavior in mice in an open field and inhibitory avoidance task, besides stereotyped behavior and genotoxic effects. The inhibitory avoidance task is a behavioral test widely used for studying the effects of drugs on associative

memory (Izquierdo e Medina, 1997). In this task the animals treated with 60 mg/kg of AMA and put on the platform 20 min after the injections showed a high time of latency, suggesting some toxicity, probably leading to no learning in this task (Fig 6). Clearly the animals showed impaired neurobehavioral performance, and consequently the responses on short and long-term retention of inhibitory avoidance performed 1.5 h and 24 h after training session were inconclusive. Fujiwara et al. (1985) investigated the behavioral effects of AMA 50 and 80 mg/kg in rats and mice. In this study, they found out that animals treated with amantadine 50 mg/kg i.p., tended to decrease ambulation and rearings. The drug at 50 mg/kg caused piloerection and hyperirritability and impaired coordinated motor activity in rats at doses over 80 mg/kg. Here, AMA at 60 mg/kg decreased rearings and crossings in open field, suggesting an impairing effects in exploration and locomotion in mice. However, at 15 mg/kg the responses were similar as saline group, suggesting no prejudice in memory. Memantine is also a NMDA receptor antagonist similar to amantadine. In the tasks to assess the memory, memantine at lower doses (2 and 5 mg/kg) did not affect memory formation in normal rats (Réus et al., 2008).

Habituation to a novel environment is believed to be one of the most elementary forms of non-associative and non-aversive learning. The repeated exposure to the same environment induces a reduction in the exploratory behavior, which can be taken as an index of habituation (Vianna et al., 2000). AMA at all doses did not decrease the number of rearings performed in a test session carried out 24 h after the first exploration session on a open field, suggesting some impairment in the habituation to a novel environment. The animals treated with AMA at 60 mg/kg poorly explored the environment in the open field in the training session, as observed by low number of rearings (Fig 4C and 5), possibly due to some toxic effect at this dose. In the

habituation test, there was a significant increase in rearings, probably because the impaired exploratory behavior in the training session.

In a similar evaluation using open field, Starr and Starr (1995) have shown AMA (5 - 40 mg/kg) reduced locomotion and other species-typical behaviors (e.g. rearing and grooming) in mice. Studies show that NMDA receptor antagonists, as AMA, may impair retention of many tasks (Morris et al., 1986; Miserendino et al., 1990; Izquierdo et al., 1997).

It should be noted that the animals used in this study were not treated to mimic neurodegenerative diseases related to changes in the glutamatergic system. The cognitive damage observed in this study is consistent with previous studies which have been verified cognitive deficits after administration of high doses of AMA (Fujiwara et al., 1985; Starr and Starr 1995).

Abnormal repetitive behaviors are often associated with specific developmental, genetic, and neuropsychiatric disorders such as schizophrenia and Parkinson's disease, which can affect the dopamine system (Ridley, 1994, Peeters et al., 2002) and can be induced by some drugs such as amphetamine and apomorphine (Grunblatt et al., 2001). In our study, AMA caused stereotyped behavior significant at the dose 15 and 60 mg/kg, compared to saline group. Apomorphine was used as positive control since it has already been well established its stereotyped behavior (Picada et al., 2002).

At the dose of 15 mg/kg there was an increase in this behavior in the comparison between the first and third days. These results possibly were due to the actions of AMA on the dopamine system by sensitization of receptors or by increasing synthesis and release of dopamine (Ridley, 1994; Kornhuber et al., 1995; Gordon et al., 1996; Page et al., 2000). Previous research indicates that nearly all dopamine agonists produce behavioral sensitization

with repeated treatments, as cocaine and apomorphine (1 and 5 mg/kg), which produced behavioral sensitization with repeated treatment (Mattingly et al., 1988).

However, AMA at the dose 60 mg/kg reduced the stereotyped behavior from the first to third day, indicating that this drug may be acting on multiple systems of neurotransmission, or causing a possible increase in recapture of dopamine as shown in previous studies (Page et al., 2000). Peeters et al. (2002) indicates that repetitive administration of AMA (40 mg/kg) induces a transient modification of dopamine receptor function in the striatum that is correlated with altered behavioral responses to dopamine stimulation, suggesting that these behavioral changes may be linked to the activation of multiple biochemical systems. At the 30 mg/kg middle dose there was no significant increase or reduction in the stereotyped behavior among the three days, possibly by the influence of the multiple effects. Thus, further studies are needed to clarify the actions of AMA on the dopamine system associated to stereotyped behavior.

The comet assay evaluates compounds for their ability to cause DNA strand breaks and alkali-labile sites and has been used for the detection of DNA damage in cells exposed to chemical and physical agents under *in vitro* and *in vivo* conditions (Singh et al., 1988, 1991). The measure of DNA damage on brain tissue by drugs acting on CNS has shown to be very appropriate to indicate neurotoxicity which can be associated to (impairment) abnormal neurobehavioral effects (Pereira et al., 2005). In the brain tissue was observed increase in DNA damage, from animals treated with AMA at 30 and 60 mg/kg (Table 2), suggesting neurotoxic effects. However, in peripheral blood DNA damage was not significantly different of the saline group, suggesting a clear DNA repair response in this tissue. In the liver, there

was a significant increase in DI and DF only in the group treated with the highest dose (60 mg/kg), suggesting a possible direct hepatotoxic effect of AMA.

The purpose of the micronucleus assay is to identify substances that cause cytogenetic damage which results in the formation of micronuclei containing lagging chromosome fragments or whole chromosomes by analysis of erythrocytes in bone marrow of animals, usually rodents (Hayashi et al., 1994; Hayashi and Honma, 2007; Van Miert et al., 2008). AMA was not able to increase the frequency of micronuclei, suggesting no mutagenic effect at chromosomal level (Table 3), after treatment of mice by three-days consecutive. In addition, AMA did not affect the normal PCE/NCE ratio in bone marrow, indicating no toxicity to this tissue.

5. CONCLUSION

The present findings show that at the same dose which AMA induced neurobehavioral deficit, there was an increase in DNA damage on brain tissue. This finding should be taken into account when considering the possible neurotoxic effects of AMA. Furthermore, at lower dose (15 mg/kg) AMA was not able to impair memory, locomotion, exploration or motivation in mice or induce DNA damage in any of tissues evaluated by comet assay. Thus, further experiments could be carried out to investigate the possible neurotoxic and neurobehavioral effects in clinical doses used in humans in the acute and chronic treatments.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by ULBRA (Universidade Luterana do Brasil), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), and FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul), Brazil.

6. REFERENCES

Davies, W.L., Grunert, R.R., Haff, R.F., McGahen, J.W., Neumayer, E.M., Paulshock, M., Watts, J.C., Wood, T.R., Hermann, E.C., Hoffmann, C.E., 1964. Antiviral activity of 1-adamantanamine (amantadine). *Science* 144, 862-863.

Dolin, R., Reichmann, R.C., Madore, H.P., Maynard, R., Linton, R.N., Webber-Jones, J., 1982. A controlled trial of amantadine and rimantadine in the prophylaxis on influenza A infection. *The New England Journal of Medicine* 307, 580-584.

Fisher, K., Coderre, T.J., Hagen, N.A., 2000. Targeting the *N*-methyl-D-aspartate receptor for chronic pain management. Preclinical animal studies, recent clinical experience and future research directions. *Journal of Pain and Symptom Management* 20, 358-373.

Fleming, D.M., 2001. Managing influenza: amantadine, rimantadine and beyond. *International Journal of Clinical Practice* 55, 189-195.

Fujiwara, M., Sakurai, Y., Kiyota, Y., Shimazoe, T., Ohta, H., Shibata, S., Ueki, S., 1985. Behavioral pharmacology of amantadine with special references to the effect on abnormal behavior in mice and rats. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 85(4), 259-274.

Gordon, I., Weizman, R., Rehavi, M., 1996. Modulatory effect of agents active in the presynaptic dopaminergic system on the striatal dopamine transporter. *European Journal of Pharmacology* 298, 27-30.

Grunblatt, E., Mandel, S., Maor, G., Youdim, M.B., 2001. Effects of R- and S-apomorphine on MPTP- induced nigro-striatal dopamine neuronal loss. *Journal of Neurochemistry* 77, 146-156.

Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., 2003. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 18, 45-51.

Hayashi M, Honma M., 2007. Evaluation of in vivo genotoxicity of chemicals--development and application of rodent micronucleus assay. *Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku* 125, 17-34.

Hayashi, M., Tice, R.R, Macgregor, J.T, Anderson, D., Blakey, D.H., Kirsch-Volders, M., Oleson, F.B. Jr, Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S., Vannier B., 1994. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutation Research* 312, 293-304.

Izquierdo, I., McGaugh, J.L., 2000. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behavioural Pharmacology* 11, 517-534.

Izquierdo, I., Medina, J.H., 1997. Memory formation: The sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of Learning and Memory* 68, 285-316.

Izquierdo, I., Quilfeldt, J.A., Zanatta, S., Quevedo, J., Schaeffer, E., Schitz, P.K., et al., 1997. Sequential role of hippocampus and amygdala entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *The European Journal of Neuroscience* 9, 786-93.

Izquierdo, I., Medina, J.H., Vianna, M.R.M., Izquierdo, L.A., Barros, D.M., 1999. Separate mechanisms for short- and long- term memory. *Behavioural Brain Research* 103, 1-11.

Kornhuber, J., Jellinge, K., Wiltfang, J., Leblhuber, F., Riederer, P., 1999. The *N*-methyl-D-aspartate receptor channel blocker amantadina does not cause histopathological alterations in human brain tissue. *Acta Neuropathologica* 98, 85-90.

Kornhuber, J., Quack, G., Danysz, W., Jellinger, K., Danielczyk, W., Gsell, W., Riederer, P., 1995. Therapeutic Brain Concentration of the NMDA Receptor Antagonist Amantadine. *Neuropharmacology* 34(7), 713-721.

Krishna, G., Hayashi, M., 2000. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research* 455, 155-166.

Machado, M.S., Rosa, R.M., Dantas, A.S., Reolon, G.K., Appelt, H.R., Braga, A.L., Henriques, J.A., Roesler, R., 2006. An organic selenium compound attenuates apomorphine-induced stereotypy in mice. *Neuroscience Letters* 410(3), 198-202.

Mattingly, B.A., Gotsick, J.E., Salamanca, K., 1988. Latent sensitization to apomorphine following repeated low doses. *Behavioral Neuroscience* 102, 553-558.

Mavournin, K.H., Blakey, D.H., Cimino, M.C., Salam-One, M.F., Heddle, J.A., 1990. The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. *Mutation Research* 239, 29-80.

Meythaler, J.M., Brunner, R.C., Johnson, A., Novack, T.A., 2002. Amantadine to improve neurorecovery in traumatic brain injury-associated diffuse axonal injury: a pilot double-blind randomized trial. *The Journal of Head Trauma Rehabilitation* 17, 300-313.

Miserendino, M.J.D., Sananes, C.B., Melia, K.R., Davis, M., 1990. Blocking of acquisition but not expression of fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. *Nature* 345, 716-718.

Morris, R.G.M., Anderson, E., Lynch, G.S., Baudry, M., 1986. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319, 774-776.

Nadin, S.B., Vargas-Roig, M.L., Ciocca, D.R., 2001. A silver staining for single-cell gel assay. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 49, 1183-1186.

Olney, J.W., Labruyere, J., Wang, G., Wozniak, D.F., Price, M.T., Sesma, M.A., 1991. NMDA antagonist neurotoxicity: mechanism and prevention. *Science* 254, 1515-1518.

Page, G., Peeters, M., Maloteaux, J.M., Hermans, E., 2000. Increased dopamine uptake in striatal synaptosomes after treatment of rats with amantadine. *European Journal of Pharmacology* 403, 75-80.

Peeters, M., Page, G., Maloteaux, J.-M., Hermans, E., 2002. Hypersensitivity of dopamine transmission in the rat striatum after treatment with the NMDA receptor antagonist amantadine. *Brain Research* 949, 32-41.

Pereira, P., Ardenghi, P., Mello e Souza T., Medina, J.H., Izquierdo, I., 2001. Training in the step-down inhibitory avoidance task time-dependently increases cAMP-dependent protein kinase activity in the endocrinal cortex. *Behavioural Pharmacology* 12, 1-4.

Pereira, P., Viana, C.C.S., Oliveira, P.A., Brum, L.F.da S., Picada, N.P., 2007. Gamma-decanolactone effect on behavioral and genotoxic parameters. *Life Sciences* 80, 1014-1019.

Pereira, P., Tysca, D., Oliveira, P., Brum, L.F. Da Silva, Picada, J.N., Ardenghi, P., 2005. Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. *Pharmacological Research: the Official Journal of the Italian Pharmacological Society* 52, 199-203.

Picada, J.N., Da Silva, K.V., Erdtmann, B., Henriques, A.T., Henriques, J.A., 1997. Genotoxic effects of structurally related beta-carboline alkaloids. *Mutation Research* 379, 135-149.

Picada, J.N., Flores, D.G., Zettler, C.G., Marroni, N.P., Roesler, R., Henriques, J.A.P., 2003a. DNA damage in brain cells of mice treated with an oxidized form of apomorphine. *Molecular Brain Research* 114, 80–85.

Picada, J.N., Henriques, J.A., Roesler, R., 2003b. An oxidized form of apomorphine fails to induce stereotypy. *Schizophrenia Research* 63, 199-200.

Picada, J.N., Schröder, N., Izquierdo, I., Henriques, J.A.P., Roesler, R., 2002. Differential neurobehavioral deficits induced by apomorphine and its oxidation product, 8-oxo-apomorphine-semiquinone, in rats. *European Journal of Pharmacology* 443, 105-111.

Pinter, M.M., Birk, M., Helscher, R.J., Binder, H., 1999. Short-term effect of amantadine sulphate on motor performance and reaction time in patients with idiopathic Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission* 106, 711-724.

Réus, G.Z., Valvassori, S.S, Machado, R.A., Martins, M.R., Gavioli, E.C., Quevedo, J., 2008. Acute treatment with low doses of memantine does not impair aversive, non-associative and recognition memory in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 376(5), 295-300.

Ridley, R.M., 1994. The psychology of perseverative and stereotyped behaviour. *Progress in Neurobiology* 44, 221-231.

Roesler, R., Vianna, M.R.M., Lara, D.R., Izquierdo, I., Schmidt, A.P., Souza, D.O., 2000. Guanosine impairs inhibitory avoidance performance in rats. *Neuroreport* 11, 2537-2540.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cell. *Experimental cell research* 175, 184-191.

Singh, N.P., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1991. A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. *Mutation Research* 252, 289-296.

Starr MS, Starr BS., 1995. Locomotor effects of amantadine in the mouse are not those of a typical glutamate antagonist. *Journal of Neural Transmission, Parkinson's Disease and Dementia Section* 9(1), 31-43.

Takahashi, T., Yamashita, H., Zhang, Y-X., Nakamura, S., 1996. Inhibitory effect of MK-801 on amantadine-induced dopamine release in the rat striatum. *Brain Research Bulletin* 41, 363-367.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A, Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.-C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35, 206-221.

Van, Miert E., Vanscheeuwijck, P., Meurrens, K., Gomm, W., Terpstra, PM., 2008. Evaluation of the micronucleus assay in bone marrow and peripheral blood of rats for the determination of cigarette mainstream-smoke activity. *Mutation Research* 652(2),131-8.

Vercelino, R., Tieppo, J., Dias, A.S., Marroni, C.A., Garcia, E., Meurer, L., Picada, J.N., Marroni, N.P., 2008. N-acetylcysteine effects on genotoxic and oxidative stress parameters in cirrhotic rats with hepatopulmonary syndrome. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 102 (4), 370-6.

Vianna, M.R., Alonso, M., Viola, H., Quevedo, J., de Paris, F., Furman, M., de Stein, M.L., Medina, J.H., Izquierdo, I., 2000. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learning & Memory* 7, 333-340.

Legend for figures

Fig 1. Chemical structure of amantadine

Fig 2. Capillary Electrophoresis of the amantadine sample used in the experiments.

Fig 3. Schedule for treatment of animals treated with amantadine or saline for genotoxic and mutagenic activities. The animals were treated with AMA at 15, 30 or 60mg/kg or saline for three consecutive days and sacrificed on the fourth day. The blood samples were collected 5h after the 1° and 3° administration of AMA. In order to evaluate possible DNA repair, blood samples were collected 24 hours after the 1° administration and then the animals received the 2° dose of amantadine. On the last day, blood, liver and brain samples were taken from each animal for comet assay. For the micronucleus assay samples of the bone marrow were collected from the femurs.

Fig 4. Effect of administration with saline or AMA (15, 30 or 60mg/kg) in open field: (a) latency to start locomotion; (b) number of crossings performed; (c) number of rearings performed; (d) number of bolus, during a 5 min exploration of an open field. Animals received an i.p. injection of vehicle or AMA 20 min prior to being exposed to the locomotors behavior in the open field. Data are expressed as means \pm S.E.M. N = 20 animals per group. * $p \leq 0.05$ compared to the vehicle group; ANOVA/ Duncan's test.

Fig 5. Effect of habituation on mice 24h after training (open field). Animals received an i.p. injection of saline or AMA (15, 30 or 60 mg/kg) 20 min prior to training. White columns: training; gray columns: test. Data are expressed as means \pm S.E.M. N = 20 animals per group. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0.01$; ANOVA/ *t*- test.

Fig 6. Effect of pretraining administration (i.p) of vehicle or AMA (15, 30 or 60 mg/kg) on STM (1.5 h after training) and LTM (24 h after training) of inhibitory avoidance. White columns: training, gray columns: STM, black columns: LTM. The analyses of the step-down inhibitory avoidance task were non-parametric, because this procedure involved a cutoff score. The data were expressed as medians (interquartile ranges) and analyzed by Kruskal-Wallis test, followed by the Mann-Whitney test when necessary. N = 20 animals per group. Significant: * $p \leq 0,01$ compared to the vehicle group.

Fig 7. Evaluation of stereotyped behavior after administration of AMA (15, 30 or 60 mg/kg), saline (control negative), or apomorphine (control positive) by three days. Black columns: negative control (saline); square columns: apomorphine; white columns: AMA 15 mg/kg; gray columns: AMA 30 mg/kg; striped columns: AMA 60 mg/kg. Data are expressed as means \pm S.D. N = 9 animals per group. Significant difference: * $p \leq 0.01$ (ANOVA, Dunnett' test).

* Different from the saline group.

^aDifference among days into each treatment.

Fig 1.

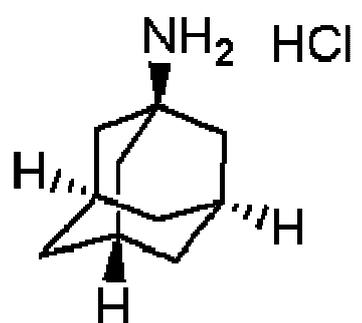


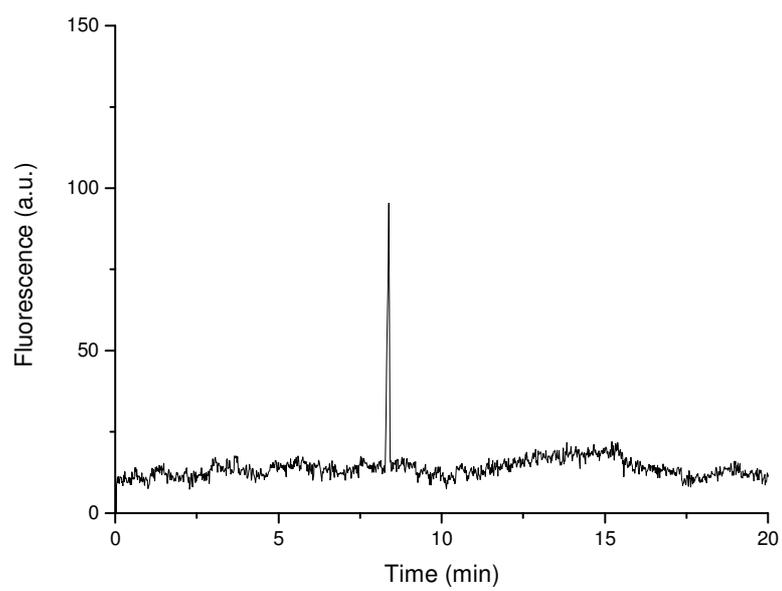
Fig 2.

Fig 3.

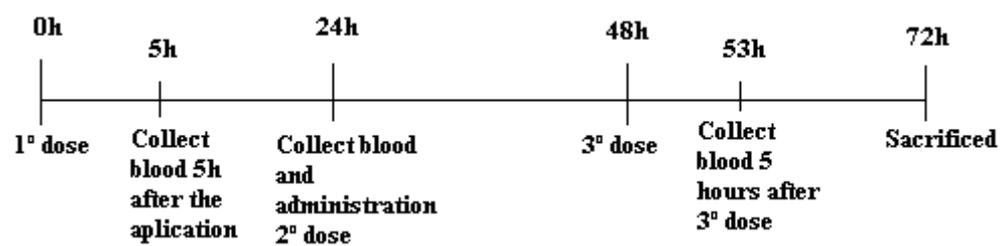
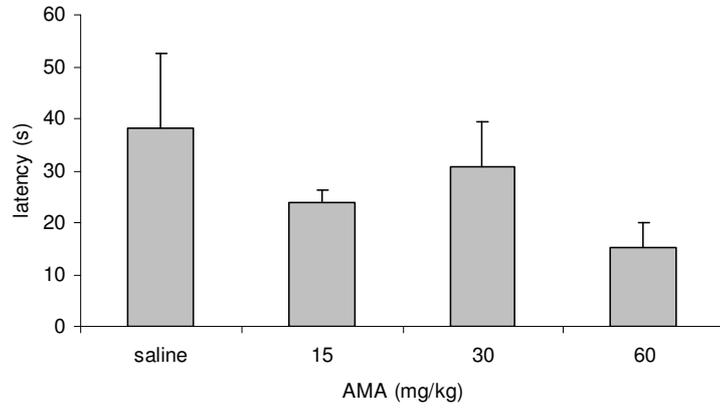
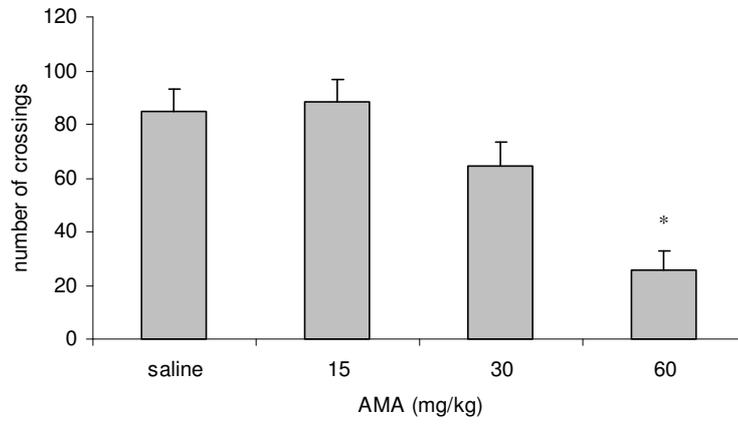


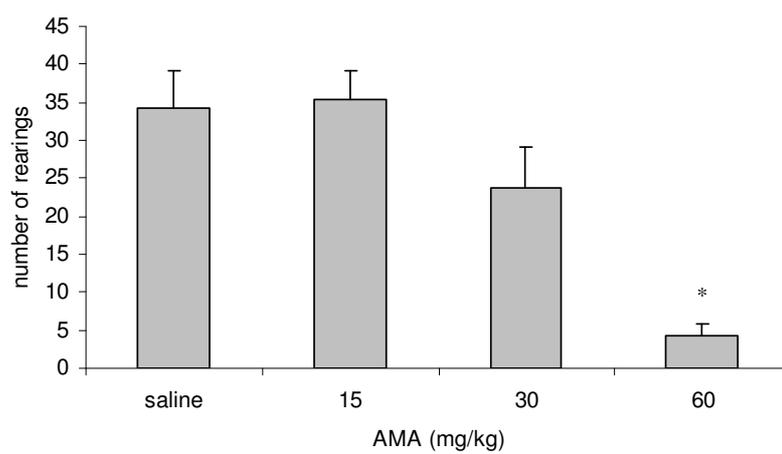
Fig 4.



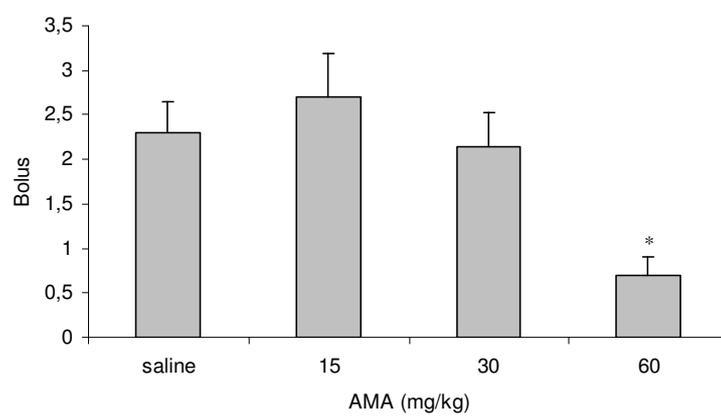
(A)



(B)



(C)



(D)

Fig 5.

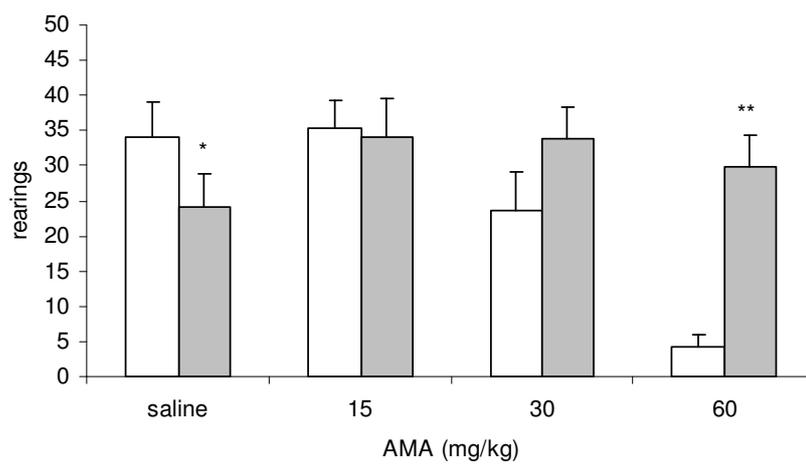


Fig 6.

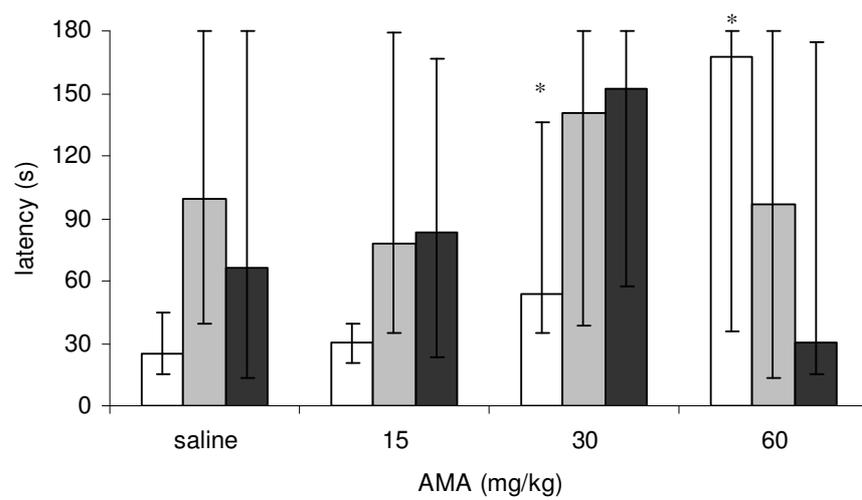


Fig 7.

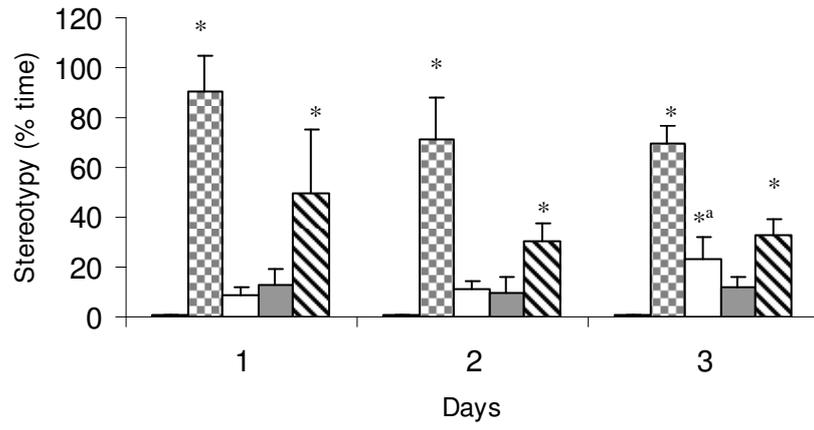


Table 1 Comet assay in the blood from mice treated with a single dose of AMA (15, 30 or 60 mg/kg) or saline.

Sampling - time	Group	^a DI	^b DF
5 h	Saline	2 ± 1	2 ± 1
	15 mg/kg	7 ± 2	7 ± 2
	30 mg/kg	8 ± 6*	5 ± 3
	60 mg/kg	8 ± 4*	7 ± 5*
	^c PC	152 ± 24**	55 ± 7**
24 h	Saline	7 ± 4	5 ± 3
	15 mg/kg	6 ± 4	6 ± 4
	30 mg/kg	7 ± 4	7 ± 4
	60 mg/kg	9 ± 5	9 ± 4
	^c PC	143 ± 15**	48 ± 8 **

N = 6 - 7 animals per group. ^aDI: Damage index - can range from 0 (completely undamaged, 100 cells x 0) to 400 (with maximum damage 100 x 4); ^bDF (%): Damage frequency - was calculated base on number of cells with tail versus those with no tail. ^cPC: positive control: cells of the peripheral blood from saline group treated ex vivo with H₂O₂ 0.20 mM. Significant difference: *p ≤ 0.05; **p ≤ 0.01 (ANOVA, Dunnett's test) in comparisons with saline group.

Table 2 Comet assay in the blood, brain and liver from mice treated by three days with AMA (15, 30 or 60 mg/kg) or saline and sacrificed on the fourth day.

Tissue	Group	^a DI	^b DF
Blood/ 53 h	Saline	6 ± 4	6 ± 4
	15 mg/kg	13 ± 4	11 ± 4
	30 mg/kg	11 ± 7	9 ± 6
	60 mg/kg	24 ± 19*	14,5 ± 9
	^c PC	176 ± 26**	49 ± 7**
Blood/ 72 h	Saline	4 ± 3,5	3 ± 3
	15 mg/kg	6 ± 5	6 ± 4
	30 mg/kg	4 ± 2	4 ± 2
	60 mg/kg	8 ± 3	7 ± 3
	^c PC	163 ± 16**	45 ± 5**
Brain/ 72 h	Saline	67 ± 21	40 ± 9
	15 mg/kg	84 ± 25	50 ± 12
	30 mg/kg	115 ± 8**	61 ± 7**
	60 mg/kg	145 ± 9**	76 ± 6**
	^c PC	342 ± 37**	89 ± 11**
Liver/ 72 h	Saline	104 ± 50	57 ± 24
	15 mg/kg	109 ± 34	62 ± 22
	30 mg/kg	115 ± 45	54 ± 14

60 mg/kg	221 ± 29**	81 ± 10*
^c PC	324 ± 33 **	94 ± 6**

N = 6 -7 animals per group. ^aDI: Damage index - can range from 0 (completely undamaged, 100 cells x 0) to 400 (with maximum damage 100 x 4); ^bDF (%): Damage frequency - was calculated base on number of cells with tail versus those with no tail. ^cPC: positive control: cells of the peripheral blood, brain or liver from saline group treated ex vivo with H₂O₂ 0.20 mM. Significant difference: *p≤ 0.05; **p≤ 0.01 (ANOVA, Dunnett's test) in comparisons with group saline.

Table 3 Micronucleus test in bone marrow of mice treated by three days with AMA (15, 30 or 60 mg/kg) or saline.

Group	Ratio (PCE/NCE)							
	Individual values						Per group (mean \pm SD)	
Saline	3.27	3.38	2.5	3.59	3.13	2.65	1.05	2.79 \pm 0.86
15 mg/kg	3.60	2.82	1.20	1.94	1.77	1.40	2.38	2.16 \pm 0.84
30 mg/kg	2.87	2.60	2.60	5.85	3.43	3.82	3.38	3.50 \pm 1.13
60 mg/kg	1.39	1.89	1.71	2.87	2.97	4.05	3.20	2.58 \pm 0.95
^a PC	0.75	0.79	0.47	1.29	2.49	-	-	1.16 \pm 0.80*
Micronucleated polychromatic erythrocytes in 2000 PCE								
Saline	1	1	1	1	1	2	1	1.14 \pm 0.37
15 mg/kg	2	2	1	1	1	1	1	1.28 \pm 0.48
30 mg/kg	2	2	2	1	1	1	1	1.43 \pm 0.53
60 mg/kg	3	2	1	2	1	2	1	1.71 \pm 0.76
PC	9	14	10	12	13	-	-	11.6 \pm 2.07**

^aPC: positive control, cyclophosphamide group (25 mg/kg treated by two days). N = 7 animals per group, except group treated with cyclophosphamide N = 5. Significant difference: * $p \leq 0.05$ (ANOVA, Dunnett's test) in comparisons with saline group.

IV - DISCUSSÃO

AMA foi utilizada inicialmente como antiviral, mas posteriormente destacou-se no tratamento da doença de Parkinson. Sua ação ainda não está bem estabelecida. Sabe-se que atua como antagonista dos receptores NMDA e age promovendo a síntese e liberação de dopamina no estriado, pois facilita a descarboxilação da L-Dopa, ou ainda, atua diminuindo a recaptção de dopamina na fenda sináptica, mas esta ação parece ser a menos relevante, já que esta interação com os receptores ocorreria somente em altas doses (KORNHUBER *et al.*, 1995; GORDON *et al.*, 1996; FISHER *et al.*, 2000; PAGE *et al.*, 2000; PEETERS *et al.*, 2002).

Apesar de ser um fármaco com ampla utilização terapêutica, há poucos relatos sobre possíveis efeitos genotóxicos, mutagênicos e mesmo o potencial neurotóxico de AMA. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da AMA no SNC, investigando o comportamento estereotipado, efeitos sobre memória e atividade genotóxica, incluindo possíveis danos ao DNA cerebral através do teste cometa.

Trabalhos em modelos animais mostram que a formação da memória envolve uma série de alterações bioquímicas em diversas áreas do SNC, entre as quais se destaca o hipocampo. Os eventos bioquímicos envolvidos na formação da memória incluem inicialmente, a ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e metabotrópicos (mGluRs), e a ativação de neurônios na cascata bioquímica (IZQUIERDO e MEDINA, 1997).

Memória de longa duração pode ser dividida em associativa e não-associativa, dependendo do mecanismo requerido para sua formação (IZQUIERDO e MEDINA, 1997). A retenção da memória de curta ou longa duração na tarefa de esquiiva inibitória pode melhorar ou piorar pela administração de substâncias, e os efeitos observados nos dois tipos de memória são independentes, por isso uma substância pode bloquear uma das memórias sem afetar a outra (IZQUIERDO, 1994, IZQUIERDO *et al.*, 1999; IZQUIERDO e MCGAUGH, 2000).

Alguns trabalhos têm descrito efeitos neurotóxicos de alguns antagonistas de receptores NMDA, como MK-801, PCP (fenciclidina) e óxido nitroso (OLNEY *et al.*, 1991). Em roedores estas drogas induzem alterações morfológicas e comportamentais dose-dependentes, como prejuízo no aprendizado, hiperlocomoção e ataxia (HESSELINK *et al.*,

1999). Estas drogas são antagonistas de receptores NMDA de alta afinidade, já AMA é um fármaco de baixa afinidade, por isso teria uma ação menor, porém com menos efeitos adversos. Estudos pré-clínicos têm mostrado que a administração de memantina, um análogo da AMA, atua como neuroprotetora contra lesões induzidas por agentes e proteção contra perda de memória (NAKAMURA *et al.*, 2006).

A tarefa de esquivar inibitória é um teste comportamental amplamente usado em estudos de efeitos de drogas sobre a memória associativa (IZQUIERDO e MEDINA, 1997). Neste teste observou-se que na dose de 15 mg/kg não houve prejuízo aparente da memória, o que sugere que esta concentração não afetou a aquisição da memória em camundongos. Já as doses mais altas de AMA (30 e 60 mg/kg) produziram um aumento no tempo de latência na sessão de treino indicando que a aprendizagem pode ter sido prejudicada no treino e conseqüentemente não houve aquisição de memória de curta e nem de longa duração na dose de 60 mg/kg. Na dose de 30 mg/kg aparentemente não houve prejuízo na STM e LTM (capítulo I, Fig 6).

FUJIWARA *et al.* (1985) investigaram o efeito da AMA nas doses de 50 e 80 mg/kg em ratos e camundongos. Os animais tratados com AMA 50 mg/kg tenderam a diminuir os movimentos e “rearings”, ocorrendo piloereção e irritabilidade. Na dose de 80 mg/kg houve prejuízo da coordenação motora nos ratos. No presente estudo, a maior dose de AMA utilizada (60 mg/kg) também causou diminuição de “rearings” além de “crossings” e de bolus fecais no campo aberto, comparados com o grupo salina, sugerindo diminuição da exploração, locomoção e ansiedade nos camundongos tratados com AMA.

No teste de habituação, realizado 24 h após o treino no campo aberto, não houve alteração significativa do número de “rearings” nos animais tratados com AMA 15 e 30 mg/kg (capítulo I, Fig. 5). Habituação a um novo ambiente é uma das mais elementares formas de aprendizagem não-associativa. A exposição repetida a um novo ambiente induz a uma redução do comportamento exploratório, que pode ser tomado como um índice de habituação (VIANNA *et al.*, 2000). Por isso, os animais que receberam apenas salina diminuíram o número de “rearings” na sessão teste em relação à sessão treino, sugerindo habituação. Os animais tratados com AMA 30 mg/kg aumentaram a atitude exploratória na sessão teste,

porém não suficiente para ser significativo em relação ao treino, o que pode indicar uma tendência ao prejuízo da habituação.

Já os animais que receberam a dose 60mg/kg, exploraram muito pouco o ambiente no campo aberto na sessão treino (Capítulo I, Fig. 4C), observados pelo baixo número de “rearings”, provavelmente devido ao prejuízo na locomoção dos animais provocado pela elevada dose de AMA. Posteriormente, na sessão teste realizado 24 h após (habituação), houve aumento significativo do número de “rearings” (capítulo I, Fig. 5) o que sugere que o prejuízo do comportamento exploratório na sessão treino possa estar levando a um prejuízo na habituação.

Estudos apontam que antagonistas de receptores NMDA podem prejudicar várias tarefas neurocomportamentais (MORRIS *et al.*, 1986; MISERENDINO *et al.*, 1990; IZQUIERDO *et al.*, 1997). Estudo similar foi realizado por STARR e STARR (1995), usando o teste de campo aberto com AMA (5-40 mg/kg), tendo como resultado a redução de locomoção e exploração.

TAHAR *et al.* (2005) investigaram a ação da AMA no processo de consolidação da memória em humanos. No estudo observou-se que receptores NMDA podem ser importantes no processo de aquisição da memória, mas talvez não seja essencial no processo de consolidação da memória.

Há estudos que mostram que a ativação de receptores NMDA é necessária para a indução de plasticidade neural e formação de memória, como algumas formas de potencialização de longo prazo são induzidas pela ativação de receptores NMDA. Por outro lado, longa ativação de receptores NMDA foi apontada em desempenhar um papel significativo nos déficits cognitivos (LIPTON, 2004). Portanto, glutamato em concentrações elevadas causa danos relacionados à neurodegeneração, como na doença de Alzheimer e Parkinson. Assim, o bloqueio de receptores de glutamato tipo NMDA pode ter ação neuroprotetora em modelos animais (OLNEY, 1991), diminuindo a neurodegeneração e deterioração cognitiva nestas patologias (DANYSZ e PARSONS, 2003; LIPTON, 2004).

Deve-se salientar que os animais utilizados neste estudo não foram tratados a fim de mimetizar doenças neurodegenerativas relacionadas a alterações do sistema glutamatérgico. Os prejuízos cognitivos observados neste estudo estão de acordo com estudos prévios onde

foram verificados déficits cognitivos após administração de doses elevadas de AMA (FUJIWARA *et al.*, 1985; STARR e STARR, 1995).

Comportamento estereotipado é frequentemente associado com doenças neuropsiquiátricas, como esquizofrenia e Parkinson, e pode ser induzida por algumas drogas como anfetamina e apomorfina (RIDLEY, 1994; GRUNBLATT *et al.*, 2001; PEETERS *et al.*, 2002). A intensidade da atividade locomotora e comportamento estereotipado obtido por drogas psicoestimulantes, como anfetamina e cocaína, e sua potência em produzir estes efeitos pode ser aumentada por exposição anterior de uma alta dose ou repetidas administrações destas drogas. Esta resposta de aumento é referida como sensibilização, e aparece por mudanças na via dopaminérgica mesolímbica e mesoestriatal. Ativação de receptores NMDA pode ser requerida para indução de mudanças na via dopaminérgica, para o desenvolvimento de sensibilização (WOLF *et al.*, 1998). Contudo não está clara a importância da ativação dos receptores NMDA na expressão de aumento de respostas de sensibilização em animais (BATTISTI *et al.*, 2000). Em vários estudos avaliando atividade locomotora ou respostas de estereotipismo, antagonistas de receptores NMDA não bloquearam a expressão de sensibilização de anfetamina e cocaína (KARLER *et al.*, 1990; WOLF *et al.*, 1998).

No nosso estudo, AMA induziu comportamento estereotipado (Fig. 7) significativo nas doses de 60 mg/kg nos três dias de administração e na dose de 15 mg/kg somente no terceiro dia, comparando com o grupo salina. Apomorfina foi usada como controle positivo, já que está bem documentada sua ação de induzir o comportamento estereotipado (DAVIES *et al.*, 1974; DALLEY *et al.*, 2002; GERMEYER *et al.*, 2002), sendo este observado nos três dias de teste.

Na dose de 15 mg/kg ocorreu um aumento deste comportamento entre o primeiro e o terceiro dia. Este aumento do comportamento estereotipado foi possivelmente devido à ação da AMA no sistema dopaminérgico, incluindo aumento da síntese e liberação de dopamina (RIDLEY, 1994; KORNHUBER *et al.*, 1995; GORDON *et al.*, 1996; PAGE *et al.*, 2000). Pode-se sugerir que nesta dose houve sensibilização de receptores dopaminérgicos, provocando um aumento de resposta comportamental. PEETERS *et al.* (2002) mostraram que a administração repetida de AMA (40 mg/kg) induziu uma modificação dos receptores de dopamina no estriado, sugerindo que estas alterações comportamentais possam estar

relacionadas à ativação de múltiplos sistemas bioquímicos. AMA na dose de 60 mg/kg reduziu o comportamento estereotipado do primeiro ao terceiro dia, sugerindo melhora neste comportamento, indicando que esta droga pode estar atuando em múltiplos sistemas de neurotransmissão, ou ainda, provocando um possível aumento da recaptção de dopamina como demonstrado em estudos anteriores (PAGE *et al.*, 2000). Na dose de 30 mg/kg não houve aumento nem diminuição significativa do comportamento estereotipado na comparação entre os três dias de teste, possivelmente por se tratar de uma dose intermediária.

Além da avaliação da ação comportamental da amantadina, avaliou-se neste trabalho também sua ação genotóxica, sendo este o primeiro a reportar os efeitos genotóxicos desta droga em camundongos. Utilizou-se como técnica para avaliação dos danos ao DNA o teste cometa, que é uma técnica que pode mensurar o efeito genotóxico em diversos tecidos (SINGH *et al.*, 1988; FAIRBAIRN *et al.*, 1995; LIU *et al.*, 2001).

Os animais foram tratados com AMA (15, 30 ou 60 mg/kg) ou salina por três dias consecutivos e sacrificados no quarto dia (Fig. 2, capítulo I). Foram observados danos ao DNA de sangue coletado 5 horas após a 1ª. administração de AMA nas doses 30 e 60 mg/kg, sugerindo efeito genotóxico. O mesmo ocorreu após 5 horas da 3ª. administração de AMA na dose 60 mg/kg. Porém, após 24 horas da 1ª. e da 3ª. administrações não houve aumento significativo de ID (índice de dano) ou DF (frequência de dano), indicando que os danos ao DNA do tecido sanguíneo foram reparados.

Estudos farmacocinéticos da AMA demonstraram que este fármaco é encontrado em concentrações maiores em tecidos do que no sangue e que sua excreção é feita em grande parte na forma não-metabolizada na urina, apesar de que pequenas quantidades de metabólitos acetilados podem ser detectadas na urina (DELEU *et al.*, 2002; GOODMAN e GILMAN, 2003; KORNHUBER *et al.*, 2006). Assim, outros tecidos podem ser mais suscetíveis à genotoxicidade da AMA do que o tecido sanguíneo.

Além do sangue, amostras de fígado e cérebro dos animais foram coletadas para avaliação genotóxica pelo teste cometa. No fígado, houve aumento significativo do DI e DF somente no grupo que recebeu a dose mais alta (60 mg/kg) por três dias consecutivos, sugerindo um possível efeito hepatotóxico direto de AMA, uma vez que esta é muito pouco metabolizada.

No tecido cerebral dos animais tratados com as doses 30 e 60 mg/kg por três dias, foi observado aumento significativo de DI e DF, indicando indução de danos ao DNA cerebral e possível efeito neurotóxico pelo tratamento com AMA. Efeito similar ocorreu nos animais tratados com apomorfina 20 mg/kg por três dias (dados não mostrados) o que causou danos ao DNA cerebral, porém foi reparado após 24h (PICADA *et al.*, 2003a). A medida de danos observada no tecido cerebral, induzidos por fármacos que agem no SNC, tem demonstrado ser muito apropriada para indicar neurotoxicidade, que pode ser associada a um prejuízo neurocomportamental (PEREIRA *et al.*, 2005).

KORNHUBER *et al.* (1999) demonstraram através de exames histológicos que AMA não foi capaz de induzir necrose em cérebro de humanos *pos mortem*. Não houve evidências clínicas de efeitos neurotóxicos ou danos irreversíveis no cérebro induzidos por AMA. Este resultado pode ser um indício de que poderia haver reparo ao DNA do tecido cerebral após o tratamento sistêmico com AMA, como ocorreu no DNA sangüíneo dos animais tratados.

Testes de mutagenicidade são importantes para estabelecer a segurança de novos produtos químicos. O teste de micronúcleo faz parte da bateria de testes de mutagenicidade requerido para o desenvolvimento de novas drogas (HAYASHI *et al.*, 1994; SASAKI *et al.*, 1999; VAN MIERT *et al.*, 2008). O aumento da frequência de micronúcleos pode ser devido à perda de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros, formando micronúcleos após a divisão celular. Assim, o teste de micronúcleos em medula óssea de camundongos é capaz de detectar atividades clastogênica e aneugênica induzidas por drogas (VAN MIERT *et al.*, 2008). Os resultados negativos para este teste suportam a conclusão de que a droga não é mutagênica *in vivo*, nas condições testadas (MACGREGOR *et al.*, 1987; MAVOURNIN *et al.*, 1990; HEDDLE *et al.*, 1991; HAYASHI *et al.*, 1994; NADIN *et al.*, 2001; PICADA *et al.*, 2003b).

Uma frequência de micronúcleos semelhante ao do controle negativo (salina) indicou que não houve indução de mutações cromossômicas por AMA em eritrócitos policromáticos da medula óssea (Tabela 3), sugerindo que esta droga não apresentou atividade mutagênica nas condições testadas. Observou-se também uma similar razão PCE/NCE em todos os grupos tratados com AMA, indicando que as doses não foram tóxicas para a medula óssea dos animais.

No teste cometa foi observado um aumento dos danos ao DNA sanguíneo em concentrações elevadas de amantadina (30 e 60 mg/kg), porém estes danos foram reparados. É possível que nos demais tecidos avaliados, os danos induzidos ao DNA por AMA possam ser passíveis de reparo. Além do mais, AMA não foi capaz de induzir mutação cromossômica, sugerindo que não houve fixação de possíveis danos às células da medula óssea dos animais.

O conjunto dos resultados indica que AMA na menor dose testada (15 mg/kg) não causou danos ao DNA e nem prejuízo na memória, locomoção, exploração e motivação, porém nas doses maiores (30 e 60 mg/kg) induziu danos ao DNA, inclusive no tecido cerebral, bem como alterações neurocomportamentais, sugerindo efeitos neurotóxicos.

V - CONCLUSÕES

1. Conclusão geral

Amantadina na dose de 15 mg/kg não afetou a memória tanto associativa (avaliada pelo teste de esQUIVA inibitória) como não-associativa (avaliado pelo teste de habituação) em camundongos. Porém na dose de 60 mg/kg houve prejuízo no desempenho comportamental. No teste de comportamento estereotipado observou-se aumento deste comportamento em baixa dose e diminuição em alta dose. Na dose de 30 e 60 mg/kg houve danos ao DNA (avaliados pelo teste cometa), mas não houve indução de mutações cromossômicas, pela avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos.

2. Conclusões específicas

- AMA 15 mg/kg não afetou a memória associativa e não-associativa.
- AMA 30 mg/kg, não afetou a locomoção ou exploração dos animais no campo aberto.
- AMA 60 mg/kg prejudicou a locomoção e exploração de camundongos no campo aberto. Assim, o teste de habituação foi prejudicado também.
- AMA 30 aumentou a latência no treino na tarefa de esQUIVA inibitória, contudo não afetou a retenção da STM ou LTM.
- AMA 60 mg/kg aumentou a latência no treino na tarefa de esQUIVA inibitória, provavelmente por efeitos neurotóxicos, prejudicando a retenção da STM e LTM.
- AMA 15 mg/kg induziu aumento do comportamento estereotipado do 1º ao 3º dia, indicando possível estimulação do sistema dopaminérgico e ainda sensibilização dos receptores. Já na dose de 60 mg/kg ocorreu diminuição do comportamento do 1º ao 3º dia, sugerindo melhora neste comportamento, indicando que esta droga pode estar atuando em múltiplos sistemas de neurotransmissão.

- AMA apresentou atividade genotóxica nas doses de 30 e 60 mg/kg para células do tecido cerebral de camundongos, avaliada pelo teste cometa.
- No fígado houve dano ao DNA somente na dose mais alta.
- Os danos ao DNA sanguíneo foram reparados.
- O teste de micronúcleo demonstrou que AMA não induziu mutação cromossômica nas condições testadas.

VI – PERSPECTIVAS

AMA exerce atividade sobre o SNC, sendo que poucos estudos são encontrados a respeito do seu potencial neurotóxico. Portanto, seria recomendável uma avaliação criteriosa do uso freqüente deste fármaco, devido aos possíveis efeitos genotóxicos, sendo necessários estudos adicionais a fim de confirmar sua total segurança.

As doses de AMA usadas neste estudo foram obtidas a partir da dose máxima tolerada em camundongos e objetivou verificar os efeitos da AMA no tratamento agudo em animais normais. Cabe salientar que essas doses alcançaram níveis superiores à dose terapêutica equivalente para humanos (posologia de 200 mg/dia em adulto de 70 kg, equivale a 3 mg/kg de peso corporal). Futuramente poderia ser verificado o efeito do tratamento crônico da AMA em animais normais na dose utilizada clinicamente.

Com o propósito de esclarecer os efeitos neurobiológicos da AMA, suas atividades poderiam ser adicionalmente estudadas em um modelo animal de Parkinson. Para uma melhor aproximação com o tratamento em humanos, os animais poderiam ser tratados continuamente com AMA, via oral, e nas doses equivalentes às utilizadas em pacientes com doença de Parkinson.

Além disso, pode-se testar este fármaco em outros modelos neurocomportamentais, como o modelo de reconhecimento de objetos.

Tendo em vista que AMA atua em múltiplos sistemas de neurotransmissão, outros estudos se fazem necessários a fim de esclarecer a ação desta droga, principalmente no sistema dopaminérgico.

Por fim, estudos para avaliação da atividade antígeno-tóxica poderiam ser incluídos, a fim de verificar se o fármaco apresenta alguma atividade neuroprotetora em modelos de animais normais ou com doença estabelecida.

VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOKI, F.Y., SITAR, D.S. Clinical pharmacokinetics of amantadine hydrochloride. *Clinical Pharmacokinetics*, v.14, p. 35-51, 1988.

BALDESSARINI, R.J., LIPINSKI, J.F., CHACE, K.V. Effects of amantadine hydrochloride on catecholamine metabolism in the brain of the rat. *Biochemical Pharmacology*, v. 21, p. 77, 1972.

BATISTI J.J., URETSKY N.J., WALLACE L.J. Importance of environmental context in the development of amphetamine – or apomorphine-induced stereotyped behavior after single and multiple dose. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, v. 66, p.671-677, 2000.

BEAR, M.F. *Neurociência: desvendando o sistema nervoso*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed: 2002.

BEDINGFIELD, J.B., CALDER, L.D., THAI, D.K., KARLER, R. The role of the striatum in the mouse in behavioral sensitization to amphetamine. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, v. 56, p. 305-310, 1997.

BLANCHET, P.J., METMAN, L.V., CHASE, T.N. Renaissance of amantadine in the treatment of Parkinson's disease. *Advances in Neurology*, v. 91, p. 251-257, 2003.

BLANPIED, T.A., BOECKMAN, F.A., AIZENMAN, E., JOHNSON, J.W. Trapping channel block of NMDA - activated responses by amantadine and memantine. *Journal of Neurophysiology*, v. 77, p. 309-323, 1997.

BOEIRA, J.M., SILVA J. DA, ERDTMANN B., HENRIQUES J.A.P. Genotoxic effects of the alkaloids harman and harmine assessed by Comet Assay and Chromosome Aberration Test in Mammalian Cells in vitro. *Pharmacology and Toxicology*, v. 89, p. 287-294, 2001.

BORMANN, J. Memantine is a potent blocker of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor channels. *European Journal of Pharmacology*, v. 166, p. 591-592, 1989.

BOULTON, A.A., EISENHOFER, G. Catecholamine metabolism: from molecular understanding to clinical diagnosis and treatment. *Advances in Pharmacology*, v. 42, p. 273-292, 1998.

BRAVI, D., MOURADIAN, M.M., ROBERTS, J.W., DAVIS, T.L., SOHN, Y.H., CHASE, T.N. Wearing-off fluctuations in Parkinson's disease: contribution of postsynaptic mechanisms. *Annals of Neurology*, v. 36, p. 27-31, 1994.

BROWN, F., REDFERN, P.H. Studies on the mechanism of action of amantadine. *British Journal of Pharmacology*, v. 58, p. 561-567, 1976.

CAHILL L., McGAUGH J.L., WEINBERGE N.M. The neurobiology of learning and memory: some reminders to remember. *Trends in Neurosciences*, v. 24, p. 578-581, 2001.

CANALES, J.J., GRAYBIEL, A.M. A measure of striatal function predicts motor stereotypy. *Nature Neuroscience*, v. 3, p. 377-383, 2000.

CARROLL, B.T., THOMAS, C., JAYANTI K. Amantadine and memantine in catatonic schizophrenia. *Annals of Clinical Psychiatry: Official Journal of the American Academy of Clinical Psychiatrists*, v.18, p.133-4, 2006.

CEPEDA, C., LEVINE, M.S. Dopamine and *N*-methyl-D-aspartate receptor interactions in the neostriatum. *Developmental Neuroscience*, v. 20, p. 1-18, 1998.

CHEN, K., KOKATE, T.G., DONEVAN, S.D., CARROLL, F.I., ROGAWSKI, M.A. Ibogaine block of the NMDA receptor: *in vitro* and *in vivo* studies. *Neuropharmacology*, v. 35, p. 423-431, 1996.

COLLINS, A., AI-GUO, M., DUTHIE, S.J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutation Research*, v. 336, p. 69-77, 1995.

COLLINS, A., DUSINSKA, M., FRANKLIN, M., SOMOROSVSKA, M., PETROVSKA, H., DUTHIE, S., FILLION, L., PANYIOTIDIS, M., RASLOVÁ, K., VAUGHAN, N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 30, p. 139-146, 1997.

DALLEY, J.W., CHUDASAMA, Y., THEOBALD, D.E., PETTIFER, C.L., FLETCHER, C.M., ROBBINS, T.W. Nucleus accumbens dopamine and discriminated approach learning: interactive effects of 6-hydroxydopamine lesions and systemic apomorphine administration. *Psychopharmacology*, v. 161, p. 425-433, 2002.

DANZSY, W., PARSONS, C.G. The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatological and neuroprotective treatment of Alzheimer's disease: preclinical evidence. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, v. 18, p. 23-32, 2003.

DANYSZ W., PARSONS C.G., MÖBIUS H.J. Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease a unified hypothesis on the mechanism of action. *Neurotoxicity Research*, v. 2, p.85-98, 2000.

DAVIES, W.L., GRUNERT, R.R., HAFF, R.F., McGAHEN, J.W., NEUMAYER, E.M., PAULSHOCK, M., WATTS, J.C., WOOD, T.R., HERMANN, E.C., HOFFMANN, C.E. Antiviral activity of 1-adamantanamine (amantadine). *Science*, v.144, p. 862-863, 1964.

DAVIES, J.A., JACKSON, B., REDFERN, P.H. The effect of amantadina, L-Dopa, (plus)-amphetamine and apomorphine on the acquisition of the conditioned avoidance response. *Neuropharmacology*, v. 13, p. 199-204, 1974.

DEARFIELD K.L., CIMINO M.C., MCCARROLL N.E., MAUER I., VALCOVIC L.R. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutation Research*, v. 521, p.121-135, 2002.

DELEU, D., NORTHWAY, M.G., HANSSENS, Y. Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of drugs used in the Treatment of Parkinson's Disease. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 41, p. 261-309, 2002.

DEUTSCHLANDER, A., ASMUS, F.; MARELLI, E.; KLOPSTOCK, T.; GASSER T.; BOTZEL, K. Excellent response to apomorphine in Parkinsonism with optic atrophy unresponsive to oral antiparkinsonian medication. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, v. 21, p. 1523-5, 2006.

DOLIN, R., REICHMANN, R.C., MADORE, H.P., MAYNARD, R., LINTON, R.N., WEBBER-JONES, J. A controlled trial of amantadine and rimantadine in the prophylaxis on influenza A infection. *The New England Journal of Medicine*, v. 307, p. 580-584, 1982.

DOUGLASS, B.G., WITKIN, J.M. Behavioral effects and anticonvulsant efficacies of low-affinity, uncompetitive NMDA antagonists in mice. *Psychopharmacology*, v. 146, p. 280-289, 1999.

DZIEDZICKA-WASYLEWSKA, M., FARON-GÓRECKA, A., ROGÓZ, Z., SOLICH, J. The effect of combined treatment with imipramine and amantadine on the behavioral reactivity of central alpha1-adrenergic system in rats. *Behavioural Pharmacology*, v. 15(2), p. 159-165, 2004.

FARBAIRN, D.W., OLIVE, P.L., O'NEILL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, v.339, p. 37-59, 1995.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*, v. 455, p. 81-95, 2000.

FERRAZ, H.B. Tratamento da doença de Parkinson. *Rev. Neurociências*, v.7(1), p. 6-12, 1999.

FISHER, K., CODERRE, T.J., HAGEN, N.A. Targeting the N-methyl-D-aspartate receptor for chronic pain management. Preclinical animal studies, recent clinical experience and future research directions. *Journal of Pain and Symptom Management*, v. 20, p. 358-373, 2000.

FLEMING, D.M. Managing influenza: amantadine, rimantadine and beyond. *International Journal of Clinical Practice*, v. 55, p. 189-195, 2001.

FREDRIKSSON, A., DANYSZ, W., QUACK, G., ARCHER, T. Co-administration of memantine and amantadine with sub/suprathreshold doses of L-Dopa restores motor behaviour of MPTP-treated mice. *Journal of Neural Transmission*, v. 108, p. 167-187, 2001.

FUJIWARA, M., SAKURAI, Y., KIYOTA, Y., SHIMAZOE, T., OHTA, H., SHIBATA, S., UEKI, S. Behavioral pharmacology of amantadine with special references to the effect on abnormal behavior in mice and rats. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, v. 85(4), p. 259-274, 1985.

GASIC, G. P. e HOLLMAN, M. Molecular neurobiology of glutamate receptors. *Annual Review of Physiology*, v. 54, p. 507-536, 1994.

GERMEYER S., BIRKE A., SCHMITT U., DAHMEN N., HIEMKE C., HAVEMANN-REINECKE U. New dopamine D2 receptor polymorphisms in rats and association with apomorphine- induced stereotypies. *Brain Research*, v. 926, p. 1-9, 2002.

GIANUTSOS, G., CHUTE, S., DUNN, J.P. Pharmacological changes in dopaminergic systems induced by long-term administration of amantadine. *European Journal of Pharmacology*, v. 110, p. 357-361, 1985.

GIRONELL, A., KULISEVSKY, J., PASCUAL-SEDANO, B., FLAMARICH D. Effect of amantadine in essential tremor: a randomized, placebo-controlled trial. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, v. 21, p. 441-5, 2006.

GOODMAN e GILMAN. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw- Hill. Cap.50 Antimicrobianos, p. 996-997 e 1446, 2003.

GORDON, I., WEIZMAN, R., REHAVI, M. Modulatory effect of agents active in the presynaptic dopaminergic system on the striatal dopamine transporter. *European Journal of Pharmacology*, v. 298, p. 27-30, 1996.

GREENAMYRE, J.T., O'BRIEN, C.F. N-methyl-D-aspartate antagonists in the treatment of Parkinson's disease. *Archives of Neurology*, v. 48, p. 977-981, 1991.

GRUNBLATT, E., MANDEL, S., MAOR, G., YOUDIM, M.B. Effects of R- and S-apomorphine on MPTP- induced nigro-striatal dopamine neuronal loss. *Journal of Neurochemistry*, v. 77, p.146-156, 2001.

GUALTIERI, T., CHANDLER, M., COONS, T.B., BROWN, L.T. Amantadine: a new clinical profile for traumatic brain injury. *Clinical Neuropharmacology*, v. 12, p. 258-270, 1989.

HARTMANN, A., AGURELL, E., BEEVERS, C., BRENDLER-SCHWAAB, S., BURLINSON, B., CLAY, P. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, v.18, p. 45-51, 2003.

HARTMANN, A., SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicology Letters*, v. 90, p. 183-188, 1997.

HAY, A.J. The action of adamantanamines against influenza A viruses: inhibition of the M2 ion channel protein. *Seminars in Virology*, v. 3, p. 21-30, 1992.

HAYASHI, M., HONMA, M. Evaluation of in vivo genotoxicity of chemicals- development and application of rodent micronucleus assay. *Kokuritsu Iyakuhiin Shokuhin Eisei Kenkyūjo hōkoku = Bulletin of National Institute of Health Sciences*, v. 125, p.17-34, 2007.

HAYASHI, M., TICE, R.R., MACGREGOR, J.T, ANDERSON, D., BLAKEY, D.H., KIRSCH-VOLDERS, M., OLESON, F.B. Jr, PACCHIEROTTI, F., ROMAGNA, F., SHIMADA, H., SUTOU, S., VANNIER B. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutation Research*, v. 312, p. 293-304, 1994.

HEDDLE, J.A., CIMINO, M.C., HAYASHI, M, ROMAGNA, F., SHELBY, M.D, TUCKER, J.D, VANPARYS, P.H., MACGREGOR, J.T. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 18, p.277-291, 1991.

HERBIN, W.F. Amantadine and catecholamine uptake. *Biochemical Pharmacology*, v. 21, p. 1993-1995, 1972.

HESSELINK, M.B., SMOLDERS, H., DE BOER, A.G., BREIMER, D.D., DANYSZ, W. Modifications of the behavioral profile of non-competitive NMDA receptor antagonists, memantine, amantadine and (+)MK-801 after chronic administration. *Behavioural Pharmacology*, v. 10(1), p. 85-98, 1999.

HIRSCH, E.C., GRAYBIEL, A.M., AJID, Y.A. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature*, v. 334, p. 345-348, 1988.

INZELBERG, R., BONUCCELLI, U., SCHECHTMAN, E., MINIOWICH, A., STRUGATSKY, R., CERAVOLO, R., LOGI, C., ROSSI, C., KLEIN, C., RABEY, J.M. Association between amantadine and the onset of dementia in Parkinson's disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, v. 21, p. 1375-9, 2006.

IZQUIERDO, I. Different forms os posttraining memory processing. *Behavioral and Neural Biology*, v. 51, p. 171-202, 1989.

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

IZQUIERDO, I. Pharmacological evidence for a role of long-term potentiation in memory. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 8, p. 1139-1145, 1994.

IZQUIERDO, I., BARROS, D.M., IZQUIERDO, L.A., SOUZA, M.M., SOUZA, T.M., MEDINA, J.H. Mechanisms for memory types differ. *Nature*, v. 393, p. 635-636, 1998a.

IZQUIERDO, I., McGAUGH, J.L. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behavioural Pharmacology*, v. 11, p. 517-534, 2000.

IZQUIERDO, I., MEDINA, J.H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 68, p. 285-316, 1997.

IZQUIERDO, I., MEDINA, J.H., IZQUIERDO, L.A., BARROS, D.M., SOUZA, M.M., SOUZA, T.M. Short- and long term memory are differentially regulated by monoaminergic systems in the rat brain. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 69, p. 219-224, 1998b.

IZQUIERDO, I., MEDINA, J.H., VIANNA, M.R.M., IZQUIERDO, L.A., BARROS, D.M. Separate mechanisms for short- and long- term memory. *Behavioural Brain Research*, v. 103, p. 1-11, 1999.

IZQUIERDO, I., QUILFELDT, J.A., ZANATTA, S., QUEVEDO, J., SCHAEFFER, E., SCHITZ, P.K., et al. Sequential role of hippocampus and amygdala entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *The European Journal of Neuroscience*, v. 9, p. 786-93, 1997.

KARLER, R., CHAUDHRY, I.A., CALDER, L.D., TURKANIS, S.A. Amphetamine behavioral sensitization and excitatory amino acid. *Brain Research*, v. 537, p. 76-82, 1990.

KEMP, B.A., GORA, M.L. Amantadine and fatigue of multiple sclerosis. *The Annals of Pharmacotherapy*, v. 27, p. 893-895, 1993.

KOLB, B., WHISHAW, I.Q. *Neurociência do comportamento*. 1 ed. Manole: São Paulo, 2002. Cap. 5, pg. 152-189.

KORNHUBER, J., BORMANN, J. HUBERS, M. RUSCHE, K. RIEDERER, P. Effects of the 1-amino-adamantanes at the MK-801-binding site of the NMDA-receptor-gated ion channel: a human postmortem brain study. *European Journal of Pharmacology*, v. 206, p. 297-300, 1991.

KORNHUBER, J., JELLINGE, K., WILTFANG, J., LEBLHUBER, F., RIEDERER, P. The N-methyl-D-aspartate receptor channel blocker amantadina does not cause histopathological alterations in human brain tissue. *Acta Neuropathologica*, v. 98, p. 85-90, 1999.

KORNHUBER, J., QUACK, G. Cerebrospinal fluid and serum concentrations of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist memantine in man. *Neuroscience Letters*, v. 195, p. 137-139, 1995.

KORNHUBER, J., QUACK, G., DANYSZ, W., JELLINGER, K., DANIELCZYK, W., GSELL, W., RIEDERER, P. Therapeutic Brain Concentration of the NMDA Receptor Antagonist Amantadine. *Neuropharmacology*, v. 34(7), p. 713-721, 1995.

KORNHUBER, J., RIEDERER, P., BLEICH, S., WILTFANG, J., KRAUS, T., MEINEKE, I. Pharmacokinetic characterization of amantadine in human brain tissue. *Therapeutic Drug Monitoring*, v. 28, p. 693-698, 2006.

KORNHUBER, J., WELLER, M., SCHOPPMAYER, K., RIEDERER, P. Amantadine and memantine are NMDA receptor antagonist with neuroprotective properties. *Journal of Neural Transmission Supplementum*, v. 43, p. 91-104, 1994.

KRAUS, M.F., SMITH, G.S., BUTTERS, M., DONNELL, A.J., DIXON, E., YILONG, C., MARION, D. Effects of the dopaminergic agent and NMDA receptor antagonist amantadine on cognitive function, cerebral glucose metabolism and D2 receptor availability in chronic traumatic brain injury: a study using positron emission tomography (PET). *Brain Injury*, v. 19(7), p. 471-9, 2005.

KRISHNA, G., HAYASHI, M. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research*, v. 455, p. 155-166, 2000.

KUBICHA, M.K., QUACK, G., DANYSZ, W. Amantadine attenuates response alterations resulting from repetitive L-DOPA treatment in rats. *Journal of Neural Transmission*, v. 105, p. 1229-1236, 1998.

LANNES, B., MICHELETTI, G. Sensitization of the striatal dopaminergic system induced by chronic administration of a glutamate antagonist in the rat. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 21, p. 417-424, 1997.

LIPTON, S.A. Paradigm shift in NMDA receptor antagonist drug development: molecular mechanism of uncompetitive inhibition by memantine in treatment of Alzheimer's disease and other neurologic disorders. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, v. 6, p. 61-74, 2004.

LIU, Z., MARTIN, L.J. Isolation of mature spinal motor neurons and single-cell analysis using the comet assay of early low-level DNA damage induced *in vitro* and *in vivo*. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, v. 49, p. 957-972, 2001.

LUPP, A., LUCKING, C.H., KOCH, R., JACKINSCH, R., FEUERSTEIN, T.J. Inhibitory effects of the antiparkinsonian drugs memantine and amantadine on *N*-methyl-D-aspartate-evoked acetylcholine release in the rabbit caudate nucleus *in vitro*. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 263, p. 717-724, 1992.

MACGREGOR, J.T., CASCIANO, D., MULLER, L. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. *Mutation Research*, v. 455, p. 3-20, 2000.

MACGREGOR, J.T., HEDDLE, J.A., HITE, M., MARGOLIN, B.H., RAMEL, C., SALAMONE, M.F., TICE, R.R., WILD, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutation Research*, v. 189, p. 103–112, 1987.

MACHADO, M.S., ROSA, R.M., DANTAS, A.S., REOLON, G.K., APPELT, H.R., BRAGA, A.L., HENRIQUES, J.A., ROESLER, R. An organic selenium compound attenuates apomorphine-induced stereotypy in mice. *Neuroscience Letters*, v. 410(3), p.198-202, 2006.

MARKOWITSCH, H. Varieties of memory: systems, structures, mechanisms of disturbance. *Neurol. Psychiatry Brain Research*, v. 5, p. 49-68, 1997.

MARTIN, L.J., LIU, Z. Injury-induced spinal motor neuron apoptosis is preceded by DNA single-strand breaks and is p53- and Bax- dependent. *Journal of Neurobiology*, v. 50, p. 181-97, 2002.

MARTINDALE. *The complet drug reference*. 32 ed. The pharmaceutical press, 1999. Cap Dopaminergics, p. 1128-1130.

MATTINGLY, B.A., GOTSICK, J.E., SALAMANCA, K. Latent sensitization to apomorphine following repeated low doses. *Behavioral Neuroscience*. v. 102, p. 553-558, 1988.

MAVOURNIN, K.H., BLAKEY, D.H., CIMINO, M.C., SALAM-ONE, M.F., HEDDLE, J.A. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. *Mutation Research*, v. 239, p.29–80, 1990.

McCULLOCH, J., IVERSEN, L.L. Autoradiographic assessment of the effects of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonists in vivo. *Neurochemical Research*., v. 16, p. 951-963, 1991.

MCEVOY, J.P., MCCUE, M., FRETER, S. Replacement of chronically administered anticholinergic drugs by amantadine in outpatient management of chronic schizophrenia. *Clinical Therapeutics*, v. 9(4), p. 429-433, 1987.

MEDINA, L.F.C. *Avaliação das atividades bioquímica e genotóxica de aminonaftoquinonas*. Porto Alegre, 2006. 86p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MEYTHALER, J.M., BRUNNER, R.C., JOHNSON, A., NOVACK, T.A. Amantadine to improve neurorecovery in traumatic brain injury-associated diffuse axonal injury: a pilot double-blind randomized trial. *The Journal of Head Trauma Rehabilitation*, v. 17, p. 300-313, 2002.

MICHELETTI, G., LANNES, B., WATER, J.M., ZWILLER, J. Evidence for NMDA/D2 receptor- receptor interactions in the rat striatum. *Advances in Neurology.*, v. 60, p. 128-258, 1993.

MISERENDINO, M.J.D., SANANES, C.B., MELIA, K.R., DAVIS, M. Blocking of acquisition but not expression of fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. *Nature*. 345, 716-718, 1990.

MIZOGUCHI, K., YAKOO, H., YOSHIDA, M. TANAKA, T., TANAKA, M. Amantadine increases the extracellular dopamine levels in the striatum by re-uptake inhibition and by N-methyl-D-aspartate antagonism. *Brain Research*, v. 31, p. 255-258, 1994.

MORESCO, R.M., VOLONTE, M.A., MESSA, C., GOBBO, C., GALLI, L., CARPINELLI, A., ROZZO, G., PANZACCHI, A., FRANCESCHI, M., FAZIO, F. New perspectives on neurochemical effects of amantadina in the brain of parkinsonian patients: a PET-^[11C]raclopride study. *Journal of Neural Transmission*, v. 109, p. 1265-1274, 2002.

MORRIS, R.G.M., ANDERSON, E., LYNCH, G.S., BAUDRY, M. Selective impairment of learning an blockade of long-term potentiation by as N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*, v. 319, p. 774-776, 1986.

MULLER, L. & SOFUNI, T. Appropriate levels of cytotoxicity for genotoxicity tests using mammalian cells in vitro. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 35, p. 202-205, 2000.

NADIN, S.B., VARGAS-ROIG, M.L., CIOCCA, D.R. A silver staining for single-cell gel assay. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, v. 49, p. 1183-1186, 2001.

NAKAMURA, S., MURAYAMA, N., NOSHITA, T., KATSURAGI, R., OHNO, T. Cognitive dysfunction induced by sequential injection of amyloid-beta and ibotenate into the bilateral hippocampus; protection by memantine and MK-801. *European Journal of Pharmacology*, v. 548(1-3), p. 115-122, 2006.

NICKELS, J.L., SCHNEIDER, W.N., DOMBOVY, M.L., WONG, T.M. Clinical use of amantadine in brain injury rehabilitation. *Brain Injury*, v. 8(8), p. 709-718, 1994.

OLNEY, J.W., LABRUYERE, J., WANG, G., WOZNIAK, D.F., PRICE, M.T., SESMA, M.A. NMDA antagonist neurotoxicity: mechanism and prevention. *Science*, v. 254, p. 1515-1518, 1991.

OWEN, J.C., WHITTON. P.S. Effects of amantadine and budipine on antidepressant drug-evoked changes in extracellular dopamine in the frontal cortex of freely moving rats. *Brain Research*, v. 1117(1), p.206-12, 2006.

PACI, C., THOMAS, A., ONOFRY, M. Amantadine for dyskinesia in patients affected by severe Parkinson's disease. *Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, v. 22, p. 75-76, 2001.

PAGE, G., PEETERS, M., MALOTEAUX, J.M., HERMANS, E. Increased dopamine uptake in striatal synaptosomes after treatment of rats with amantadine. *European journal of Pharmacology*, v. 403, p. 75-80, 2000.

PARSONS, C.G., DANYSZ, W., QUACK, G. Glutamate in CNS disorders as a target for drug development: an update. *Drug news and perspectives*, v. 11, p. 523-569, 1998.

PEETERS, M., PAGE, G., MALOTEAUX, J-M., HERMANS, E. Hypersensitivity of dopamine transmission in the rat striatum after treatment with the NMDA receptor antagonist amantadine. *Brain Research*, v. 949, p. 32-41, 2002.

PEREIRA, P., ARDENGHI, P., MELLO E SOUZA T., MEDINA, J.H., IZQUIERDO, I. Training in the step-down inhibitory avoidance task time-dependently increases cAMP-dependent protein kinase activity in the endocrinal cortex. *Behavioural Pharmacology*, v. 12, p. 1-4, 2001.

PEREIRA, P., TYSCA, D., OLIVEIRA, P., BRUM, L.F. DA SILVA, PICADA, J.N., Ardenghi, P. Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 52, 199-203, 2005.

PEREIRA, P., VIANA, C.C.S., OLIVEIRA, P.A., BRUM, L.F.DA S., PICADA, N.P. Gamma-decanolactone effect on behavioral and genotoxic parameters. *Life Sciences*, v. 80, p. 1014-1019, 2007.

PICADA, J.N., DA SILVA, K.V., ERDTMANN, B., HENRIQUES, A.T., HENRIQUES, J.A. Genotoxic effects of structurally related beta-carboline alkaloids. *Mutation Research*, v. 379, p. 135-149, 1997.

PICADA, J.N., FLORES, D.G., ZETTLER, C.G., MARRONI, N.P., ROESLER, R., HENRIQUES, J.A.P. DNA damage in brain cells of mice treated with an oxidized form of apomorphine. *Molecular Brain Research*, v. 114, p.80-85, 2003a.

PICADA, J.N., HENRIQUES, J.A.P., ROESLER, R. An oxidized form of apomorphine fails to induce stereotypy. *Schizophrenia Research*, v. 63 (1-2), p. 199-200, 2003b.

PICADA, J.N., SCHRÖDER, N., IZQUIERDO, I., HENRIQUES, J.A.P., ROESLER, R. Differential neurobehavioral deficits induced by apomorphine and its oxidation product, 8-oxo-apomorphine-semiquinone, in rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 443 (1-3), p. 105-111, 2002.

PINTER, M.M., BIRK, M., HELSCHER, R.J., BINDER, H. Short-term effect of amantadine sulphate on motor performance and reaction time in patients with idiopathic Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*, v. 106, p. 711-724, 1999.

POWELL, S.B., NEWMAN, H.A., PENDERGAST, J.F., LEWIS, M.H. A rodent model of spontaneous stereotypy: initial characterization of developmental, environmental, and neurobiological factors. *Physiology and Behavior*, v. 66, p. 355-363, 1999.

PRESTI, M.F., MIKES, H.M., LEWIS, M.H. Selective blockade of spontaneous motor stereotypy via intrastriatal pharmacological manipulation. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, v. 74, p. 833-839, 2003.

PRESTI, M.F., POWELL, S.B., LEWIS, M.H. Dissociation between spontaneously emitted and apomorphine-induced stereotypy in *Peromyscus maniculatus bairdii*. *Physiology and Behavior*, v. 75, p. 347-353, 2002.

PRESTI, M.F., WATSON, C.J., KENNEDY, R.T., YANG, M., LEWIS, M.H. Behavior-related alterations of striatal neurochemistry in a mouse model of stereotyped movement disorder. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, v. 77, p. 501-507, 2004.

REIS, J., JOHN, D., HEIMEROOTH, A., MUELLER, H.H., OVERTHEL, W.H., ARNDT, T., ROSENOW, F. Modulation of human motor cortex excitability by single doses of amantadine. *Neuropsychopharmacology*, v. 31(12), p. 2758-2766, 2006.

RÉUS, G.Z., VALVASSORI, S.S., MACHADO, R.A., MARTINS, M.R., GAVIOLI, E.C., QUEVEDO, J. Acute treatment with low doses of memantine does not impair aversive, non-associative and recognition memory in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 376(5), p. 295-300, 2008.

RIDLEY, R.M. The psychology of perseverative and stereotyped behaviour. *Progress in Neurobiology*, v. 44, p. 221-231, 1994.

RIBEIRO, L.R., SALVADORI, D.M.F., MARQUES, E.K. *Mutagênese ambiental*. Canoas: Ed. ULBRA, 2003. Cap. 7 (Teste micronúcleo), pg. 173-200, Cap. 10 (Teste Cometa), pg 247-279.

ROESLER, R., VIANNA, M.R.M., LARA, D.R., IZQUIERDO, I., SCHMIDT, A.P., SOUZA, D.O. Guanosine impairs inhibitory avoidance performance in rats. *Neuroreport*, v.11, p. 2537-2540, 2000.

ROESLER, R., VIANNA, M., SANT' ANNA, M.K., KUYVEN, C.R., KRUEL, A.V.S., QUEVEDO, J., FERREIRA, M.B.C. Intrahippocampal infusion of the NMDA receptor antagonist AP5 impairs retention of an inhibitory avoidance task: protection from impairment by pretraining or preexposure to the task apparatus. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 69, p. 87-91, 1998.

ROGAWSKI, M.A. Therapeutic potential of excitatory amino acid antagonists: channel blockers and 2,3-benzodiazepines. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 14, p. 325-331, 1993.

ROGÓZ, Z., SKUZA, G., MAJ, J., DANYSZ, W. Synergistic effect of uncompetitive NMDA receptor antagonists and antidepressant drugs in the forced swimming test in rats. *Neuropharmacology*, v. 42, p. 1024-1030, 2002.

ROGÓZ, Z., SKUZA, G., DANIEL, W.A., WÓJCIKOWSKI, J., DUDEK, D., WRÓBEL, A. Amantadine as an additive treatment in patients suffering from drug-resistant unipolar depression. *Pharmacological Reports*, v. 59(6), p. 778-784, 2007.

ROIN, S., WINTERS, S. Amantadine Hydrochloride: current and new uses. *Journal Neuroscience Nursing*, v. 22(5), p. 322-325, 1990.

SALAMONE, M.F., MAVOURNIN, K.H. Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 23, p. 239-273, 1994.

SASAKI, Y.F., FUJIKAWA, K., ISHIDA, K., KAWAMURA, N., NISHIKAWA, Y., OHTA, S., SATOH, M., MADARAME, H., UENO, S., SUSAN, N., MATSUSAKA, N., TSUDA, S. The alkaline single cell gel electrophoresis assay with mouse multiple organs: results with 30 aromatic amines evaluated by the IARC and U.S. NTP. *Mutation Research*, v. 440, p. 1-18, 1999.

SASAKI, Y.F., SAGA, A., AKASAKA, M., ISHIBASHI, S., YOSHIDA, K., SU, Y.Q., MATSUSAKA, N., TSUDA, S. Detection of in vivo genotoxicity of haloalkanes and haloalkenes carcinogenic to rodents by the alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay in multiple mouse organs. *Mutation Research*, v. 419, p. 13-20, 1998.

SAUVAIGO, S., SERRES, C., SIGNORINI, N., EMONET, N., RICHARD, M.J., CADET, J. Use of the single-cell gel electrophoresis assay for the immunofluorescent detection of specific DNA damage. *Analytical Biochemistry*, v.259, p.1-7, 1998.

SCHWAB, R.S., ENGLAND, Jr A.C., POSKANZER, D.C., YOUNG, R.R. Amantadine in the treatment of Parkinson's disease. *JAMA: the Journal of the American Medical Association*, v. 208, pg. 1168-1170, 1969.

SEGOVIA, G., PORRAS, A., DEL ARCO, A., MORA, F. Glutamatergic transmission in aging: a critical perspective. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 122, p. 1-29, 2001.

SEKIHASHI, K., YAMAMOTO, A., MATSUMURA, Y., UENO, S., WATANABE-AKANUMA, M., KASSIE, F., KNASMULLER, S., TSUDA, S., SASAKI, Y.F. Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay. *Mutation Research*, v. 517, p. 53-75, 2002.

SHEN, S., COOLEY, D.M., GLICKMAN, L.T., GLICKMAN, N., WATERS, D.J. Reduction in DNA damage in brain and peripheral blood lymphocytes of elderly dogs after treatment with dehydroepiandrosterone (DHEA). *Mutation Research*, v. 480-481, p.153-162, 2001.

SHIH, M.C., AMARO, E.J., FERRA, H.B., HOEXTER, M.Q., GOULART, F.O., WAGNER, J., LIN, F.L., FU, Y.K., MARI, J.J., LACERDA, A.L.T., TUFIK, S., BRESSAN, R.A. Neuroimagem do transportador de dopamina na doença de Parkinson. *Arquivos de Neuro-psiquiatria*, v. 64(3-A), p. 628-634, 2006.

SILVA, J. DA, DE FREITAS, T.R.O., HEUSER, V., MARINHO, J.R., BITTENCOURT, F., CERSKI, C.T.S., KLIEMANN, L.M., ERDTMANN, B. Effects of chronic exposure to coal in wild rodents (*Ctenomys torquatus*) evaluated by multiple methods and tissues. *Mutation Research*, v. 470, p. 39-51, 2000.

SILVA, J. DA, ERDTMANN, B., HENRIQUES, J.A.P. *Genética toxicological*. Porto Alegre: Alcance, 2003. Cap. Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental, pg. 160.

SINGH, N.P. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutation Research*, v.455, p. 111-127, 2000.

SINGH, N.P., MCCOY, M.T., TICE, R.R., SCHEIDER, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, v. 175, p. 184-191, 1988.

SINGH, N.P., TICE, R.R., SCHNEIDER, E.L. A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. *Mutation Research*, v. 252, p. 289-296, 1991.

SMITH, C.C., ADKINS, D.J., MARTIN, E.A., O'DONOVAN, M.R. Recommendations for design of the rat comet assay. *Mutagenesis*, v. 23 (3), p. 233-240, 2008.

SNOW, B.J., MAC, D.L., MCAULEY, D., WALLIS, W. The effect of amantadine on levodopa- induced dyskinesias in Parkinson's disease: a double blind, placebo- controlled study. *Clinical neuropharmacology*, v. 23, p. 82-85, 2000.

SPEIT G., HARTMANN, A. The comet assay (single-cell gel test): a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *DNA Repair Protocols*. v. 113, p. 203-212, 1999.

STARR, M.S., STARR, B.S. Locomotor effects of amantadina in the mouse are not those of a typical glutamate antagonist. *Journal of Neural Transmission. Parkinson's disease and dementia section*, v. 9(1), p. 31-43, 1995.

STORCH, A., LUDOLPH, A.C., SCHWARZ, J. Dopamine transporter: involvement in selective dopaminergic neurotoxicity and degeneration. *Journal of Neural Transmission*, v. 111, p. 1267-1286, 2004.

TAKAHASHI, T., YAMASHITA, H., ZHANG, Y-X., NAKAMURA, S. Inhibitory effect of MK-801 on amantadine-induced dopamine release in the rat striatum. *Brain Research Bulletin*, v. 41, p. 363-367, 1996.

TAHAR, A.H., BLANCHET, P.J., DOYON, J. Motor-learning impairment by Amantadine in Healthy volunteers. *Neuropsychopharmacol*, v. 29, p. 187-194, 2004.

TAHAR, A.H., BLANCHET, P.J., DOYON, J. Effect of amantadine on motor memory consolidation in humans. *Behavioural Pharmacology*, v. 16(2), p. 107-112, 2005.

TICE, R.R., AGURELL, E., ANDERSON, D., BURLINSON, B., HARTMANN, A, KOBAYASHI, H., MIYAMAE, Y., ROJAS, E., RYU, J.-C., SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 35, p. 206-221, 2000.

TICE, R.R., HAYASHI, M., MACGREGOR, J.T., ANDERSON, D., BLAKEY, D., HOLDE, H.E., KIRSCH- VILDERS, M., OLESON Jr, F.B., PACCHIEROTTI, F., PRESTON, R.J., ROMAGNA, R., SHIMADA, H., SUTOU, S. & VANNIER, B. Report from working group on the in vivo mammalian bone marrow chromosomal aberration test. *Mutation Research*, v.312, p. 305-312, 1994.

THOMPSON, R.F., KIM J.J. Memory systems in the brain and localization of a memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 93, p. 13438- 13444, 1996.

TOIDE, K. Effects of amantadine on dopaminergic neurons in discrete regions of the rat brain. *Pharmaceutical Research*, v. 7, p. 670-672, 1990.

VALVERDE, M., FORTOUL, T.I., DIAZ-BARRIGA, F., MEJIA, J., DEL CASTILLO, E.R. Genotoxicity induced in CD-1 mice by inhaled lead: differential organ response. *Mutagenesis*, v. 17, p. 55-61, 2002.

VAN MIERT, E., VANSCHEEUWIJCK, P., MEURENS, K., GOMM, W., TERPSTRA, PM. Evaluation of the micronucleus assay in bone marrow and peripheral blood of rats for the determination of cigarette mainstream-smoke activity. *Mutation Research*, v. 652(2), p.131-8, 2008.

VERCELINO, R., TIEPPO, J., DIAS, A.S., MARRONI, C.A., GARCIA, E., MEURER, L., PICADA, J.N., MARRONI, N.P. N-acetylcysteine effects on genotoxic and oxidative stress parameters in cirrhotic rats with hepatopulmonary syndrome. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, v. 102 (4), p. 370-6, 2008.

VERHAGEN, M.L., MORRIS, M.J., FARMER, C., GILLESPIE, M., MOSBY, K., WUU, J. *et al.* Huntington's disease: a randomized, controlled trial using the NMDA-antagonist amantadine. *Neurology*, v. 59, p. 694-699, 2002.

VIANNA, M.R., ALONSO, M., VIOLA, H., QUEVEDO, J., de PARIS, F., FURMAN, M., de STEIN, M.L., MEDINA, J.H., IZQUIERDO, I. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learning and Memory*, v. 7, p. 333-340, 2000.

WANDINGER, K.P., HAGENAH, J.M., KLÜTER, H., ROTHERMUNDT, M., PETERS, M., VIEREGGE, P. Effects of amantadine treatment on in vitro production of interleukin-2 in de-novo patients with idiopathic Parkinson's disease. *Journal of Neuroimmunology*, v. 98, p. 214-220, 1999.

WATERS, M.D., STACK, H.F., JACKSON, M.A. Genetic toxicology data in the evaluation of potential human environmental carcinogens. *Mutation Research*, v. 437, p. 21-49, 1999.

WOLF, M.E. The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants. *Progress in Neurobiology*, v. 54, p. 679-720, 1998.

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](#)