

KARLA DE MICHELIS MOGRABI

**EFEITO DE DOIS ANTAGONISTAS DO RECEPTOR GABA_a, APLICADOS VIA
INTRAPERITONEAL, NAS ALTERAÇÕES DO COMPORTAMENTO MOTOR
INDUZIDAS POR INIBIÇÃO DE RECEPTORES DE DOPAMINA**

CAMPO GRANDE

2015

KARLA DE MICHELIS MOGRABI

**EFEITO DE DOIS ANTAGONISTAS DO RECEPTOR GABA_a, APLICADOS VIA
INTRAPERITONEAL, NAS ALTERAÇÕES DO COMPORTAMENTO MOTOR
INDUZIDAS POR INIBIÇÃO DE RECEPTORES DE DOPAMINA**

Dissertação apresentada como exigência para a obtenção do título de mestre em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a orientação do Prof. Dr. Albert Schiaveto de Souza.

CAMPO GRANDE

2015

KARLA DE MICHELIS MOGRABI

**EFEITO DE DOIS ANTAGONISTAS DO RECEPTOR GABA_a, APLICADOS VIA
INTRAPERITONEAL, NAS ALTERAÇÕES DO COMPORTAMENTO MOTOR
INDUZIDAS POR INIBIÇÃO DE RECEPTORES DE DOPAMINA**

Dissertação apresentada como exigência para a obtenção do título de mestre em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a orientação do Prof. Dr. Albert Schiaveto de Souza.

A banca examinadora atribuiu ao candidato o conceito _____.

Campo Grande, de de 2015.

BANCA EXAMINADORA

NOTA/CONCEITO

Professor Doutor Albert Schiaveto de Souza

Professor Doutor Cristiano Marcelo Espinola Carvalho

Professora Doutora Fátima del Fava

Professora Doutora Maria Araújo Teixeira

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, a Deus, que me permitiu a oportunidade de realizar o Mestrado, mesmo eu postergando sua realização. Ele me trouxe de volta a Campo Grande e me colocou em contato com meu orientador. Também, queria agradecer minha família pelo apoio, paciência e compreensão durante esses dois anos, me incentivando para que eu pudesse me dedicar ao máximo. Não posso deixar de agradecer aos meus chefes, tanto do HRMS, quanto da UNAES, por permitirem algumas adaptações nos meus horários de serviço para que eu pudesse concluir as exigências do programa para defender minha dissertação.

Igualmente, preciso agradecer ao Ricardo Saravy, também mestrando, ao técnico do laboratório, Luis, e aos alunos da graduação do curso de Fisioterapia da UFMS, Carol, Jainny e Patrick que me ajudaram muito durante minha coleta de dados, sem os quais seria muito mais difícil a sua realização.

Por fim, mas não menos importante, quero agradecer ao meu orientador Professor Albert, que mesmo tendo várias atribuições, dedicou um pouco do seu tempo a me auxiliar nessa empreitada e se tornou um grande amigo.

RESUMO

Os principais sintomas observados na doença de Parkinson (DP) são ocasionados por morte dos neurônios dopaminérgicos da substância negra. O tratamento atual da DP é bastante eficaz nos estágios iniciais da doença, mas não altera sua progressão e ainda promovem efeitos colaterais. Outros neurotransmissores, além da dopamina, parecem estar envolvidos na fisiopatologia desta doença, assim, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito de dois antagonistas do receptor GABA_A, aplicados via intraperitoneal, no comportamento motor, em um modelo animal da doença de Parkinson, induzido por inibição de receptores de dopamina. Foram utilizados 96 camundongos Suíços, machos, pesando entre 30 e 40 gramas. O bloqueio de receptores de dopamina com Haloperidol foi utilizado como modelo farmacológico da doença de Parkinson, sendo que os antagonistas de receptores GABA_A, Bicuculina (1 e 5 mg/Kg) e Flumazenil (3 e 6 mg/Kg), foram utilizados para a avaliação da interação entre estes neurotransmissores, neste modelo da DP. O comportamento motor dos animais foi avaliado por meio do teste de catalepsia (30, 60 e 90 minutos após a aplicação das drogas), pelo teste do campo aberto (após 60 minutos) e pela avaliação funcional da marcha (após 60 minutos). Tanto a Bicuculina como o Flumazenil foram capazes de reverter parcialmente a catalepsia induzida por Haloperidol. No teste do campo aberto o Haloperidol reduziu o número de explorações horizontais e verticais dos animais, que não foi revertido pela aplicação dos antagonistas de GABA_A. Já a avaliação funcional da marcha não se mostrou sensível o suficiente para detectar as alterações motoras neste modelo animal da DP. Assim, nossos resultados sugerem que há uma interação entre dopamina e GABA nos núcleos da base do encéfalo e que o bloqueio de receptores GABA_A possui um potencial terapêutico no tratamento da DP.

Palavras-chaves: GABA. Catalepsia. Bicuculina. Flumazenil.

ABSTRACT

The main symptoms observed in Parkinson's disease (PD) are caused by the death of dopaminergic neurons of the substantia nigra. The current treatment of PD is very effective in initial stages, but it doesn't change its progression and yet promote adverse effects. Others neurotransmitters, besides dopamine, seem to be involved in the pathophysiology of PD, thus, this study aimed to evaluate the effect of two receptor GABA_A antagonists, applied intraperitoneally, in motor behavior in an animal model of the Parkinson's disease, induced inhibition of dopaminergic receptor. 96 male, Swiss mice were used, weighing between 30 and 40 grams. The blockade of dopaminergic receptor with Haloperidol was used as pharmacologic model of Parkinson's disease, and the GABA_A receptors antagonists Bicuculline (1 and 5 mg/Kg) and Flumazenil (3 and 6mg/Kg) were used for assessment of the interaction among these neurotransmitters, in this PD model. The motor behavior of the animals was evaluated by the catalepsy test (30, 60 and 90 minutes after drugs application), by open field test (after 60 minutes) and by functional gait assessment (after 60 minutes). Both Bicuculline and Flumazenil were able to partially reverse catalepsy induced by Haloperidol. In the open field test Haloperidol reduced the number of horizontal and vertical exploration of the animals, which was not reversed by application of GABA_A antagonists. Already the functional gait assessment was not sensitive enough to detect motor changes in this animal model of PD. Thus, our results suggest that there is an interaction between dopamine and GABA in the basal ganglia and the blocking GABA_A receptors have therapeutic potential in the treatment of PD.

Keywords: GABA. Catalepsy. Bicuculline. Flumazenil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema ilustrando a formação dos grupos nos dois Experimentos.....	23
Figura 2 – Foto ilustrando o método da barra para avaliar o tempo de catalepsia....	25
Figura 3 – Foto ilustrando o teste do campo aberto.....	26
Figura 4 – Ilustração da mensuração dos parâmetros avaliados na avaliação funcional da marcha.....	28
Figura 5 – Gráfico referente ao tempo de catalepsia em cada grupo experimental, em cada momento de realização do teste, no Experimento I.....	32
Figura 6 – Figura 6 – Gráfico referente à exploração horizontal e vertical no teste do campo aberto em cada grupo experimental do Experimento I.....	34
Figura 7 – Gráfico referente ao tempo de catalepsia em cada grupo experimental, em cada momento de realização do teste, no Experimento II.....	37
Figura 8 – Gráfico referente à exploração horizontal e vertical no teste do campo aberto em cada grupo experimental do Experimento II.....	39
Figura 9 – Gráfico referente ao comprimento do passo em cada grupo no Experimento II.....	41
Figura 10 – Gráfico referente ao desvio ântero-posterior em cada grupo no Experimento II.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados referentes ao tempo de catalepsia nos momentos 30, 60 e 90 minutos após a aplicação das drogas, em cada um dos grupos experimentais do Experimento I.....	32
Tabela 2 - Resultados referentes à exploração horizontal e vertical no campo aberto, em cada grupo experimental do Experimento I.....	33
Tabela 3 - Resultados referentes à avaliação funcional da marcha, em cada grupo experimental do Experimento I.....	35
Tabela 4 - Resultados referentes ao tempo de catalepsia nos momentos 30, 60 e 90 minutos após a aplicação das drogas, em cada um dos grupos experimentais do Experimento II.....	37
Tabela 5 - Resultados referentes à exploração horizontal e vertical no campo aberto, em cada grupo experimental do Experimento II.....	38
Tabela 6 - Resultados referentes à avaliação funcional da marcha, em cada grupo experimental do Experimento II.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT - serotonina

6-OHDA – 6-hydroxydopamina

BZD - benzodiazepínico

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

cm - centímetro

cm² – centímetro ao quadrado

Cl⁻ - cloreto

DP – doença de Parkinson

GABA – ácido gama-amino butírico

GAD - ácido glutâmico decarboxylase

i.p. - intraperitoneal

Kg - quilograma

L-DOPA - Levodopa

mg - miligrama

n – número/quantidade

SNC – Sistema Nervoso Central

UFMS – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	11
2.0 REVISÃO DE LITERATURA	13
3.0 OBJETIVOS	20
3.1 Geral	20
3.2 Específicos	20
4.0 METODOLOGIA	21
4.1 Animais	21
4.2 Drogas	21
4.3 Via de administração das drogas	22
4.4 Experimentos e grupos experimentais	22
<u>4.4.1 Experimento I</u>	22
<u>4.4.2 Experimento II</u>	23
4.5 Avaliação funcional dos animais	24
<u>4.5.1 Teste de catalepsia na barra</u>	24
<u>4.5.2 Teste do campo aberto</u>	25
<u>4.5.3 Avaliação funcional da marcha</u>	26
4.6 Descarte dos animais	28
4.7 Análise estatística	29
4.8 Aspectos éticos	29
5.0 RESULTADOS	30
5.1 Experimento I	30
<u>5.1.1 Catalepsia</u>	30
5.1.1.1 Comparação entre os momentos	30
5.1.1.2 Comparação entre os grupos	30
<u>5.1.2 Campo aberto</u>	33
<u>5.1.3 Análise funcional da marcha</u>	34
5.2 Experimento II	35
<u>5.2.1 Catalepsia</u>	35
5.2.1.1 Comparação entre os momentos	35
5.2.1.2 Comparação entre os grupos	36
<u>5.2.2 Campo aberto</u>	38

<u>5.2.3 Análise funcional da marcha</u>	39
5.2.3.1 Base de sustentação.....	39
5.2.3.2 Comprimento do passo.....	40
5.2.3.3 Desvio látero-lateral.....	40
5.2.3.4 Desvio ântero-posterior.....	40
6.0 DISCUSSÃO	43
7.0 CONCLUSÃO	47
8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXO A	56

1.0 INTRODUÇÃO

A morte de neurônios dopaminérgicos da substância negra leva a uma alteração da função motora extrapiramidal, denominada doença de Parkinson (DP). Com isso a reposição dopaminérgica é utilizada como principal tratamento na DP, com o objetivo de amenizar as alterações desta neurotransmissão na via nigro-estriatal (JANKOVIC, 2002; OBESO; OLANOW; NUTT, 2000; QUINN, 1998).

Atualmente, o tratamento medicamentoso da DP é realizado com agonistas de dopamina e Levodopa (L-dopa). Estas drogas são bastante eficazes nos estágios iniciais da doença, tratando os sintomas neuromotores, porém não altera sua progressão. E ainda provocam efeitos adversos, tais como: náusea, vômito e hipotensão, além de complicações motoras a longo prazo. Assim, é necessário que se desenvolvam novas drogas capazes de agir adequadamente em todas as fases da doença, diminuindo o risco de aparecimento de movimentos involuntários (JENNER, 2003).

O principal neurotransmissor inibitório no Sistema Nervoso Central é o ácido γ -amino butírico (GABA). Ele é mediado por receptores ionotrópicos ou metabotrópicos, situados pré ou pós-sinapticamente (OWENS; KRIGSTEIN, 2002). Um dos receptores ionotrópicos mais conhecidos dentro da circuitaria dos núcleos da base é chamado de receptor GABA_A. Seu efeito inibitório se dá por meio do aumento da condutância de cloreto (Cl⁻) (IACONO; ALTAFINI; TORRE, 2013). Esses receptores são constituídos por uma combinação de 8 subunidades: α (1-6), β (1-3), γ (1-3), δ , ϵ , θ , π , e ρ (1-3) (JACOB *et al.*, 2012). A composição mais importante nos seres humanos é $\alpha 1 \beta 2 \gamma 2$, onde o GABA se liga entre $\alpha 1$ e $\beta 2$ (BERGMANN *et al.*, 2013).

Cheng e Yung (2004) publicaram uma revisão de literatura onde relataram que a diminuição de dopamina liberada pela substância negra *pars compacta* aumenta a atividade GABAérgica estriadopalidal que, por sua vez, reduz o disparo espontâneo do globo pálido e modifica seu padrão, contribuindo para os sintomas hipocinéticos da DP. Deste modo, a inibição desta via, através do receptor GABA_A, localizado no globo pálido, poderia aliviar estes sintomas. Desta forma evidencia-se uma relação direta entre o receptor GABA_A e a DP.

Nenhum estudo, ainda, correlacionou o bloqueio dos receptores GABA_A, com os sinais e sintomas motores da DP. Assim, neste trabalho nos propusemos a testar o efeito de dois antagonistas do receptor GABA_A - Bicuculina e Flumazenil, aplicados por via intraperitoneal, na catalepsia induzida por inibidores de dopamina. Além disso, estudamos as possíveis modificações no comportamento motor decorrentes da interação destes neurotransmissores, por meio do teste do campo aberto, e alterações na marcha, através do teste funcional de marcha.

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

Os núcleos da base são um grupo de núcleos envolvidos no controle de movimentos, funções associativas, cognitivas e mnemônicas. Seu papel principal é transmitir sinais corticais e modificar a função cerebral, integrando informações sensoriomotora, associativa e límbica na produção de comportamentos contexto dependentes (BOLAM *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2014; NELSON; KREITZER, 2014)

Os núcleos que participam da circuitaria são o estriado (caudado e putâmen), globo pálido (segmentos interno e externo), núcleo subtalâmico e substância negra (*pars reticulada* e *pars compacta*). O principal núcleo de entrada é o estriado, e os núcleos de saída são globo pálido interno e a substância negra *pars reticulada* (BOLAM *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2014; NELSON; KREITZER, 2014; REDGRAVE *et al.*, 2010).

O estriado é composto de projeções de neurônios espinhosos GABAérgicos, chamados de neurônios espinhosos médios. Eles recebem *inputs* excitatórios corticais, do tálamo, amígdala, hipocampo e do mesencéfalo (projeções dopaminérgicas da substância negra *pars compacta*). O estriado, por sua vez, manda projeções direta (monosináptica) e indiretamente (polisináptica) aos núcleos de saída, que transmitem informações para o tálamo e tronco encefálico, fechando uma complexa circuitaria compostas por duas vias, direta e indireta (BOLAM *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2014; NELSON; KREITZER, 2014; REDGRAVE *et al.*, 2010).

As projeções dopaminérgicas da substância negra *pars compacta* modulam a transmissão através de um efeito duplo dependendo do receptor ativado no estriado. Na via direta, são ativados receptores D1 que excitam os núcleos de saída. Já na via indireta, os receptores ativados são os D2, que promovem um efeito inibitório, com transmissão GABAérgica para o globo pálido externo. Assim, a ativação da via direta facilitaria a função motora, enquanto que a ativação da via indireta inibiria a atividade motora (NELSON; KREITZER, 2014; REDGRAVE *et al.*, 2010).

A doença de Parkinson é uma patologia caracterizada por uma perda progressiva dos neurônios dopaminérgicos na substância negra *pars compacta*, reduzindo a neurotransmissão de dopamina no estriado, principalmente no putâmen, e levando a sintomas motores, tais como rigidez, bradicinesia e tremor de repouso.

Em estágios mais avançados da doença podem ocorrer distúrbios cognitivos e psiquiátricos (NELSON; KREITZER, 2014; SHIH *et al.*, 2006).

O surgimento dos primeiros sinais e sintomas se dão, geralmente, entre os 50 e 70 anos, onde sua incidência e prevalência aumentam significativamente (85 a 187 casos por 100.000 pessoas). Contudo, também, é descrito na literatura início da doença em idades mais precoce (MENESES; TEIVE, 1996). Estudos mais recentes destacam que a DP deve ser considerada como uma doença neurodegenerativa progressiva, de etiologia genética e ambiental, com disfunção monoaminérgica múltipla, ou seja, apresenta deficiências dos sistemas dopaminérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos e noradrenérgicos (TEIVE, 2005).

Essa perda da dopamina liberada no estriado produz efeitos diferentes na via direta e indireta, facilitando a atividade dos neurônios da via indireta e reduzindo a atividade da via direta. Na via indireta, o estriado aumenta a inibição do globo pálido e, conseqüentemente, aumenta a atividade do núcleo subtalâmico. Por outro lado na via direta, o estriado diminui a inibição dos núcleos de saída, que por sua vez aumentam sua atividade inibitória no tálamo e tronco encefálico, o que facilita movimentos involuntários e dificulta os voluntários (LANG; OBESO, 2004; REDGRAVE *et al.*, 2010; ZOLD *et al.*, 2007). Ou seja, a via indireta está hiperativa na DP, a atividade do globo pálido se torna sincronizada o que contribui para oscilações patológicas nos núcleos da base que favorece os distúrbios motores (GITTIS *et al.*, 2014).

As alterações pela DP, além de comprometer a funcionalidade do indivíduo, também causam impacto negativo na sociedade, principalmente financeiro, uma vez que a evolução da doença e os efeitos colaterais e complicações advindas das terapias utilizadas atualmente levam o indivíduo a apresentar baixa qualidade de vida, maior risco de internação hospitalar por outras patologias, duas vezes mais risco de morte (BROTCHIE; LEE; VENDEROVA, 2005).

O tratamento atual da DP com drogas agonistas de dopamina e L-dopa é bastante eficaz nos estágios iniciais da doença, tratando os sintomas neuromotores, mas não alterando a progressão da doença (LANG; OBESO, 2004). Seu principal objetivo é a reposição dopaminérgica, visando reverter os efeitos causados pela sua diminuição na via nigro-estriatal (BROTCHIE; LEE; VENDEROVA, 2005; JANKOVIC, 2002; JURI; CHANÁ, 2006; MATTOS; MATTOS, 1999; OBESO; OLANOW; NUTT,

2000; QUINN, 1998). Além de efeitos benéficos, estas drogas também provocam efeitos adversos que levam a várias complicações a longo prazo (JENNER, 2003).

Inicialmente, a reposição melhora os sintomas motores e qualidade de vida dos pacientes de DP. Porém, com poucos anos de tratamento, geralmente de 5 a 10 anos, com a L-dopa leva, principalmente, a complicações motoras em 50 a 80% dos indivíduos com DP (LANG; OBESO, 2004; OLANOW *et al.*, 2004; SINGH; PILLAY; CHOONARA, 2007). Alguns estudos relatam que é necessário doses elevadas de L-dopa, quando administrada via oral, uma vez que ela é metabolizada rapidamente e uma pequena quantidade chega ao Sistema Nervoso Central, sendo considerada neurotóxica (SINGH; PILLAY; CHOONARA, 2007).

A principal complicação motora é a discinesia, caracterizada por uma mistura de movimentos distônicos e coreicos, que se agravam com a duração do tratamento, podendo se tornar tão grave que contraindica sua continuidade (BROTCHIE; LEE; VENDEROVA, 2005). Alterações da marcha, do equilíbrio, deglutição, disfunção urinária e distúrbios do sono, também são descritos como efeitos colaterais do uso da L-dopa (LANG; OBESO, 2004). Distúrbios psiquiátricos, tais como, depressão, demência, insônia, agitação, ansiedade, também, são encontrados (SINGH; PILLAY; CHOONARA, 2007).

Novos estudos estão sendo desenvolvidos utilizando diferentes caminhos dentro do circuito dos núcleos da base (BROTCHIE, 1998; JENNER, 2000). Os principais receptores descritos como potencial terapêutico são os glutamatérgicos, canabinóides, opióides, α_2 -adrenérgicos, colinérgicos e GABAérgicos (CHEN; YUNG, 2004; JENNER, 2003).

GABA é o principal neurotransmissor inibitório existente no SNC. Ele é sintetizado, primariamente do glutamato, através de uma reação catalítica de duas enzimas de ácido glutâmico decarboxylase (GAD): GAD65 e GAD67. Ele é carregado em vesículas sinápticas e liberado por uma exocitose cálcio-dependente, porém a secreção não vesicular também é encontrada. Seus efeitos podem ser mediados pela ativação de receptores ionotrópicos ou metabotrópicos, que podem estar situados pré ou pós-sinapticamente (OWENS; KRIGSTEIN, 2002). Além disso, ele, também, age como um fator trófico que influencia na proliferação celular, migração, diferenciação, maturação de sinapses e morte celular. E, inclusive pode desempenhar um papel no câncer, asma, diabetes e sistema imunológico (JOHNSTON, 2013).

A sinapse mediada pelo GABA apresenta diferenças farmacológicas, sensibilidade, seletividade iônica e propriedades cinéticas. Deste modo, é descrito na literatura diferentes tipos de receptores GABAérgicos: GABA_A, GABA_B e GABA_C (OWENS; KRIGSTEIN, 2002). Os receptores GABA_A são ionotrópicos, onde após a ligação de GABA, exercem um efeito inibitório através do aumento da condutância de Cl⁻ (IACONO; ALTAFINI; TORRE, 2013). Estruturalmente, esses receptores podem ser constituídos de 8 subunidades: α (1-6), β (1-3), γ (1-3), δ , ϵ , θ , π , e ρ (1-3) (JACOB *et al.*, 2012). A mais importante combinação de subunidades em humanos é a $\alpha 1 \beta 2 \gamma 2$, onde o GABA endógeno se liga na interface entre $\alpha 1$ e $\beta 2$ (BERGMANN *et al.*, 2013).

Os receptores GABA_B são metabotrópicos, ou seja, são mediados pela ativação da proteína G, que, quando localizado pré-sinapticamente, reduz a concentração de cálcio no terminal nervoso, reduzindo a liberação do neurotransmissor. Por outro lado, quando ativado pós-sinapticamente, a proteína G aumenta a concentração de potássio e hiperpolariza o neurônio. Já o receptor GABA_C é considerado uma variação do GABA_A, sendo formado pelas mesmas subunidades, ele também é ionotrópico (canal iônico seletivo para Cl⁻), no entanto não é sensível ao antagonista Bicuculina (OWENS; KRIGSTEIN, 2002), nem a drogas benzodiazepínicas e nem aos moduladores do receptor GABA_B (ENZ; CUTTING, 1998).

Alguns estudos têm demonstrado uma relação entre os receptores GABA_A e a DP. Conforme a posição que o globo pálido ocupa no circuito indireto dos núcleos da base, a diminuição de dopamina na substância negra diminui a taxa de disparo espontâneo do globo pálido. A hipoatividade do globo pálido por sua vez contribui com os sintomas hipocinéticos da DP (CHEN; YUNG, 2004).

Isso pode ser explicado por um aumento na liberação de GABA pelo estriado e/ou terminais palidopalidais, uma vez que há evidências que mostram que a expressão dos receptores GABA_A está diminuída no globo pálido e aumentada no núcleo subtalâmico de animais com DP (FAN *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2001). Porém, é necessário observar outras considerações, como ineficiência da recaptação de GABA, mudanças nos níveis de Cl⁻ interneuronal, redução dos *inputs* excitatórios ou mudança nas ações de alguns peptídeos (XUE; HAN; CHEN, 2010). Assim, com o bloqueio dos receptores GABA_A, pode ocorrer a estimulação do globo pálido, podendo levar a um potencial efeito terapêutico para a DP (CHEN *et al.*, 2013).

Vários estudos têm sido realizados utilizando antagonistas dos receptores GABA_A a fim de elucidar sua localização, sua ação fisiológica dentro do circuito dos núcleos da base, e sua possível relação com o tratamento da DP (CHEN *et al.*, 2013; DARBIN; WICHMANN, 2008; HALLWORTH; BEVAN, 2005; KITA *et al.*, 2006; XUE; HAN; CHEN, 2010).

Um dos antagonistas do receptor GABA_A mais utilizado é a Bicuculina. Ela age como um antagonista competitivo que inibe a ligação do GABA no receptor GABA_A, reduzindo o tempo e a frequência de abertura dos canais de Cl⁻ (JOHNSTON, 2013). O local de ligação da Bicuculina ainda é controverso, alguns estudos relatam ligação direta no mesmo local do GABA, porém promove uma mudança na configuração do receptor, ou seja, também interage com outros locais de ligação (UENO *et al.*, 1997). Possivelmente devido seu tamanho molecular ser três vezes maior que o do GABA, ela consegue alcançar locais onde o próprio GABA não chegaria (JOHNSTON, 2013).

A Bicuculina tem sido amplamente utilizada como uma ferramenta para detectar a participação inibitória do GABA em diferentes locais do Sistema Nervoso Central. Ela foi usada num estudo que procurou determinar se a inibição pré-pulso no circuito que promove a contração muscular rápida a partir de estímulos auditivos é mediada ou não pelo receptor GABA_A e/ou receptor de Glicina. Foi verificado que o tratamento com a Bicuculina causou redução geral na inibição pré-pulso, aumento na amplitude e duração do potencial pós-sináptico evocado pelo som nas células que iniciam a contração muscular, ou seja, o sistema GABAérgico modula a excitabilidade dessas células (CURTIN; PREUSS, 2015). Outro estudo, com finalidade de determinar o mecanismo de ação a Sevoflurano na indução de apoptose de células-tronco neurais, demonstrando que o Sevoflurano poderia ativar os receptores GABA_A, que induz a apoptose celular e que a Bicuculina foi efetiva na sua redução (QIU *et al.*, 2015).

Alguns estudos, têm usado a Bicuculina para verificar a participação GABAérgica nos núcleos da base. No estudo de Celada, Paladini e Tepper, em 1999, utilizaram a Bicuculina para verificar que o padrão de disparo dos neurônios dopaminérgicos são mediados, indireta e principalmente por neurônios GABAérgicos da substância negra *pars reticulata*. Estudos examinaram o mecanismo de ação do neuroesteróide 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one (3 α ,5 α -THP allopregnanolone) na indução de catalepsia, demonstrando, através do uso da Bicuculina, o envolvimento

de vias GABAérgicas (DEHPANDE; KHISTI; CHOPDE, 2001; KHISTI; MANDHANE; CHOPDE, 1998).

Os receptores GABA_A são amplamente conhecidos por causarem, distúrbios como epilepsia, desordens de ansiedade, déficits cognitivos, esquizofrenia, depressão, quando apresentam déficits funcionais (JACOB; MOSS; JURD, 2008). Com isso são alvos importantes para estudos com benzodiazepínicos (BZD), medicamento utilizado para o tratamento clínico desses distúrbios (JACOB *et al.*, 2012; SANCAR; CZAJKOWSKI, 2012). O receptor GABA_A é composto por uma superfície celular complexa contendo um sítio de ligação benzodiazepínico, um de GABA e um canal de Cl⁻ (VOTEY *et al.*, 1991).

Os BZD melhoram a condutância dos íons de Cl⁻, através do aumento da frequência de abertura do canal iônico, aumentando a afinidade e o acoplamento do GABA no seu sítio de ligação (JACOB *et al.*, 2012; KORPI; GRÜNDER; LÜDDENS, 2002; VOTEY *et al.*, 1991). Eles se ligam nas interfaces das subunidades α e γ dos receptores GABA_A (BERGMANN *et al.*, 2013; TAN *et al.*, 2010), causando efeitos sedativos/hipnóticos, ansiolíticos, relaxante muscular e anticonvulsivante (LÜSCHER *et al.*, 2012).

Flumazenil é outra droga antagonista dos receptores GABA_A, com afinidade de ligação no sítio benzodiazepínico. Portanto, ele bloqueia competitivamente a inibição mediada pela via GABAérgica, e parece agir somente no SNC (SUZUKI *et al.*, 1991; VOTEY *et al.*, 1991).

Assim como a Bicuculina, o Flumazenil, também, é uma ferramenta importante para o esclarecimento dos aspectos farmacológicos de drogas que se ligam com o receptor GABA_A (RODRIGUEZ-LANDA *et al.*, 2013). Ele tem sido estudado em várias situações onde o receptor GABA_A está envolvido, como overdose por benzodiazepínicos, despertar de pacientes em coma, reverter sedação, entre outros (HOFFMANN; WARREN, 1993; MIZUNO, 2013).

Divljaković *et al.* (2013), realizaram um estudo onde encontraram que o Flumazenil é capaz de reverter a ansiedade induzida pela abstinência de benzodiazepínicos, através da interrupção dos receptores GABA_A. Além do efeito ansiolítico, o Flumazenil tem demonstrado ser eficiente para verificar a influência GABAérgica na esquizofrenia (GEERTS; ROBERTS; SPIROS, 2013), na sedação (SILVA *et al.*, 2013) e nas drogas anticonvulsivantes (LI *et al.*, 2013; MANTE *et al.*, 2013).

Já Rego, Vaudry e Vaudry (2015) utilizaram a Bicuculina e o Flumazenil para investigar o mecanismo de ação da Etifoxina na biosíntese de neuroesteróides. E verificaram que essa biosíntese não é mediada pela ativação de receptores GABA_A, uma vez que o Flumazenil e a Bicuculina não modificaram a produção de neuroesteróides. OH *et al.*, em 2015, avaliaram os efeitos anti-estresse de metabólitos do Ginseng utilizando, também, ambos os antagonistas do receptor GABA_A, demonstrando que o Ginseng exerce um efeito ansiolítico via GABAérgica. Outro estudo, utilizou o Flumazenil para reverter o quadro de catalepsia em ratos, evidenciando que a droga utilizada interage com o receptor GABA_A, e demonstrando o local exato de sua ligação com o receptor (MIERZEJEWSKI *et al.*, 2013).

Alguns estudos sugerem que o GABA parece estar envolvido na fisiopatologia da DP, principalmente por causar a hipoatividade do globo pálido, uma vez que a diminuição da dopamina, liberada pela substância negra *pars compacta*, aumenta sua liberação pelo estriado (CHEN; YUNG, 2004, YU *et al.*, 2001). Xue *et al.* (2009), demonstraram que excitar o globo pálido de ratos lesionados com 6-OHDA pode ser usado como nova terapêutica para DP. O bloqueio dos receptores de GABA no globo pálido poderia levar a uma mudança no padrão motor de animais com DP (CHEN *et al.*, 2013), pois o receptor GABA_A também é encontrado no globo pálido e vários estudos têm demonstrado uma forte relação entre receptores GABA_A e DP (CHEN *et al.*, 2013; XUE *et al.*, 2010; DARBIN; WICHMANNI, 2008; HALLWORTH; BEVAN, 2005; KITA *et al.*, 2006).

Assim, neste estudo nos propusemos a testar o efeito de dois antagonistas do receptor GABA_A - Bicuculina e Flumazenil, aplicados por via intraperitoneal, na catalepsia induzida por inibição de receptores de dopamina. Além disso, estudaremos as possíveis modificações no comportamento motor decorrentes da interação destes neurotransmissores, por meio do teste do campo aberto, e alterações na marcha, através do teste funcional de marcha.

3.0 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito de dois antagonistas do receptor GABA_A, aplicados via intraperitoneal, nas alterações do comportamento motor induzidas por inibição de receptores de dopamina, em camundongos.

3.2 Específicos

Analisar o efeito dos antagonistas do receptor GABA_A, Bicuculina e Flumazenil, na catalepsia induzida por inibição de receptores de dopamina.

Investigar o efeito dos antagonistas do receptor GABA_A, Bicuculina e Flumazenil, nas alterações do comportamento motor em camundongos, induzida por inibição de receptores de dopamina, por meio do teste do Campo Aberto.

Averiguar o efeito dos antagonistas do receptor GABA_A, Bicuculina e Flumazenil, na alteração de marcha em camundongos, induzida por inibição de receptores de dopamina, por meio da avaliação funcional de marcha.

4.0 METODOLOGIA

Este estudo caracteriza-se como um estudo experimental com animais, realizado no Laboratório de Biofisiofarmacologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS.

4.1 Animais

Neste experimento foram utilizados 96 camundongos Suíços, machos, oriundos do biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pesando entre 30-40g. Os animais foram mantidos, no biotério, com água e comida a vontade até o início dos testes. O ciclo de luz (12/12 horas, luzes ligadas às 6:00 horas) e a temperatura ambiente ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$) foram controlados.

4.2 Drogas

Antagonistas de receptores de dopamina: Haloperidol (Haldol-Janssen-Cilag, injetável) - 1 mg/Kg; antagonistas do receptor GABA_A Bicuculina (Sigma Aldrich) – 1 e 5 mg/Kg e Flumazenil (Cristália) – 3 e 6 mg/Kg. As drogas Haloperidol e Bicuculina foram dissolvidas em solução salina a 0,9%, a um volume de 10 ml/Kg do peso do animal, e o Flumazenil foi aplicado a 30 ml/Kg. As doses das drogas utilizadas foram baseadas em estudos prévios que utilizaram a mesmas drogas e a mesma via de aplicação (GEWISSE *et al.*, 1994; MIERZEJEWSKI *et al.*, 2013; RODRIGUEZ-LANDA *et al.*, 2013; SUZUKI *et al.*, 1991; VIANA *et al.*, 2011).

4.3 Via de administração das drogas

As drogas foram administradas por via intraperitoneal (i.p.).

4.4 Experimentos e grupos experimentais

Foram realizados 2 experimentos, com 6 grupos em cada um deles, como ilustrados na Figura 1 e descritos a seguir, sendo cada grupo constituído de 8 camundongos. Cada animal foi utilizado somente em um dos grupos experimentais.

4.4.1 Experimento I: Efeito da Bicuculina (Sigma Aldrich) nas alterações do comportamento motor induzidas pelo Haloperidol

Neste experimento os animais receberam injeção i.p. de Salina ou Haloperidol (1 mg/kg), e após 30 minutos aplicação i.p. de salina, Bicuculina (1 mg/Kg), ou Bicuculina (5 mg/Kg). Foram realizados os seguintes grupos experimentais:

Grupo 1 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de Salina e após 30 minutos, outra injeção i.p. de Salina;

Grupo 2 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de Salina e após 30 minutos, injeção i.p. de Bicuculina (1 mg/Kg);

Grupo 3 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de Salina e após 30 minutos, injeção i.p. de Bicuculina (5 mg/Kg);

Grupo 4 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de Haloperidol (1 mg/kg) e após 30 minutos, injeção i.p. de salina;

Grupo 5 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de Haloperidol (1 mg/kg) e após 30 minutos, injeção i.p. de Bicuculina (1 mg/Kg);

Grupo 6 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de Haloperidol (1 mg/kg) e após 30 minutos, injeção i.p. de Bicuculina (5 mg/Kg).

4.4.2 Experimento II: Efeito do Flumazenil (Cristália) nas alterações do comportamento motor induzidas pelo Haloperidol

Neste experimento os animais receberam injeção i.p. de salina ou Haloperidol (1 mg/kg), seguida pela aplicação i.p. de Salina, de Flumazenil (3 mg/Kg), ou Flumazenil (6 mg/Kg) após 30 minutos. Foram realizados os seguintes grupos experimentais:

Grupo 1 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de Salina e após 30 minutos, outra injeção i.p. de salina;

Grupo 2 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de Salina e após 30 minutos, injeção i.p. de Flumazenil (3 mg/Kg);

Grupo 3 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de Salina e após 30 minutos, injeção i.p. de Flumazenil (6 mg/Kg);

Grupo 4 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de Haloperidol (1 mg/kg) e após 30 minutos, injeção i.p. de salina;

Grupo 5 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de Haloperidol (1 mg/kg) e após 30 minutos, injeção i.p. de Flumazenil (3 mg/Kg);

Grupo 6 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de Haloperidol (1 mg/kg) e após 30 minutos, injeção i.p. de Flumazenil (6 mg/Kg).



Figura 1 – Esquema ilustrando a formação dos grupos nos dois Experimentos.

4.5 Avaliação funcional dos animais

A avaliação funcional dos animais após a aplicação das drogas foi realizada por meio do teste de catalepsia (ZARRINDAST; MODABBER; SABETKASAI, 1993) do teste do campo aberto (WALSH; CUMMINS, 1976; WHIMBEY; DENENBERG, 1967) e da avaliação funcional da marcha (MULLENIX; NORTON; CULVER, 1975). O primeiro teste de catalepsia foi realizado após 30 minutos da aplicação dos antagonistas de GABA_A. Após 60 minutos foi realizado outro teste de catalepsia, o teste do campo aberto e a avaliação funcional da marcha. E após 90 minutos, novamente, o teste de catalepsia. Os testes de comportamento foram realizados sempre no mesmo horário e local: 4 animais por dia, sempre no período da manhã (09:00 às 13:00 horas), no laboratório de Biofisiopharmacologia, com isolamento acústico para que não houvesse interferência de ruídos durante as avaliações.

4.5.1 Teste de catalepsia na barra

O método da barra foi utilizado para testar a catalepsia (Figura 2). A barra foi confeccionada de vidro horizontal (diâmetro de 0,5 cm) e elevada a 4,5 cm do solo (SANBERG *et al.*, 1988). O camundongo foi colocado com as duas patas dianteiras sobre a barra e seu tempo (em segundos) de permanência nessa posição foi anotado. O tempo da catalepsia terminou no momento em que as patas dianteiras tocaram o chão ou se o camundongo subisse na barra. Foram permitidas três tentativas de realização do teste, e um tempo de no máximo 300 segundos (ZARRINDAST; MODABBER; SABETKASAI, 1993). O teste foi realizado 30, 60 e 90 minutos após a administração das drogas.



Figura 2 – Foto ilustrando o método da barra para avaliar o tempo de catalepsia.

4.5.2 Teste do campo aberto

Este teste foi primeiramente descrito por Calvin S. Hall na década 1930, sendo modificado, posteriormente na década de 1960 por P.L. Broaderhurst, que evidenciou que o número de bolos fecais eliminados pelos ratos estava relacionado com o medo. Whimbey e Denenberg (1967) demonstraram que o teste do campo aberto, estava, na verdade, relacionado com o comportamento de deambulação e exploratório do rato, e não com o medo (apud GRAY, 1987). Gradativamente, outros parâmetros de avaliação foram sendo acrescentados ao teste e, atualmente, já são mais de 30 itens avaliados (WALSH; CUMMINS, 1976).

O teste do campo aberto foi realizado em uma arena cilíndrica de 40 cm de diâmetro, com paredes de acrílico translúcido de 30 cm de altura, colocada sobre uma base de madeira recoberta de fórmica de cor branca, a qual foi subdividida em 12 quadrantes de $104,7 \text{ cm}^2$ cada um deles (Figura 3). Em nosso estudo, avaliamos os seguintes parâmetros: a frequência dos comportamentos de exploração

horizontal, que é a quantidade de quadrantes percorridos em 5 minutos, e exploração vertical, quantidade de erguimentos realizados pelo animal nos mesmos 5 minutos.



Figura 3 – Foto ilustrando o teste do campo aberto.

4.5.3 Avaliação funcional da marcha

A avaliação funcional da marcha foi realizada de acordo com o método descrito por Hruska *et al.*(1979), modificado por Kunkel-Badgen *et al.*(1993) e Clarke e Still (2001). Para esta análise, as patas anteriores e posteriores dos animais foram pintadas e as pegadas foram impressas quando o camundongo andou sobre uma plataforma de madeira (5 cm de largura e 29 cm de comprimento), forrada com um papel apropriado, em direção a uma casinhola escura situada ao final da plataforma. O papel onde foram impressas as pegadas foi corado com uma solução de azul de

bromofenol a 0,5%, o qual muda da cor alaranjado para a cor azul escuro quando em contato com a pata úmida do camundongo (LOWDON; SEABER; URBANIAK, 1988). As pegadas das patas anteriores foram utilizadas para caracterizarem a direção da locomoção.

Três medidas foram feitas a partir dos registros das pegadas (Figura 4). Primeiro, o comprimento do passo (em centímetros) foi determinado pela distância média entre a região central de duas pegadas consecutivas. Segundo, o desvio ântero-posterior e látero-lateral entre as pegadas ipsilaterais da pata anterior e posterior, foram mensuradas. E terceiro, a base de sustentação foi medida pela distância das pegadas das patas posteriores contralaterais. Normalmente, a pegada da pata posterior é impressa um pouco atrás daquela da pata anterior, porém, ainda com uma grande sobreposição entre elas (MULLENIX; NORTON; CULVER, 1975). A avaliação funcional da marcha foi realizada apenas 60 minutos após a aplicação das drogas.

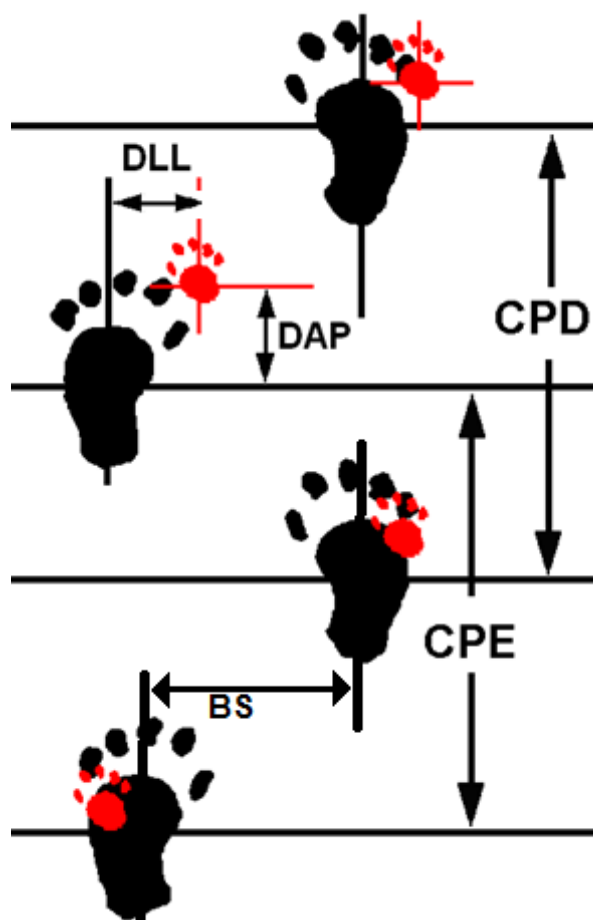


Figura 4 – Ilustração da mensuração dos parâmetros avaliados na avaliação funcional da marcha. BS: base de sustentação; CPE: comprimento da passada esquerda; CPD: comprimento da passada direita; DLL: desvio látero-lateral; DAP: desvio ântero-posterior.

4.6 Descarte dos animais

Após os testes de comportamento, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Os descartes dos animais foram encaminhados para incineração por meio do sistema de coleta de lixo biológico da UFMS.

4.7 Análise estatística

A análise estatística dos dados obtidos neste estudo foi realizada por meio de testes não-paramétricos, uma vez que as amostras de dados não passaram no teste de normalidade de Shapiro-Wilk. A comparação entre os momentos de análise da catalepsia foi realizado por meio do teste não-paramétrico de Friedman, seguido pelo pós-teste de Student-Newman-Keuls. Já a comparação entre grupos, em relação às variáveis, tempo de catalepsia, exploração horizontal, exploração vertical, comprimento do passo, base de sustentação, desvios látero-laterais e ântero-posteriores, foi realizado por meio do teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Student-Newman-Keuls.

Os demais resultados foram apresentados na forma estatística descritiva ou em tabelas e gráficos. A análise estatística foi realizada utilizando o pacote estatístico SigmaPlot, versão 12.5, considerando um nível de significância de 5% (NORMAN; STREINER, 1994; SHOTT, 1990).

4.8 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais/CEUA da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, com protocolo número 586/2014 (Anexo A).

5.0 RESULTADOS

5.1 Experimento I

5.1.1 Catalepsia

Os resultados referentes ao tempo de catalepsia, nos diferentes grupos e momentos de análise, do Experimento I estão apresentados na Tabela 1 e ilustrados na Figura 5.

5.1.1.1 Comparação entre momentos

Nos grupos Salina+salina e Haloperidol+Bicuculina 5 mg/Kg houve diferença entre os momentos de análise, em relação ao tempo de catalepsia (teste de Friedman, Salina+Salina: $p=0,018$; Haloperidol+Bicuculina 5 mg/Kg: $p=0,018$), sendo que o tempo de catalepsia nos momentos 60 e 90 minutos após a aplicação da droga foi significativamente maior do que aquele aos 30 minutos, em ambos os grupos (pós-teste de Student-Newman-Keuls, $p<0,05$). Por outro lado, não houve diferença entre os momentos analisados, para os grupos Salina+Bicuculina (1 mg/Kg), Haloperidol+Salina e Haloperidol+Bicuculina 1 mg/Kg ($p>0,05$). E no grupo Salina+Bicuculina (5 mg/Kg) apesar do valor de p ser 0,038, não foi encontrado diferença quando realizado o pós-teste de Student-Newman-Keuls.

5.1.1.2 Comparação entre grupos

Houve diferença entre os grupos experimentais, em todos os momentos de catalepsia analisados (teste de Kruskal-Wallis, $p<0,001$).

Aos 30 minutos, os animais dos grupos que receberam Haloperidol apresentaram um tempo de catalepsia maior do que aqueles que receberam Salina como primeira droga, todavia, neste momento, os animais do grupo Haloperidol+Bicuculina 5 mg/Kg apresentaram uma reversão significativa, porém, parcial da catalepsia, quando comparado com o grupo Haloperidol+Salina (pós-teste de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$). Ainda aos 30 minutos, o tempo de catalepsia dos animais do grupo Salina+Bicuculina 5 mg/Kg foi maior do que aquele para os animais do grupo Salina+Salina ($p < 0,05$).

Aos 60 minutos, os animais dos grupos que receberam Haloperidol ainda apresentaram um tempo de catalepsia maior do que aqueles que receberam Salina como primeira droga, todavia, neste momento, os animais dos grupos Haloperidol+Bicuculina 1 e 5 mg/Kg apresentaram uma reversão significativa, porém, parcial da catalepsia, quando comparado com o grupo Haloperidol+Salina ($p < 0,05$). Neste momento, o tempo de catalepsia dos animais dos grupos Salina+Bicuculina 1 e 5 mg/Kg foi maior do que aquele para os animais do grupo Salina+Salina ($p < 0,05$).

Aos 90 minutos, os animais dos grupos que receberam Haloperidol apresentaram um tempo de catalepsia maior do que aqueles que receberam Salina como primeira droga ($p < 0,05$). Neste momento não foi observado qualquer reversão significativa do tempo de catalepsia, pela aplicação da Bicuculina ($p > 0,05$).

Tabela 1 – Resultados referentes ao tempo de catalepsia nos momentos 30, 60 e 90 minutos após a aplicação das drogas, em cada um dos grupos experimentais do Experimento I.

Grupos	Momento			Valor de p
	30'	60'	90'	
SSalina+Salina	5,36±1,85Bd	13,19±5,45Ad	24,46±12,65Ab	0,018
Sal+Bic 1mg/Kg	12,24±7,34Acd	26,67±10,00Ac	58,60±37,64Ab	0,236
Sal+Bic 5mg/Kg	45,41±36,46Ac	31,19±11,12Ac	87,08±34,91Ab	0,038
HHal+Salina	119,59±38,76Aa	220,30±41,21Aa	218,44±43,61Aa	0,285
Hal+Bic 1mg/Kg	59,67±15,13Aa	115,71±36,52Ab	216,77±39,42Aa	0,079
Hal+Bic 5mg/Kg	26,52±5,40Bb	114,59±42,87Ab	222,66±38,93Aa	0,018
VValor de p	<0,001	<0,001	<0,001	

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão. Tempo de catalepsia mensurado em segundos. Letras maiúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa entre os momentos de análise. Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (pós-teste de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$).

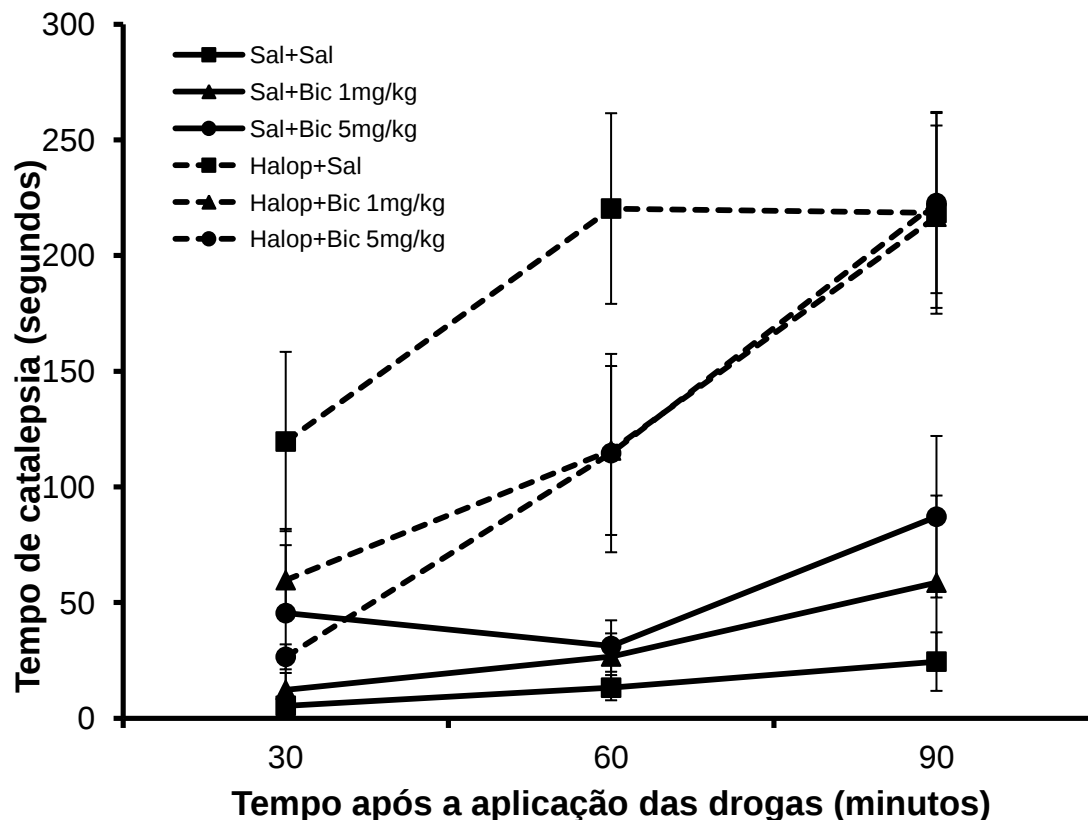


Figura 5 – Gráfico referente ao tempo de catalepsia em cada grupo experimental, em cada momento de realização do teste, no Experimento I.

5.1.2 Campo aberto

Os resultados referentes ao teste do campo aberto nos diferentes grupos, do Experimento I estão apresentados na Tabela 2 e ilustrados na Figura 6.

A diferença entre os grupos foi significativa para ambas as explorações: horizontal e vertical, sendo que os grupos onde o Haloperidol foi utilizado como a primeira droga os animais exploraram menos que os que receberam primeiro Salina (teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,001$ pós-teste de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$). Assim a Bicuculina não foi capaz de reverter os efeitos motores do Haloperidol ($p > 0,05$).

Tabela 2 - Resultados referentes à exploração horizontal e vertical no campo aberto, em cada grupo experimental do Experimento I.

Grupos	Comportamento	
	Exp. Horizontal	Exp. Vertical
Salina+Salina	74,75±13,91a	26,13±3,69a
Sal+Bic 1mg/Kg	65,25±9,51a	14,50±3,19a
Sal+Bic 5mg/Kg	56,88±12,64a	18,75±5,42a
Hal+Salina	15,25±3,98b	3,38±1,28b
Hal+Bic 1mg/Kg	13,25±3,34b	2,13±0,64b
Hal+Bic 5mg/Kg	17,00±5,12b	2,25±0,92b
Valor de p	<0,001	<0,001

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão. Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (pós-teste de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$).

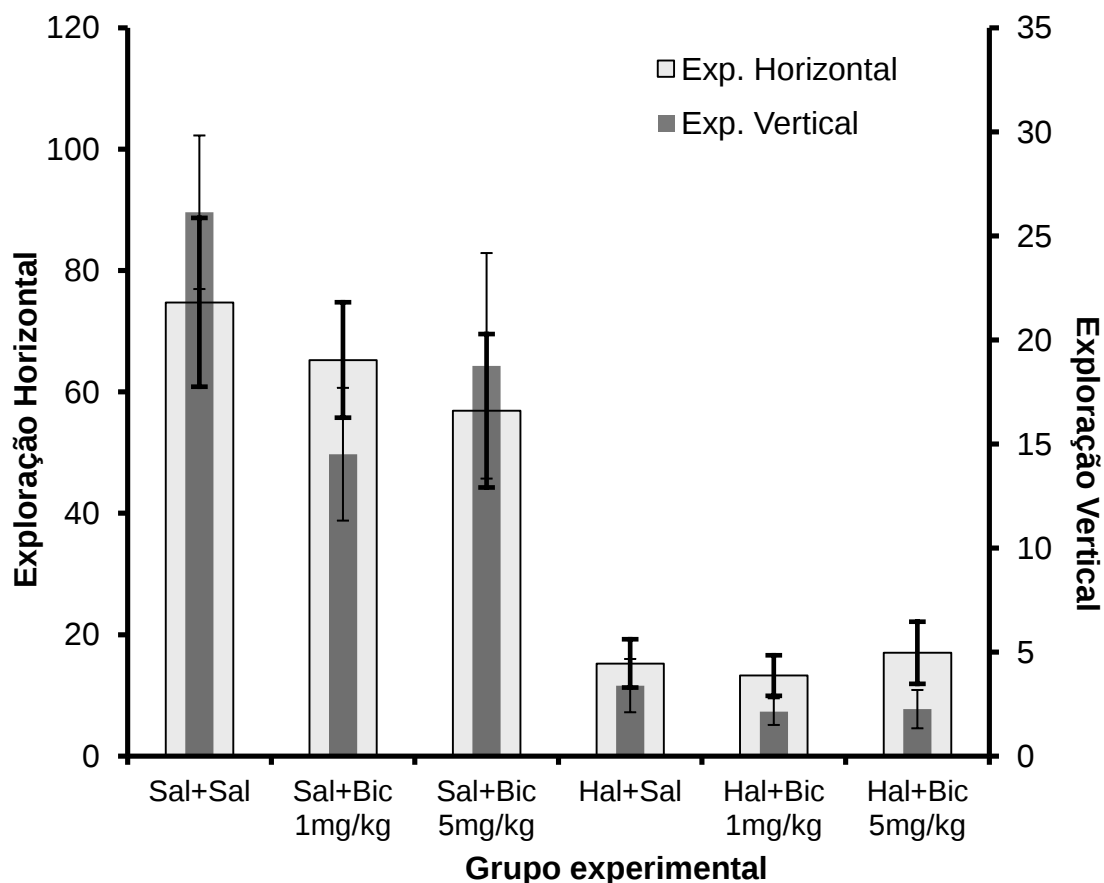


Figura 6 – Gráfico referente à exploração horizontal e vertical no teste do campo aberto em cada grupo experimental do Experimento I.

5.1.3 Avaliação funcional da marcha

Os resultados referentes a avaliação de marcha nos diferentes grupos, do Experimento I estão apresentados na Tabela 3.

Não houve diferença significativa entre grupos experimentais para nenhuma variável estudada: base de sustentação, comprimento do passo, desvio látero-lateral e desvio ântero-posterior (teste de Kruskal-Wallis, p variando entre 0,031 e 0,828, pós-teste de Student-Newman-Keuls, $p > 0,05$).

Tabela 3 - Resultados referentes à avaliação funcional da marcha, em cada grupo experimental do Experimento I.

Grupos	Avaliação funcional da marcha			
	Base de Sustent.	Comp. Do Passo	D. Lat-Lat	D. Ant-Post
Salina+Salina	2,70±0,10a	2,84±0,18a	0,66±0,19a	0,89±0,15a
Sal+Bic 1mg/Kg	2,61±0,21a	3,35±0,18a	0,52±0,05a	0,81±0,11a
Sal+Bic 5mg/Kg	2,54±0,11a	3,14±0,17a	0,49±0,004a	0,67±0,06a
Hal+Salina	2,59±0,12a	2,81±0,12a	0,53±0,04a	0,75±0,14a
Hal+Bic 1mg/Kg	2,28±0,21a	2,59±0,17a	0,47±0,02a	1,04±0,07a
Hal+Bic 5mg/Kg	2,19±0,27a	2,60±0,25a	0,59±0,07a	0,93±0,18a
Valor de p	0,467	0,031	0,828	0,324

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão. Dados mensurados em centímetros. Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (pós-teste de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$).

5.2 Experimento II

5.2.1 Catalepsia

Os resultados referentes ao tempo de catalepsia, nos diferentes grupos e momentos de análise, do Experimento II estão apresentados na Tabela 4 e ilustrados na Figura 7.

5.2.1.1 Comparação entre momentos

Nos grupos Salina+Salina e Haloperidol+Salina houve diferença entre os momentos de análise, em relação ao tempo de catalepsia (teste de Friedman, Salina+Salina: $p=0,030$; Haloperidol+Salina: $p=0,005$), sendo que o tempo de catalepsia nos momentos 60 e 90 minutos após a aplicação da droga foi significativamente maior do que aquele aos 30 minutos, em ambos os grupos (pós-

teste de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$). Por outro lado, não houve diferença entre os momentos analisados, para os grupos Salina+Flumazenil (3 e 6 mg/Kg) e Haloperidol+Flumazenil 3 e 6 mg/Kg ($p > 0,05$).

5.2.1.2 Comparação entre grupos

Houve diferença entre os grupos experimentais, em todos os momentos de catalepsia analisados (teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,001$).

Aos 30 minutos, os animais dos grupos que receberam Haloperidol apresentaram um tempo de catalepsia maior do que aqueles que receberam Salina como primeira droga, porém o Flumazenil não foi capaz de reverter a catalepsia produzida pelo Haloperidol (pós-teste de Student-Newman-Keuls, $p > 0,05$). Ainda aos 30 minutos, o tempo de catalepsia dos animais dos grupos Salina+Flumazenil 3 e 6 mg/Kg foi menor do que aquele para os animais do grupo Salina+Salina ($p < 0,05$).

Aos 60 minutos, os animais dos grupos que receberam Haloperidol ainda apresentaram um tempo de catalepsia maior do que aqueles que receberam Salina como primeira droga, todavia, neste momento, os animais do grupo Haloperidol+Flumazenil 3 mg/Kg apresentaram uma reversão significativa, porém parcial, da catalepsia, quando comparado com o grupo Haloperidol+Salina ($p < 0,05$). Neste momento, o tempo de catalepsia dos animais dos grupos Salina+Flumazenil 3 e 6 mg/Kg foi menor do que aquele para os animais do grupo Salina+Salina ($p < 0,05$).

Aos 90 minutos, os animais dos grupos que receberam Haloperidol apresentaram um tempo de catalepsia maior do que aqueles que receberam Salina como primeira droga ($p < 0,05$). Neste momento não foi observado qualquer reversão significativa do tempo de catalepsia, pela aplicação do Flumazenil ($p > 0,05$). Entretanto, o tempo de catalepsia dos grupos Salina+Flumazenil 3 e 6 mg/Kg permaneceu menor que o do grupo Salina+Salina. ($p < 0,05$).

Tabela 4 - Resultados referentes ao tempo de catalepsia nos momentos 30, 60 e 90 minutos após a aplicação das drogas, em cada um dos grupos experimentais do Experimento II.

Grupos	Momento			Valor de p
	30'	60'	90'	
Salina+Salina	13,43±3,67Bb	43,65±20,59Ac	34,89±11,46Ab	0,030
Sal+Flu 3mg/Kg	4,14±0,83Ac	8,30±3,90Ad	6,21±1,01Ac	0,531
Sal+Flu 6mg/Kg	4,69±1,03Ac	7,49±3,27Ad	11,76±5,48Ac	0,9
Hal+Salina	104,93±40,16Ba	212,06±38,55Aa	231,91±31,96Aa	0,005
Hal+Flu 3mg/Kg	83,08±31,96Aa	122,21±43,63Ab	159,43±42,75Aa	0,531
Hal+Flu 6mg/Kg	111,68±43,19Aa	197,74±37,95Aa	202,07±37,96Aa	0,285
Valor de p	<0,001	<0,001	<0,001	

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão. Tempo de catalepsia mensurado em segundos. Letras maiúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa entre os momentos de análise. Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (pós-teste de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$).

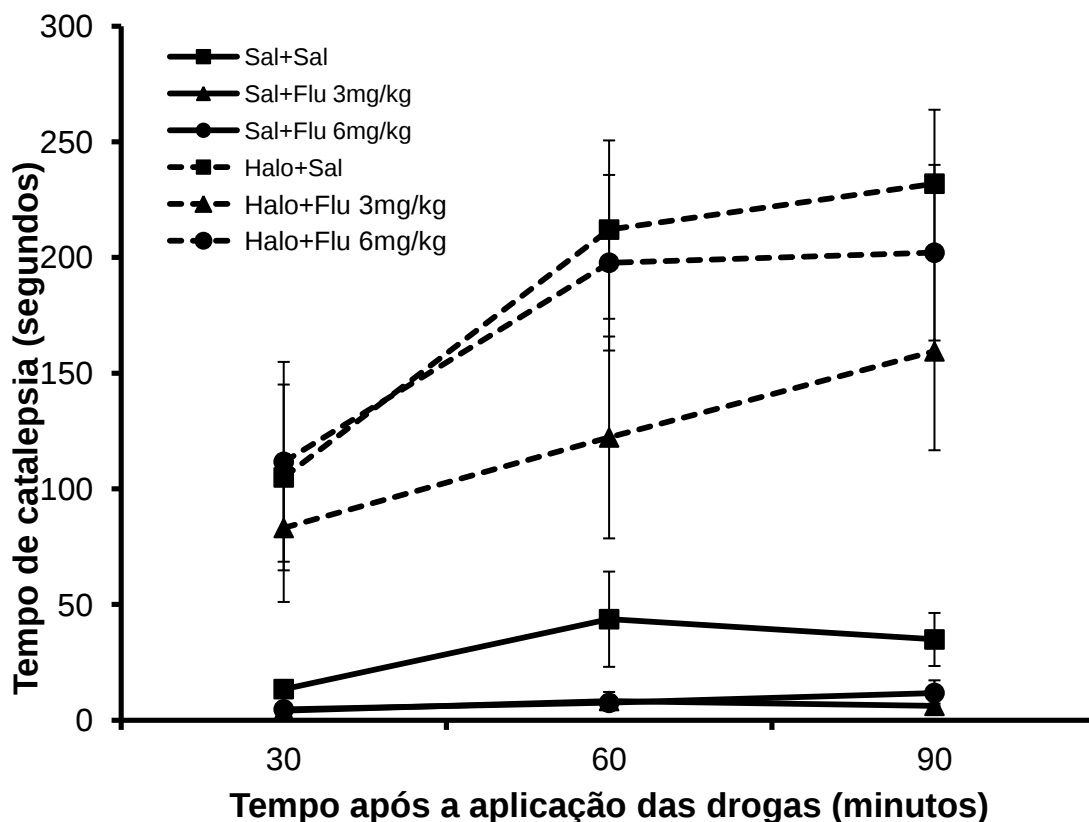


Figura 7 – Gráfico referente ao tempo de catalepsia em cada grupo experimental, em cada momento de realização do teste, no Experimento II.

5.2.2 Campo aberto

Os resultados referentes ao teste do campo aberto nos diferentes grupos, do Experimento II estão apresentados na Tabela 5 e ilustrados na Figura 8.

A diferença entre os grupos foi significativa para ambas as explorações: horizontal e vertical, sendo que os grupos onde o Haloperidol foi utilizado como a primeira droga os animais exploraram menos que os que receberam primeiro Salina (teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,001$ pós-teste de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$). Assim, o Flumazenil não foi capaz de reverter os efeitos motores do Haloperidol ($p > 0,05$).

Tabela 5 - Resultados referentes à exploração horizontal e vertical no campo aberto, em cada grupo experimental do Experimento II.

Grupos	Comportamento	
	Exp. Horizontal	Exp. Vertical
Salina+Salina	64,00±7,34a	18,75±3,98a
Sal+Flu 3mg/Kg	54,63±6,07a	17,50±2,64a
Sal+Flu 6mg/Kg	60,38±15,99a	19,00±6,11a
Hal+Salina	17,25±8,39b	5,25±3,03b
Hal+Flu 3mg/Kg	7,75±2,78b	1,75±1,10b
Hal+Flu 6mg/Kg	4,25±1,72b	1,13±0,48b
Valor de p	<0,001	<0,001

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão. Letras minúsculas na coluna indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (pós-teste de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$).

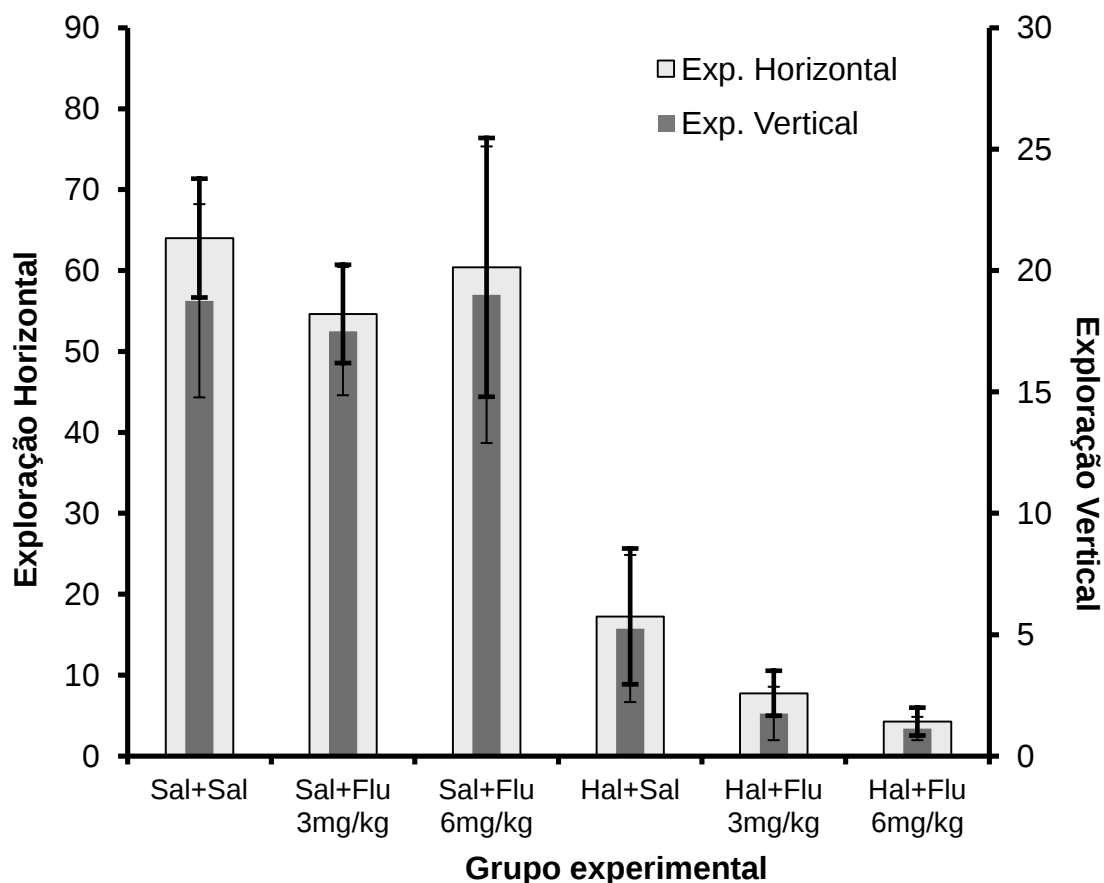


Figura 8 – Gráfico referente à exploração horizontal e vertical no teste do campo aberto em cada grupo experimental do Experimento II.

5.2.3 Avaliação funcional da marcha

Os resultados referentes à avaliação funcional da marcha nos diferentes grupos, do Experimento II estão apresentados na Tabela 6 e ilustrados nas Figuras 9 e 10.

5.2.3.1 Base de sustentação

Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais para a base de sustentação (teste de Kruskal-Wallis, $p=0,361$, pós-teste de Student-Newman-Keuls, $p>0,05$).

5.2.3.2 Comprimento do passo

Os animais que receberam Haloperidol como a primeira droga tiveram o comprimento do passo menor que os que receberam Salina, todavia os animais que receberam a maior dose do Flumazenil (6 mg/Kg) demonstraram uma recuperação parcial desse comprimento (teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,001$, pós-teste de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$).

5.2.3.3 Desvio látero-lateral

Não houve diferença significativa entre grupos experimentais para o desvio látero-lateral (teste de Kruskal-Wallis, $p = 0,88$, pós-teste de Student-Newman-Keuls, $p > 0,05$).

5.2.3.4 Desvio ântero-posterior

Houve diferença significativa entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,001$), sendo todos os grupos diferentes entre si (pós-teste de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$), na seguinte ordem: Haloperidol+Flumazenil 3 mg/Kg, Haloperidol+Flumazenil 6 mg/Kg, Salina+Flumazenil 3 mg/Kg, Haloperidol+Salina, Salina+Flumazenil 6 mg/Kg e Salina+Salina.

Tabela 6 - Resultados referentes à avaliação funcional da marcha, em cada grupo experimental do Experimento II.

Grupos	Avaliação funcional da marcha			
	Base de Sustent.	Comp. Do Passo	D. Lat-Lat	D. Ant-Post
Salina+Salina	2,66±0,14a	3,29±0,22a	0,50±0,07a	0,46±0,07f
Sal+Flu 3mg/Kg	2,60±0,15a	3,04±0,13a	0,46±0,07a	0,87±0,14c
Sal+Flu 6mg/Kg	2,43±0,10a	3,37±0,12a	0,51±0,12a	0,52±0,05e
Hal+Salina	2,41±0,09a	2,14±0,32c	0,45±0,04a	0,66±0,06d
Hal+Flu 3mg/Kg	2,64±0,09a	2,12±0,18c	0,46±0,06a	1,25±0,13a
Hal+Flu 6mg/Kg	2,65±0,09a	2,74±0,22b	0,51±0,03a	0,94±0,06b
Valor de p	0,361	<0,001	0,880	<0,001

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão. Dados mensurados em centímetros. Letras minúsculas na coluna indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (pós-teste de Student-Newman-Keuls, $p<0,05$).

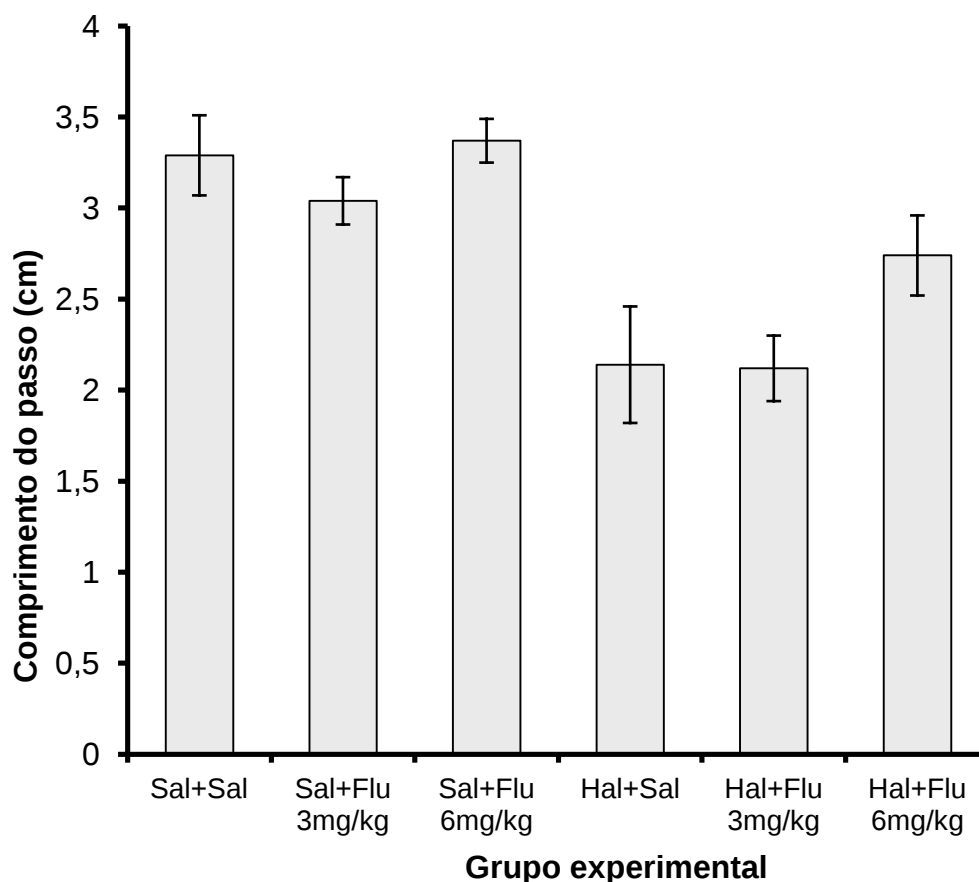


Figura 9 – Gráfico referente ao comprimento do passo em cada grupo no Experimento II.

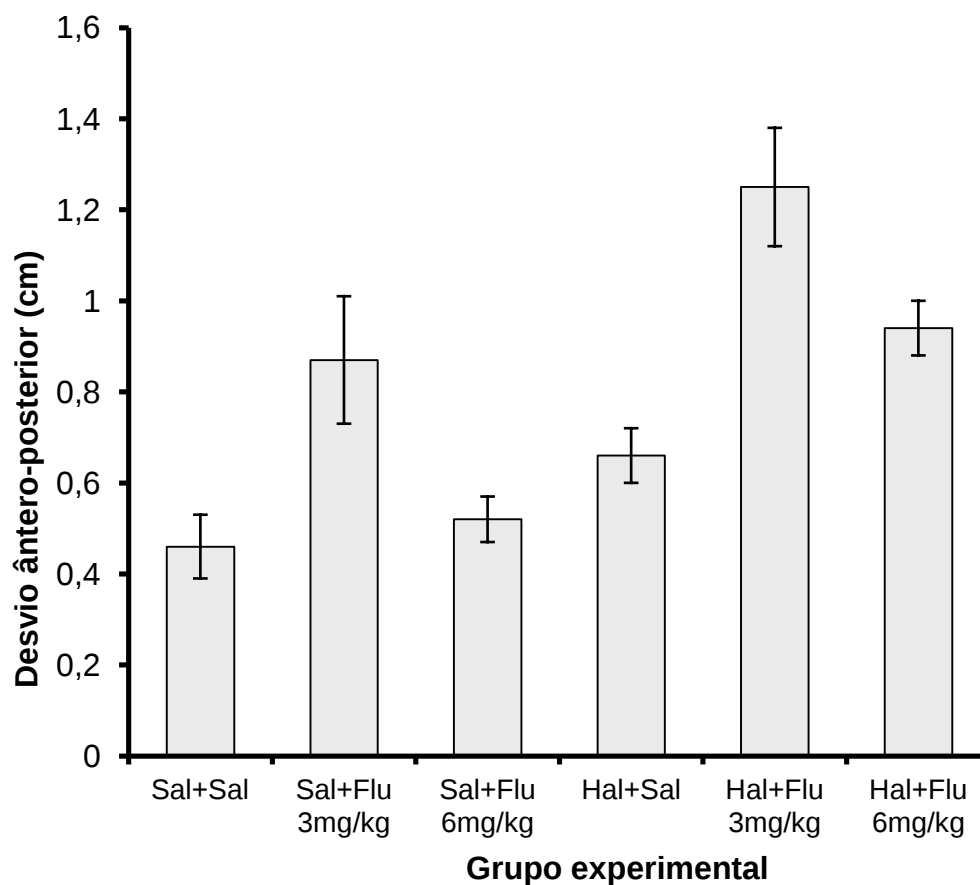


Figura 10 – Gráfico referente ao desvio ântero-posterior em cada grupo no Experimento II.

6.0 DISCUSSÃO

Neste estudo, no experimento I, a aplicação de Haloperidol causou catalepsia nos animais, sendo que Bicuculina, tanto na dose de 1 mg/kg, como na dose de 5 mg/Kg foi capaz de produzir uma reversão parcial significativa da catalepsia, nos momentos 30 e 60 minutos após a aplicação das drogas. No teste do Campo Aberto a aplicação de Haloperidol diminuiu significativamente tanto a exploração horizontal como a exploração vertical dos animais, porém, Bicuculina não foi capaz de reverter estes efeitos motores. Finalmente, no experimento I, Haloperidol não levou a alterações motoras significativas na avaliação funcional da marcha.

No experimento II, a catalepsia causada pelo Haloperidol foi parcialmente revertida apenas aos 60 minutos após a aplicação do Flumazenil, na dose de 3 mg/Kg. No teste do Campo Aberto, Flumazenil também não foi capaz de reverter os efeitos motores do Haloperidol. Diferente do que foi observado no experimento I, Haloperidol levou a uma diminuição no comprimento do passo dos animais, que foi parcialmente revertida pelo Flumazenil, na dose de 6 mg/Kg. Em relação ao desvio ântero-posterior, os resultados não foram conclusivos.

Vários estudos já demonstraram uma forte relação entre a neurotransmissão GABAérgica e a DP (CHEN *et al.*, 2013; DARBIN; WICHMANNI, 2008; HALLWORTH; BEVAN, 2005; KITA *et al.*, 2006; XUE; HAN; CHEN, 2010). Assim, neste estudo nos propusemos a avaliar se o bloqueio dos receptores GABA_A no globo pálido reverteria os distúrbios motores típicos da DP num modelo animal, utilizando dois antagonistas específicos: Bicuculina e Flumazenil. Esses antagonistas têm sido amplamente utilizados em estudos que visam entender a fisiopatologia da DP, e a relação do receptor GABA_A com outras doenças, como, ansiedade, alteração de memória, estresse (DESHPANDE; KHISTI; CHOPDE, 2001; MARTIN *et al.*, 2014; ONDO; HUNTER, 2003; ONDO; SILAY, 2006; PALOTAI; TELEGDY; JÁSZBERÉNYI, 2014; WHISSELL *et al.*, 2013)

A catalepsia é a principal disfunção encontrada em modelos animais da DP. Dessa forma, quando aplicado o antagonista do receptor GABA_A, Bicuculina, observamos a reversão do tempo de catalepsia de forma parcial, pois não houve retorno ao nível dos animais controles (Salina+Salina). A droga utilizada para o modelo animal, Haloperidol, é uma droga neuroléptica potente, que causa sintomas

de lesões extrapiramidais, como da doença de Parkinson, também quando utilizado em humanos (NAYEBI; SHEIDAEI, 2010).

Além da reversão ter ocorrido de forma parcial, também foi breve, ou seja, ocorreu apenas nos dois primeiros momentos da avaliação – 30 e 60 minutos após sua aplicação. Esse resultado corrobora com o estudo de Tostes, Medeiros e Melo-Thomas (2013), que observaram que o pico de ação da Bicuculina se dá, aproximadamente, 15 minutos após sua aplicação (via intracerebral), demonstrando que, provavelmente, sua ação já estava em declínio, uma vez que o primeiro teste só foi realizado 30 minutos após sua administração.

Petri *et al.* (2013) demonstraram que a ativação dos receptores GABA_A no núcleo subtalâmico aliviam os sintomas motores causados por lesão dos neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta*. Como a Bicuculina e o Flumazenil foram aplicados intraperitonealmente, o que leva a uma ação sistêmica, envolvendo os receptores GABA_A em várias estruturas do SNC, as suas administrações, além do bloqueio no globo pálido, podem ter atuado no núcleo subtalâmico, mantendo-o hiperativo, não revertendo totalmente a catalepsia como visto em nossos resultados, apesar de seus *inputs* GABAérgicos estarem reduzidos (KALIA; BROTHIE; FOX, 2013).

Provavelmente, outro fator que pode influenciar na interação das drogas utilizadas com o receptor GABA_A, é a variedade de subunidades existentes, tais como $\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$, ϵ , θ , e π , que se combinam em diferentes subtipos de receptores com diversas funções e farmacologia (JOHNSTON, 2013). Os subtipos dos receptores GABA_A que contêm a subunidade $\alpha 6$ são menos sensíveis a Bicuculina (JOHNSTON, 2013). Assim, se faz necessário, também, o conhecimento sobre quais combinações de subunidades são encontradas nas diferentes áreas do SNC, a fim de selecionar a droga mais adequada (BRICHTA; GREENGARD; FLAJOLET, 2013).

Nenhum estudo havia avaliado, ainda, a interação do sistema GABAérgico com os sintomas motores da doença de Parkinson, propriamente ditos. Alguns estudos têm usado a Bicuculina para testar a interação de outras diferentes drogas, que causam catalepsia, com o sistema GABAérgico. Por exemplo, em um estudo que investigou novas estratégias de tratamento para distúrbios psiquiátricos e buscou explicar a ação do receptor 5-HT, a Bicuculina foi capaz de reverter a

catalepsia, mesmo sendo aplicada intraperitonealmente (DESHPANDE; KHISTI; CHOPDE, 2001).

No experimento II, o Flumazenil foi capaz de reverter a catalepsia, parcialmente, 60 minutos após sua aplicação. Esta também é uma droga de ação rápida, com meia vida em torno de 0,7 a 1,3 horas, podendo seu efeito durar até 5 horas, administrados via oral (VOTEY *et al.*, 1991). Em um estudo que objetivou verificar as características da catalepsia causada por uma droga hipnótica não-benzodiazepínica - Zolpidem, animais que foram tratados previamente com o Flumazenil (intraperitoneal) tiveram seu tempo de catalepsia significativamente menor que os que receberam apenas o Zolpidem, 15 minutos após sua aplicação (MIERZEJEWSKI *et al.*, 2013).

O teste do campo aberto é um teste simples que avalia atividade motora global, vontade de explorar bem como comportamentos de ansiedade (PEÑA *et al.*, 2013) e tem sido utilizado em estudos que visam avaliar a melhora no desempenho motor de modelos animais da doença de Parkinson, utilizando diversos tipos de drogas (ARAÚJO *et al.*, 2013; MORAIS *et al.*, 2012; PEÑA *et al.*, 2013; MIAO *et al.*, 2014).

Na avaliação motora através do teste do campo aberto, nenhum dos dois antagonistas utilizados no estudo foi capaz de reverter a diminuição das explorações, tanto horizontal quanto vertical, causada pelo Haloperidol, o que corrobora com os achados do estudo Rodríguez-Landa *et al.* (2013), que mostrou que nem a Bicuculina e nem o Flumazenil foram capazes de melhorar a atividade motora prejudicada pelo fluido amniótico humano e por uma mistura de oito ácidos graxos.

Por outro lado, estudos têm demonstrado que o Flumazenil pode melhorar a atividade motora alterada por drogas que interagem com o sistema GABAérgico, avaliada pelo teste do campo aberto. Num estudo com objetivo de avaliar o mecanismo de ação do princípio ativo Tiliandin isolado a partir de um extrato metanol ativo da *Agastache mexicana*, utilizou-se o teste do campo aberto (realizado 60 minutos após aplicação das drogas) e o Flumazenil (via intraperitoneal dose de 5mg/Kg), para comprovar sua ação nos receptores GABA_A, onde este antagonista foi capaz de bloquear a alteração na atividade motora (GONZÁLEZ-TRUJANO *et al.*, 2015). Outro estudo, com objetivo de avaliar o mecanismo de ação do Phytol, também utilizaram o Flumazenil (via intraperitoneal, na dose de 2,5mg/Kg) e o teste

do campo aberto (realizado 30 minutos após a aplicação das drogas) e verificaram sua interação com o sistema GABAérgico através da melhora da atividade motora após a sua administração (COSTA *et al.*, 2014).

Neste estudo, na análise funcional da marcha, Haloperidol só foi capaz de causar alterações motoras perceptíveis no experimento II, as quais foram parcialmente revertidas pelo Flumazenil, demonstrando que este teste de avaliação motora talvez não seja sensível suficiente para detectar os déficits motores em modelos animais da DP. Esses dados concordam com o estudo de Bonito-Oliva, Masini e Fisone (2014), que avaliaram a dinâmica da marcha de animais com lesão por 6-OHDA, e não encontraram diferença significativa no comprimento do passo, base de sustentação, e desvios látero-lateral e ântero-posterior quando comparados com animais controles. Porém eles demonstraram anormalidades no ciclo do passo, como aumento da fase de balanço e diminuição da fase de apoio ambos nos membros posteriores, que não foram testados neste estudo.

Por outro lado, outro estudo avaliou as alterações motoras apresentadas por um modelo animal modificado geneticamente – camundongos A53T, evidenciou que os animais apresentaram o comprimento do passo diminuído, correspondente com as alterações de marcha encontradas em pacientes com a doença de Parkinson (PAUMIER *et al.*, 2013).

Assim, sugere-se a realização de novos estudos para elucidar as questões remanescentes, tais como o bloqueio do receptor GABA_A somente no globo pálido e o momento mais adequado para a realização dos testes motores, buscando abranger o pico de ação destes antagonistas.

7.0 CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos neste estudo é possível retirar as seguintes conclusões:

- Haloperidol levou a alterações no comportamento motor dos animais, tanto no teste de catalepsia, como no teste do Campo Aberto, compatíveis com déficits motores observados em pessoas com doença de Parkinson;
- Bicuculina e Flumazenil foram capazes de reverter parcialmente as alterações motoras causadas por Haloperidol, especificamente no tempo de catalepsia, porém, por um breve período de tempo;
- A avaliação funcional da marcha não se mostrou muito sensível às alterações motoras causadas por antagonismo de receptores dopaminérgicos;
- A neurotransmissão GABAérgica, especificamente por receptores GABA_A, parece estar intrinsecamente envolvida na circuitaria dos núcleos da base do encéfalo e a modulação da mesma pode ter um potencial terapêutico importante no tratamento da doença de Parkinson.

8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, D. P.; SOUSA, C. N. S.; ARAÚJO, P. V. P.; MENEZES, C. E. S.; RODRIGUES, F. T. S.; ESCUDEIRO, S. S.; LIMA, N. B. C.; PATROCÍNIO, M. C. A.; AGUIAR, L. M. V.; VIANA, G. S. B.; VASCONCELOS, S. M. M. Behavioral and neurochemical effects of alpha-lipoic acid in the model of Parkinson's disease induced by unilateral stereotaxic injection of 6-OHDA in rat. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-12, June 2013.

BERGMANN, R.; KONGSBÄK, K.; SØRENSEN, P. L.; SANDER, T.; BALLE, T. A unified model of the GABA_A receptor comprising agonist and benzodiazepine binding sites. **Plos One**, v. 8, n. 1, p. 1-13, Jan. 2013.

BOLAM, J. P.; HANEY, J. J.; BOOTH, A. C.; BEVAN, M. D. Synaptic organization of the basal ganglia. **Journal of Anatomy**, v. 196, p. 527-542, May 2000.

BONITO-OLIVA, A.; MASINI, D.; FISONE, G. A mouse model of non-motor symptom on Parkinson's disease: focus on pharmacological interventions targeting affective dysfunctions. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 27, n. 8, p. 1-12, Aug. 2014.

BRICHTA, L.; GREENGARD, P.; FLAJOLET, M. Advances in the pharmacological treatment of Parkinson's disease: targeting neurotransmitter systems. **Trends in Neuroscience**, v. 36, n. 9, p. 543-554, Sept. 2013.

BROTCHE, J. M. Adjuncts to dopamine replacement: a pragmatic approach to reducing the problem of dyskinesia in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 13, n. 6, p. 871-876, Nov. 1998.

BROTCHE, J. M.; LEE, J.; VENDEROVA, K. Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 112, n. 3, p. 359-391, Mar. 2005.

CELADA, P.; PALADINI, C. A.; TEPPER, J. M. GABAergic control of rat substantia nigra dopaminergic neurons: role of globus pallidus and substantia nigra pars reticulata. **Neuroscience**, v. 89, n. 3, p. 813-825, Jan. 1999.

CHEN, L.; YUNG, W. H. GABAergic neurotransmission in globus pallidus and its involvement in neurologic disorders. **Acta Physiologica Sinica**, v. 56, n. 4, p. 427-435, Aug. 2004.

CHEN, X. Y.; XUE, Y.; WANG, H.; ZHU, S. H.; HAO, X. M.; CHEN, L. Modulation of firing activity by endogenous GABA_A receptors in the globus pallidus of MPTP-treated parkinsonian mice. **Neuroscience Bulletin**, v. 29, n. 6, p. 1-7, Dec. 2013.

CLARKE, K. A.; STILL, J. Development and consistency of gait in the mouse. **Physiology & Behavior**, v. 73, n. 1-2, p. 159-164, May 2001.

COSTA, J. P.; OLIVEIRA, G. A. L.; ALMEIDA, A. A. C.; ISLAM, M. T.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Anxiolytic effects of phytol: possible involvement of GABAergic transmission. **Brain Research**, v.14, n. 1547, p. 34-42, Feb. 2014.

CURTIN, P. C. P.; PREUSS, T. Glycine and GABA_A receptors mediate tonic and phasic inhibitory process that contribute to prepulse inhibition in the goldfish startle network. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 24, n. 9, p. 1-9, Mar. 2015.

DARBIN, O.; WICHMANN, T. Effects of striatal GABA_A-receptor blockade on striatal and cortical activity in monkeys. **Journal of Neurophysiology**, v. 99, n. 3, p. 1294-1305, Mar. 2008.

DESHPANDE, L. S.; KHISTI, R. T.; CHOPDE, C. T. Cataleptic effect of neurosteroid 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one in mice: modulation by serotonergic agents. **Brain Research**, v. 898, n. 1, p. 13-26, Apr. 2001.

DIVLJAKOVIĆ, J.; MILIĆ, M.; NAMJOSH, I. O. A.; TIRUVEEDHULA, V. V.; TIMIĆ, T.; COOK, J. M.; SAVIĆ, M. M. β CCT, an antagonist selective for α 1GABA_A receptors, reverses diazepam withdrawal-induced anxiety in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 91, p. 1-7, Feb. 2013.

ENZ, R.; CUTTING, G. R. Molecular composition of GABA_C receptors. **Vision Research**, v. 38, n. 10, p.1431-1441, May 1998

FAN, K. Y.; BAUFRETON, J.; SURMEIER, D. J.; CHAN, C. S.; BEVAN, M. D. Proliferation of external globus pallidus-subthalamic nucleus synapses following degeneration of midbrain dopamine neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 40, p. 13718-13728, Oct. 2012.

GEERTS, H.; ROBERTS, P.; SPIROS, A. A quantitative system pharmacology computer model for cognitive deficits in schizophrenia. **Pharmacometrics & Systems Pharmacology**, v. 2, n. 4, p. 1-8, Apr. 2013.

GEWISS, M. V.; MARLEY, R. J.; THORNDIKE, E. B.; GOLDBERG, S. R.; SCHINDLER, C. W. GABA receptor-linked chloride channels and the behavioral effects of naltrexone in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 49, n. 3, p. 589-597, Nov. 1994.

GITTIS, A. H.; BERKE, J. D.; BEVAN, M. D.; CHAN, C. S.; MALLET, N.; MORROW, M. M.; SCHMIDT, R. New roles for the external globus pallidus in basal ganglia circuits and behavior. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 46, p. 15178-15183, Nov. 2014.

GONZÁLEZ-TRUJANO, M. E.; MUÑOZ, H. P.; FIGUEROA, S. H.; VÁZQUEZ, G. N.; SOTO, S. E. Depressant effects of *Agastache mexicana* methanol extract and one of major metabolites tilianin. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 3, p. 185-190, Mar. 2015.

HALLWORTH, N. E.; BEVAN, M. D. Globus pallidus neurons dynamically regulate the activity pattern of subthalamic nucleus neurons through the frequency-dependent activation of postsynaptic GABA_A and GABA_B receptors. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 27, p. 6304-6315, July 2005.

HOFFMAN, E. J.; WARREN, E. W. Flumazenil: a benzodiazepine antagonist. **Clinical Pharmacology**, v. 12, n. 9, p. 641-655, Sept. 1993.

HRUSKA, R. E.; KENNEDY, S.; SILBERGELD, E. K. Quantitative aspects of normal locomotion in rats. **Life Sciences**, v. 25, n. 2, p. 171-179, July 1979.

IACONO, G.; ALTAFINI, C.; TORRE, V. Early phase of plasticity-relates gene regulation and SRF dependent transcription in the hippocampus. **Plos One**, v. 8, n.7, p. 1-15, July 2013.

JACOB, T. C.; MOSS, S. J.; JURD, R. GABA_A receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 5, p. 331-343, May 2008.

JACOB, T. C.; MICHELS, G.; SILAYEVA, L.; HAYDON, J.; SCCOL, F.; MOSS, S. J. Benzodiazepine treatment induces subtype-specific changes in GABA_A receptor trafficking and decreases synaptic inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Physical Sciences**, v. 109, n. 45, p. 18595-18600, Nov. 2012.

JANKOVIC, J. Levodopa strengths and weaknesses. **Neurology**, v. 58, n. 4, Suppl 1, p. S19-S32, Feb. 2002.

JENNER, P. Pathophysiology and biochemistry of dyskinesia: clues for the development of non-dopaminergic treatments. **Journal of Neurology**, v. 247, Suppl 2, p. II43-II50, Apr. 2000.

JENNER, P. A2A antagonists as novel non-dopaminergic therapy for motor dysfunction in PD. **Neurology**, v. 61, n. 11, Suppl 6, p. S32-S38, Dec. 2003.

JOHNSTON, G. A. R. Advantages of an antagonist: bicuculline and other GABA antagonists. **British Journal of Pharmacology**, v. 169, n. 2, p. 328-336, May 2013.

JURI, C.; CHANÁ, P. Levodopa en la enfermedad de Parkinson: ¿qué hemos aprendido? **Revista Medica de Chile**, v. 134, n. 7, p. 893-901, jul. 2006.

KALIA, L. V.; BROTHIE, J. M.; FOX, S. H. Novel nondopaminergic targets for motor features of Parkinson's disease: review of recent trials. **Movement Disorders**, v. 28, n. 2, p. 131-144, Feb. 2013.

KHISTI, R. T.; MANDHANE, S. N.; CHOPDE, C. T. The neurosteroid 3 α -hydroxy-5 α -pregna-20-one induces catalepsy in mice. **Neuroscience Letters**, v. 251, n. 2, p. 85-88, June 1998.

KIM, S. N.; DOO, A. R.; PARK, J. Y.; CHOO, H. J.; SHIM, I.; PARK, J. J.; CHAE, Y.; LEE, B.; LEE, H.; PARK, H. J. Combined treatment with acupuncture reduces effective dose and alleviate adverse effect of L-dopa by normalizing Parkinson's disease-induced neurochemical imbalance. **Brain Research**, v. 28, n. 1544, p. 33-44, Jan. 2014.

KITA, H.; CHIKEN, S.; TACHIBANA, Y.; NAMBU, A. Origins of GABA_A and GABA_B receptor-mediated responses of globus pallidus induced after stimulation of the putamen in the monkey. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 24, p. 6554-6562, June 2006.

KORPI, E. S.; GRUNDER, G.; LÜDDENS, H. Drug interactions at GABA_A receptors. **Progress in Neurobiology**, v. 67, n. 2, p. 113-159, June 2002.

KUNKEL-BAGDEN, E.; DAI, H. N.; BREGMANN, B. S. Methods to assess the development and recovery of locomotor function after spinal cord injury in rats. **Experimental Neurology**, v. 119, n. 2, p. 153-164, Feb. 1993.

LANG, A. E.; OBESO, J. A. Challenges in Parkinson's disease restoration of the nigrostriatal dopamine system is not enough. **The Lancet Neurology**, v. 3, n. 5, p. 309-316, May. 2004.

LI, B.; TANG, F.; WANG, I.; LIU, L.; ZHAO, J.; ZHOU, Y.; WANG, Y.; SONG, Y.; LI, Y.; CUI, R. Anticonvulsant effects of fuzi total alkaloid on pentylenetetrazole-induced seizure in mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 123, n. 2, p. 195-198, Oct. 2013.

LOWDON, I. M.; SEABER, A. V.; URBANIAK, J. R. An improved method of recording rat tracks for measurement of the sciatic functional index of the Medinaceli. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 24, n. 3, p. 279-281, July 1988.

LÜSCHER, B. P.; BAUR, R.; GOELDNER, M.; SIGEL, E. Influence of GABA_A receptor subunit isoforms on the benzodiazepine binding site. **Plos One**, v. 7, n. 7, p. 1-8, July 2012.

MANTE, P. K.; ADONGO, D. W.; WOODE, E.; KUKUIA, K. K. E.; AMEYAW, E. O. Anticonvulsant effect of *Antiaris toxicaria* (Pers.) Lesch. (Moraceae) aqueous extract in rodents. **Pharmacology**, v. 2013, n. 18, p. 1-9, Sept. 2013.

MARTIN, C. B. P.; GASSMANN, M.; CHEVARIN, C.; HAMON, M.; RUDOLPHS, U.; BETTLER, B.; LANFUMEY, L.; MONGEAU, R. Effect of genetic and pharmacological blockade of GABA receptors on the 5-HT receptor function during stress. **Journal of Neurochemistry**, v. 131, n. 5, p. 566-572, Dec. 2014.

MATTOS, J. P.; MATTOS, V. M. B. C. Novos agonistas dopaminérgicos. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 57, n. 2, p. 329-332, jun 1999.

MENESES, M. S.; TEIVE, H. F. G. **Doença de Parkinson: aspectos clínicos e cirúrgicos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

MIAO, Y. L.; GUO, W. Z.; SHI, W. Z.; FANG, W. W.; LIU, Y.; LIU, J.; LI, B. W.; WU, W.; LI, Y. F. Midazolam ameliorates the behavior deficits of a rat posttraumatic stress disorder model through dual 18 kDa translocator protein and central benzodiazepine receptor and neurosteroid genesis. **PlosOne**, v. 9, n. 7, p. 1-7, July 2014.

MIERZEJEWSKI, P.; KOLACZKOWSKI, M.; NOWAK, N.; KORKOSZ, A.; SCINSKA, A.; SIENKIEWICZ-JERZY, H.; SAMOCHOWIC, J.; KOSTOWSKI, W.; BIENKOWSKI, P. Pharmacological characteristics of zolpidem-induced catalepsy in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 27, n. 556, p. 99-103, Nov. 2013.

MIZUNO, J. Flumazenil. **Masui**, v. 62, n. 1, p. 10-18, Jan. 2013.

MORAIS, L. H.; LIMA, M. M. S.; MARTYNHAK, B. J.; SANTIAGO, R.; TAKAHASHI, T. T.; ARIZA, D.; BARBIERO, J. K.; ANDREATINI, R.; VITAL, M. A. B. F. Characterization of motor depressive-like and neurochemical alterations induced by a short-term rotenone administration. **Pharmacological Reports**, v. 64, n. 5, p. 1081-1090, June 2012.

MULLENIX, P.; NORTON, S.; CULVER, B. Locomotor damages in rats after X-irradiation in utero. **Experimental Neurology**, v. 48, n. 2, p. 310-324, Aug. 1975.

NAYEBI, M. A.; SHEIDAEI, H. Buspirone improves haloperidol-induced Parkinson disease in mice through 5-HT receptors. **Daru Journal of Faculty of Pharmacy**, v. 18, n. 1, p. 41-45, Nov. 2010.

NELSON, A. B.; KREITZER, A. C. Reassessing models of basal ganglia function and dysfunction. **Annual Review of Neuroscience**, v. 37, p. 117-135, Dec. 2014.

NORMAN, G. R.; STREINER D. L. **Biostatistics the bare essentials**. London: Mosby, 1994.

OBESO, J. A.; OLANOW, C. W.; NUTT, J. G. Levodopa motor complication in Parkinson's disease. **Trends in Neuroscience**, v. 23, n.10, p. S2-S7, Oct. 2000.

OH, H. A.; KIM, D. E.; CHOI, H. J.; KIM, N. J.; KIM, D. H. Anti-stress effects of 20(s)-protopanaxadiol and 20 (s)-protopanaxatriol in immobilized mice. **Biological Pharmacy Bulletin**, v. 38, n. 2, p. 331-335, Jan. 2015.

OLANOW, C. W.; AGID, Y.; MIZUNO, Y.; ALBANESE, A.; BONUCCELLI, U.; DAMIER, P.; YEBENES, J. D.; GERSHANIK, O.; GUTTMAN, M.; GRANDAS, F.; HALLETT, M.; HORNYKIEWICZ, O.; JENNER, P.; KATZENSCHLAGER, R.; LANGSTON, W. J.; WITT, P. L.; MELAMED, E.; MENA, M. A.; MICHEL, P. P.; MYTILINEOU, C.; OBESO, J. A.; POEWE, W.; QUINN, N.; RAISMAN-VOZARI, R.; RAJPUT, A. H.; RASCOL, O.; SAMPAIO, C.; STOCCHI, F. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: current controversies. **Movement Disorders**, v. 19, n. 9, p. 997-1005, July 2004.

ONDO, W. G.; HUNTER, C. Flumazenil, a GABA antagonist, may improve features of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 18, n. 6, p. 683-711, June. 2003.

ONDO, W. G.; SILAY, Y. S. Intravenous flumazenil for Parkinson's disease: a single dose, double blind, placebo controlled, cross-over trial. **Movement Disorders**, v. 21, n. 10, p. 1614-1617, Oct. 2006.

OWENS, D. F.; KRIGSTEIN, A. R. Is there more to GABA than synaptic inhibition? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 9, p. 715-727, Sept. 2002.

PALOTAI, M.; TELEGDY, G.; JÁSZBERÉNYI, M. Orexin A-induced anxiety-like behavior is mediated through GABAergic, α - and β -adrenergic neurotransmissions in mice. **Peptides**, v. 57, p. 129-134, July 2014.

PAUMIER, K. L.; RIZZO, S. J. S.; BERGER, Z.; CHEN, Y.; GONZALES, C.; KAFTAN, E.; LI, L.; LOTARSKI, S.; MONAGHAN, M.; SHEN, W.; STOLYAR, P.; VASILYEV, D.; ZALESKA, M.; HIRST, W. D.; DUNLOP, J. Behavioral characterization of A53T mice reveals early and late stage deficits related to Parkinson's disease. **Plos One**, v. 8, n. 8, p. 1-14, Aug. 2013.

PEÑA, I. J. I.; LEE, H. L.; YOON, S. Y.; PEÑA, J. B. I.; KIM, K. H.; HONG, E. Y.; CHEONG, J. H. The ethanol of *Cirsium japonicum* increased chloride ion influx through stimulating GABA_A receptor in human neuroblastoma cells and exhibited anxiolytic-like effects in mice. **Drug Discoveries & Therapeutics**, v. 7, n. 1, p. 18-33, Feb. 2013.

PETRI, D.; MARTIN, P.; VESPER, J.; HUSTON, J. P.; SCHNITZLER, A. GABA_A-receptor activation in the subthalamic nucleus compensates behavioral asymmetries in the hemiparkinsonian rat. **Behavioural Brain Research**, v. 1, n. 252, p. 58-67, Sept. 2013.

QIU, J.; SHI, P.; MAO, W.; ZHAO, Y.; LIU, W.; WANG, Y. Effect of apoptosis in neural stem cells treated with sevoflurane. **Anesthesiology**, v. 15, n. 25, p. 1-8, Mar. 2015.

QUINN, N. P. Classification of fluctuations in patients with Parkinson's disease. **Neurology**, v. 51, n. 2, Suppl 2, p. S25-S29, Aug. 1998.

REDGRAVE, P.; RODRIGUEZ, M.; SMITH, Y.; OROZ, M. C. R.; LEHERICY, S.; BERGMAN, H.; AGID, Y.; DeLONG, M. R.; OBESO, J. A. Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n.11, p. 760-772, Nov. 2010.

RODRIGUEZ-LANDA, J. F.; GARCIA-RÍOS, I. G.; CUETO-ESCOBEDO, J. C.; BERNAL-MORALES, B. B.; CONTERAS, C.M. Participation of GABA_A chloride channels in the anxiolytic-like effects of a fatty acid mixture. **Biomedical Research International**, v. 2013, p. 1-7, Aug. 2013.

REGO, J. L.; VAUDRY, D.; VAUDRY, H. The non-benzodiazepine anxiolytic drug etiofoxine causes a rapid, receptor-independent stimulation of neurosteroid biosynthesis. **Plos One**, v. 10, n. 3, p. 1-20, Mar. 2015.

SANBERG, P. R.; BUNSEY, M. D.; GIORDANO, M.; NORMAN, A. B. The catalepsy test: its ups and downs. **Behavioral Neuroscience**, v. 102, n. 5, p. 748-759, Oct. 1988.

SANCAR, F.; CZAJKOWSKI, C. Allosteric modulators induce distinct movements at the GABA binding site interface of the GABA_A receptor. **Neuropharmacology**, v. 60, n.2-3, p.520-528, Feb/Mar. 2011.

SHIH, M. C.; AMARO JÚNIOR, E.; FERRAZ, H. B.; HOEXTER, M. Q.; GOULART, F. O.; WAGNER, J.; LIN, L. F.; 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 Neuropsiquiatria**, v. 64, n. 3-A, p. 628-634, set. 2006.

SHOT, S. **Statistics for health professionals**. London: W.B. Saunders Company, 1990.

SILVA, G. A. P.; KUMMERLE, A. E.; ANTUNES, F.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J.; ZAPATA-SUDO, G.; SUDO R. T. Impairment of locomotor activity induced by the novel N-acylhydrazones derivatives LASSbio-785 and LASSBio-786 in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, n. 3, p. 263-269, Mar. 2013.

SINGH, N.; PILLAY, V.; CHOONARA, Y. E. Advances in the treatment of Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 81, n. 1, p. 29-44, Jan. 2007.

SUZUKI, N.; HIROSE, Y.; KATAKURA, N.; KUBOTA, Y. Flumazenil antagonizes the suppressive effect of midazolam on the somatosensory evoked potentials in the rat. **Anesthesia Progress**, v. 38, n. 1, p. 17-20, Jan./Feb. 1991.

TAN, K. R.; BROWN, M.; LABOUÈBE, G.; YVON, C.; CRETON, C.; FRITSCHY, J. M.; RUDOLPH, U.; LÜSCHER, C. Neural bases for addictive properties of benzodiazepines. **Nature**, v. 463, n. 7282, p.769-774, Feb. 2010.

TEIVE, A. G. Etiopatogenia da doença de Parkinson. **Revista Neurociências**, v. 13, n. 4, p. 201-214, out./dez. 2005.

TOSTES, J. G.; MEDEIROS, P.; MELO-THOMAS, L. Modulation of haloperidol-induced catalepsy in rats by GABAergic neural substrate in the inferior colliculus. **Neuroscience**, v. 255, p. 212-218, Oct. 2013.

UENO, S.; BRACAMONTES, J.; ZORUMSKI, C.; WEISS, D. S.; STEINBACH, J. H. Bicuculline and gabazine are allosteric inhibitors of channel opening of the GABA_A receptor. **Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 2, p. 625-634, Jan. 1997.

VIANA, A. F.; MACIEL, I. S.; MOTTA, E. M.; LEAL, P. C.; PIANOWSKI, L.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive activity of *Trichilia catigua* hydroalcoholic extract: new evidence on its dopaminergic effects. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-8, Apr. 2011.

VOTEY, S. R.; BOSSE, G. M.; BAYER, M. J.; HOFFMAN, J. R. Flumazenil: a new benzodiazepine antagonist. **Annals of Emergency Medicine**, v. 20, n. 2, p. 181-188, Feb. 1991.

WALSH, R.; CUMMINS, R. A. The open-field test: acritical review. **Psychological Bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482-504, May 1976.

WHIMBEY, A. E.; DENENBERG, V. H. Two independent behavioral dimensions in open-field performance. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 63, n. 3, p. 500-504, June 1967.

WHISSELL, P. D.; ENG, D.; LECKER, I.; MARTIN, L. J.; WANG, D. S.; ORSER, B. A. Acutely increasing δ GABA_A receptor activity impairs memory and inhibits synaptic plasticity in the hippocampus. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 17, n. 7, p. 1-12, Sept. 2013.

XUE, Y.; BAI, B.; YUNG, W. H.; CHEN, L. Electrophysiological effects of neurotensin on globus pallidus neurons of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. **Neurosignals**, v. 17, n. 2, p. 153-161, Feb. 2009.

XUE, Y.; HAN, X. H.; CHEN, L. Effects of pharmacological block of GABA_A receptors on pallidal neurons in normal and parkinsonian state. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 4, n. 2, p. 1-10, Feb. 2010.

YU, T. S.; WANG, S. D.; LIU, J. C.; YIN, H. S. Changes in the gene expression of GABA_A receptor α 1 and α 2 subunits and metabotropic glutamate receptor 5 in embryonic mesencephalic grafts. **Experimental Neurology**, v. 168, n. 2, p. 231-241, Apr. 2001.

ZARRINDAST, M. R.; MODABBER, M.; SABETKASAI, M. Influences of different adenosine receptor subtypes on catalepsy in mice. **Psychopharmacology (Berlin)**, v. 113, n. 2, p. 257-261, Apr. 1993.

ZOLD, C. L.; LARRAMENDY, C.; RIQUELME, L. A.; MURER, M. G. Distinct changes in evoked and resting globus pallidus activity in early and late Parkinson's disease experimental models. **European Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 5, p. 1267-1279, Sept. 2007.

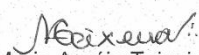
ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais /CEUA

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 586/2014 do Pesquisador Albert Schiaveto de Souza, referente ao projeto de pesquisa “Efeito de dois antagonista do receptor GABAA, aplicado via intraperitoneal, nas alterações do comportamento motor induzidas por inibição de receptores de dopamina”, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião ordinária do dia 28 de março de 2014.


Mária Araújo Teixeira

Coordenadora da CEUA/UFMS

Campo Grande, 01 de abril - 2014.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua@propp.ufms.br
fone (67) 3345-7184