

LEONARDO CAPELLO FILHO

**INTERAÇÃO ENTRE ADENOSINA E ÓXIDO NÍTRICO NOS NÚCLEOS
BASAIS: ANÁLISE DO COMPORTAMENTO EM UM MODELO
ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON**

CAMPO GRANDE
2012

LEONARDO CAPELLO FILHO

**INTERAÇÃO ENTRE ADENOSINA E ÓXIDO NÍTRICO NOS NÚCLEOS
BASAIS: ANÁLISE DO COMPORTAMENTO EM UM MODELO
ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Albert Schiaveto de Souza

CAMPO GRANDE
2012

FOLHA DE APROVAÇÃO

LEONARDO CAPELLO FILHO

**INTERAÇÃO ENTRE ADENOSINA E ÓXIDO NÍTRICO NOS NÚCLEOS
BASAIS: ANÁLISE DO COMPORTAMENTO EM UM MODELO
ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Resultado _____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____
Instituição _____

Prof. Dr. _____
Instituição _____

Prof. Dr. _____
Instituição _____

DEDICATÓRIA

À minha esposa, **Paula Renata Rici Capello**, pelo amor, carinho e palavras de incentivo.

À minha mãe, **Olga Maria Martins Capello**, pelo amor e pelo exemplo que me guia em todas as batalhas e me emociona em todas as conquistas. Minha eterna gratidão e amor.

Ao meu pai, **Leonardo Capello** (In Memoriam), pela luz, amor e proteção que me fortalece e me faz seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador, Prof. Dr. Albert Schiaveto de Souza, por dividir seu conhecimento científico com dedicação e atenção, pelo exemplo de humildade e compreensão. Minha eterna gratidão e respeito.
- Ao acadêmico de Fisioterapia da UFMS e aluno da iniciação científica, Ricardo Saravy de Araújo, pela valiosa contribuição na realização deste trabalho, pelos momentos de amizade e por dividir as preocupações e ansiedades ao longo desta caminhada.
- Ao técnico de laboratório, Luiz, por cuidar tão bem das nossas instalações e animais com amor, dedicação e muita força de vontade.
- A minha querida amiga e mestra, Prof^a. Dr^a. Mara Lisiane de Moraes dos Santos Barone, por todos os ensinamentos, amizade, respeito e companheirismo.
- A Prof^a. Dr^a. Lais Alves de Souza, pela contribuição, apoio e incentivo.
- A Fisioterapeuta Tatiana de Lima Leme, pela amizade e por cobrir os plantões que tive que me ausentar para a realização desta pesquisa.
- Aos meus familiares e amigos, pelas palavras de encorajamento.
- Ao Programa de Pós-Graduação Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste, através de seus professores e funcionários, que possibilitaram a realização de um grande sonho, a concretização de um grande projeto.
- A todos, que ajudaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho, sem os quais seria impossível alcançar essas metas.

“Nunca desista dos seus sonhos. Pois se
isso acontecer, você continuará vivendo,
mas terá deixado de existir.”

(Mark Twain)

RESUMO

Capello Filho L. Interação entre adenosina e óxido nítrico nos núcleos basais: análise do comportamento em um modelo animal da doença de Parkinson.

Campo Grande. 2012. [Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Introdução: A adenosina e o óxido nítrico (NO) desempenham um papel importante na função dos núcleos da base do encéfalo, todavia, a interação entre estes, na modulação do comportamento motor ainda permanece pouco esclarecida.

Objetivos: Avaliar a interação entre os neurotransmissores adenosina e óxido nítrico nos núcleos basais do encéfalo, por meio da avaliação do comportamento motor, em um modelo animal da Doença de Parkinson. **Material e Métodos:**

Animais e grupos experimentais de camundongos Suíços (n=144), machos, pesando entre 20-30g. Sete dias antes da aplicação das drogas e da avaliação do comportamento motor, os animais foram anestesiados e submetidos a uma cirurgia estereotáxica para implantação bilateral de cânulas de aço inox, direcionadas aos núcleos caudado e putâmen, as mesmas foram fixadas ao crânio com um capacete de resina acrílica e obturadas com uma guia interna de aço inox maciço.

Experimento I: os animais receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de salina ou de L-NOARG (40mg/kg), após uma hora foi feita a aplicação intracerebral (i.c.) de salina ou cafeína (5 e 10nM), perfazendo um total de seis grupos experimentais.

Experimento II: os animais receberam injeção i.p. de salina ou de L-NAME (40mg/kg), após uma hora foi feita a aplicação i.c. de salina ou cafeína (5 e 10nM), perfazendo um total de seis grupos experimentais.

Experimento III: os animais receberam injeção i.p. de salina ou de L-arginina (300mg/kg), após uma hora foi feita a aplicação i.c. de salina ou cafeína (5 e 10nM). Após os intervalos de tempo 5, 35, 65 minutos da aplicação das drogas, os animais foram submetidos à avaliação funcional no teste de catalepsia e campo aberto.

Análise estatística: A análise estatística foi realizada utilizando-se o “Software” SigmaStat, versão 2.0. A avaliação do efeito do grupo experimental e do momento de análise, bem como a interação entre estes dois fatores, em relação ao tempo de catalepsia, foi realizada por meio do teste ANOVA de duas vias de medidas repetitivas.

A comparação entre os momentos de análise, em relação ao tempo de catalepsia, foi realizada por meio do teste ANOVA de uma via de medidas repetitivas, seguida pelo pós-teste de Tukey.

Já a comparação entre os grupos experimentais, em relação ao tempo de catalepsia e aos comportamentos de exploração horizontal e vertical no Campo Aberto, foi realizada por meio do teste ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey.

Em todos os testes realizados foi considerado um nível de significância de 5%.

Resultados: A inibição da sintase do óxido nítrico (NOS), com L-NOARG E L-NAME, causaram catalepsia e hipolocomoção nos animais, sendo estas alterações do comportamento motor, parcialmente (L-NOARG) ou quase que totalmente (L-NAME) revertidas pela cafeína, um antagonista não-seletivo de receptores de adenosina. Além disso, estimulou o comportamento motor quando aplicada sem a indução da catalepsia.

Conclusão: As observações deste estudo sugerem uma estreita interação entre o óxido nítrico e a adenosina, onde uma estimula a atividade motora e a outra a inibe, respectivamente, nos núcleos da base do encéfalo.

Palavras-chave: adenosina, óxido nítrico, cafeína, doença de Parkinson, núcleos da base.

ABSTRACT

Capello Filho L. Interaction between adenosine and nitric oxide in the basal ganglia: behavior analysis in an animal model of Parkinson's disease. Campo Grande. 2011. [Dissertation – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Introduction: Adenosine and nitric oxide (NO) play an important role in the function of the basal ganglia of the brain, however, the interaction among them, in the modulation of motor behavior remains poorly understood. **Objectives:** To evaluate the interaction between the neurotransmitter adenosine and nitric oxide in basal ganglia of the brain, through the evaluation of motor behavior in an animal model of Parkinson's disease. **Material and Methods:** Animals and experimental groups of Swiss mice (n = 144), males, weighing between 20-30g. Seven days before the application of drugs and evaluation of motor behavior, the animals were anesthetized and underwent a bilateral stereotactic surgery for implantation of stainless steel cannulae, targeting the caudate and putamen, they were fixed to the skull with a helmet acrylic resin and filled with an internal stainless steel guide massive. Experiment I: animals were injected intraperitoneally (ip) of saline or L-NOARG (40mg/kg) after one hour was to use intracerebral (ic) of saline or caffeine (5 and 10nM), a total of six experimental groups. Experiment II: animals were injected ipsalpine or L-NAME (40mg/kg) one hour after the application was made ic of saline or caffeine (5 and 10nM), a total of six experimental groups. Experiment III: animals were injected ip of saline or L-arginine (300mg/kg), one hour after the application was made ic of saline or caffeine (5 and 10nM). After the time intervals 5, 35, 65 minutes of application of drugs, the animals underwent functional evaluation test in open field and catalepsy. **Statistical analysis:** Statistical analysis was performed using the "Software" SigmaStat, version 2.0. The evaluation of the effect of the experimental group and time of analysis, as well as the interaction between these two factors, with respect to time of catalepsy was performed using the two-way ANOVA for repeated measures. The comparison between the moments of analysis, with respect to time of catalepsy was performed using the one-way ANOVA for repeated measures followed by post-Tukey test. The comparison between the experimental groups, with respect to time of catalepsy and exploratory behaviors horizontal and vertical in the open field, was performed using the one-way ANOVA followed by Tukey post-test. In all tests was considered a significance level of 5%. **Results:** Inhibition of nitric oxide synthase (NOS) with L-NAME and L-NOARG caused catalepsy and hypolocomotion in animals, these changes in motor behavior, in part (L-NOARG) or almost completely (L-NAME) reversed by caffeine, a nonselective antagonist of adenosine receptors. In addition, stimulated motor behavior when applied without the induction of catalepsy. **Conclusion:** The observations in this study suggest a close interaction between nitric oxide and adenosine, which stimulates a motor activity and inhibits the other, respectively, in the basal ganglia of the brain.

Keywords: adenosine, nitric oxide, caffeine, Parkinson's disease, basal ganglia.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados referentes ao tempo de catalepsia para os grupos do Experimento I, mensurados 5, 35 e 65 minutos após a aplicação das drogas.....	33
Tabela 2 - Resultados referentes à exploração horizontal e vertical dos animais no Campo Aberto, 30 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do Experimento I..	35
Tabela 3 - Resultados referentes ao tempo de catalepsia para os grupos do Experimento II, mensurados 5, 35 e 65 minutos após a aplicação das drogas.....	37
Tabela 4 - Resultados referentes à exploração horizontal e vertical dos animais no Campo Aberto, 30 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do Experimento II ..	39
Tabela 5 - Resultados referentes ao tempo de catalepsia para os grupos do Experimento III, mensurados 5, 35 e 65 minutos após a aplicação das drogas.....	41
Tabela 6 - Resultados referentes à exploração horizontal e vertical dos animais no Campo Aberto, 30 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do Experimento III ..	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cirurgia estereotáxica em roedores, para implantação de cânulas direcionadas ao estriado..	24
Figura 2 - Local da aplicação da droga, no estriado da base do cérebro.	24
Figura 3 - Bomba de micro infusão.	25
Figura 4 - Infusão bilateral das drogas e seus veículos no estriado do camundongo	26
Figura 5 - Ilustração do experimento I	27
Figura 6 - Ilustração do experimento II	28
Figura 7 - Ilustração do experimento III	29
Figura 8 - Teste de catalepsia na barra	30
Figura 9 - Teste do Campo Aberto	31
Figura 10 - Arena cilíndrica	31
Figura 11 - Gráfico ilustrando o tempo de catalepsia para os grupos do experimento I, mensurados 5, 35 e 65 minutos após a aplicação das drogas	34
Figura 12 - Gráfico ilustrando o número de quadrantes percorridos (exploração horizontal) e de erguimentos (exploração vertical) expressos pelos animais no Campo Aberto, 30 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do experimento I	36
Figura 13 - Gráfico ilustrando o tempo de catalepsia para os grupos do experimento II, mensurados 5, 35 e 65 minutos após a aplicação das drogas	38
Figura 14 - Gráfico ilustrando o número de quadrantes percorridos (exploração horizontal) e de erguimentos (exploração vertical) expressos pelos animais no Campo Aberto, 30 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do experimento II	40
Figura 15 - Gráfico ilustrando o tempo de catalepsia para os grupos do experimento III, mensurados 5, 35 e 65 minutos após a aplicação das drogas	42

Figura 16 - Gráfico ilustrando o número de quadrantes percorridos (exploração horizontal) e de erguimentos (exploração vertical) expressos pelos animais no Campo Aberto, 30 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do experimento III.....44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCPA	2-cloro-N6-ciclopentiladenosina
Cpu	Caudado-putâmen
CEUA	Comissão de Ética no uso de animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle da experimentação Animal
DA	Dopamina
DP	Doença de Parkinson
i.p.	Intraperitoneal
i.c.	Intracerebral
L-DOPA	L3,4-dihydroxyphenylalanine
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginine methyl Ester
L-NOARG	N ^G -nitro-L-arginine
NECA	5',N-Ethylcarboxamidoadenosine
5HT	5- hidroxitriptamina
6-OHDA	6-hidroxidopamina
7-NI	7' Nitroindazole
MPP ⁺	1-metil-4-phenylpyridinium
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidroperidina
NMDA	N-metil D-Aspartato
NADPH-d	Atividade diaforásica da enzima dinucleotídeo de nicotinamida adenina fosfatada.
NO	Óxido Nítrico
NOS	Sintase de Óxido Nítrico
SNC	Sistema Nervoso Central
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	Centímetro
g	Gramma
kg	Kilograma
MG	Miligrana
n	Tamaño da amostra
nM	Nanomol
μl	Microlitro
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
3 OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos	21
4 MATERIAL E MÉTODO	22
4.1 Animais	22
4.2 Drogas	22
4.3 Vias de administração das drogas	23
4.3.1 Via intraperitoneal	23
4.3.2 Via intracerebral	23
4.4 Experimentos e grupos experimentais	26
4.4.1 Experimento I - Efeito da cafeína nas alterações do comportamento motor induzidas pelo L-NOARG	26
4.4.2 Experimento II: Efeito da cafeína nas alterações do comportamento motor induzidas pelo L-NAME	27
4.4.3 Experimento III: Efeito da cafeína nas alterações do comportamento motor induzidas por L-arginina	28
4.5 Avaliação funcional dos animais	29
4.5.1 Teste de catalepsia na barra	29
4.5.2 Teste do campo aberto.....	30
4.6 Descarte dos animais	32
4.7 Análise estatística	32
5 RESULTADOS	33
6 DISCUSSÃO	45
7 CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Parkinson (DP) é primariamente uma doença da função motora extrapiramidal, causada por degeneração severa de neurônios dopaminérgicos da substância negra. O tratamento corrente da doença de Parkinson está baseado na terapia dopaminérgica, visando reverter os efeitos da depleção de dopamina estriatal induzida pela destruição da via Nigro-estriatal (QUINN, 1998; OBESO; OLANOW; NUTT, 2000; JANKOVIC, 2002) .

O tratamento sintomático da doença de Parkinson com L-dopa e drogas agonistas de dopamina (DA) predominam a terapia e são altamente efetivas em tratar os estágios iniciais da doença. Todavia, a introdução de drogas dopaminérgicas está associada com efeitos colaterais agudos, tais como náusea, vômito e hipotensão, além de uma série de complicações relacionadas ao tratamento a longo prazo, as quais aumentam em severidade com a progressão da doença. Além disso, todas as terapias utilizadas atualmente tratam os sintomas e não modificam significativamente a progressão da doença. Como consequência disso, há necessidade do desenvolvimento de novas manipulações farmacológicas para o tratamento da DP, com o objetivo de produzir agentes com ação anti-parkinsonianas em todas as fases da doença, sem perda da eficácia da droga e que previna o surgimento de discinesias (JENNER, 2003).

O estudo de novas terapias para a DP está voltada para sistemas não dopaminérgicos dentro dos núcleos basais que vão além das vias nigro-estriatais lesionadas (BROTCHIE, 1998; JENNER, 2000). Vários agentes apresentando um potencial terapêutico têm sido descritos, incluindo agentes que atuam em receptores glutamatérgicos, canabinóides, opióides, α_2 -adrenérgicos e receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos (JENNER, 2003).

A identificação de receptores de adenosina A2A nos núcleos basais, como uma maneira potencial de modificar o comportamento motor, por meio de um mecanismo não dopaminérgico, pode ter consequências terapêuticas importantes para o tratamento futuro da DP (ONGINI & FREDHOLM, 1996; SVENNINGSSON *et al.*, 1999; KASE, 2001; JENNER, 2003) .

A cafeína é um antagonista não-seletivo de receptores de adenosina e a droga psicoestimulante mais consumida no mundo. Evidências experimentais

sugerem que a cafeína tem potencial antiparkinsoniano por conter propriedades que bloqueiam os receptores de adenosina A2A estriatal reduzindo a liberação de acetilcolina no estriado (RICHARDSON *et al.*, 1997; SVENNINGSSON *et al.*, 1999; FERRE *et al.*, 2001).

No entanto, outros neurotransmissores, além de adenosina e dopamina, estão presentes nos núcleos da base e participam da modulação do comportamento motor (HALCAK *et al.*, 2000; DEL BEL *et al.*, 2002). Entre eles está o óxido nítrico (NO) que é uma molécula lipossolúvel de vida curta gerada a partir do aminoácido L-arginina por uma família de enzimas chamadas óxido nítrico sintases (NOS) e tem se mostrado como modulador da integração das informações processadas pelos núcleos dos gânglios basais e modula a liberação de vários neurotransmissores, incluindo DA, 5-HT, acetilcolina e GABA. (NETO *et al.*, 2009).

O estudo de novas drogas como o NO e adenosina no tratamento da doença de Parkinson é de extrema importância, visando um avanço nas terapias medicamentosas realizadas na medicina atual.

Assim, neste trabalho foi proposto testar o efeito de um antagonista de adenosina na catalepsia induzida por inibidores de óxido nítrico, por meio do teste de catalepsia, e as possíveis modificações no comportamento motor decorrentes da interação destes neurotransmissores, por meio do teste do campo aberto.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A adenosina desempenha um papel importante em regular um conjunto de funções fisiológicas no sistema nervoso central (SNC). Adenosina está presente em todas as partes do SNC de mamíferos e tem sido conhecida como moduladora da função neuronal via receptores de membrana celular específicos. No SNC ela está co-localizada nos terminais pré-sinápticos com uma variedade de neurotransmissores dos quais é liberada depois da despolarização, com a finalidade de modular a atividade neuronal (ABBRACCHIO; CATTABENI, 1999). Adenosina se liga a receptores de membrana específicos, acoplados a proteína G (FREDHOLM *et al.*, 1994). Quatro sub-tipos principais de receptores de adenosina têm sido caracterizados de acordo com sua seqüência primária e suas propriedades bioquímicas e farmacológicas: A1, A2A, A2B e A3 (FREDHOLM *et al.*, 1994).

Receptores do tipo A1 são vastamente distribuídos em todas as partes do cérebro (ex. hipocampo, córtex cerebral, tálamo e cerebelo), onde eles regulam a liberação de neurotransmissores e os disparos neuronais. Atuando em receptores do tipo A1 localizados na região pré-sináptica, a adenosina suprime a liberação de vários neurotransmissores (incluindo glutamato e dopamina), enquanto que a ativação pós-sináptica destes receptores induz hiperpolarização neuronal (BRUNDEGE; DUNWIDDIE, 1997). Esta atividade inibitória, que é aumentada sob condições neurotóxicas, coloca adenosina como um importante agente em mecanismos de neuroproteção (BRUNDEGE; DUNWIDDIE, 1997; RALEVIC; BURNSTOCK, 1998).

Por outro lado, receptores do tipo A2 são normalmente facilitatórios. Eles são particularmente expressos em regiões ricas em receptores de dopamina, onde se co-localizam com receptores do tipo D2 (FINK *et al.*, 1992). A ativação de receptores A2A de adenosina reduz a atividade de receptores D2 a agonistas dopaminérgicos, incluindo o ligante endógeno dopamina (FERRE *et al.*, 1991; FERRE *et al.*, 1997).

Nos núcleos da base, neuromodulação pela adenosina desempenha um papel crucial no controle motor (FERRE *et al.*, 1997). Vários estudos de comportamento indicam que ativação ou bloqueio de receptores A2 de adenosina inibe ou estimula, respectivamente, efeitos mediados por receptores D2 de dopamina, provavelmente por meio de interação direta entre os receptores A2 de

adenosina e D2 de dopamina (FERRE *et al.*, 1992; BARRACO *et al.*, 1993; MORELLI *et al.*, 1994; ONGINI; FREDHOLM, 1996).

No caudado-putámen (Cpu ou estriado), a estrutura de maior entrada dos núcleos da base, receptores A2A são seletivamente expressos e co-localizados com receptores D2 de dopamina, em uma sub-população de neurônios projetando para o globo pálido (SCHIFFMANN *et al.*, 1991; FINK *et al.*, 1992). Estes neurônios estriato-palidais constituem a via indireta, uma das duas maiores vias de saída do Cpu que controla a atividade dos núcleos de saída dos núcleos da base, i.e. a substância negra, pars reticulada e o núcleo entopeduncular.

Em contraste, neurônios estriato-nigrais e estriato-entopedunculares, regulados por receptores A1 e D1 (FERRE *et al.*, 1997), constituem a via direta dos núcleos da base. A via direta e indireta tem efeitos opostos na atividade motora (ALBIN; YOUNG; PENNEY, 1989).

Bloqueio sistêmico de receptores A2A estimulou rotações contra-laterais dependentes de receptores D1 e D2 em ratos lesados com 6-hidroxidopamina (PINNA *et al.*, 1996; POLLACK; FINK, 1996; FENU *et al.*, 1997). Além disso, administração sistêmica de antagonistas de receptores A2A reverteu catalepsia induzida por bloqueio de receptores ou depleção de dopamina e potencializou os efeitos anti-catalépticos da L-DOPA (KANDA *et al.*, 1994; HAUBER *et al.*, 1998; KANDA *et al.*, 1998; SHIOZAKI *et al.*, 1999; HAUBER *et al.*, 2001).

Os efeitos motores sinérgicos ou antagônicos mediados por ligantes de receptores A2A e D2 poderia ser explicado por interações diretas entre receptores A2A-D2 nos neurônios estriato-palidais (FERRE *et al.*, 1997). Em contraste, interações entre a via direta e a via indireta pode explicar os efeitos motores sinérgicos e antagônicos dos ligantes de receptores A2A e D1 (PINNA *et al.*, 1996; FERRE *et al.*, 1997), já que os respectivos receptores estão localizados em populações separadas de neurônios estriatais. Dados de comportamento mais recentes sugerem que interações entre receptores A2A-D1 (POPOLI; REGGIO; PEZZOLA, 2000) pode não ser tão fortes como as interações entre os receptores A2A-D2 (PINNA *et al.*, 1996; POLLACK; FINK, 1996; FENU *et al.*, 1997; STROMBERG *et al.*, 2000).

Evidências experimentais sugerem que cafeína, um alcalóide vastamente conhecido por suas propriedades estimulantes do SNC (FREDHOLM *et al.*, 1999), apresenta propriedades anti-parkinsonianas por meio do bloqueio de receptores

estriatais de adenosina A2A (SVENNINGSSON *et al.*, 1999; FERRE *et al.*, 2001). Adenosina provê um tono inibitório a várias regiões cerebrais e a estimulação de comportamentos pela cafeína e teofilina são atribuídos ao antagonismo não seletivo dos receptores de adenosina A1/A2A (BRUNDEGE; DUNWIDDIE, 1997).

Por outro lado, tem sido demonstrado que agonistas de receptores de adenosina produzem hipomobilidade (DURCAN; MORGAN, 1989) e têm efeito ansiolítico em camundongos (JAIN *et al.*, 1995), sendo o efeito motor atribuído a receptores do A2 e o efeito ansiolítico a receptores A1 (JAIN *et al.*, 1995). Todavia, alguns agonistas induzem modificações no comportamento de forma bifásica. Por exemplo, 5', N-Ethylcarboxamidoadenosine (NECA) um agonista não seletivo de receptores de adenosina e 2-cloro-N6-ciclopentiladenosina (CCPA) agonista seletivo A1, em doses baixas estimulam e em doses altas inibem locomoção (FLORIO *et al.*, 1997). Agonistas de receptores de adenosina podem ainda induzir catalepsia (FERRE *et al.*, 1991; ZARRINDAST; MODABBER; SABETKASAI, 1993) ou potencializar catalepsia induzida por antagonistas de dopamina (KHISTI; CHOPDE; ABRAHAM, 2000).

No entanto, outros neurotransmissores, além de adenosina e dopamina, estão presentes nos núcleos da base e participam da modulação do comportamento motor (HALCAK *et al.*, 2000; DEL BEL *et al.*, 2002). Entre eles, pode-se citar o neuromodulador óxido nítrico (NO), o qual tem de forma crescente sido reconhecido como um mensageiro inter e extracelular no SNC (PRAST; PHILIPPU, 2001).

Ativação de receptores N-Methyl-D-aspartate (NMDA) é um estímulo pivô para a produção de NO em neurônios, em um processo dependente de Ca^{2+} -calmodulina (KISS; VIZI, 2001; PRAST; PHILIPPU, 2001). NO, o qual pode se difundir por distâncias relativamente grandes no tecido cerebral (LANCASTER, JR., 1997), é também hábil para regular a atividade sináptica (KISS; VIZI, 2001; PRAST; PHILIPPU, 2001). Entre seus papéis extra-celulares, o NO tem sido mostrado regulando a liberação de vários neurotransmissores, tais como aminoácidos, dopamina, acetilcolina e serotonina (PRAST; PHILIPPU, 2001). Na análise do comportamento, moduladores de NO exercem resultados incongruentes, como mostrado pelos efeitos similares produzidos tanto por aumento como por diminuição dos níveis de NO, observados em hiper-locomoção induzida por antagonistas de receptores NMDA (JOHANSSON; JACKSON; SVENSSON, 1997; BUJAS-

BOBANOVIC *et al.*, 2000), epilepsia, sono (FARADJI *et al.*, 2000) e lesão cerebral (IADECOLA *et al.*, 1997).

Tem sido demonstrado que inibidores da sintase do óxido nítrico (NOS) produzem catalepsia em camundongos (MARRAS *et al.*, 1995; DEL BEL; DA SILVA; GUIMARAES, 1998) e em ratos (DEL BEL *et al.*, 2004), a qual é potencializada pela co-administração de haloperidol (CAVAS; NAVARRO, 2002; DEL BEL *et al.*, 2004).

A interferência com a formação do NO também pode produzir déficits em outros testes motores. Inibidores da NOS diminuem locomoção e exploração vertical de camundongos no teste do campo aberto (DEL BEL *et al.*, 2002) e a atividade motora espontânea de ratos (HALCAK *et al.*, 2000). Os inibidores da NOS, L-NOARG e 7-NI suprimem a atividade locomotora induzida por agonistas de receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ (STARR; STARR, 1995). Estes autores levantaram a hipótese que a atividade contínua ou tônica da NOS constitutiva seria necessária para ocorrerem movimentos normais do corpo. A administração sistêmica de antagonistas de receptores da dopamina do tipo D₁ diminuem a atividade da NADPH-d em neurônios estriatais, enquanto que antagonistas de receptores do tipo D₂ produzem o efeito oposto (MORRIS *et al.*, 1997).

Doadores de NO estimulam a liberação de adenosina em *slíces* hipocampais (FALLAHI *et al.*, 1996; BROAD; FALLAHI; FREDHOLM, 2000) e em culturas neuronais, por meio da inibição da adenosina-quinase (ROSENBERG *et al.*, 2000). De forma similar, doadores de NO aumentam, ao passo que inibidores da sintase do óxido nítrico (NOS) diminuem os níveis de adenosina estriatal *in vivo* (FALLAHI *et al.*, 1996). Todavia, a interação entre NO e adenosina não está bem esclarecida ao nível do comportamento.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a interação entre os neurotransmissores adenosina e óxido nítrico nos núcleos basais de camundongos, por meio da avaliação do comportamento motor em um modelo animal da Doença de Parkinson.

3.2 Objetivos específicos

a) Avaliar o efeito da cafeína, um antagonista não seletivo de receptores de adenosina, aplicada por via intracerebral, no comportamento de catalepsia em camundongos, induzida por inibição da sintase do óxido nítrico (NOS) com L-NOARG ou L-NAME, aplicados por via intraperitoneal, por meio do teste de catalepsia;

b) Estudar as possíveis modificações no comportamento motor decorrentes da interação destes neurotransmissores, por meio do teste do campo aberto.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais

Neste experimento foram utilizados 144 camundongos Suíços, machos, oriundos do biotério central da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), adultos jovens, pesando entre 20-30g. Os animais foram mantidos, no biotério, com água e comida a vontade até o início dos testes. O ciclo de luz (12/12 hs, luzes ligadas às 6:00 h) e a temperatura ambiente ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$) foram controlados. Todos os experimentos foram realizados conforme preconizados pela Lei nº 11794 de 08 de outubro de 2008 e pela Resolução normativa nº 1 de 09 de julho de 2010, do CONCEA, sendo os protocolos experimentais aprovados pelo Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), sob o protocolo nº 276/2010 (Anexo 1). Os animais que foram a óbito durante ou após a realização da cirurgia foram descartados. Ao final dos experimentos, todos os procedimentos foram realizados novamente com animais de reposição. Neste estudo houve 16 óbitos por hipotermia pós-cirúrgica e dois grupos foram descartados por adequação no intervalo de tempo entre a aplicação das drogas. Esses animais foram repostos e realizados novamente todos os procedimentos. Esta reposição foi aprovada e autorizada pelo CEUA da UFMS que manifestou parecer favorável, sob a CI nº 8/2011 (Anexo 2).

4.2 Drogas

Antagonista não seletivo de receptores de adenosina: cafeína (Sigma); inibidores da sintase do óxido nítrico (NOS): N^{G} -nitro-L-arginine (L-NOARG - Sigma) e N^{G} -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME - Sigma); substrato para a enzima NOS: L-arginina (Sigma). Todas as drogas foram dissolvidas em solução salina a 0,9%.

4.3 Via de administração das drogas

As drogas inibidoras da síntese do óxido nítrico foram administradas por via intraperitoneal. A droga antagonista não seletivo de receptores de adenosina foi administrada por via intracerebral, conforme técnicas descritas a seguir:

4.3.1 Via Intraperitoneal

Após sete dias da cirurgia estereotáxica (descrita no item 4.3.2) foi iniciado a infusão das drogas (inibidoras da síntese do óxido nítrico) e os respectivos veículos por via intraperitoneal. Após uma hora da administração intraperitoneal foi iniciado o processo de administração intracerebral (descrito no item 4.3.2).

4.3.2 Via intracerebral

Para as injeções intracerebrais das drogas no estriado, sete dias antes da aplicação das drogas e da avaliação do comportamento de catalepsia, os animais foram anestesiados (via i.p.) com Ketamina (70mg/kg) e Xilasina (10mg/kg), misturadas na mesma seringa e submetidos a uma cirurgia estereotáxica utilizando um aparelho estereotáxico da marca *Insight* (Figura 1) para implantação bilateral de cânulas de aço inox, direcionadas aos ventrículos laterais do cérebro, próximo aos núcleos caudado e putâmen (Cpu ou estriado), de acordo com as coordenadas referenciadas pelo atlas de Paxinos e Franklin (2008): (Antero-posterior - 0,5 mm, latero-lateral +/-2,5mm e vertical -2,7mm do bregma – figuras 2 A e B).

Ao final da implantação das cânulas, as mesmas foram fixadas ao crânio com um capacete de resina acrílica e obturadas com uma guia interna de aço inox maciço. Após este procedimento o animal foi deixado para se recuperar da cirurgia até o dia do teste (após 7 dias).

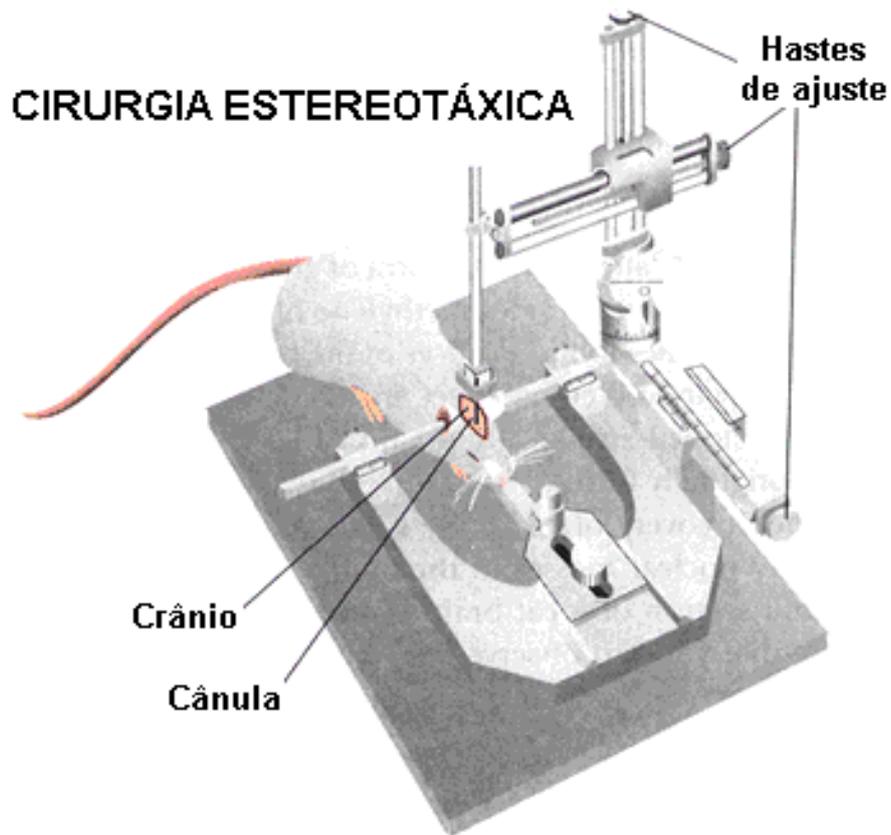


Figura 1 - Cirurgia estereotáxica em roedores, para implantação de cânulas direcionadas ao estriado.

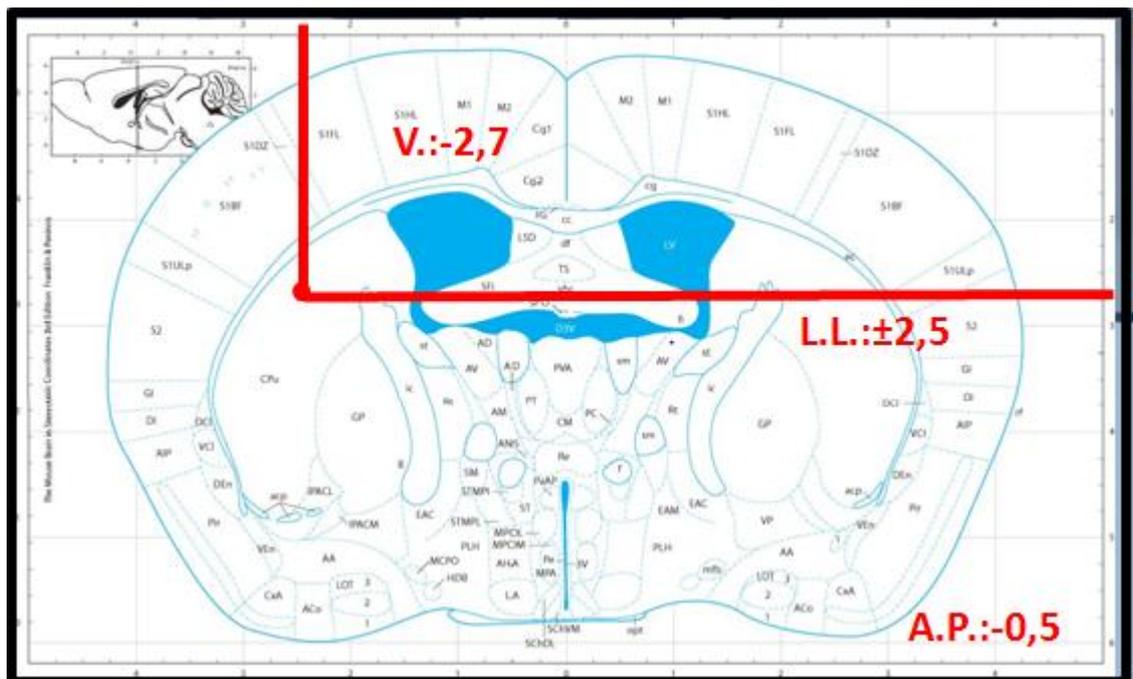


Figura 2 – Local da aplicação da droga, no estriado da base do cérebro.
 Fonte: The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates 3rd Edition Franklin e Paxinos, 2007.

No dia da injeção das drogas, com o animal acordado, os obturadores foram retirados e uma cânula de injeção, ligada a uma bomba de micro infusão (Figura 3) por um tubo de polipropileno, foi baixada pela cânula guia até o sítio final de infusão (estriado). A droga e os respectivos veículos foram então infundidos bilateralmente no estriado (1 μ l por hemisfério), a uma taxa de infusão de 0,33 μ l/minuto (Figura 4).

Após a infusão da droga, a cânula de injeção foi deixada na mesma posição por mais 1 minuto para permitir a difusão da droga no tecido nervoso, sendo então realizado o primeiro teste de catalepsia após 5 minutos da retirada da cânula de injeção. Foram realizados mais dois testes de catalepsia, um após 35 minutos e outro após 65 minutos. O teste no campo aberto foi realizado após 35 minutos da retirada da cânula de injeção.



Figura 3 – Bomba de micro infusão.



Figura 4 – Infusão bilateral das drogas e seus veículos no estriado do camundongo.

4.4 Experimentos e grupos experimentais

Foram realizados 3 experimentos, com 6 grupos em cada um deles, como 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 cafeína nas alterações do comportamento motor induzidas pelo L-NOARG

Neste experimento os animais receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de salina ou de L-NOARG (40mg/kg), após uma hora foi feita a aplicação intracerebral (i.c.) de salina ou cafeína (5 e 10nM). Foram realizados os seguintes grupos experimentais (Figura 5):

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

Grupo 2 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de salina e após 1 hora, injeção i.c. de cafeína (5nM);

Grupo 3 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de salina e após 1 hora, injeção i.c. de cafeína (10nM);

Grupo 4 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de L-NOARG (40mg/kg) e após 1 hora, injeção i.c. de salina;

Grupo 5 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de L-NOARG (40mg/kg) e após 1 hora, injeção i.c. de cafeína (5nM);

Grupo 6 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de L-NOARG (40mg/kg) e após 1 hora, injeção i.c. de cafeína (10nM).

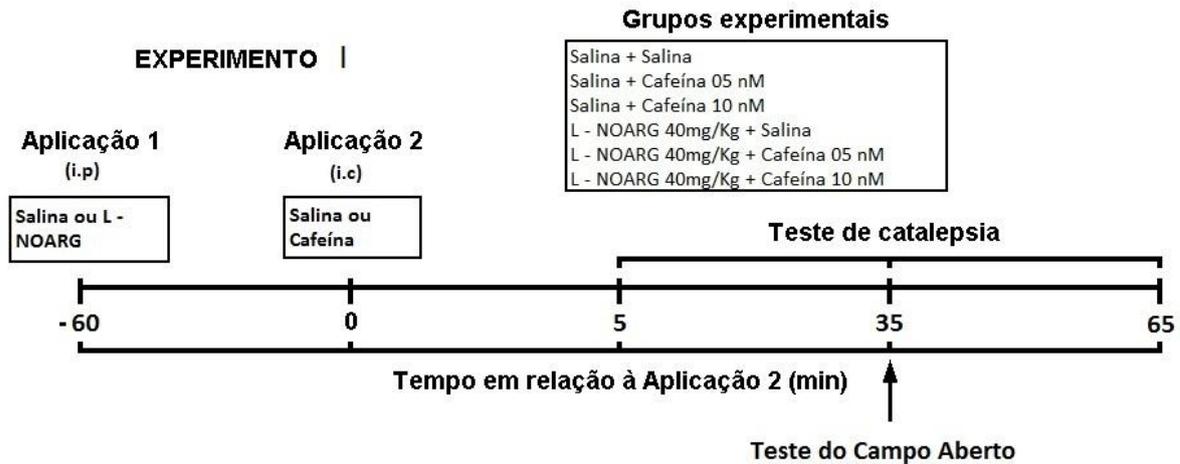


Figura 5 – Ilustração do experimento 1.

4.4.2 Experimento II: Efeito da cafeína nas alterações do comportamento motor induzidas pelo L-NAME

Neste experimento os animais receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de salina ou de L-NAME (40mg/kg), após uma hora foi feita a aplicação intracerebral (i.c.) de salina ou cafeína (5 e 10nM). Foram realizados os seguintes grupos experimentais (Figura 6):

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

Grupo 2 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de salina e após 1 hora, injeção i.c. de cafeína (5nM);

Grupo 3 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de salina e após 1 hora, injeção i.c. de cafeína (10nM);

Grupo 4 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de L-NAME (40mg/kg) e após 1 hora, injeção i.c. de salina;

Grupo 6 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de L-arginina (300mg/kg) e após 1 hora, injeção i.c. de cafeína (10nM).

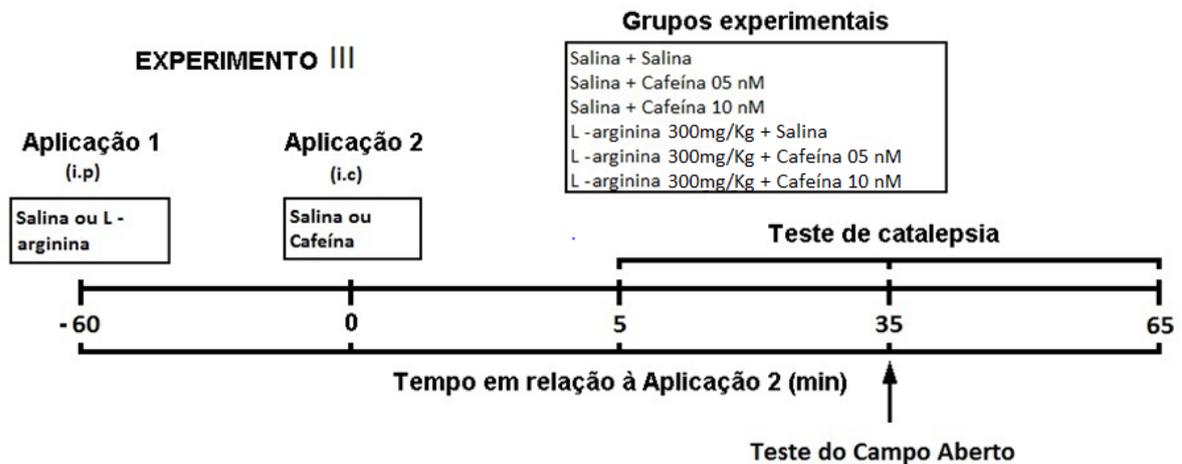


Figura 7 – Ilustração do experimento 3.

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) e do teste do campo aberto (WALSH, 1976; WHIMBEY, 1967). Os testes de comportamento foram realizados sempre no mesmo horário e local, com o mesmo pesquisador, como descritos a seguir:

4.5.1 Teste de catalepsia na barra

A catalepsia foi avaliada de acordo com método da barra (Figura 8), onde o camundongo é colocado com ambas as patas anteriores sobre uma barra de vidro horizontal (diâmetro de 0,5 cm), elevada 4,5 cm do solo (SANBERG et al., 1988). O tempo em segundos, durante o qual o animal permanece nesta posição foi registrado, até um tempo máximo de 300 segundos (ZARRINDAST; MODABBER; SABETKASAI, 1993), permitindo três tentativas de colocação do animal em posição cataléptica. O tempo de catalepsia foi considerado finalizado quando as patas anteriores tocaram o solo ou quando o camundongo subiu na barra. As medidas foram realizadas depois de 5, 35 e 65 minutos após a administração das drogas.



Figura 8 – Teste de catalepsia na barra.

4.5.2 Teste do campo aberto

Este teste foi utilizado para avaliar o estado motor do animal. Este teste foi inicialmente descrito e utilizado por Calvin S. Hall na década de 1930, sendo o seu uso estendido e modificado por P. L. Broderhurst na década de 1960, em estudos sobre o medo e a herança do comportamento. Através dos estudos de Whimbey e Denenberg (1967), ficou demonstrado que no teste de campo aberto, havia uma forte correlação positiva entre o comportamento de ambulação e o comportamento exploratório do rato (exceto no primeiro dia de teste no campo aberto), e negativamente relacionado com o medo e a quantidade de bolos fecais expelidos durante o teste (*apud* GRAY, 1987). Outros parâmetros de avaliação foram sendo gradativamente acrescentados ao teste, sendo que atualmente, mais de 30 itens são listados neste teste (WALSH, 1976).

No laboratório, os parâmetros avaliados durante a realização do teste do campo aberto foram: a frequência dos comportamentos de exploração horizontal (quadrantes percorridos – Figura 9) e vertical (erguimentos), 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 é subdividida em 12 quadrantes de 104,67 cm² cada (Figura 10). A duração do teste foi de 5 minutos, sendo quantificado cada um dos comportamentos durante este tempo.



Figura 09 – Teste do Campo Aberto.



Figura 10 – Arena cilíndrica.

4.6 Confirmação da localização das cânulas e descarte dos animais

Após o procedimento experimental, foi injetado por meio de cada uma das cânulas implantadas nos animais, 1 μ l de solução de azul de metileno a 4%, em solução salina a 0,9%. Em seguida os animais foram eutanasiados com dose letal de CO₂, os cérebros foram retirados e seccionados. A correta localização da cânula foi confirmada pela presença do corante azul de metileno no estriado dos animais, sendo que todas as cânulas deste estudo estavam corretamente posicionadas. O descarte dos animais foi congelado e em seguida acondicionado em sacos plásticos apropriados. A coleta dos animais eutanasiados foi realizada pelos responsáveis pelo lixo biológico da UFMS.

4.7 Análise estatística

Neste estudo, a avaliação do efeito do grupo experimental e do momento de análise, bem como a interação entre estes dois fatores, em relação ao tempo de catalepsia apresentado pelos animais, foi realizada por meio do teste ANOVA de duas vias de medidas repetitivas. A comparação entre os momentos de análise, em relação ao tempo de catalepsia, foi realizada por meio do teste ANOVA de uma via de medidas repetitivas, seguida pelo pós-teste de Tukey. Já a comparação entre os grupos experimentais, em relação ao tempo de catalepsia e aos comportamentos de exploração horizontal e vertical no Campo Aberto, foi realizada por meio do teste ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey. Os demais resultados das variáveis avaliadas neste estudo foram apresentados na forma de estatística descritiva ou na forma de tabelas e gráficos. A análise estatística foi realizada utilizando-se o “Software” SigmaStat, versão 2.0, considerando um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

Experimento I

Os resultados referentes ao tempo de catalepsia para os grupos do Experimento I, mensurados 5, 35 e 65 minutos após a aplicação das drogas, estão apresentados na Tabela 1 e ilustrados na Figura 11.

Tabela 1 - Resultados referentes ao tempo de catalepsia para os grupos do Experimento I, mensurados 5, 35 e 65 minutos após a aplicação das drogas.

Grupos experimentais	Catalepsia			Valor de p (entre tempos)
	Tempo após a aplicação das drogas (Minutos)			
	5	35	65	
Salina+salina	1,50±0,42Cb	2,25±0,65Cab	3,75±0,77Ca	0,039
Salina+cafeína 5nM	0,88±0,40Da	0,50±0,19Ca	0,38±0,18Da	0,473
Salina+cafeína 10nM	0,38±0,26Db	1,25±0,53Cb	4,25±1,40Ca	0,003
L-NOARG+salina	23,50±1,43Ac	151,75±12,06Ab	226,63±18,71Aa	<0,001
L-NOARG+cafeína 5nM	9,63±1,35Bc	21,13±2,52Bb	37,25±3,31Ba	<0,001
L-NOARG+cafeína 10nM	5,75±1,99BCb	17,88±4,02Ba	42,63±17,48Ba	0,001
Valor de p (entre grupos)	<0,001	<0,001	<0,001	

Os dados estão apresentados em média±erro padrão da média. Letras maiúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (pós-teste de Tukey, $p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa entre os tempos (pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

Na análise de variância de duas vias dos dados referentes ao tempo de catalepsia nos animais dos grupos do Experimento I, houve efeito do grupo experimental ($p < 0,001$), efeito do tempo ($p < 0,001$) e interação entre grupo e tempo ($p < 0,001$). Na comparação entre os momentos 5, 35 e 65 minutos, em relação ao comportamento de catalepsia, houve diferença entre eles em todos os grupos experimentais (teste ANOVA de uma via de medidas repetitivas, valor de p variando de $< 0,001$ a 0,039), especificamente um aumento do tempo de catalepsia com o decorrer do tempo, com exceção apenas para o grupo salina+cafeína (5nM)

($p=0,473$). O aumento da catalepsia no decorrer do tempo foi mais evidente no grupo L-NOARG+salina, onde o tempo de catalepsia passou de $9,63\pm 1,35$ segundos após 5 minutos da aplicação das drogas, para $226,63\pm 18,71$ segundos no tempo de 65 minutos.

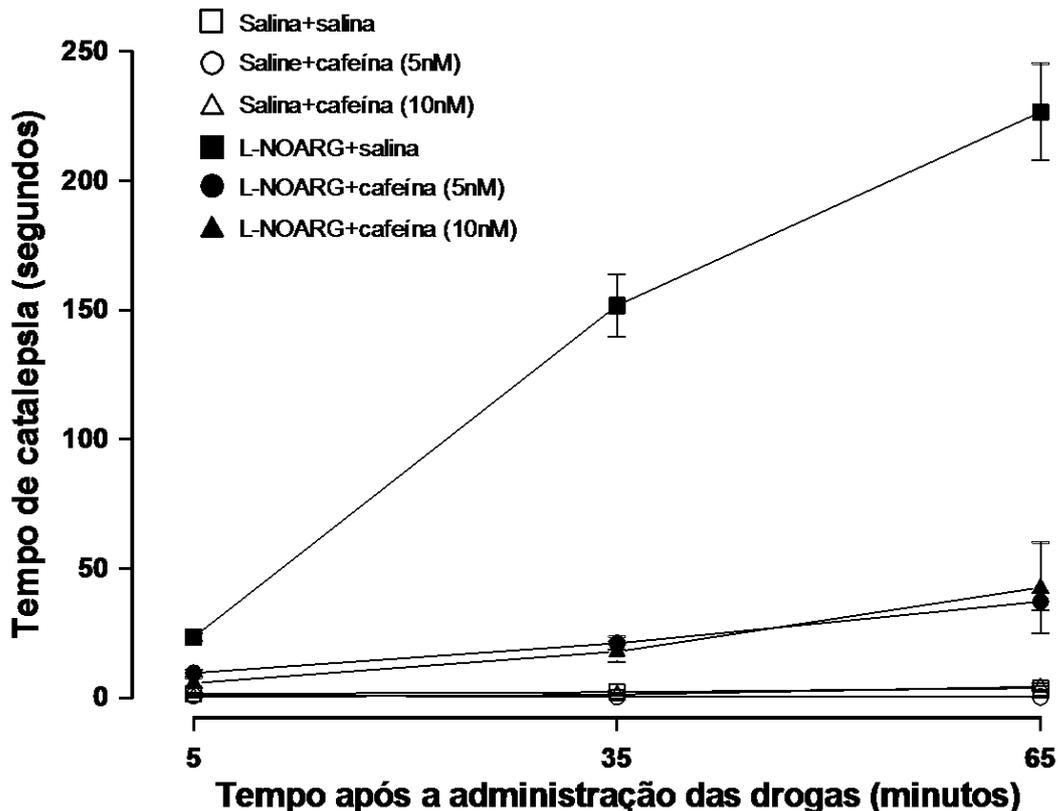


Figura 11: Gráfico ilustrando o tempo de catalepsia para os grupos do experimento I, mensurados 5, 35 e 65 minutos após a aplicação das drogas. Cada símbolo representa a média e a barra o erro padrão da média.

Em todos os momentos analisados, houve diferença significativa entre os grupos experimentais, em relação ao tempo de catalepsia (teste ANOVA de uma via, $p<0,001$), sendo que neste momentos, o tempo de catalepsia no grupo L-NOARG+salina foi significativamente maior do que aquele observado para os demais grupos experimentais (pós-teste de Tukey, $p<0,05$). Além disso, em todos os momentos analisados, o tempo de catalepsia nos animais dos grupos L-NOARG+cafeína 5nM e L-NOARG+cafeína 10nM foi maior do que aquele observado para os grupos controles (Salina+salina, Salina+cafeína 5 e 10 nM) (pós-teste de Tukey, $p<0,05$). Estes resultados juntos evidenciam o efeito da cafeína em reverter, todavia apenas parcialmente, o efeito cataléptico do L-NOARG, independente da dose utilizada.

Os resultados referentes à exploração horizontal e vertical dos animais no Campo Aberto, 30 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do Experimento I, estão apresentados na Tabela 2 e ilustrados na Figura 12.

Tabela 2 - Resultados referentes à exploração horizontal e vertical dos animais no Campo Aberto, 30 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do Experimento I.

Grupos experimentais	Exploração	
	Horizontal	Vertical
Salina+salina	100,63±11,18AB	62,88±8,50A
Salina+cafeína 5nM	129,75±10,41AB	28,88±6,56B
Salina+cafeína 10nM	150,75±10,19A	34,63±3,80B
L-NOARG+salina	56,00±14,06B	14,25±5,36B
L-NOARG+cafeína 5nM	94,88±14,73AB	22,75±4,76B
L-NOARG+cafeína 10nM	146,38±36,54A	22,25±8,78B
Valor de p (entre grupos)	0,007	<0,001

Os dados estão apresentados em média±erro padrão da média. Letras maiúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (pós-teste de Tukey, $p<0,05$).

Na comparação entre os grupos experimentais, houve diferença significativa entre eles, em relação aos comportamentos de exploração horizontal (quadrantes percorridos) e de exploração vertical (erguimentos) expressos pelos animais (teste ANOVA de uma via, horizontal: $p=0,007$; vertical: $p<0,001$), sendo que os animais do grupo L-NOARG+salina percorreram um número menor de quadrantes que aqueles dos grupos Salina+cafeína 10nM e L-NOARG+cafeína 10nM (pós-teste de Tukey, $p<0,05$). Além disso, os animais dos grupos Salina+cafeína (5 e 10nM), L-NOARG+salina e L-NOARG+cafeína (5 e 10nM), realizaram menos erguimentos que os animais do grupo Salina+salina (pós-teste de Tukey, $p<0,05$).

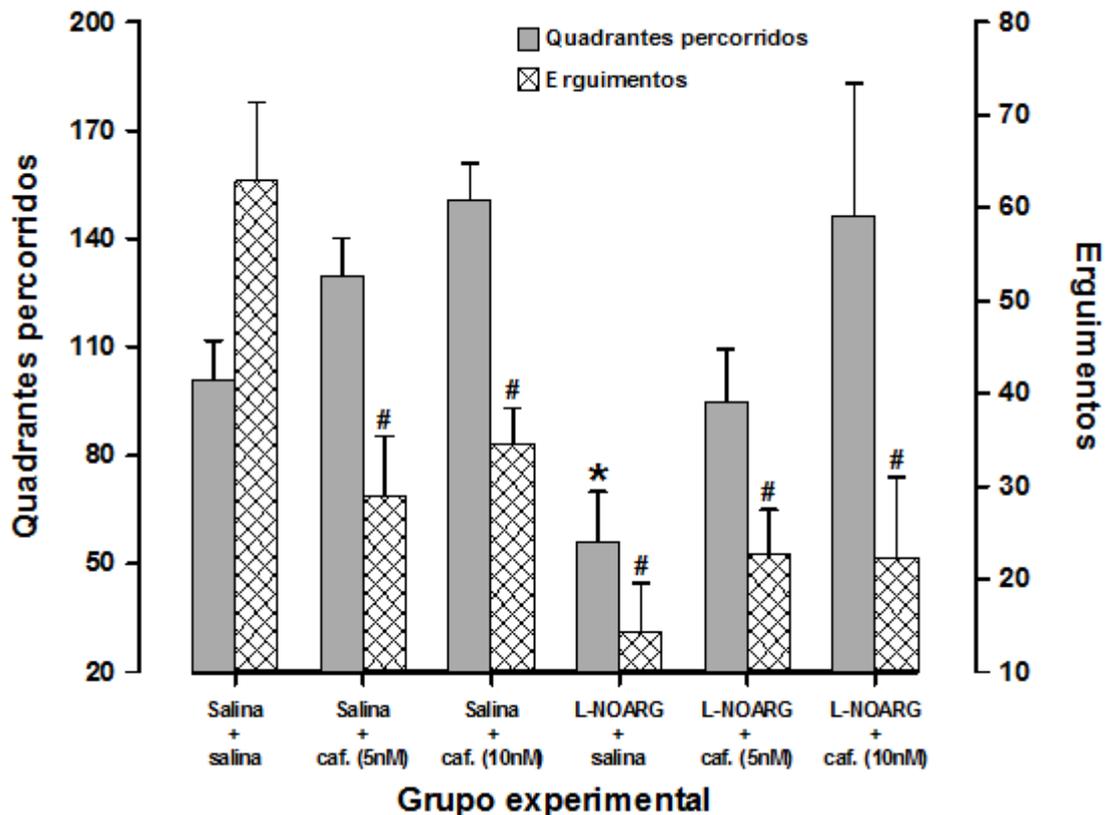


Figura 12: Gráfico ilustrando o número de quadrantes percorridos (exploração horizontal) e de erguimentos (exploração vertical) expressos pelos animais no Campo Aberto, 30 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do Experimento I. Cada coluna representa a média e a barra o erro padrão da média. * Diferença significativa na quantidade de quadrantes percorridos em relação aos grupos Salina+cafeína 10nM e L-NOARG+cafeína 10nM; # Diferença significativa na quantidade de erguimentos em relação ao grupo Salina+salina.

Experimento II

Os resultados referentes ao tempo de catalepsia para os grupos do Experimento II, mensurados 5, 35 e 65 minutos após a aplicação das drogas, estão apresentados na Tabela 3 e ilustrados na Figura 13. Na análise de variância de duas vias dos dados referentes ao tempo de catalepsia nos animais dos grupos do Experimento II, houve efeito do grupo experimental ($p < 0,001$), efeito do tempo ($p < 0,001$) e interação entre grupo e tempo ($p < 0,001$). Na comparação entre os momentos 5, 35 e 65 minutos, em relação ao comportamento de catalepsia, houve diferença entre eles apenas nos grupos L-NAME+salina e L-NAME+cafeína 5nM (teste ANOVA de uma via de medidas repetitivas, L-NAME+salina: $p < 0,001$; L-

NAME+cafeína 5nM: $p=0,002$), especificamente um aumento do tempo de catalepsia com o decorrer do tempo, sendo este mais evidente no grupo experimental L-NAME+salina, onde o tempo de catalepsia passou de $8,13\pm 1,44$ segundos após 5 minutos da aplicação das drogas, para $63,25\pm 15,40$ segundos no tempo de 65 minutos. Para os demais grupos, não foram observadas diferenças significativas entre os tempos, em relação ao tempo de catalepsia (teste ANOVA de uma via de medidas repetitivas, valor de p variando entre 0,159 e 0,672).

Tabela 3 - Resultados referentes ao tempo de catalepsia para os grupos do Experimento II, mensurados 5, 35 e 65 minutos após a aplicação das drogas.

Grupos experimentais	Catalepsia			Valor de p (entre tempos)
	Tempo após a aplicação das drogas (Minutos)			
	5	35	65	
Salina+salina	$1,75\pm 0,45$ Ba	$2,13\pm 0,44$ BCa	$1,88\pm 0,48$ CDa	0,658
Salina+cafeína 5nM	$1,50\pm 0,57$ Ba	$0,63\pm 0,38$ CDa	$0,50\pm 0,19$ Da	0,159
Salina+cafeína 10nM	$0,38\pm 0,18$ Ca	$0,13\pm 0,13$ Da	$0,13\pm 0,13$ Da	0,393
L-NAME+salina	$8,13\pm 1,44$ Ac	$25,25\pm 5,12$ Ab	$63,25\pm 15,40$ Aa	<0,001
L-NAME+cafeína 5nM	$3,75\pm 0,65$ ABb	$6,00\pm 1,30$ Bb	$9,88\pm 1,63$ Ba	0,002
L-NAME+cafeína 10nM	$2,13\pm 0,44$ Ba	$2,50\pm 0,57$ Ba	$4,25\pm 2,28$ Ca	0,672
Valor de p (entre grupos)	<0,001	<0,001	<0,001	

Os dados estão apresentados em média±erro padrão da média. Letras maiúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (pós-teste de Tukey, $p<0,05$). Letras minúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa entre os tempos (pós-teste de Tukey, $p<0,05$).

Em todos os momentos analisados, houve diferença significativa entre os grupos experimentais, em relação ao tempo de catalepsia (teste ANOVA de uma via, $p<0,001$). No momento de 5 minutos após a aplicação das drogas, o tempo de catalepsia observado nos animais do grupo L-NAME+salina foi significativamente maior do que aquele observado nos animais dos grupos Salina+salina, Salina+cafeína (5 e 10nM) e L-NAME+cafeína 10nM (pós-teste de Tukey, $p<0,05$). Já nos momentos 35 e 65 minutos, o tempo de catalepsia no grupo L-NAME+salina foi significativamente maior do que aquele observado para os demais grupos

experimentais (pós-teste de Tukey, $p < 0,05$). Além disso, em todos os momentos analisados, o tempo de catalepsia nos animais dos grupos L-NAME+cafeína (5 e 10nM) não diferiram daquele observado para o grupo Salina+salina (pós-teste de Tukey, $p > 0,05$), com exceção para o momento de 65 minutos, em que a catalepsia dos animais do grupo L-NAME+cafeína 5nM, ainda era maior do que aquele observado nos animais do grupo Salina+salina (pós-teste de Tukey, $p < 0,05$). Estes resultados juntos evidenciam o efeito da cafeína em reverter o efeito cataléptico do L-NAME, principalmente na dose de 10nM.

Finalmente, em todos os momentos analisados, o tempo de catalepsia nos animais dos grupos Salina+cafeína 10nM foi significativamente menor do que aquele observado nos animais do grupo Salina+salina (pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

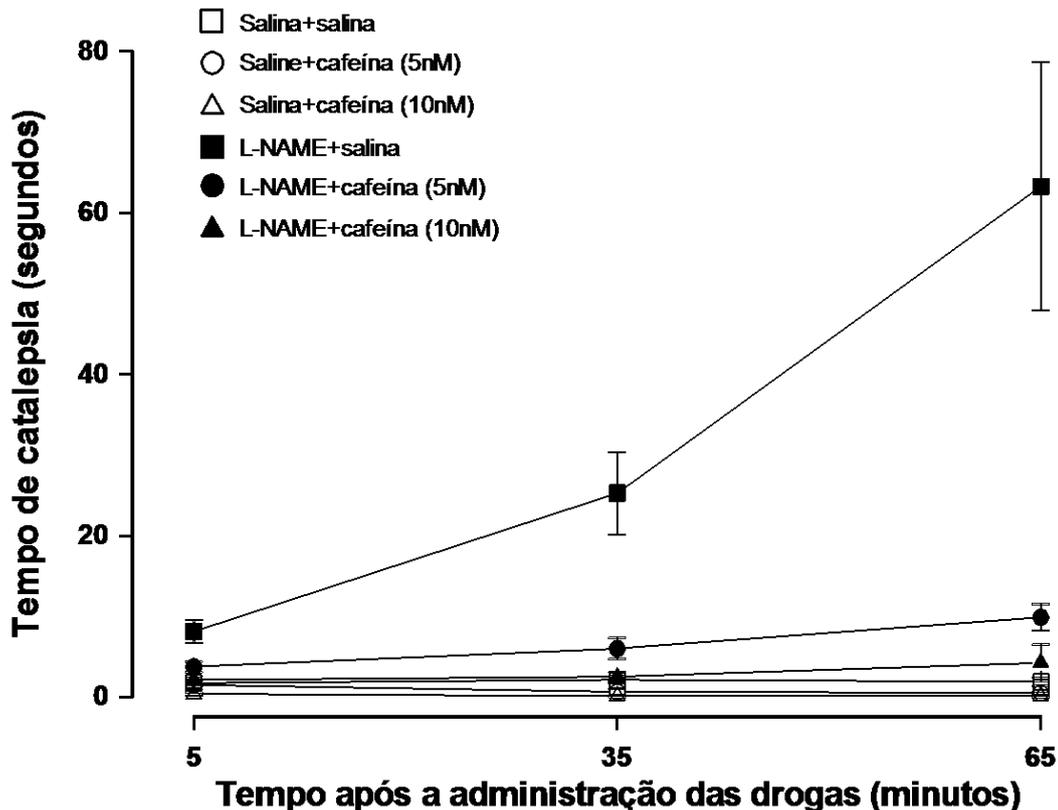


Figura 13: Gráfico ilustrando o tempo de catalepsia para os grupos do experimento II, mensurados 5, 35 e 65 minutos após a aplicação das drogas. Cada símbolo representa a média e a barra o erro padrão da média.

Os resultados referentes à exploração horizontal e vertical dos animais no Campo Aberto, 30 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do Experimento II, estão apresentados na Tabela 4 e ilustrados na Figura 14.

Na comparação entre os grupos experimentais, houve diferença significativa entre eles, em relação aos comportamentos de exploração horizontal (quadrantes percorridos) e de exploração vertical (erguimentos) expressos pelos animais (teste ANOVA de uma via, horizontal: $p < 0,001$; vertical: $p = 0,001$), sendo que os animais do grupo L-NAME+salina percorreram um número menor de quadrantes que aqueles dos demais grupos experimentais (pós-teste de Tukey, $p < 0,05$). Além disso, os animais dos grupos Salina+cafeína (5 e 10nM), L-NAME+salina e L-NAME+cafeína 10nM, realizaram menos erguimentos que os animais do grupo Salina+salina (pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

Tabela 4 - Resultados referentes à exploração horizontal e vertical dos animais no Campo Aberto, 30 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do Experimento II.

Grupos experimentais	Exploração	
	Horizontal	Vertical
Salina+salina	132,13±9,69A	73,13±13,33A
Salina+cafeína 5nM	125,13±8,98A	45,63±10,36AB
Salina+cafeína 10nM	146,50±11,08A	51,50±3,66AB
L-NAME+salina	71,38±3,98B	18,50±3,24B
L-NAME+cafeína 5nM	131,25±5,58A	44,25±8,06AB
L-NAME+cafeína 10nM	129,75±10,51A	32,88±5,09B
Valor de p (entre grupos)	<0,001	0,001

Os dados estão apresentados em média±erro padrão da média. Letras maiúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

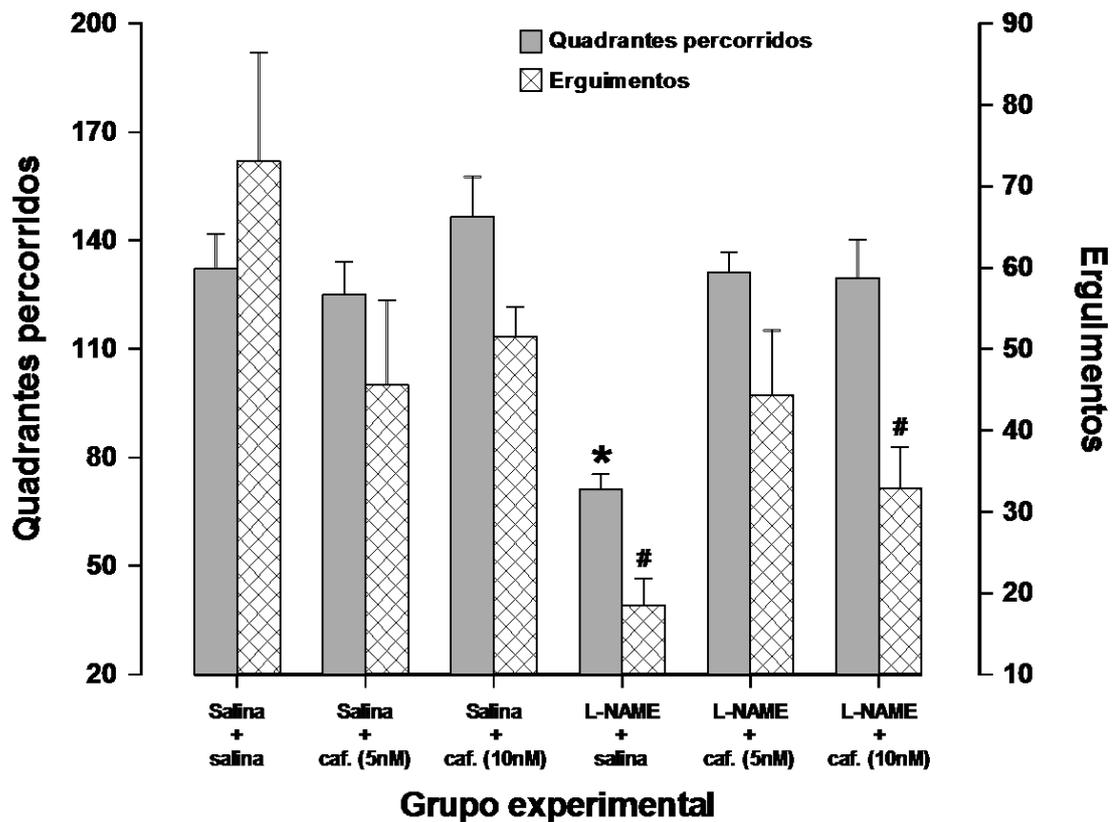


Figura 14: Gráfico ilustrando o número de quadrantes percorridos (exploração horizontal) e de erguimentos (exploração vertical) expressos pelos animais no Campo Aberto, 30 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do Experimento II. Cada coluna representa a média e a barra o erro padrão da média. * Diferença significativa na quantidade de quadrantes percorridos em relação aos demais grupos experimentais; # Diferença significativa na quantidade de erguimentos em relação ao grupo Salina+salina.

Experimento III

Os resultados referentes ao tempo de catalepsia para os grupos do Experimento III, mensurados 5, 35 e 65 minutos após a aplicação das drogas, estão apresentados na Tabela 5 e ilustrados na Figura 15. Na análise de variância de duas vias dos dados referentes ao tempo de catalepsia nos animais dos grupos do Experimento III, houve efeito do grupo experimental ($p < 0,001$), porém, não houve efeito do tempo ($p = 0,109$) e nem interação entre grupo e tempo ($p = 0,227$).

Na comparação entre os momentos 5, 35 e 65 minutos, em relação ao comportamento de catalepsia, não houve diferença entre eles em nenhum dos grupos experimentais (teste ANOVA de uma via de medidas repetitivas, valor de p variando entre 0,067 e 0,908).

Tabela 5 - Resultados referentes ao tempo de catalepsia para os grupos do Experimento III, mensurados 5, 35 e 65 minutos após a aplicação das drogas.

Grupos experimentais	Catalepsia			Valor de p (entre tempos)
	Tempo após a aplicação das drogas (Minutos)			
	5	35	65	
Salina+salina	2,38±0,46Aba	2,50±0,63Aa	2,25±0,45Aa	0,908
Salina+cafeína 5nM	1,13±0,30Ba	2,25±0,80Aa	2,50±0,73ABa	0,451
Salina+cafeína 10nM	0,75±0,25Ba	0,75±0,25Aa	0,50±0,27Ba	0,667
L-arginina+salina	3,13±0,44Aa	1,88±0,52Aa	3,13±0,79Aa	0,172
L-arginina+cafeína 5nM	2,38±0,46Aba	3,00±0,57Aa	3,63±0,53Aa	0,323
L-arginina+cafeína 10nM	0,88±0,40Ba	0,88±0,48Aa	2,38±0,56Aba	0,067
Valor de p (entre grupos)	<0,001	0,062	0,003	

Os dados estão apresentados em média±erro padrão da média. Letras maiúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (pós-teste de Tukey, $p<0,05$). Letras minúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa entre os tempos (pós-teste de Tukey, $p<0,05$).

No momento 35 minutos após a aplicação das drogas, não houve diferença entre os grupos experimentais, em relação ao tempo de catalepsia (teste ANOVA de uma via, $p=0,062$). Por outro lado, nos momentos 5 e 65 minutos, houve diferença significativa entre os grupos experimentais, em relação a este comportamento (teste ANOVA de uma via, 5 minutos: $p<0,001$; 65 minutos: $p=0,003$). No momento de 5 minutos após a aplicação das drogas, o tempo de catalepsia observado nos animais que receberam cafeína (Salina+cafeína 5 e 10nM; L-arginina+cafeína 5 e 10nM) foi significativamente menor do que aquele observado nos animais do grupo L-arginina+salina (pós-teste de Tukey, $p<0,05$). Já no momento 65 minutos, o tempo de catalepsia no grupo Salina+cafeína 10nM foi significativamente menor do que

aquele observado para os grupos experimentais Salina+salina, L-arginina+salina e L-arginina+cafeína 5nM (pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

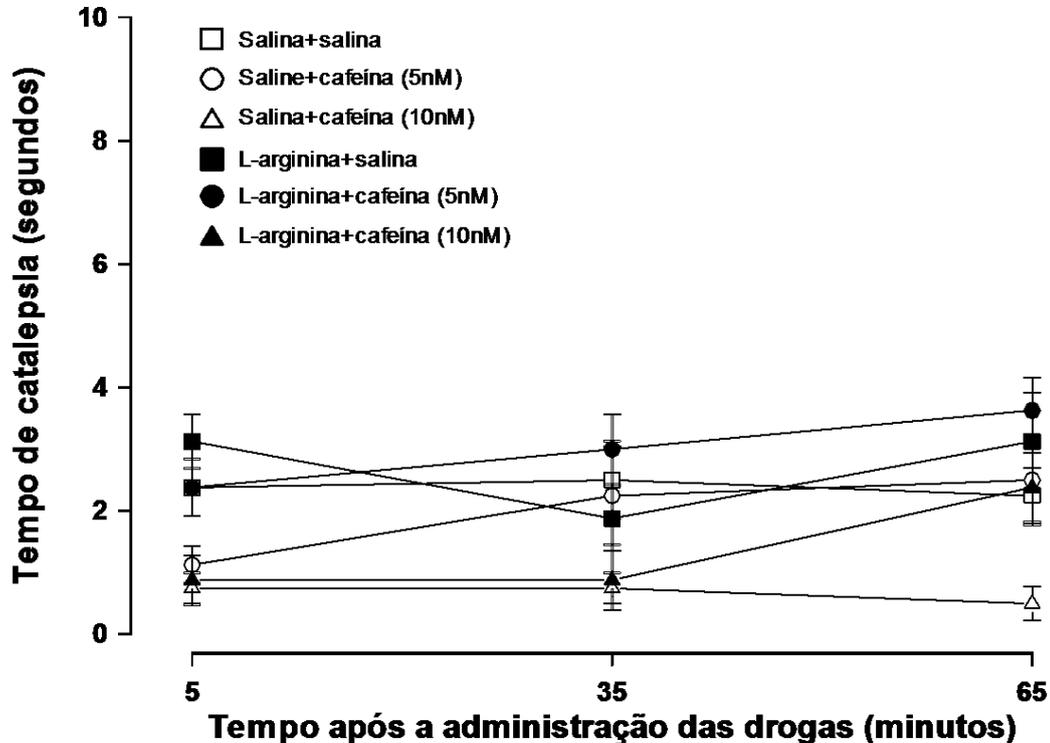


Figura 15: Gráfico ilustrando o tempo de catalepsia para os grupos do experimento III, mensurados 5, 35 e 65 minutos após a aplicação das drogas. Cada símbolo representa a média e a barra o erro padrão da média.

Os resultados referentes à exploração horizontal e vertical dos animais no Campo Aberto, 30 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do Experimento III, estão apresentados na Tabela 6 e ilustrados na Figura 16. Na comparação entre os grupos experimentais, houve diferença significativa entre eles, em relação aos comportamentos de exploração horizontal (quadrantes percorridos) e de exploração vertical (erguimentos) expressos pelos animais (teste ANOVA de uma via, $p < 0,001$), sendo que os animais dos grupos Salina+cafeína 10nM e L-arginina+cafeína 10nM percorreram um número maior de quadrantes que aqueles dos grupos experimentais Salina+salina, Salina+cafeína 5nM e L-arginina+salina (pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

Tabela 6 - Resultados referentes à exploração horizontal e vertical dos animais no Campo Aberto, 30 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do Experimento III.

Grupos experimentais	Exploração	
	Horizontal	Vertical
Salina+salina	121,38±8,89C	45,00±3,92B
Salina+cafeína 5nM	121,38±5,78C	41,13±6,06B
Salina+cafeína 10nM	178,75±6,35A	53,63±2,72AB
L-arginina+salina	132,38±3,98BC	49,50±5,15B
L-arginina+cafeína 5nM	157,88±6,97AB	46,38±5,60B
L-arginina+cafeína 10nM	173,50±9,68A	67,75±9,02A
Valor de p (entre grupos)	<0,001	<0,001

Os dados estão apresentados em média±erro padrão da média. Letras maiúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

Além disso, os animais dos grupos L-arginina+cafeína 5nM percorreram um número maior de quadrantes que aqueles dos grupos experimentais Salina+salina e Salina+cafeína 5nM (pós-teste de Tukey, $p < 0,05$). Em relação à exploração vertical no Campo Aberto, os animais do grupo L-arginina+cafeína 10nM apresentaram um número maior de erguimentos que os animais dos demais grupos experimentais (pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

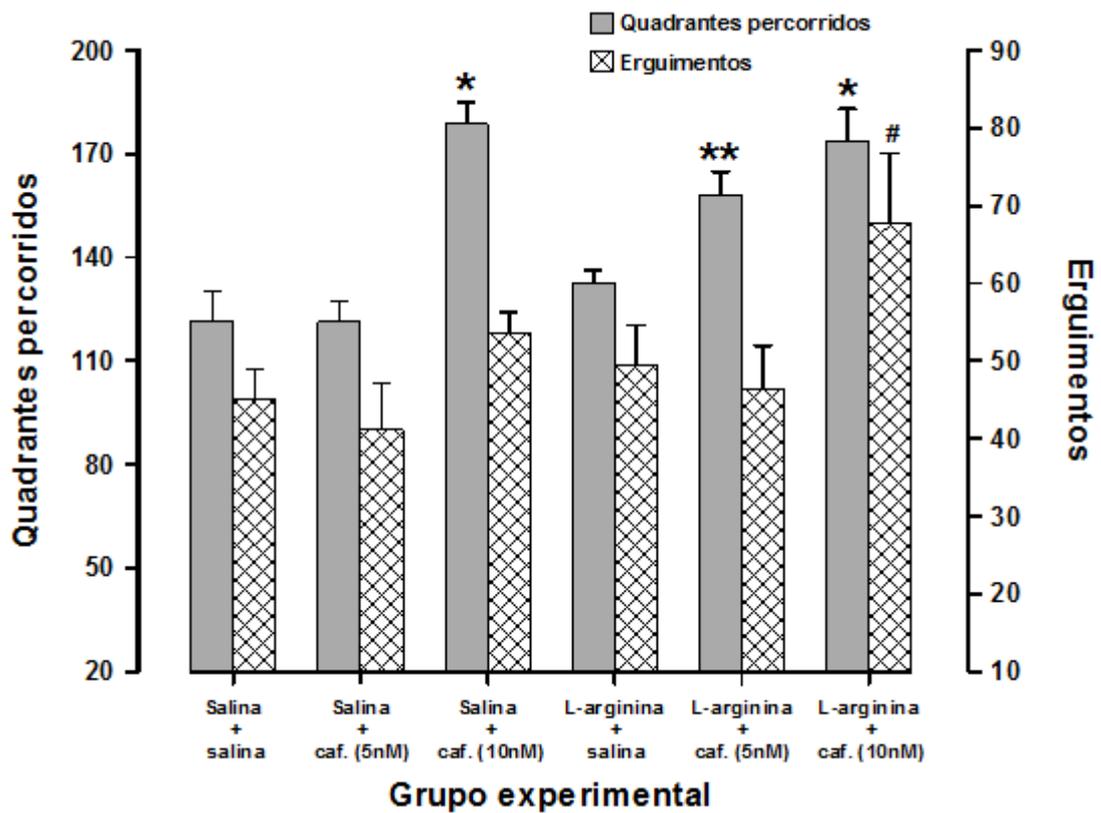


Figura 16: Gráfico ilustrando o número de quadrantes percorridos (exploração horizontal) e de erguimentos (exploração vertical) expressos pelos animais no Campo Aberto, 30 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do Experimento III. Cada coluna representa a média e a barra o erro padrão da média. * Diferença significativa na quantidade de quadrantes percorridos em relação aos grupos Salina+salina, Salina+caféina 5nM e L-arginina+caféina 5nM; ** Diferença significativa na quantidade de quadrantes percorridos em relação aos grupos Salina+salina e Salina+caféina 5nM; # Diferença significativa na quantidade de erguimentos em relação aos demais grupos experimentais.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo avaliou-se o efeito da cafeína, um antagonista não seletivo de receptores de adenosina, aplicada por via intracerebral, no comportamento de catalepsia e motor em camundongos, induzida por inibição da sintase do óxido nítrico (NOS) com L-NOARG ou L-NAME, aplicados por via intraperitoneal.

Na presente investigação, os resultados obtidos demonstraram que o L-NOARG (40 mg/Kg i.p) causa catalepsia em camundongos e a cafeína (5nM e 10 nM i.c) tem efeito de reverter, apenas parcialmente, o seu efeito cataléptico, independente da dose utilizada. Com relação ao comportamento de exploração horizontal, os animais que receberam cafeína (10nM) percorreram significativamente um número maior de quadrantes comparado ao grupo L-NOARG+salina. O mesmo ocorre com o L-NAME (40mg/Kg i.p), onde a cafeína tem efeito de reverter o seu efeito cataléptico, principalmente na dose de 10nM. Além disso, os animais também percorreram um número maior de quadrantes comparado com o grupo L-NAME+salina, porém, neste caso, em ambas as doses.

Com relação a L-Arginina, observou-se que a mesma não causa catalepsia e a cafeína estimula o comportamento motor, pois os animais percorreram mais quadrantes, principalmente na dose de 10 nM i.c, além de maior exploração vertical. O mesmo ocorreu com os outros grupos, pois os animais que receberam salina+cafeína também tiveram tempo menor de catalepsia e percorreram mais quadrantes comparados com os camundongos que receberam salina+salina, principalmente no tempo de 5 minutos e com dose de 10 nM de cafeína, demonstrando que a cafeína realmente estimulou a atividade motora nos camundongos, indicando a possibilidade de sua adoção na terapia futura da doença de Parkinson (DP).

O tratamento corrente da doença de Parkinson está baseado na terapia dopaminérgica, visando reverter os efeitos da depleção de dopamina estriatal induzida pela destruição da via nigro-estriatal (QUINN, 1998; OBESO; OLANOW; NUTT, 2000; JANKOVIC, 2002). A reposição de dopamina (DA), com L-3,4-dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA) como terapêutica, continua sendo o tratamento mais eficaz para DP (FAHN, 2008; OLANOW, 2008). Atualmente, terapias não – dopaminérgicas tem sido aplicadas como condutas terapêuticas para os agravos

motores da L – DOPA (Jenner, 2008). Novas abordagens para o tratamento de distúrbios do movimento com base na manipulação de sistemas não-dopaminérgicos, como glutamato, 5-hidroxitriptamina (5-HT), canabinóides, adenosina, adrenérgicos, histaminérgicos e opióides têm sido propostos (CHASE *et al.*, 2000; SILVERDALE *et al.*, 2003; BROTCHE, 2005; JENNER, 2008).

No entanto, outros neurotransmissores, além de adenosina e dopamina (DA), estão presentes nos núcleos da base e participam da modulação do comportamento motor (HALCAK *et al.*, 2000; DEL BEL *et al.*, 2002). Entre eles, pode-se citar o neuromodulador óxido nítrico, o qual tem, de forma crescente, sido reconhecido como um mensageiro inter e extracelular no SNC (PRAST; PHILIPPU, 2001) e tem se mostrado como modulador da integração das informações processadas pelos núcleos dos gânglios basais, e modula a liberação de vários neurotransmissores, incluindo DA, 5-HT, acetilcolina e GABA. Embora existam resultados contraditórios o NO normalmente facilita a liberação de DA (NETO *et al.*, 2009).

Estudos *post-mortem* (QURESHI *et al.*, 1995; HUNOT *et al.*, 1996) e de modelos experimentais (Mehler-Wex *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2008) evidências que sugerem o envolvimento de NO na degeneração seletiva de neurônios DA na DP, além de contribuir para o controle motor no estriado (Del Bel *et al.*, 2005). Indicando, portanto, que o NO é tanto um mediador de processos neurotóxicos quanto neuroprotetor (KWIATKOSK, *et al.* 2010). Os efeitos do NO podem variar dependendo de diversos fatores, tais como o estado funcional dos neurônios-alvo e da composição instantânea do fluido extracelular, sendo que mudanças mínimas na concentração de NO local podem ser um fator chave na determinação do seu efeito biológico (CONTESTABILE, 2000).

Recentemente descobriu-se que a administração sistêmica de NG-nitro-L-arginina (L-NOARG), NG-nitro-L-arginina metílicos (L-NAME), ou NG-monometil-L-arginina (L-NMMA), inibidores da NOS, induz a catalepsia em camundongos (SILVA *et al.*, 2009). É possível afirmar que o NO desempenha um papel no controle do comportamento motor (DEL BEL *et al.*, 2004), além de diminuir a atividade exploratória horizontal e vertical no teste do campo aberto (DEL BEL *et al.*, 2002) e a atividade motora espontânea de ratos (HALCAK *et al.*, 2000). Corroborando com estes estudos, em nossa experiência, os grupos L-NOARG+salina e L-NAME+salina tiveram um tempo de catalepsia significativamente maior que o grupo salina + salina nos tempos 05, 35 e 65 minutos após a aplicação das drogas,

portanto tanto o L-NOARG quanto L-NAME causaram catalepsia, e modificaram significativamente a exploração horizontal e vertical no teste do campo aberto.

Embora se conheça o papel neurotransmissor do óxido nítrico, bem como sua importância no controle motor, ainda não existem evidências científicas explicando com clareza a maneira como o NO interage com os receptores de dopamina e de adenosina.

A purina adenosina é um neuromodulador de grande importância, com ações tanto excitatórias quanto inibitórias dentro do sistema nervoso central. Esta molécula exerce influência em diversos processos como, por exemplo, o sono, a locomoção, a respiração e fornece neuroproteção durante a hipóxia / isquemia (NEWMAN & MCLLWAIN, 1977; DUNWIDDIE & DIAO, 1994). A Regulação do nível extracelular de adenosina no cérebro é essencial, já que pequenas alterações nos níveis de adenosina afetam o grau de inibição sináptica, sendo a concentração extracelular dessa substância definida pelo equilíbrio de sua produção e eliminação (WALL, M. J; ATTERBURY, A; DALE, N, 2007).

Estudos recentes têm indicado que os receptores de adenosina modulam a atividade dos neurônios de projeção do estriado, e estão, portanto, numa posição chave para afetar a função geral dos gânglios basais. Receptores A2A e receptores D2 agem de forma antagônica, acredita-se que um importante papel da dopamina é antagonizar a sinalização dos receptores A2A. Portanto, a perda de dopamina levaria a sinalização de adenosina, o que resulta em hiperatividade da via estriatopallidal, promovendo a inibição do movimento (TREVITT *et al.*, 2009).

Na literatura, é clara a relação existente entre a dopamina e a adenosina, porém a relação desta com o óxido nítrico não está descrita com clareza, demonstrando que estudos como este são essenciais para elucidar como esses neurotransmissores se relacionam entre si.

Estudos epidemiológicos têm apoiado que a ingestão de cafeína exerce uma ação neuroprotetora em seres humanos (ALFAROA *et al.*, 2009). Evidências experimentais sugerem que a cafeína tem potencial antiparkinsoniano por conter propriedades que bloqueiam os receptores de adenosina A2A estriatal reduzindo a liberação de acetilcolina no estriado (RICHARDSON *et al.*, 1997; SVENNINGSSON *et al.*, 1999; FERRE *et al.*, 2001).

De fato, um grande número de estudos indicam evidências que apóiam o potencial neuroprotetor da cafeína tanto *in vitro* como *in vivo* (ARMENTERO *et al.*,

2011). *In vitro*, a cafeína pode proteger as células mesencefálicas de ratos da toxicidade de 6-hidroxidopamina (6-OHDA), aumentando a viabilidade das células, reduzindo o número de células apoptóticas e bloqueando completamente a toxina induzida pela peroxidação lipídica (NOBRE *et al.*, 2010). A cafeína protege as células contra 1-metil-4-phenylpyridinium (MPP+) induzida pela inibição do complexo I mitocondrial em neurônios granulares do cerebelo (ALVIRA *et al.*, 2007).

In vivo, a administração de cafeína em diferentes experimentos com metodologia que consideraram fase aguda e crônica, pré e pós-tratamento demonstrou a proteção dos camundongos tratados contra a degeneração nigroestriatal em 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), modelo animal bem caracterizado da DP. (CHEN *et al.*, 2001; XU *et al.*, 2002; KALDA *et al.*, 2006; SINGH *et al.*, 2009).

Recentemente, a cafeína também evidenciou atenuar a perda de neurônios dopaminérgicos em camundongos que receberam uma combinação de Paraquat e Maneb (KACHROO *et al.*, 2010), dois pesticidas ligados ao risco aumentado de desenvolvimento de DP (COSTELLO *et al.*, 2010).

Embora a cafeína possa atuar em ambos receptores, A1 e A2A, evidências demonstram que o A2A contribui com suas ações estimulantes no cérebro, diferenciando-se do A1, que não desempenha a mesma contribuição (FREDHOLM *et al.*, 1999). Assim, considerando a descoberta inicial do potencial neuroprotetor da cafeína, numerosos antagonistas A2A foram desenvolvidos e todos demonstraram potencial para reduzir a toxina indutora de morte de células neuronais em modelos de roedores da DP (CHEN *et al.*, 2001; IKEDA *et al.*, 2002; JOGHATAIE *et al.*, 2004; PIERRI *et al.*, 2005; CARTA *et al.*, 2009), com o A1, tal efeito protetor não foi evidenciado (CHEN *et al.*, 2001). Os mecanismos pelos quais os antagonistas A2A pode atenuar a morte de neurônios dopaminérgicos ainda são desconhecidos (ARMENTERO *et al.*, 2011).

Além do efeito neuroprotetor, a cafeína estimula comportamentos através do antagonismo não seletivo dos receptores de adenosina A1/A2A e apresenta propriedades anti-parkinsonianas pelo mesmo mecanismo, porém essas propriedades são atribuídas aos receptores A2A (SVENNINGSON *et al.*, 1999; FERRE *et al.*, 2001).

Achados evidenciam que a administração sistêmica de antagonistas de receptores A2A reverte a catalepsia induzida por bloqueio de receptores ou

depleção de dopamina e potencializa os efeitos anti-catalépticos da L-DOPA (KANDA *et al.*, 1994; HAUBER *et al.*; KANDA *et al.*, 1998; SHIOZAKI *et al.*, 1999; HAUBER *et al.*, 2001; SCHWARZCHUL *et al.*, 2006; BISHNOI *et al.*; MORELLI *et al.*, 2007; TREVITT *et al.*, 2009; SILVA, 2010). Uma explicação plausível para o aumento da efetividade motora consiste na seletiva co-localização do receptor A2A com o receptor D2 dos neurônios da via estriatopalidal. Em adição, tem sido demonstrado que há um número aumentado de receptor A2A na substância negra parte compacta (HURLEY *et al.*, 2000).

Em nosso estudo observamos que a cafeína reverteu parcialmente a catalepsia induzida pelo L-NOARG e aos níveis basais a catalepsia induzida pelo L-NAME. Corroborando com estes achados, várias outras pesquisas. Malec (1997), estudando ratos no teste de catalepsia da barra, demonstrou que altas doses de cafeína (10-50 mg/Kg) antagonizam a catalepsia induzida por haloperidol, assim como Trevitt *et al.* (2009) que obtiveram o mesmo resultado com ratos de 250 a 300g, sendo a reversão compatível com o grupo salina+salina, com doses de 20 e 40 mg/Kg (i.p.).

Moo-Puc *et al.* (2003) utilizaram baixas doses de cafeína (3mg/kg/dia) por uma semana e evidenciaram efeito significativo anti-cataléptico em resposta a administração da substância em ratos de 240 a 320g. Golembiowska *et al.* (2004) utilizando uma dose de cafeína de 1 mg/kg intraperitoneal em ratos pesando 250 a 300g, descreveram a redução significativa da catalepsia, sendo que nesse experimento o mesmo não ocorreu com administração em doses menores (0,1 e 0,3 mg/Kg). Silva (2010), realizou o teste de catalepsia na barra com camundongos de peso entre 20 e 30g, utilizou doses de 1 e 2 mg/kg de cafeína intraperitoneal e evidenciou reversão parcial da catalepsia induzida por haloperidol e L-NOARG.

Neste estudo, além da reversão da catalepsia, observamos que os animais que receberam a cafeína após a indução da catalepsia por inibição da sintase do óxido nítrico (NOS) através da administração de L-NOARG ou L-NAME, tiveram reversão em sua atividade locomotora, com maior resposta quanto à exploração horizontal. Não houve reversão em relação à exploração vertical e uma hipótese para este fato seria que, com o aumento significativo da exploração horizontal, esse movimento foi priorizado com relação aos erguimentos, que ocorreram em menor número.

Silva (2010), realizou o teste do campo aberto em camundongos com peso entre 20 e 30g, utilizou doses de 1 e 2 mg/kg de cafeína intraperitoneal e evidenciou reversão parcial da hipolocomoção induzida por haloperidol e L-NOARG. Trevitt *et al.* (2009), relataram que foi restabelecido de forma significativa a quantidade de movimento nos ratos que tiveram suprimida sua atividade locomotora pelo uso de haloperidol (0,75 mg/kg i.p.). Esse fato ocorreu somente na dose de 20 mg/kg de cafeína, sendo que nas doses de 10 e 40 mg/kg não foi observado o mesmo resultado. Vários estudos obtiveram sucesso na reversão da supressão locomotora induzida por haloperidol com antagonistas A2A em roedores (CORREA *et al.*, 2004; ISHIWARI *et al.*, 2007; SALAMONE *et al.*, 2008). Porém nesses estudos foram utilizadas doses mais baixas de haloperidol (0,5 mg/kg), o que evidencia a necessidade de novos estudos em diferentes doses e formas indutoras de catalepsia para afirmações de maior consistência.

Observamos ainda, que os camundongos que receberam a cafeína sem a indução da catalepsia também percorreram mais quadrantes que o grupo controle. Houve uma estimulação da atividade locomotora quando a cafeína foi associada com salina ou L-Arginina, que é o substrato para a produção de óxido nítrico pela sintase do NO, principalmente na dose de 10 nM, o que evidencia claramente que a cafeína estimula comportamentos, possivelmente por meio do antagonismo não seletivo dos receptores de adenosina A1 / A2A (BRUNGEDE; DUNWIDDIE, 1997).

Além disso, a cafeína mostrou-se eficaz na reversão da catalepsia, como já demonstrado nesta investigação, pois apresenta propriedades anti-parkinsonianas pelo mesmo mecanismo de antagonismo não seletivo dos receptores de adenosina, porém essas propriedades são atribuídas aos receptores A2A (KANDA *et al.*, 1994; SHIOZAKI *et al.*; SVENNINGSON *et al.*, 1999; FERRE *et al.*, 2001; VILLANUEVA-TOLEDO *et al.*, 2003; PINNA *et al.*, 2005; STASI *et al.*, 2006; GILLESPIE *et al.*; HODGSON *et al.*, 2009).

A ação da cafeína em receptores de adenosina pode perder seu efeito motor estimulante após a administração repetida (FREDHOLM *et al.*, 1999; HALLDNER *et al.*, 2000). Em contraste, outros antagonistas A2A, tanto na administração aguda como crônica, apresentam melhora nos déficits motores em modelos animais da DP mesmo com administração repetida (KANDA *et al.*, 1998; KOGA *et al.*, 2000; PINNA *et al.*, 2001), ocorrendo principalmente quando associados ao tratamento com L-DOPA (KOGA *et al.*, 2000; PINNA *et al.*, 2001; OH & CHASE, 2002; BIBBIANI *et al.*,

2003; TRONCI *et al.*, 2007; HODGSON *et al.*, 2009). Trevitt *et al.* (2009) relataram após investigação que antagonistas de adenosina são promissores nas terapias da doença de Parkinson.

Dados de estudos pré-clínicos indicam que a administração de antagonista A2A tem efeitos benéficos sobre o comprometimento e complicações motoras da DP produzidas por tratamento com L-DOPA por tempo prolongado. Estes efeitos são de grande interesse, dado que complicações motoras representam uma limitação intrínseca da L-DOPA terapia que é muitas vezes insensível à manipulação farmacológica. Contudo, os antagonistas A2A podem ser usados com sucesso por longos períodos, tornando-se particularmente adequados para um tratamento farmacológico de longa duração, como o requerido na DP (ARMENTERO *et al.*, 2011).

Considerando o “wearing-off”, encurtamento progressivo dos efeitos motores da L-DOPA, que é uma das principais desvantagens do seu uso a longo prazo, e o fato que os efeitos clínicos positivos com o uso de anti-A2A são evidentes em estudos, a tendência é que surjam medicamentos anti-A2A, mas são necessários novos estudos para a definição da melhor forma de administração de antagonistas A2A, particularmente em uma dose sub-ótima de L-DOPA, como sugeridos em estudos pré-clínicos. (ARMENTERO *et al.*, 2011).

Armentero *et al.* (2011) sugere que resultados adicionais de pacientes com estágio inicial da DP deverão elucidar se antagonistas A2A são adequados para a administração como monoterapia contra os sintomas motores presentes na DP. Devem ser realizadas avaliações destes medicamentos em pacientes sem L-DOPA com complicações motoras a fim de avaliar com maior ênfase o efeito de antagonistas A2A sobre o aparecimento e a evolução da discinesia humana.

Os achados deste estudo corroboram com os estudos desenvolvidos anteriormente que ressaltam que a modulação do comportamento motor é influenciada pela ação e interação de diversos neurotransmissores, sugerindo uma estreita interação entre o óxido nítrico e a adenosina, onde uma estimula a atividade motora e a outra a inibe, respectivamente, e demonstram ir além da ação isolada da dopamina e da L-DOPA nos núcleos basais do encéfalo.

Por fim, novos estudos são necessários para confirmarem a interação entre estes neurotransmissores, não só para o entendimento da fisiologia nos núcleos da base, como também para o desenvolvimento de tratamentos eficazes a curto, médio

e longo prazo para a Doença de Parkinson, buscando implementar a qualidade de vida dos indivíduos acometidos por esta doença.

7 CONCLUSÕES

Os resultados observados neste estudo levam às seguintes conclusões:

a) A inibição da sintase do óxido nítrico (NOS), com L-NOARG, causou catalepsia e hipolocomoção nos animais, sendo essas alterações do comportamento motor, parcialmente revertidas pela cafeína, um antagonista não seletivo de receptores de adenosina, independente da dose utilizada.

b) A inibição da sintase do óxido nítrico (NOS), com L-NAME, causou catalepsia e hipolocomoção nos animais, sendo essas alterações do comportamento motor, revertidas a níveis basais pela cafeína, um antagonista não seletivo de receptores de adenosina, principalmente na dose de 10 nM.

c) A utilização de L-Arginina, um substrato verdadeiro para a produção do óxido nítrico, não causou catalepsia e hipolocomoção nos animais, sendo que a cafeína, um antagonista não seletivo de receptores de adenosina, estimulou o comportamento motor desses camundongos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbracchio MP, Cattabeni F. Brain adenosine receptors as targets for therapeutic intervention in neurodegenerative diseases. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1999; 890:79-92.

Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 1989 Oct; 12(10):366-375.

Alfaroa JLG, *et al.* Long-lasting resistance to haloperidol-induced catalepsy in male rats chronically treated with caffeine. *Neurosci Lett.* 2009 Oct; 463(3):210 - 4.

Alvira D, *et al.* Comparative analysis of the effects of resveratrol in two apoptotic models: Inhibition of complex I and potassium deprivation in cerebellar neurons. *Neuroscience.* 2007; 147:746–756.

Armentero MT, *et al.* Past, present and future of A2A adenosine receptor antagonists in the therapy of Parkinson's disease. *Pharmacology & Therapeutics.* 2011; 132:280–299.

Barraco RA, *et al.* Adenosine A2a receptors in the nucleus accumbens mediate locomotor depression. *Brain Res.Bull.* 1993; 31(3-4):397-404.

Bibbiani F, *et al.* A2A antagonist prevents dopamine agonist-induced motor complications in animal models of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2003; 184: 285–294.

Bishnoi M, Chopra K, Kulkarni SK. Theophylline, adenosine receptor antagonist prevents behavioral, biochemical and neurochemical changes associated with an animal model of tardive dyskinesia. *Pharmacol Resp.* 2007; 59:181 – 191.

Broad RM, Fallahi N, Fredholm BB. Nitric oxide interacts with oxygen free radicals to evoke the release of adenosine and adenine nucleotides from rat hippocampal slices. *J.Auton.Nerv.Syst.* 2000 Jul; 81(1-3):82-86.

Brotchie JM, Lee J, Venderova K. Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 2005; 112:359–391.

Brotchie JM. Adjuncts to dopamine replacement: a pragmatic approach to reducing the problem of dyskinesia in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 1998 Nov; 13(6):871-876.

Brundege JM, Dunwiddie TV. Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. *Adv.Pharmacol.* 1997; 39:353-391.

Bujas-Bobanovic M, *et al.* Blockade of phencyclidine-induced effects by a nitric oxide donor. *Br.J.Pharmacol.* 200 Jul; 130(5):1005-1012.

Carta AR. *et al.* Inactivation of neuronal forebrain α receptors protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2009; 111:1478–1489.

Cavas M, Navarro JF. Coadministration of L-NOARG and tiapride: effects on catalepsy in male mice. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry.* 2002 Jan; 26(1):69-73.

Chase t N, Oh JD, Konitsiotis S. Antiparkinsonian and antidyskinetic activity of drugs targeting central glutamatergic mechanisms. *J Neurol.* 2000; 247:36–42.

Chen J, *et al.* The role of the D(2) dopamine receptor (D(2)R) in A(2A) adenosine receptor (A(2A)R)-mediated behavioral and cellular responses as revealed by A (2A) and D(2) receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci.* 2001; 98:1970–1975.

Contestabile A. Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. *Brains Res. Rev.* 2000; 32:476– 509.

Correa M, Wisniecki A, Betz A, Dobson DR, O'Neill MF, O'Neill MJ, et al. The adenosine A2A antagonist KF17837 reverses the locomotor suppression and tremulous jaw movements induced by haloperidol in rats: possible relevance to parkinsonism. *Behav Brain Res.* 2004;148:47–54.

Costello S, *et al.* Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California. *Am J Epidemiol.* 2010; 169:919–926.

Del Bel EA, *et al.* Catalepsy induced by intra-striatal administration of nitric oxide synthase inhibitors in rats. *European Journal of Pharmacology.* 2004; 485:175– 181.

Del Bel EA, *et al.* Motor effects of acute and chronic inhibition of nitric oxide synthesis in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 2002 Apr; 161(1):32-37.

Del Bel EA, Da Silva CA, Guimaraes FS. Catalepsy induced by nitric oxide synthase inhibitors. *Gen.Pharmacol.* 1998 Feb; 30(2): 245-248.

Del Bel, E.A. *et al.* Role of NO on motor behavior. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2005; 25:371–392.

Dunwiddie TV, Diao L. Extracellular adenosine concentration in hippocampal brain slices and the tonic inhibitory modulation of evoked excitatory responses. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994; 268:537–545.

Durcan, M. J.; Morgan, P. F. Neca-induced hypomotility in mice: evidence for a predominantly central site of action. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 1989 Feb; 32(2): 487-490.

Fahn S. The history of dopamine and levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2008; 23: S497–S508.

Fallahi, N. *et al.* Release of adenosine from rat hippocampal slices by nitric oxide donors. *J.Neurochem.* 1996 Jul; 67(1): 186-193.

Faradji, H. *et al.* Sleep and epilepsy: A key role for nitric oxide? *Epilepsia.* 2000 Jul; 41(7): 794-80.

Fenu, S. *et al.* Adenosine A2A receptor antagonism potentiates L-DOPA-induced turning behaviour and c-fos expression in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Eur.J.Pharmacol.* 1997 Feb; 321(2):143-147.

Ferre, S. *et al.* Adenosine/dopamine interaction: implications for the treatment of Parkinson's disease. *Parkinsonism.Relat Disord.* 2001 Jul; 7(3):235-241.

Ferre, S. *et al.* Adenosine-dopamine interactions in the brain. *Neuroscience.* 1992 Dec; 51(3): 501-512.

Ferre, S. *et al.* Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 1997 Oct; 20, (10): 482-487.

Ferre, S. *et al.* Postsynaptic dopamine/adenosine interaction: I. Adenosine analogues inhibit dopamine D2-mediated behaviour in short-term reserpinized mice. *Eur.J.Pharmacol.* 1991 Jan; 192(1): 25-30.

Ferre S, *et al.* Postsynaptic dopamine/adenosine interaction: II. Postsynaptic dopamine agonism and adenosine antagonism of methylxanthines in short-term reserpinized mice. *Eur.J.Pharmacol.* 1991 Jan; 192(1): 31-37.

Fink JS, *et al.* Molecular cloning of the rat A2 adenosine receptor: selective co-expression with D2 dopamine receptors in rat striatum. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 1992 Jul; 14(3): 186-195.

Florio C, *et al.* Inhibitory and excitatory effects of adenosine antagonists on spontaneous locomotor activity in mice. *Life Sci.* 1997; 60(17): 1477-1486.

Fredholm BB, *et al.* Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol.Rev.* 1999 Mar; 51(1): 83-133.

Fredholm BB, *et al.* Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol.Rev.* 1994 Jun; 46(2):143-156.

Gillespie RJ, *et al.* Antagonists of the human A2A adenosine receptor. 4. Design, synthesis, and preclinical evaluation of 7-Aryltriazolo[4,5-d]pyrimidines. *J Med Chem.* 2009; 52:33–47.

Golembiowska K, Dziubina A. Striatal adenosine A2A receptor blockade increases extracellular dopamine release following L – DOPA administration in intact and dopamine denervated rats. *Neuropharmacology.* 2004 Sep; 47: 414-426.

Gomes MZ, Raisman-Vozari R, Del Bel EA. A nitric oxide synthase inhibitor decreases 6-hydroxydopamine effects on tyrosine hydroxylase and neuronal nitric oxide synthase in the rat nigrostriatal pathway. *Brain Res.* 2008; 120 ;, 160–169.

GRAY JA. The inheritance of fear. *The psychology of fear and stress.* [4], 57-85. 1987. Cambridge, Press Syndicate of the University of Cambridge. Ref Type: Book Chapter

Halçak, L. *et al.* Inhibition of NO synthase activity in nervous tissue leads to decreased motor activity in the rat. *Physiol Res.* 2000; 49(1): 143-149.

Halldner L, *et al.* Lack of tolerance to motor stimulant effects of a selective adenosine A(2A) receptor antagonist. *Eur J Pharmacol.* 2000; 406:345–354.

Hauber W, *et al.* Catalepsy induced by a blockade of dopamine D1 or D2 receptors was reversed by a concomitant blockade of adenosine A(2A) receptors in the caudate-putamen of rats. *Eur.J.Neurosci.* 2001 Oct; 14(8):1287-1293.

Hauber W. *et al.* Motor effects induced by a blockade of adenosine A2A receptors in the caudate-putamen. *Neuroreport.* 1998 Jun; 9(8): 1803-1806.

Hodgson RA, *et al.* Characterization of the potent and highly selective A2A receptor antagonists preladenant and SCH 412348 in rodent models of movement disorders and depression. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009; 330: 294–303.

Hunot S, *et al.* Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience* v.72, n.2, p.355–363. 1996.

Hurley m. J. *et al.* Adenosine A(2A) receptor mRNA expression in Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* v.291, p. 54 – 8. 2000.

Iadecola, C. *et al.* Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *J.Neurosci.* 1997 Dec: 17(23): 9157-9164.

Ikeda, K. *et al.* Neuroprotection by adenosine A2A receptor blockade in experimental models of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2002; 80:262–267.

Ishiwari K, *et al.* Injections of the selective adenosine A2A antagonist MSX-3 into the nucleus accumbens core attenuate the locomotor suppression induced by haloperidol in rats. *Behav Brain Res.* 2007;178:190–9.

Jain, N. *et al.* Anxiolytic activity of adenosine receptor activation in mice. *Br.J.Pharmacol.* 1995 Oct; 16(3):2127-2133.

Jankovic, J. Levodopa strengths and weaknesses. *Neurology.* 2002 Feb; 58(4) Suppl 1: S19-S32.

Jenner P. Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat Rev Neurosci.* 2008; 9:665–677.

Jenner P. A2A antagonists as novel non-dopaminergic therapy for motor dysfunction in PD. *Neurology.* 2003 Dec; 61(11) Suppl 6: S32-S38.

Jenner P. Pathophysiology and biochemistry of dyskinesia: clues for the development of non-dopaminergic treatments. *J.Neurol.* 2000 Apr; 247 Suppl 2: II43-II50.

Joghataie M, *et al.* Protective effect of caffeine against neurodegeneration in a model of Parkinson's disease in rat: Behavioral and histochemical evidence. *Parkinsonism Relat Disord.* 2004; 10:465–468.

Johansson C, Jackson DM, Svensson L. Nitric oxide synthase inhibition blocks phencyclidine-induced behavioural effects on prepulse inhibition and locomotor activity in the rat. *Psychopharmacology (Berl).* 1997 May; 131(2): 167-173.

Kachroo A, Irizarry MC, Schwarzschild MA. Caffeine protects against combined paraquat and maneb-induced dopaminergic neuron degeneration. *Exp Neurol.* 2010; 223: 657–661.

Kalda A, *et al.* Novel neuroprotection by caffeine and adenosine A(2A) receptor antagonists in animal models of Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 2006; 248: 9–15.

Kanda T, *et al.* Adenosine A_{2A} receptors modify motor function in MPTP-treated common marmosets. *Neuroreport*. 1998 Aug; 9(12): 2857-2860.

Kanda T, *et al.* KF17837: a novel selective adenosine A_{2A} receptor antagonist with anticataleptic activity. *Eur.J.Pharmacol.* 1994 May; 256(3):263-268.

Kanda T, *et al.* (1998). Adenosine A_{2A} antagonist: a novel antiparkinsonian agent that does not provoke dyskinesia in parkinsonian monkeys. *Ann Neurol.* 1998; 43: 507–513.

Kase H. New aspects of physiological and pathophysiological functions of adenosine A_{2A} receptor in basal ganglia. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 2001 Jul; 65(7):1447-1457.

Khisti RT, Chopde CT, Abraham E. GABAergic involvement in motor effects of an adenosine A_{2A} receptor agonist in mice. *Neuropharmacology.* 2000 Apr; 39(6):1004-1015.

Kiss JP, Vizi ES. Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission. *Trends Neurosci.* 2001 Apr; 24(4): 211-215.

Koga K, *et al.* Adenosine A_{2A} receptor antagonists KF17837 and KW-6002 potentiate rotation induced by dopaminergic drugs in hemi-Parkinsonian rats. *Eur J Pharmacol.* 2000; 408: 249–255.

Kwiatkosk RC, *et al.* Altered expression of neuronal nitric oxide synthase in weaver mutant mice. *Brainresearch.* 2010; 1326: 40 – 50.

Lancaster JR. A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric.Oxide.* 1997 Feb; 1(1):18-30.

Malec D. Haloperidol-induced catalepsy is influenced by adenosinereceptor antagonists. *Pol. J. Pharmacol.* 1997; 49:323–327.

Marras RA, *et al.* L-NOARG, an inhibitor of nitric oxide synthase, induces catalepsy in mice. *Neuroreport.* 1995 Dec; 7(1):158-160.

Mehler-Wex C, Riederer P, Gerlach M. Dopaminergic dysbalance in distinct basal ganglia neurocircuits: implications for the pathophysiology of Parkinson's disease, schizophrenia and attention deficit hyperactivity disorder. *Neurotox. Res.* 2006; 10(3–4):167–179.

Moo-Puc ER, *et al.* Caffeine and muscarinic antagonists act in synergy to inhibit haloperidol-induced catalepsy. *Neuropharmacology.* 2003; 45:493–503.

Morelli M, *et al.* Role of adenosine A2A receptors in parkinsonian motor impairment and L – DOPA – induced motor complications. *Prog Neurobiol.* 2007; 83:293 – 309.

Morelli M, *et al.* Adenosine A2 receptors interact negatively with dopamine D1 and D2 receptors in unilaterally 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Eur.J.Pharmacol.* 1994; 251(1):21-25.

Morris BJ, *et al.* Dynamic changes in NADPH-diaphorase staining reflect activity of nitric oxide synthase: evidence for a dopaminergic regulation of striatal nitric oxide release. *Neuropharmacology.* 1997 Nov; 36(11-12):1589-1599.

Neto FEP, *et al.* Nitric oxide synthase inhibition attenuates l-dopa-induced dyskinesias in a rodent model of parkinson's disease. *Neuroscience.* 2009; 159: 927–935.

Newman ME, Mcilwain H. Adenosine as a constituent of the brain and of isolated cerebral tissues and its relationship to the generation of cyclic AMP. *Biochem J.* 1977; 164:131–137.

Obeso JA, Olanow CW, Nutt JG. Levodopa motor complications in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 2000 Oct; 23(10) Suppl: S2-S7.

Oh JD, Chase TN. Glutamate-mediated striatal dysregulation and the pathogenesis of motor response complications in Parkinson's disease. *Amino Acids.* 2002; 23: 133–139.

Olanow CW. Levodopa/dopamine replacement strategies in Parkinson's disease: future directions. *Mov Disord.* 2008; 23:613–622.

Ongini E, Fredholm BB. Pharmacology of adenosine A2A receptors. *Trends Pharmacol.Sci.* 1996 Oct;17(10):364-372.

Paxinos G, Franklin, KBJ. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact.* 3th ed., Salt Lake City: Academic Press; 2008: 256, ISBN 978-0123742445 /0123742447.

Pierri M, *et al.* KW-6002 protects from MPTP induced dopaminergic toxicity in the mouse. *Neuropharmacology.* 2005; 48:517–524.

Pinna A, *et al.* Blockade of A2a adenosine receptors positively modulates turning behaviour and c-Fos expression induced by D1 agonists in dopamine-denervated rats. *Eur.J.Neurosci.* 1996 Jun; 8(6):1176-1181.

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

Pinna A, *et al.* New adenosine A2A receptor antagonists: actions on Parkinson's disease models. *Eur J Pharmacol.* 2005; 512:157–164.

Pollack AE, Fink J. Synergistic interaction between an adenosine antagonist and a D1 dopamine agonist on rotational behavior and striatal c-Fos induction in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Brain Res.* 1996 Dec; 743(1-2):124-130.

Popoli P, Reggio R, Pezzola A. Effects of SCH 58261, an adenosine A(2A) receptor antagonist, on quinpirole-induced turning in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. Lack of tolerance after chronic caffeine intake. *Neuropsychopharmacology.* 2000 May; 22(5):522-529.

Prast H, Philippu A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog.Neurobiol.* 2001 May; 64(1): 51-68.

Quinn NP. Classification of fluctuations in patients with Parkinson's disease. *Neurology.* 1998 Aug; 51(2) Suppl 2:S25-S29.

Qureshi GA, *et al.* Increased cerebrospinal fluid concentration of nitrite in PD. *Neuroreport.* 1995; 6:1642–1644.

Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol.Rev.* 1998; 50(3):413-492.

Richardson PJ, Kase H, Jenner PG. Adenosine A2A receptor antagonists as new agents for the treatment of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 1997;18:338–344.

Rosenberg PA, *et al.* Nitric oxide-stimulated increase in extracellular adenosine accumulation in rat forebrain neurons in culture is associated with ATP hydrolysis and inhibition of adenosine kinase activity. *J.Neurosci.* 2000 Aug;20(16):6294-6301.

Salamone JD, *et al.* Tremorolytic effects of adenosine A2A antagonists: implications for parkinsonism. *Front Biosci.* 2008;13:3594–605.

Sanberg PR, *et al.* The catalepsy test: its ups and downs. *Behav. Neurosci.* 1988 Oct;102(5):748-759.

Schiffmann SN, *et al.* Distribution of adenosine A2 receptor mRNA in the human brain. *Neurosci. Lett.* 1991 Sep;130(2):177-181.

Schwartz M A, *et al.* Targeting adenosine a2a receptors in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 2006;29:647-654.

Shiozaki S, *et al.* Actions of adenosine A2A receptor antagonist KW-6002 on drug-induced catalepsy and hypokinesia caused by reserpine or MPTP. *Psychopharmacology (Berl)*. 1999 Nov;147(1):90-95.

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

Silva N, Guimarães FS, Del Bel EA. Serotonin modulation of catalepsy induced by NG-nitro-L-arginine in mice. *European Journal of Pharmacology*. 2009;379:47–52.

Silva SI. *Interação entre adenosina, dopamina e óxido nítrico nos núcleos basais: Análise do comportamento motor em um modelo animal da doença de Parkinson [Dissertação]*. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2010.

Silverdale MA, *et al.* Potential nondopaminergic drugs for Parkinson's disease. *Adv Neurol*. 2003;91:273–291.

Singh S, *et al.* Effect of caffeine on the expression of cytochrome P450 1A2, adenosine A2A receptor and dopamine transporter in control and 1-methyl 4-phenyl 1, 2, 3, 6 tetrahydropyridine treated mouse striatum. *Brain Res*. 2009;1283:115–126.

Starr MS, Starr BS. Do NMDA receptor-mediated changes in motor behaviour involve nitric oxide? *Eur. J. Pharmacol.* 1995 Jan;272(2-3):211-217.

Stasi MA, *et al.* ST 1535: A preferential A2A adenosine receptor antagonist. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2006; 9:575–584.

Stromberg I, *et al.* Electrophysiological and behavioural evidence for an antagonistic modulatory role of adenosine A2A receptors in dopamine D2 receptor regulation in the rat dopamine-denervated striatum. *Eur.J.Neurosci.* 2000 Nov;12(11):4033-4037.

Svenningsson P. *et al.* Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A2A receptors. *Prog.Neurobiol.* 1999 Nov;59(4):355-396.

Trevitt J, *et al.* Adenosine antagonists reverse the cataleptic effects of haloperidol: Implications for the treatment of Parkinson's disease. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* 2009 Feb;92:521–527.

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

Villanueva-Toledo J, Moo-Puc RE, Góngora-Alfaro JL. (2003). Selective A2A, but not A1 adenosine antagonists enhance the anticataleptic action of trihexyphenidyl in rats. *Neurosci Lett.* 2003;346:1–4.

Wall MJ, Atterbury A, Dale N. Control of basal extracellular adenosine concentration in rat cerebellum. *J Physiol.* 2007;582(1):137–151.

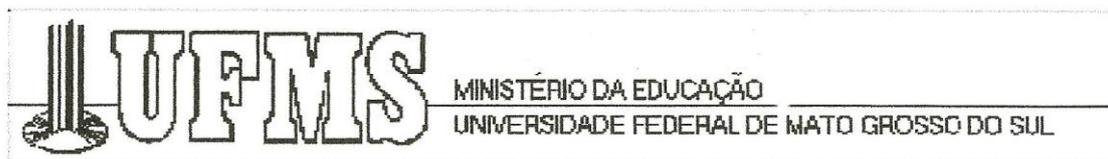
Walsh R, Cummins RA. The open-field test: A critical review. *Psychological Bulletin.* 1976;83(3):482-504.

Whimbey AE, Denenberg VH. Two independent behavioral dimensions in open-field performance. *J.Comp Physiol Psychol.* 1967 Jun;63(3):500-504.

Xu K, et al. Caffeine's neuroprotection against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity shows no tolerance to chronic caffeine administration in mice. *Neurosci Lett.* 2002;322:13–16.

Zarrindast MR, Modabber M, Sabetkasai M. Influences of different adenosine receptor subtypes on catalepsy in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 1993;113(2):257-261.

ANEXOS



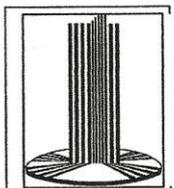
C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 276 do Pesquisador Albert Schiavetto de Souza referente ao projeto de pesquisa, “**Interação entre adenosina e óxido nítrico nos núcleos basais: análise do comportamento em um modelo animal da doença de Parkinson**”, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), 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 de 5 de novembro de 2010.

Campo Grande (MS), 5 de novembro de 2010.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Joice Stein', is written over a faint, circular stamp or watermark.

Dr^a Joice Stein
Presidente em exercício da CEUA



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UFMS**

CI 8/2011

Do(a): Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA/UFMS

Para: Pesquisador Albert Schiaveto de Souza

Data: 13 de setembro de 2011

Prezado Pesquisador,

Acusamos o recebimento do adendo referente ao Protocolo 276/2010 intitulado, **“Interação entre adenosina e óxido nítrico nos núcleos basais: análise do comportamento em um modelo animal da doença de Parkinson”**, solicitando a utilização de mais 32 camundongos suíços machos com peso entre 25 - 30g.

A subcomissão de análise de Protocolos da CEUA manifestou Parecer favorável ao solicitado.

Atenciosamente,

Joice Stein

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais/UFMS