

LILIAM FLAVIA LINHARES RODRIGUES

**ANÁLISE DA INTERAÇÃO ENTRE ACETILCOLINA, DOPAMINA E
ÓXIDO NÍTRICO SOBRE O COMPORTAMENTO MOTOR EM UM
MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON**

CAMPO GRANDE – MS

2012

LILIAM FLAVIA LINHARES RODRIGUES

**ANÁLISE DA INTERAÇÃO ENTRE ACETILCOLINA, DOPAMINA E
ÓXIDO NÍTRICO SOBRE O COMPORTAMENTO MOTOR EM UM
MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON**

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

Orientador: Prof. Dr. Albert Schiaveto de Souza

CAMPO GRANDE - MS

2012

FOLHA DE APROVAÇÃO

LILIAM FLAVIA LINHARES RODRIGUES

ANÁLISE DA INTERAÇÃO ENTRE ACETILCOLINA, DOPAMINA E ÓXIDO NÍTRICO SOBRE O COMPORTAMENTO MOTOR EM UM MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON

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

Resultado _____

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Albert Shiaveto de Souza (Presidente)
UFMS – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Prof^a. Dr^a. Alexandra Maria Almeida Carvalho Pinto
UFMS – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Prof^a. Dr^a. Mara Lisiane de Moraes dos Santos
UFMS – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Gustavo Christofolletti (Suplente)
UFMS – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Aos meus pais, e meu filho.

AGRADECIMENTO

À Deus, pela saúde, oportunidades e graças recebidas em toda minha vida;

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, pela implementação do Programa de Pós Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro – Oeste;

Ao Prof. Dr. Albert, por aceitar guiar - me nesta laboriosa jornada;

À acadêmica do Curso de Fisioterapia da UFMS Bruna, pelo auxílio na coleta dos dados;

“Nenhum homem produtivo pensa como se estivesse escrevendo uma dissertação.”

(Albert Einstein)

RESUMO

Rodrigues LFL. Análise da interação entre acetilcolina, dopamina e óxido nítrico sobre o comportamento motor em um modelo animal da doença de Parkinson. Campo Grande; 2012. [Dissertação - Programa e Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

O objetivo deste trabalho foi avaliar a interação entre os neurotransmissores acetilcolina, dopamina e óxido nítrico nos núcleos basais de camundongos.

Foram realizados quatro experimentos, com seis grupos, com oito camundongos suíços, machos, pesando entre 20-30g. No Experimento 1, os animais receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de salina ou haloperidol (1mg/kg) seguida pela aplicação i.p. de salina ou biperideno (2,5 e 10mg/kg). No Experimento 2, os animais receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de salina ou L-NOARG (40mg/kg) seguida pela aplicação i.p. de salina ou biperideno (2,5 e 10mg/kg). No Experimento 3, os animais receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de salina ou haloperidol (1mg/kg) seguida pela aplicação i.p. de salina ou tropicamida (2,5 e 10mg/kg). No Experimento 4, os animais receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de salina ou L-NOARG (40mg/kg) seguida pela aplicação i.p. de salina ou tropicamida (2,5 e 10mg/kg). Após 30, 60 e 90 minutos da aplicação das drogas, os animais foram submetidos ao teste de catalepsia na barra. Após 60 minutos, ao teste de campo aberto. No Experimento 1, o grupo haloperidol+salina apresentou maior tempo de catalepsia em relação aos demais (pós-teste de Tukey $p<0,05$). Os grupos Haloperidol+biperideno (2,5 e 10mg/kg) apresentaram menor tempo de catalepsia que o Haloperidol+salina ($p<0,05$). No Experimento 2, o grupo L-NOARG+ salina apresentou maior tempo de catalepsia em relação aos demais ($p<0,05$). Os grupos L-NOARG+biperideno (2,5 e 10mg/kg) apresentaram menor tempo de catalepsia que L-NOARG+salina ($p<0,05$). No Experimento 3, o grupo Haloperidol+salina apresentou maior tempo de catalepsia em relação aos demais ($p<0,05$). Os grupos Haloperidol+tropicamida (2,5 e 10mg/kg) apresentaram menor tempo de catalepsia que Haloperidol+salina ($p<0,05$). No Experimento 4, o grupo L-NOARG+salina apresentou maior tempo de catalepsia em relação aos demais. Os grupos L-NOARG+tropicamida (2,5 e 10mg/kg) apresentaram menor tempo de catalepsia que L-NOARG+salina ($p<0,05$). O antagonista de dopamina, haloperidol, causou alterações no comportamento motor, levando à catalepsia e diminuição na exploração horizontal e exploração vertical. O antagonista da síntese de óxido nítrico (NOS), L-NOARG causou as mesmas alterações, porém mais discretamente. Os antagonistas de receptores muscarínicos de acetilcolina (M1), biperideno e tropicamida (M4) reverteram catalepsia e aumentaram a exploração horizontal e vertical induzida.

Palavras Chave: núcleos da base, receptores de acetilcolina, catalepsia, dopamina.

ABSTRACT

Rodrigues LFL. Analysis of the interaction between acetylcholine, dopamine and nitric oxide on motor behavior in an animal model of Parkinson's disease. Campo Grande; 2012. [Thesis - Graduate Program and Health and Development in the Midwest Region, Federal University of Mato Grosso do Sul].

The aim of this study was to evaluate the interaction between the neurotransmitters acetylcholine, dopamine and nitric oxide in basal ganglia of mice. Four experiments were conducted with six groups of eight Swiss mice, male, weighing 20-30g. In Experiment 1, animals were injected intraperitoneally (ip) with saline or haloperidol (1mg/kg) followed by ip application of saline or biperiden (2.5 and 10mg/kg). In Experiment 2, animals were injected intraperitoneally (ip) of saline or L-NOARG (40mg/kg) followed by ip application of saline or biperiden (2.5 and 10mg/kg). In Experiment 3, animals were injected intraperitoneally (ip) with saline or haloperidol (1mg/kg) followed by ip application of saline or tropicamide (2.5 and 10mg/kg). In Experiment 4, animals were injected intraperitoneally (ip) with saline or L-NOARG (40mg/kg) followed by ip application of saline or tropicamide (2.5 and 10mg/kg). After 30, 60 and 90 minutes of application of drugs, the animals were submitted for catalepsy in the bar. After 60 minutes an open field. In Experiment 1, saline + haloperidol group showed a longer catalepsy in relation to the others (Tukey's test $p < 0.05$). The groups haloperidol + biperiden (2.5 and 10mg/kg) were shorter than the haloperidol catalepsy + saline ($p < 0.05$). In Experiment 2, the group L-NOARG + saline showed longer catalepsy in relation to the others ($p < 0.05$). The groups L-NOARG + biperiden (2.5 and 10mg/kg) showed less catalepsy time that L-NOARG + saline ($p < 0.05$). In Experiment 3, haloperidol + saline group had longer catalepsy in relation to the others ($p < 0.05$). The groups haloperidol + tropicamide (2.5 and 10mg/kg) were shorter than haloperidol catalepsy + saline ($p < 0.05$). In Experiment 4, the group L-NOARG + saline showed longer catalepsy in relation to other groups tropicamide + L-NOARG (2.5 and 10mg/kg) showed less catalepsy time that L-NOARG + saline ($p < 0.05$). The dopamine antagonist, haloperidol, caused changes in motor behavior, leading to the decrease in catalepsy and horizontal scanning and vertical scanning. The antagonist of nitric oxide synthesis (NOS), L-NOARG caused the same changes, but more discreetly. Antagonists of muscarinic acetylcholine receptors (M1), biperiden and tropicamide (M4) reversed catalepsy and increased explotation induced horizontal and vertical.

Keywords: basal ganglia, acetylcholine receptors, catalepsy, dopamine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática do Experimento I	23
Figura 2 -	Representação esquemática do Experimento II	24
Figura 3 -	Representação esquemática do Experimento III	25
Figura 4 -	Representação esquemática do Experimento IV	26
Figura 5 -	Ilustração do teste de catalepsia	27
Figura 6 -	Ilustração do teste do campo aberto	29
Figura 7 -	Gráfico ilustrando o tempo de catalepsia para os grupos do experimento I, mensurados 30, 60 e 90 minutos após a aplicação das drogas	34
Figura 8 -	Gráfico ilustrando o número de quadrantes percorridos (exploração horizontal) e de erguimentos (exploração vertical) expressos pelos animais no campo aberto, 60 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do Experimento I.....	36
Figura 9 -	Gráfico ilustrando o tempo de catalepsia para os grupos do experimento II, mensurados 30, 60 e 90 minutos após a aplicação das drogas	39
Figura 10 -	Gráfico ilustrando o número de quadrantes percorridos (exploração horizontal) e de erguimentos (exploração vertical) expressos pelos animais no campo aberto, 60 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do Experimento II	41
Figura 11 -	Gráfico ilustrando o tempo de catalepsia para os grupos do experimento III, mensurados 30, 60 e 90 minutos após a aplicação das drogas	44
Figura 12 -	Gráfico ilustrando o número de quadrantes percorridos (exploração horizontal) e de erguimentos (exploração vertical) expressos pelos animais no campo aberto, 60 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do Experimento III	46
Figura 13 -	Gráfico ilustrando o tempo de catalepsia para os grupos do experimento IV, mensurados 30, 60 e 90 minutos após a aplicação das drogas	49

Figura 14 - Gráfico ilustrando o número de quadrantes percorridos (exploração horizontal) e de erguimentos (exploração vertical) expressos pelos animais no campo aberto, 60 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do Experimento IV	51
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resultados referentes ao tempo de catalepsia para os grupos do Experimento I, mensurados 30, 60 e 90 minutos após a aplicação das drogas	33
Tabela 2 -	Resultados referentes à exploração horizontal e vertical dos animais no campo aberto, 60 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 30, 60 e 90 minutos após a aplicação das drogas	38
Tabela 4 -	Resultados referentes à exploração horizontal e vertical dos animais no campo aberto, 60 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do Experimento II	40
Tabela 5 -	Resultados referentes ao tempo de catalepsia para os grupos do Experimento III, mensurados 30, 60 e 90 minutos após a aplicação das drogas	43
Tabela 6 -	Resultados referentes à exploração horizontal e vertical dos animais no campo aberto, 60 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do Experimento III	45
Tabela 7 -	Resultados referentes ao tempo de catalepsia para os grupos do Experimento IV, mensurados 30, 60 e 90 minutos após a aplicação das drogas	48
Tabela 8 -	Resultados referentes à exploração horizontal e vertical dos animais no campo aberto, 60 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do Experimento IV	50

LISTA DE ABREVIATURAS

CEUA	Comissão Ética do Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DP	Doença de Parkinson
5 (HT)	5-hidroxitriptamina
L-dopa	Levodopa
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintase de óxido nítrico
SNC	Sistema Nervoso Central

LISTA DE SIMBOLOS

cm	Centímetro
kg	Quilograma
g	Grama
mg	Miligrama
n	Tamanho da amostra
%	Percentual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
3 OBJETIVOS	20
3.1 Geral	20
3.2 Específicos	20
4 MATERIAL E MÉTODO	21
4.1 Animais	21
4.2 Drogas	21
4.3 Experimentos e grupos experimentais	21
4.3.1 Experimento I	22
4.3.2 Experimento II	23
4.3.3 Experimento III	24
4.3.4 Experimento IV	25
4.4 Avaliação funcional dos animais	26
4.4.1 Teste de catalepsia na barra	26
4.4.2 Teste do campo aberto	28
4.5 Descarte dos animais	29
4.6 Análise dos resultados	29
5 RESULTADOS	31
5.1 Experimento I	31
5.2 Experimento II	36
5.3 Experimento III	41
5.4 Experimento IV	46
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é o principal distúrbio da postura e do movimento encontrado na população idosa, perdendo apenas para os acidentes vasculares encefálicos (AVE). Estima-se que esse distúrbio acomete cerca de 1% da população mundial com mais de 65 anos, representando até 2/3 dos pacientes que frequentam os grandes centros de distúrbios do movimento em todo o mundo (MENESES *et al.*, 1996).

A Doença de Parkinson é considerada cosmopolita, uma vez que não apresenta distinção entre as classes sociais, nem entre raças, acometendo homens e mulheres, principalmente, na faixa etária entre 55 a 65 anos, porém tende a ocorrer com maior frequência nos homens (LIMONGI, 2001). Porém, em alguns casos, a DP pode manifestar-se também em indivíduos com menos de 40 anos, caracterizando o Parkinsonismo Precoce (BARBOSA ; SALLEM, 2005).

Conforme Silberman *et al.* (2002), o número de idosos com mais de 60 anos vem aumentando, bem como a expectativa de vida dos brasileiros. Assim, é possível teorizar que a DP pode provocar um impacto nas estruturas econômicas, sociais e de saúde, o que necessitará de um maior conhecimento acerca da DP e um melhoramento do planejamento de saúde pública. Ademais, estima-se que em 2020 aproximadamente 40 milhões de pessoas no mundo terão desordens motoras secundárias à DP (LANA *et al.*, 2007).

A DP é uma doença crônica, causada pela perda seletiva de neurônios dopaminérgicos localizados na *pars compacta* da substância nigra, determinando uma diminuição da neurotransmissão dopaminérgica no corpo estriado, em especial no putâmen. Seus sintomas característicos são o tremor de repouso, a rigidez muscular e a acinesia ou bradicinesia (SHIH *et al.*, 2006).

Teives (2005) destaca que pesquisas recentes têm demonstrado que a DP deve ser considerada como uma enfermidade neurodegenerativa, progressiva, com hipóteses etiológicas de origem genética e ambiental caracterizada pela presença de disfunção monoaminérgica múltipla, incluindo o déficit de sistemas dopaminérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos e noradrenérgicos.

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 (JANKOVIC, 2002; OBESO *et al.*, 2000; QUINN, 1998).

Seu principal tratamento é a levodopa (L-dopa), considerado o agente farmacológico sintomático mais eficaz. No entanto seu uso contínuo apresenta declínio da eficácia terapêutica e surgem efeitos colaterais a longo prazo, como as flutuações motoras, as discinesias e os distúrbios neuro-psiquiátricos (JÚRI, CHANÁ, 2006; MATTOS, MATTOS, 1999; SALAMONE, 2010).

Com o objetivo principal de superar ou controlar as limitações do uso da L-dopa, foram introduzidos os agonistas dopaminérgicos, altamente efetivos em tratar os estágios iniciais da doença, que não modificam significativamente a progressão da doença. Mas novas manipulações farmacológicas para o tratamento da DP devem produzir agentes com ação anti-parkinsoniana em todas as fases da doença, sem perda da eficácia da droga e que previna o surgimento de complicações (JENNER, 2003; JÚRI, CHANÁ, 2006; MATTOS, MATTOS, 1999).

O estudo de novas terapias para a doença de Parkinson está voltado para sistemas não dopaminérgicos dentro dos núcleos da base que vão além das vias nigroestriatais lesionadas (BROTCHIE, 1998; JENNER, 2000; SALAMONE, 2010). Vários agentes que apresentam potencial terapêutico tem sido descritos, incluindo agentes que atuam em receptores glutamatérgicos, canabinóides, opióides, α_2 -adrenérgicos e receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos (JENNER, 2003).

Devido à alta incidência e prevalência da DP, associado ao surgimento dos efeitos colaterais relacionados ao uso contínuo da terapia dopaminérgica, esta pesquisa busca o melhor conhecimento da fisiologia dos núcleos da base e da fisiopatologia da DP, assim como, em um modelo animal, refletir ações anti-parkinsonianas de novos agentes, para que assim, possam ser produzidas novas manipulações farmacológicas capazes de apresentar um potencial terapêutico em todas as fases da doença, sem o declínio da eficiência e que possam também prevenir o surgimento de complicações.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A doença de Parkinson (DP) é primariamente uma doença da função motora extrapiramidal, causada por degeneração severa de neurônios dopaminérgicos da substância nigra. 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 (JANKOVIC, 2002; OBESO, OLANOW; NUTT, 2000 & QUINN, 1998).

O tratamento sintomático da doença de Parkinson com L-dopa e drogas agonistas de dopamina predominam a terapia farmacológica e são altamente efetivos em tratar os estágios iniciais da doença. Todavia, com a introdução de drogas dopaminérgicas associam-se efeitos colaterais adversos, 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, as demais terapias utilizadas atualmente tratam os sintomas neuromotores e não modificam significativamente a progressão da doença. Como consequência disso, há a necessidade do desenvolvimento de novas manipulações farmacológicas para o tratamento da DP capazes 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; SALAMONE, 2010).

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; SALAMONE, 2010).

No estriado (núcleo caudado e putâmen), acetilcolina e dopamina interagem fortemente e desempenham um papel importante no controle motor normal (CALABRESI *et al.*, 2006; INCE, CILAX & LEVEY, 1997; JENSEN *et al.*, 2011). O desequilíbrio da transmissão de acetilcolina e dopamina no sistema nigro-estriatal é a base patogênica das desordens extrapiramidais, como no caso da DP. De acordo com a clássica hipótese clínica, a diminuição da atividade do sistema dopaminérgico é paralela a hiperfunção do sistema colinérgico (DAGAEV *et al.*, 2004).

A liberação de acetilcolina depende de um controle inibitório contínuo de dopamina, mediante sua ação sobre os receptores de dopamina do tipo D2, presentes nos interneurônios colinérgicos. A diminuição da atividade dopaminérgica

resulta no aumento da liberação de acetilcolina e, portanto no excesso de estimulação dos receptores muscarínicos do estriado (ALFARO *et al.*, 2005).

O conhecimento das funções dos receptores muscarínicos colinérgicos e de seus subtipos avançou consideravelmente após a clonagem de seus cinco genes distintos (M1-M5) em células de mamíferos. Entre os cinco subtipos de receptores muscarínicos clonados apenas o subtipo M5 não foi totalmente caracterizado ao nível farmacológico e funcional. Todos os receptores muscarínicos pertencem a família de receptores acoplados à proteína G, sendo esta uma classe de proteína envolvida na transdução metabotrópica de sinais celulares (LANGMEAD *et al.*, 2008; GUO *et al.*, 2010).

Sítios de ligação específicos para acetilcolina, agonistas e antagonistas muscarínicos estão presentes na região N-terminal e nas alças extra-celulares. Na região intracelular, os receptores muscarínicos colinérgicos conservam a região C-terminal, além de três alças intracelulares (i1, i2, i3) (VANKOPPEN & NATHANSON, 1991).

A diferença funcional na ativação dos diferentes subtipos de receptores muscarínicos colinérgicos reside principalmente na constituição da alça i3 desses receptores. A i3 é a região dos receptores muscarínicos que interage com a proteína G e apresenta variação na sequência de aminoácidos entre os receptores muscarínicos colinérgicos. Já as alças i1 e i2 são bastante conservadas em todos os subtipos (WESS, 1993).

A variação da sequência de aminoácidos na alça i3 nos dois grupos de receptores muscarínicos provavelmente determina o acoplamento distinto à proteína G, justificando os diferentes mecanismos de regulação da resposta celular. Os receptores M1, M3 e M5, quando ativados por agonistas colinérgicos, acoplam-se preferencialmente com a proteína G_{q/11}, induzem a ativação da fosfolipase C, que promove a hidrólise de fosfoenositídeos presentes na membrana e a produção de diacilglicerol e inositol trifosfato (segundos mensageiros) (SANDIFORD; SLEPAK, 2009).

De forma diferenciada, os receptores M2 e M4, quando ativados, acoplam-se preferencialmente à proteína G inibitória, G_{i/o}, que inibe a atividade da adenociclase e reduz os níveis intracelulares de AMP cíclico (CAULFIELD, 1993; GUO, *et al.*, 2010; LANGMEAD, *et al.*, 2008).

No SNC, os receptores muscarínicos subtipo M1 estão localizados no córtex, hipocampo, estriado e tálamo, encontrados nos axônios pós-sinápticos, M2 encontram-se predominantemente no tálamo, córtex, hipocampo e estriado, nos terminais sinápticos colinérgicos, M3 encontram-se no córtex e hipocampo, M5 localizam-se muito discretamente na substância nigra (LANGMEAD, *et al.*, 2008).

Em particular, o subtipo M4 é encontrado em muitas regiões do cérebro, incluindo córtex e hipocampo, porém, em abundância no estriado, desempenhando papel importante no controle motor e no controle da liberação de dopamina (DENCKER *et al.*, 2009; LANGMEAD, *et al.*, 2008; JENSEN, 2011).

Antagonistas não seletivos de receptores muscarínicos de acetilcolina são utilizados há vários anos como drogas anti-parkinsonianas (BETZ *et al.*, 2007). No entanto, com a abundância de receptores M4 encontrados no estriado, e por estar demonstrado seu importante papel na função motora, supõe-se que antagonistas de receptores M4 poderiam também ser úteis na restauração do equilíbrio entre dopamina e acetilcolina e, portanto, serem utilizados como tratamento na DP (BETZ *et al.*, 2007; LANGMEAD *et al.*, 2008; JENSEN *et al.*, 2011).

Como os anticolinérgicos utilizados clinicamente não possuem seletividade particular pelos subtipos de receptores muscarínicos, aliado às fortes evidências do importante papel na função motora dos receptores M4, é necessário investigar a possível utilidade terapêutica de antagonistas muscarínicos seletivos a esse subtipo de receptores e seus efeitos em modelos animais. Estudos têm demonstrado forte afinidade de tropicamida por receptores M4. A tropicamida, um antagonista de receptores muscarínicos que penetra facilmente na barreira hemato-encefálica, é utilizada clinicamente para fins oftálmicos e seus efeitos anti-parkinsonianos são pouco conhecidos (BETZ *et al.*, 2007).

No entanto, outros neurotransmissores, além de acetilcolina e dopamina, estão presentes nos núcleos da base e participam da modulação do comportamento. Entre eles, 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 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). O NO 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 regular 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 (BUJAS-BOBANOVIC *et al.*, 2000; JOHANSSON *et al.*, 1997), epilepsia, sono (FARADJI *et al.*, 2000) e lesão cerebral (IADECOLA *et al.*, 1997).

Doadores de NO estimulam a liberação de acetilcolina em “slices” estriatais, ao passo que inibidores da sintase do óxido nítrico (NOS) diminuem os níveis de acetilcolina estriatal (HANANIA; JOHNSON, 1998). Todavia, a interação entre NO e acetilcolina não está bem esclarecida ao nível do comportamento.

Assim, neste trabalho foi testado o efeito de um antagonista de receptores muscarínicos de acetilcolina M1 e um antagonista de receptores muscarínicos de acetilcolina M4, na catalepsia induzida por inibidores de dopamina e de óxido nítrico. Além disso, também foram estudadas as possíveis modificações no comportamento motor decorrentes da interação destes neurotransmissores, por meio do teste do campo aberto.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a interação entre os neurotransmissores acetilcolina, dopamina e óxido nítrico sobre o comportamento motor de camundongos.

3.2 Específicos

a) Avaliar o efeito de dois antagonistas de receptores muscarínicos de acetilcolina, biperideno (mais seletivo para receptores tipo M1) e tropicamida (mais seletivo para receptores tipo M4), no comportamento de catalepsia em camundongos, induzida por inibição de receptores de dopamina;

b) Avaliar o efeito de dois antagonistas de receptores de muscarínicos de acetilcolina, biperideno (mais seletivo para receptores tipo M1) e tropicamida (mais seletivo para receptores tipo M4), no comportamento de catalepsia em camundongos, induzida por inibição da NOS;

c) Estudar a interação entre os neurotransmissores acetilcolina, dopamina e óxido nítrico sobre o comportamento motor de camundongos, especificamente em relação à exploração horizontal e vertical, por meio do teste do campo aberto.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Neste experimento foram utilizados camundongos Suíços, machos, adultos jovens, oriundos do biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pesando entre 20-30g. No laboratório, os animais foram alojados em grupo de até quatro animais e mantidos com água e comida a vontade até o início dos testes. O ciclo de luz (12/12 h, 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 CEUA da UFMS, sob o nº 281/2010.

4.2 Drogas

Antagonistas de receptores de dopamina: haloperidol 1mg (Haldol-Janssen-Cilag); inibidores da sintase do óxido nítrico: N^{G} -nitro-L-arginine (L-NOARG - Sigma); antagonista de receptores muscarínicos de acetilcolina M1: 3 biperidino-1-fenil-1-bicicloheptenil-1-propanol ou biperideno – Abbott; antagonista de receptores de acetilcolina M4: N-etil-N-(4-piridilmetil) tropicamida ou tropicamida - Alcon. Todas as drogas foram dissolvidas em solução salina a 0,9%.

4.3 Experimentos e grupos experimentais

Foram realizados 4 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.

4.3.1 Experimento I

Avaliar o efeito do 3 biperidino-1-fenil-1-biciclohoftenil-1-propanol (biperideno) nas alterações do comportamento motor induzidas pelo haloperidol:

Neste experimento os animais receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de salina ou haloperidol (1mg/kg), seguida pela aplicação i.p. de salina ou de biperideno (2,5 e 10mg/kg) após 30 minutos. Foram realizados os seguintes grupos experimentais:

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

Grupo 2 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de salina e após 30 minutos, injeção i.p. de biperideno (2,5mg/kg);

Grupo 3 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de salina e após 30 minutos, injeção i.p. de biperideno (10mg/kg);

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

Grupo 5 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de haloperidol (1mg/kg) e após 30 minutos, injeção i.p. de biperideno (2,5mg/kg);

Grupo 6 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de haloperidol (1mg/kg) e após 30 minutos, injeção i.p. de biperideno (10mg/kg).

As etapas do Experimento I relacionando o tempo de aplicação das drogas com o tempo de aplicação dos testes estão apresentados na Figura 1.

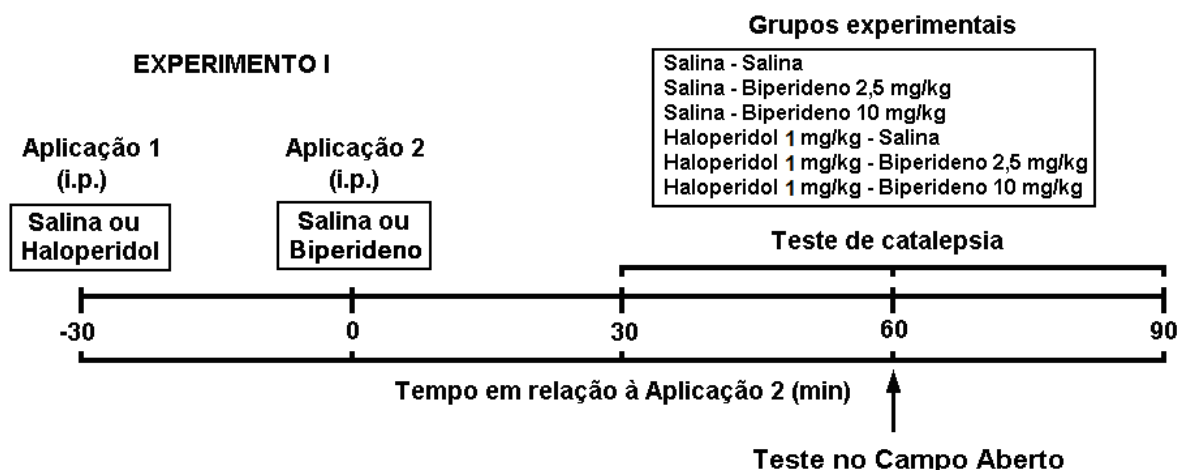


Figura 1 - Ilustração da representação esquemática do Experimento I.

Fonte: Elaboração própria

4.3.2 Experimento II

Avaliar o efeito do 3 biperidino-1-fenil-1-bicicloheptenil-1-propanol (biperideno) nas alterações do comportamento motor induzidas pelo L-NOARG:

Neste experimento os animais receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de salina ou L-NOARG (40mg/kg), seguida pela aplicação i.p. salina ou de biperideno (2,5 e 10mg/kg) após 30 minutos. Foram realizados os seguintes grupos experimentais:

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

Grupo 2 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de salina e após 30 minutos, injeção i.p. de biperideno (2,5mg/kg);

Grupo 3 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de salina e após 30 minutos, injeção i.p. de biperideno (10mg/kg);

Grupo 4 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de L-NOARG (40mg/kg) e após 30 minutos, injeção i.p. de salina;

Grupo 5 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de L-NOARG (40mg/kg) e após 30 minutos, injeção i.p. de biperideno (2,5mg/kg);

Grupo 6 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de L-NOARG (40mg/kg) e após 30 minutos, injeção i.p. de biperideno (10mg/kg).

As etapas do Experimento II relacionando o tempo de aplicação das drogas com o tempo de aplicação dos testes estão apresentados na Figura 2.

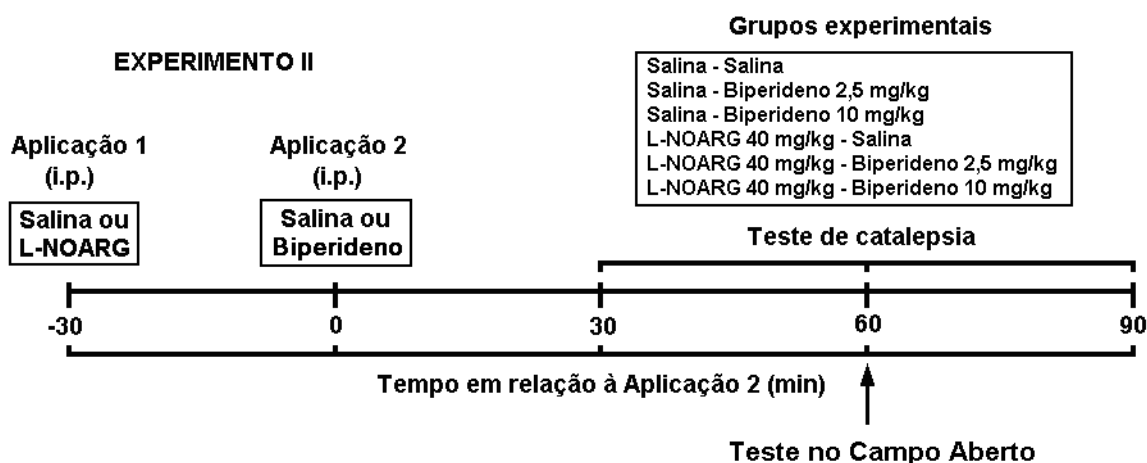


Figura 2 - Ilustração da representação esquemática do Experimento II.

Fonte: Elaboração própria

4.3.3. Experimento III

Avaliar o efeito da N-etil-N-(4-piridilmetil)tropicamida (tropicamida) nas alterações do comportamento motor induzidas pelo haloperidol:

Neste experimento os animais receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de salina ou haloperidol (1mg/kg), seguida pela aplicação i.p. salina ou de tropicamida (2,5 e 10mg/kg), após 30 minutos. Foram realizados os seguintes grupos experimentais:

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

Grupo 2 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de salina e após 30 minutos, injeção i.p. de tropicamida (2,5mg/kg);

Grupo 3 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de salina e após 30 minutos, injeção i.p. de tropicamida (10mg/kg);

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

Grupo 5 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de haloperidol (1mg/kg) e após 30 minutos, injeção i.p. de tropicamida (2,5mg/kg);

Grupo 6 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de haloperidol (1mg/kg) e após 30 minutos, injeção i.p. de tropicamida (10mg/kg).

As etapas do Experimento III relacionando o tempo de aplicação das drogas com o tempo de aplicação dos testes estão apresentados na Figura 3.

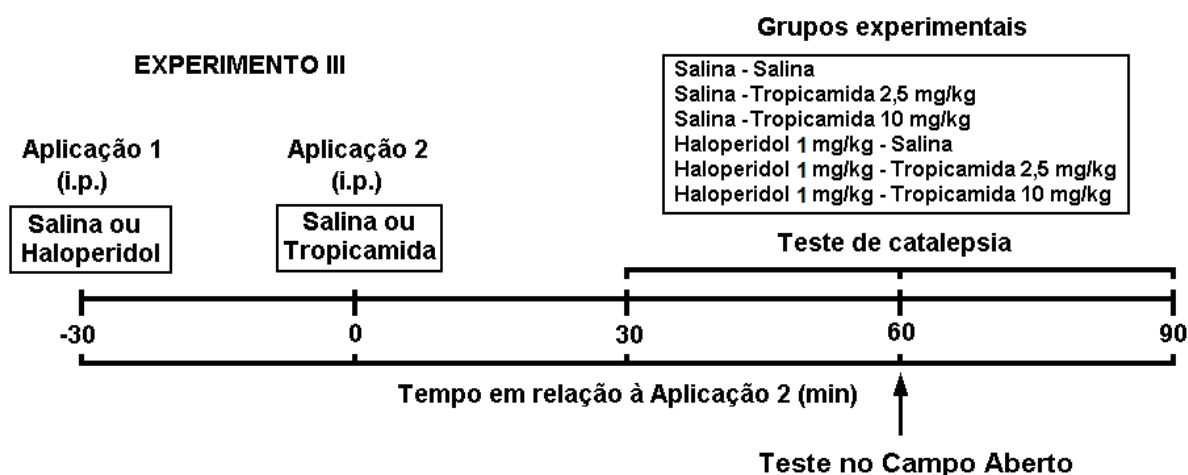


Figura 3 - Ilustração da representação esquemática do Experimento III.

Fonte: Elaboração própria

4 3.4 Experimento IV

Avaliar o efeito da N-etil-N-(4-piridimetil)tropicamida (tropicamida) nas alterações do comportamento motor induzidas pelo L-NOARG:

Neste experimento os animais receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de salina ou L-NOARG (40mg/kg), seguida pela aplicação i.p. salina ou de tropicamida (2,5 e 10mg/kg) após 30 minutos. Foram realizados os seguintes grupos experimentais:

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

Grupo 2 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de salina e após 30 minutos, injeção i.p. de tropicamida (2,5mg/kg);

Grupo 3 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de salina e após 30 minutos, injeção i.p. de tropicamida (10mg/kg);

Grupo 4 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de L-NOARG (40mg/kg) e após 30 minutos, injeção i.p. de salina;

Grupo 5 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de L-NOARG (40mg/kg) e após 30 minutos, injeção i.p. de tropicamida (2,5mg/kg);

Grupo 6 (n=8): os animais receberam injeção i.p. de L-NOARG (40mg/kg) e após 30 minutos, injeção i.p. de tropicamida (10mg/kg).

As etapas do Experimento IV relacionando o tempo de aplicação das drogas com o tempo de aplicação dos testes estão apresentados na Figura 4.

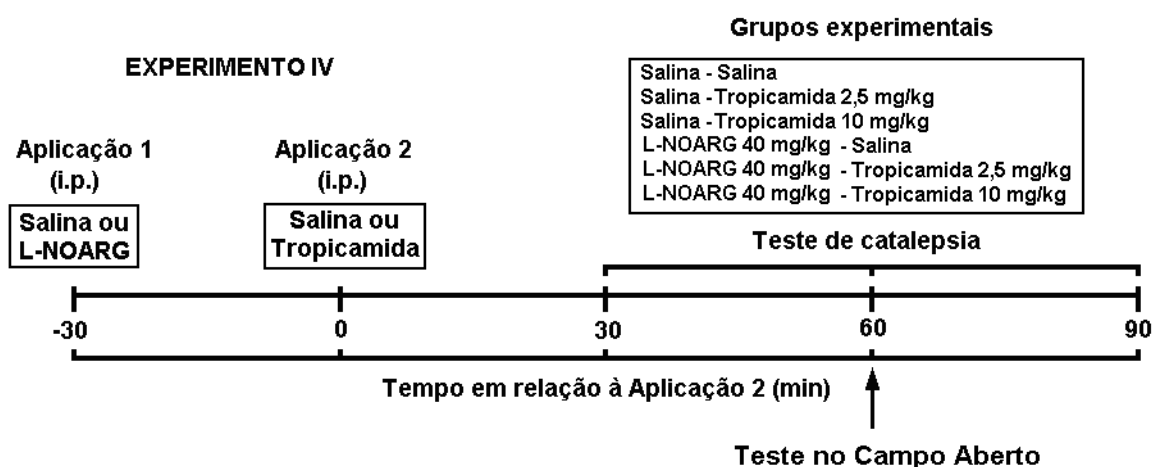


Figura 4 - Ilustração da representação esquemática do Experimento IV.

Fonte: Elaboração própria

4.4 Avaliação funcional dos animais

A avaliação funcional dos animais após a aplicação das drogas foi realizada por meio do teste de catalepsia (ZARRINDAST, MODABBER e SABETKASAI, 1993), e do teste do campo aberto (WALSH, 1976; WHIMBEY, 1967).

4.4.1 Teste de catalepsia na barra:

A catalepsia foi avaliada de acordo com método da barra, onde o camundongo foi 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 30, 60 e 90 minutos após a administração das drogas (Figura 5).



Figura 5: Ilustração de um animal cataléptico posicionado na barra, durante a realização do teste de catalepsia.

Fonte: Elaboração própria

4.4.2 Teste do campo aberto:

Este teste foi utilizado para avaliar o estado motor e a emocionalidade 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. Broaderhurst na década de 1960, em estudos sobre o medo e a herança do comportamento, onde ficou demonstrado que a quantidade de bolos fecais expelidos pelo rato era relacionada positivamente com o medo. 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 relacionados 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).

Neste estudo, os parâmetros avaliados durante a realização do teste do campo aberto foram: a frequência dos comportamentos de exploração horizontal e vertical 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 104,7 cm² cada (Figura 6). O teste foi aplicado 60 minutos após a administração das drogas, onde o animal permanecia na arena durante 5 minutos.

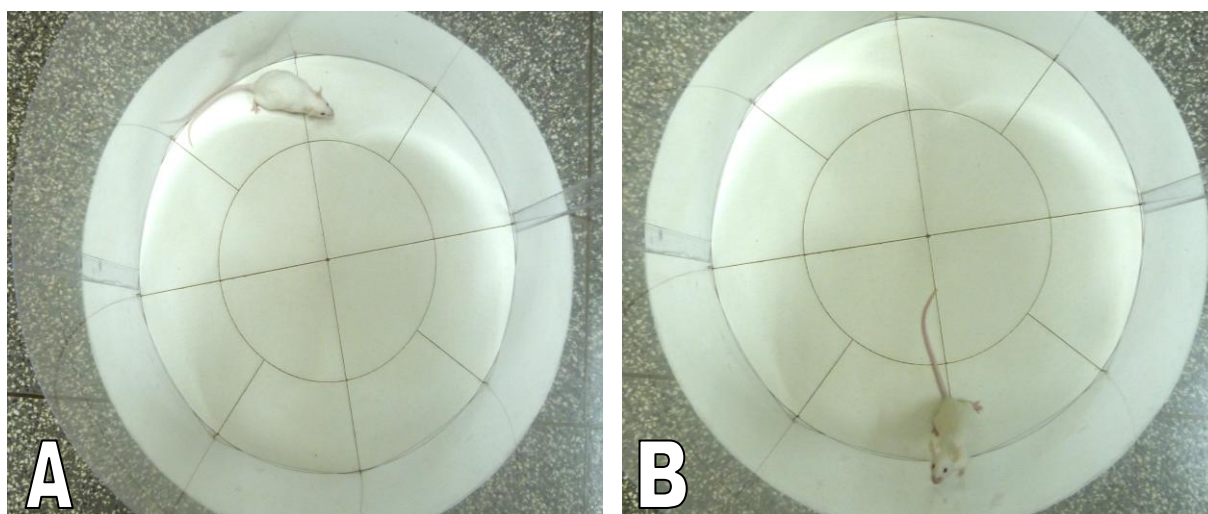


Figura 6: Ilustração da arena onde foi realizado o teste do campo aberto. A) exploração horizontal do animal (quadrantes percorridos); B) comportamento de exploração vertical do animal (erguimentos).

Fonte: Elaboração própria.

4.5 Descarte dos animais

Após o procedimento experimental, os animais foram sacrificados com CO_2 e encaminhados para incineração.

4.6 Análise dos resultados

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, seguido pelo pós-teste de Tukey. Já a comparação entre os grupos experimentais, em relação 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 3.5, considerando um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Experimento I

Os resultados referentes ao tempo de catalepsia para os grupos do Experimento I, mensurados 30, 60 e 90 minutos após a aplicação das drogas, estão apresentados na Tabela 1 e ilustrados na Figura 7. 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 ($p < 0,001$), porém não houve efeito do tempo ($p = 0,309$) e nem interação entre grupo e tempo ($p = 0,352$).

Em todos os momentos analisados, o tempo de catalepsia nos animais não apresenta diferença significativa, exceto para o grupo Haloperidol+biperideno (10mg/kg), onde o tempo de catalepsia passou de $2,00 \pm 73$ segundos após 30 minutos da aplicação das drogas, para $4,25 \pm 80$ segundos no tempo de 90 minutos.

Na comparação entre grupos experimentais, houve diferença significativa em todos os momentos analisados. Nos momentos 30, 60 e 90 minutos, os animais do grupo Haloperidol+salina apresentaram maior tempo de catalepsia em relação àqueles dos demais grupos experimentais (pós-teste de Tukey $p < 0,05$). Foi observado também que o tempo de catalepsia nos animais dos grupos Haloperidol+biperideno (2,5mg/kg) e (10mg/kg) apresentaram menor tempo de catalepsia (reversão) do que aquele observado para o grupo Haloperidol+salina (pós-teste de Tukey, $p < 0,05$). Esta reversão foi total para o grupo Haloperidol+biperideno (10mg/kg) aos 30 e 60 minutos e parcial aos 90 minutos. Para o grupo Haloperidol+biperideno (2,5mg/kg) a reversão foi total aos 90 minutos e parcial aos 30 e 60 minutos, com valores semelhantes àqueles do grupo Salina+salina (pós-teste de Tukey, $p > 0,05$).

Os resultados referentes à exploração horizontal e vertical dos animais no campo aberto, 60 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do Experimento I, estão apresentados na Tabela 2 e ilustrados na Figura 8. 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 Haloperidol+salina percorreram um número menor de quadrantes que aos demais grupos experimentais, com exceção para aqueles animais do grupo Haloperidol+biperideno (2,5mg/kg) ($p > 0,05$), sendo que os animais deste grupo também percorreram um número menor de quadrantes do que aqueles do grupo Salina+salina ($p < 0,05$). Por outro lado, os animais do grupo Haloperidol+biperideno (10mg/kg) percorreram mais quadrantes que os animais do grupo Haloperidol+salina, além de não diferirem dos animais do grupo Salina+salina (pós-teste de Tukey, $p > 0,05$). Finalmente, os animais do grupo Salina+biperideno (10mg/kg) percorreram um número maior de quadrantes do que aqueles do grupo controle Salina+salina (pós-teste de Tukey $p < 0,05$). Em relação a exploração vertical, os animais dos grupos Salina+biperideno (10mg/kg) e Haloperidol+salina, realizaram menos erguimentos que os animais dos demais grupos experimentais (pós-teste de Tukey, $p < 0,05$). Também foi observado que os animais dos grupos Haloperidol+biperideno (2,5mg/kg) e (10mg/kg) realizaram um número maior de erguimentos do que aqueles do grupo controle Haloperidol+salina, além disso, o grupo Haloperidol+biperideno (2,5mg/kg) não difere do grupo Salina+salina ($p > 0,05$)

Tabela 1: Resultados referentes ao tempo de catalepsia para os grupos do Experimento I, mensurados 30, 60 e 90 minutos após a aplicação das drogas.

Grupos experimentais	Catalepsia		
	Tempo após a aplicação das drogas (Minutos)		
	30	60	90
Salina+salina	1,13±0,30Ca	1,38±0,32CDa	1,25±0,45CDa
Salina+biperideno (2,5mg/kg)	0,25±0,16Ca	0,50±0,19CDa	1,00±0,33CDa
Salina+biperideno (10mg/kg)	0,00±0,00Ca	0,00±0,00Da	0,00±0,00Da
Haloperidol+salina	100,63±21,26Aa	88,13±28,98Aa	105,38±29,06Aa
Haloperidol+biperideno (2,5mg/kg)	5,13±1,22Ba	4,38±1,51Ba	4,13±1,27Ca
Haloperidol+biperideno (10mg/kg)	2,00±0,73BCb	2,75±0,94Cab	4,25±0,80Ba

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, $p<0,05$).

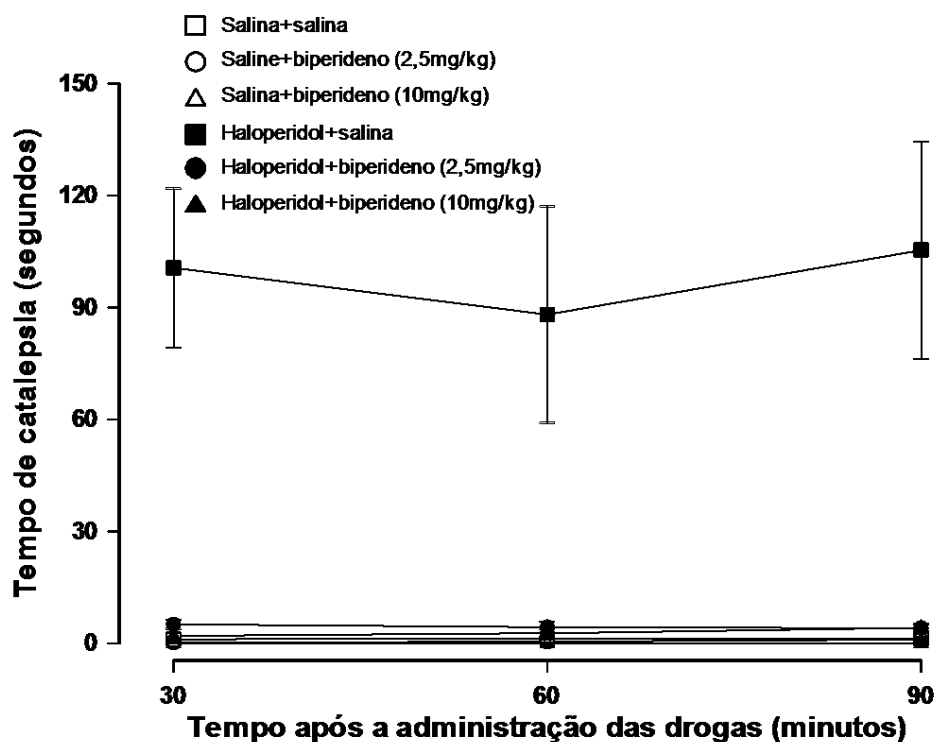


Figura 7: Gráfico ilustrando o tempo de catalepsia para os grupos do experimento I, mensurados 30, 60 e 90 minutos após a aplicação das drogas. Cada símbolo representa a média e a barra o erro padrão da média.

Tabela 2: Resultados referentes à exploração horizontal e vertical dos animais no campo aberto, 60 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do Experimento I.

Grupos experimentais	Exploração	
	Horizontal	Vertical
Salina+salina	103,63±7,18B	49,50±5,08A
Salina+biperideno(2,5mg/kg)	130,88±10,56AB	38,38±2,20AB
Salina+biperideno(10mg/kg)	158,25±8,50A	11,13±3,00C
Haloperidol+salina	27,75±3,91D	10,00±1,65C
Haloperidol+biperideno(2,5mg/kg)	61,38±4,70CD	42,63±5,21A
Haloperidol+biperideno(10mg/kg)	100,00±17,47BC	22,13±5,31BC
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, $p<0,05$).

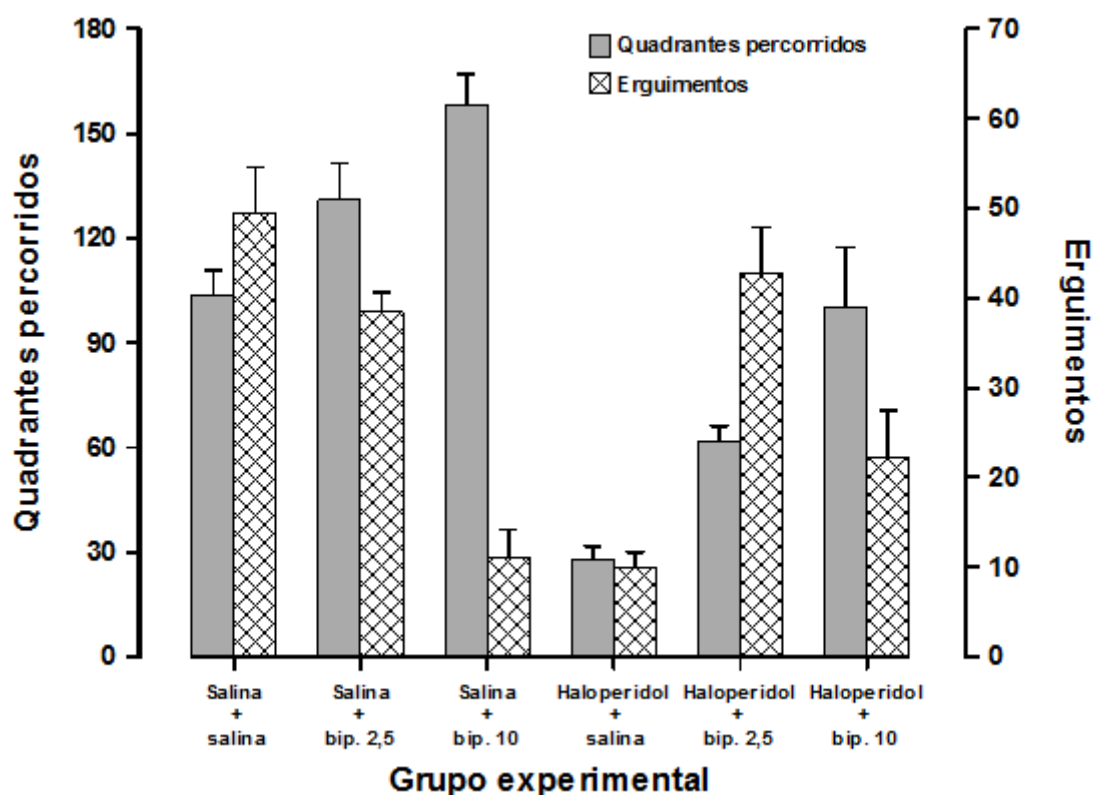


Figura 8: Gráfico ilustrando o número de quadrantes percorridos (exploração horizontal) e de erguimentos (exploração vertical) expressos pelos animais no campo aberto, 60 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do Experimento I. Cada coluna representa a média e a barra o erro padrão da média.

5.2 Experimento II

Os resultados referentes ao tempo de catalepsia para os grupos do Experimento II, mensurados 30, 60 e 90 minutos após a aplicação das drogas, estão apresentados na Tabela 3 e ilustrados na Figura 9. 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 ($p < 0,001$), porém não houve interação entre grupo e tempo ($p = 0,073$).

Na comparação entre os momentos analisados, houve diferença significativa entre eles, em relação ao tempo de catalepsia nos animais, para os grupos

Salina+salina, L-NOARG+biperideno (2,5mg/kg) e (10mg/kg) (pós-teste de Tukey, $p<0,05$). Nos grupos L-NOARG+biperideno (2,5mg/kg) e (10mg/kg), o tempo de catalepsia nos momentos 60 e 90 minutos foi maior do que aquele observado no momento 30 minutos. Além disso, para o grupo Salina+salina, o tempo de catalepsia no momento 90 minutos foi maior do que aquele observado no momento 30 minutos.

Na comparação entre grupos experimentais, houve diferença significativa entre eles, em todos os momentos analisados. Nos momentos 30, 60 e 90 minutos, os animais do grupo L-NOARG+ salina apresentaram maior tempo de catalepsia em relação àqueles dos demais grupos experimentais (pós-teste de Tukey $p<0,05$). Foi observado também que o tempo de catalepsia nos animais dos grupos L-NOARG+biperideno (2,5mg/kg) e (10mg/kg) apresentaram menor tempo de catalepsia (reversão) do que aquele observado para o grupo L-NOARG+salina (pós-teste de Tukey, $p<0,05$). Esta reversão foi total para os grupos L-NOARG+biperideno (2,5mg/kg) e (10mg/kg), em todos os momentos, com valores semelhantes (pós-teste de Tukey, $p>0,05$) ou menores àqueles do grupo Salina+salina ($p<0,05$).

Os resultados referentes à exploração horizontal e vertical dos animais no campo aberto, 60 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do Experimento II, estão apresentados na Tabela 4 e ilustrados na Figura 10. 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 dos grupos L-NOARG+biperideno (2,5mg/kg) e (10mg/kg) percorreram um número maior de quadrantes do que aqueles dos grupos Salina+salina e L-NOARG+salina (pós-teste de Tukey, $p<0,05$). Além disso, o número de quadrantes percorridos pelos animais dos grupos Salina+biperideno (2,5mg/kg) e (10mg/kg) foi maior do que aquele para os animais do grupo Salina+salina ($p<0,05$). Quanto a exploração vertical, foi observado que os animais dos grupos Salina+salina, realizaram mais erguimentos que os animais dos demais grupos experimentais (pós-teste de Tukey, $p<0,05$). Foi observado também que os animais do grupo L-NOARG+biperideno (10mg/kg) realizaram um número maior de erguimentos do que os animais do grupo L-NOARG+biperideno (2,5mg/kg) ($p<0,05$).

Tabela 3: Resultados referentes ao tempo de catalepsia para os grupos do Experimento II, mensurados 30, 60 e 90 minutos após a aplicação das drogas.

Grupos experimentais	Catalepsia Tempo após a aplicação das drogas (Minutos)		
	30	60	90
Salina+salina	1,38±0,42Bb	3,13±0,72Bab	5,13±0,64Ba
Salina+biperideno(2,5mg/kg)	0,38±0,38Ba	0,00±0,00Ca	0,00±0,00Da
Salina+biperideno(10mg/kg)	0,00±0,00Ba	0,25±0,16Ca	0,25±0,16Da
L-NOARG+salina	13,25±3,23Aa	14,00±2,58Aa	21,63±6,08Aa
L-NOARG+biperideno (2,5mg/kg)	1,00±0,38Bb	4,00±1,44Ba	3,88±1,03BCa
L-NOARG+biperideno (10mg/kg)	0,00±0,00Bb	2,50±1,83BCa	1,38±0,65CDa

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, $p<0,05$).

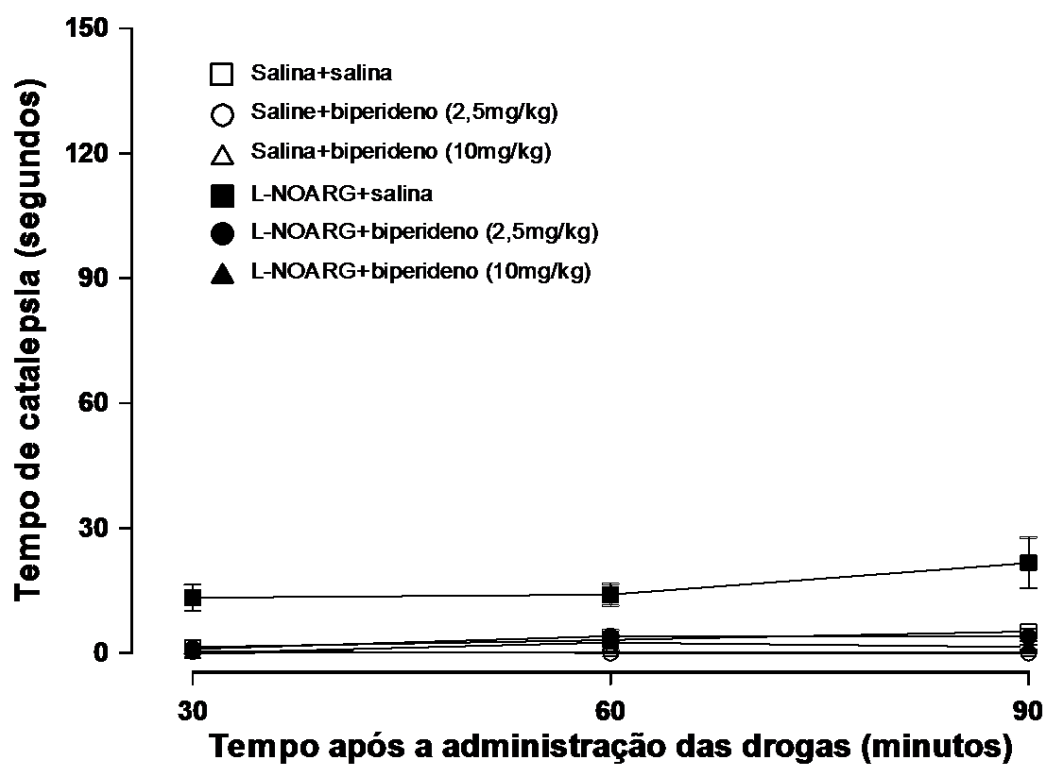


Figura 9: Gráfico ilustrando o tempo de catalepsia para os grupos do experimento II, mensurados 30, 60 e 90 minutos após a aplicação das drogas. Cada símbolo representa a média e a barra o erro padrão da média.

Tabela 4: Resultados referentes à exploração horizontal e vertical dos animais no campo aberto, 60 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do Experimento II.

Grupos experimentais	Exploração	
	Horizontal	Vertical
Salina+salina	73,25±7,98C	52,50±3,05A
Salina+biperideno(2,5mg/kg)	123,75±9,66AB	22,88±3,51BC
Salina+biperideno(10mg/kg)	141,63±8,56AB	16,13±2,17BC
L-NOARG+salina	98,25±5,64BC	28,38±5,89BC
L-NOARG+biperideno (2,5mg/kg)	156,75±12,08A	9,63±3,84C
L-NOARG+biperideno (10mg/kg)	159,38±16,42A	29,25±6,68B
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, $p<0,05$).

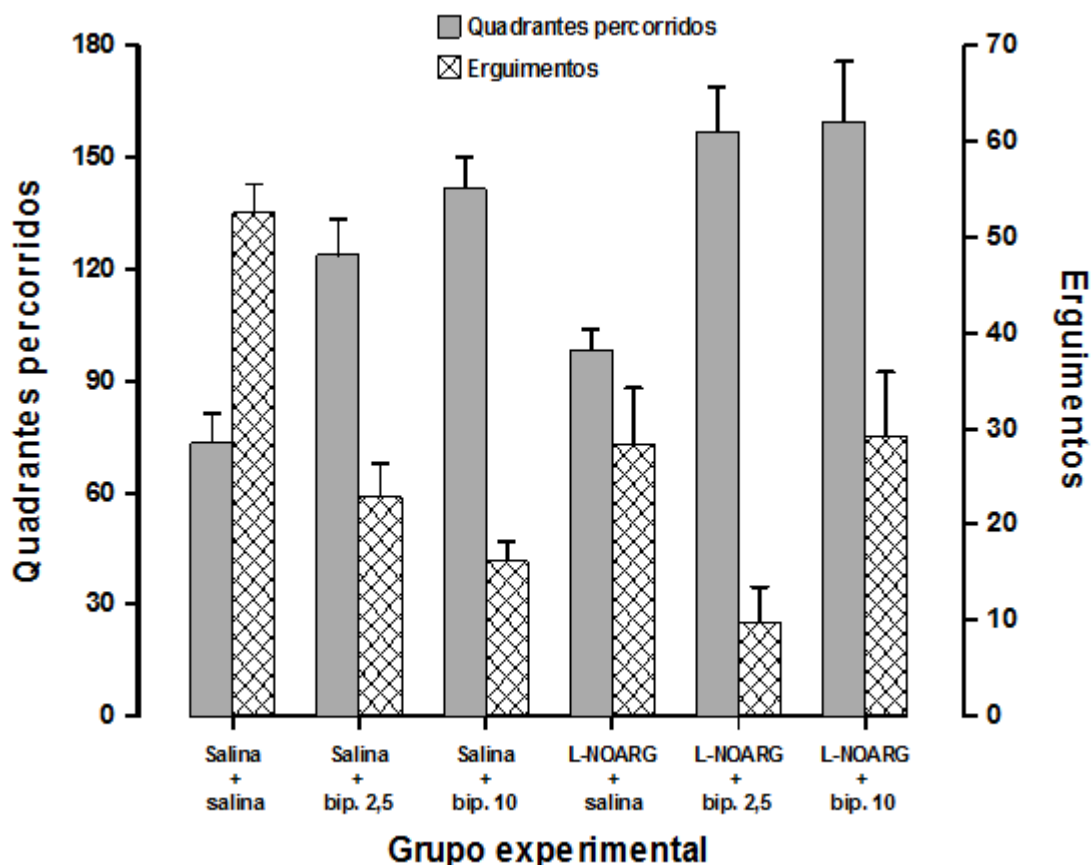


Figura 10: Gráfico ilustrando o número de quadrantes percorridos (exploração horizontal) e de erguimentos (exploração vertical) expressos pelos animais no campo aberto, 60 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do Experimento II. Cada coluna representa a média e a barra o erro padrão da média.

5.3 Experimento III

Os resultados referentes ao tempo de catalepsia para os grupos do Experimento III, mensurados 30, 60 e 90 minutos após a aplicação das drogas, estão apresentados na Tabela 5 e ilustrados na Figura 11. 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 ($p < 0,001$), houve efeito do tempo ($p < 0,001$) e houve interação entre grupo e tempo ($p < 0,001$).

Na comparação entre os momentos analisados, houve diferença significativa entre eles, em relação ao tempo de catalepsia nos animais, para os grupos

Haloperidol+tropicamida (2,5mg/kg) e (10mg/kg), sendo que nestes grupos o tempo de catalepsia nos tempos 60 e 90 minutos foi maior do que aquele observado no momento de 30 minutos (pós-teste de Tukey, $p<0,05$). Para os demais grupos não houve diferença significativa entre os momentos, em relação ao tempo de catalepsia dos animais ($p>0,05$).

Na comparação entre grupos experimentais, houve diferença significativa entre eles em todos os momentos analisados. Nos momentos 30, 60 e 90 minutos, os animais do grupo Haloperidol+salina apresentaram maior tempo de catalepsia em relação àqueles dos demais grupos experimentais (pós-teste de Tukey $p<0,05$). Foi observado também que o tempo de catalepsia nos animais dos grupos Haloperidol+tropicamida (2,5mg/kg) e (10mg/kg) apresentaram menor tempo de catalepsia (reversão) do que aquele observado para o grupo Haloperidol+salina (pós-teste de Tukey, $p<0,05$). Esta reversão foi total para os grupos Haloperidol+tropicamida (2,5mg/kg) e (10mg/kg) aos 30 minutos, com valores semelhantes àqueles do grupo Salina+salina (pós-teste de Tukey, $p>0,05$). Para os grupos Haloperidol+tropicamida (2,5mg/kg) e (10mg/kg) a reversão foi parcial aos 60 e 90 minutos (pós-teste Tukey, $p<0,05$), em relação ao grupo Salina+salina.

Os resultados referentes à exploração horizontal e vertical dos animais no campo aberto, 60 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do Experimento III, estão apresentados na Tabela 6 e ilustrados na Figura 12. 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 Haloperidol+salina percorreram um número de quadrantes menor que os demais grupos experimentais ($p<0,05$). Além disso, não houve diferença significativa entre os grupos Haloperidol+tropicamida (2,5mg/kg) e (10mg/kg) e o grupo Salina+salina ($p>0,05$). Em relação à exploração vertical no campo aberto, os animais do grupo Haloperidol+salina apresentaram um número menor de erguimentos que os animais dos demais grupos experimentais (pós-teste de Tukey, $p<0,05$), todavia, os animais dos grupos Haloperidol+tropicamida (2,5mg/kg) e (10mg/kg) ainda realizaram menos erguimentos do que aqueles do grupo controle Salina+salina ($p<0,05$).

Tabela 5: Resultados referentes ao tempo de catalepsia para os grupos do Experimento III, mensurados 30, 60 e 90 minutos após a aplicação das drogas.

Grupos experimentais	Catalepsia		
	Tempo após a aplicação das drogas (Minutos)		
	30	60	90
Salina+salina	1,25±0,37BCa	1,13±0,30Ca	1,50±0,33Ca
Salina+tropicamida (2,5mg/kg)	2,13±0,61BCa	1,38±0,32Ca	1,63±0,75Ca
Salina+tropicamida (10mg/kg)	0,13±0,13Da	0,75±0,31Ca	1,00±0,38Ca
Haloperidol+salina	86,63±23,93Aa	142,63±21,28Aa	113,88±14,42Aa
Haloperidol+tropicamida (2,5mg/kg)	1,75±1,35Cb	18,13±2,41Ba	23,00±7,38Ba
Haloperidol+tropicamida (10mg/kg)	5,13±1,63Bb	13,88±2,21Ba	25,25±5,13Ba

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, $p<0,05$).

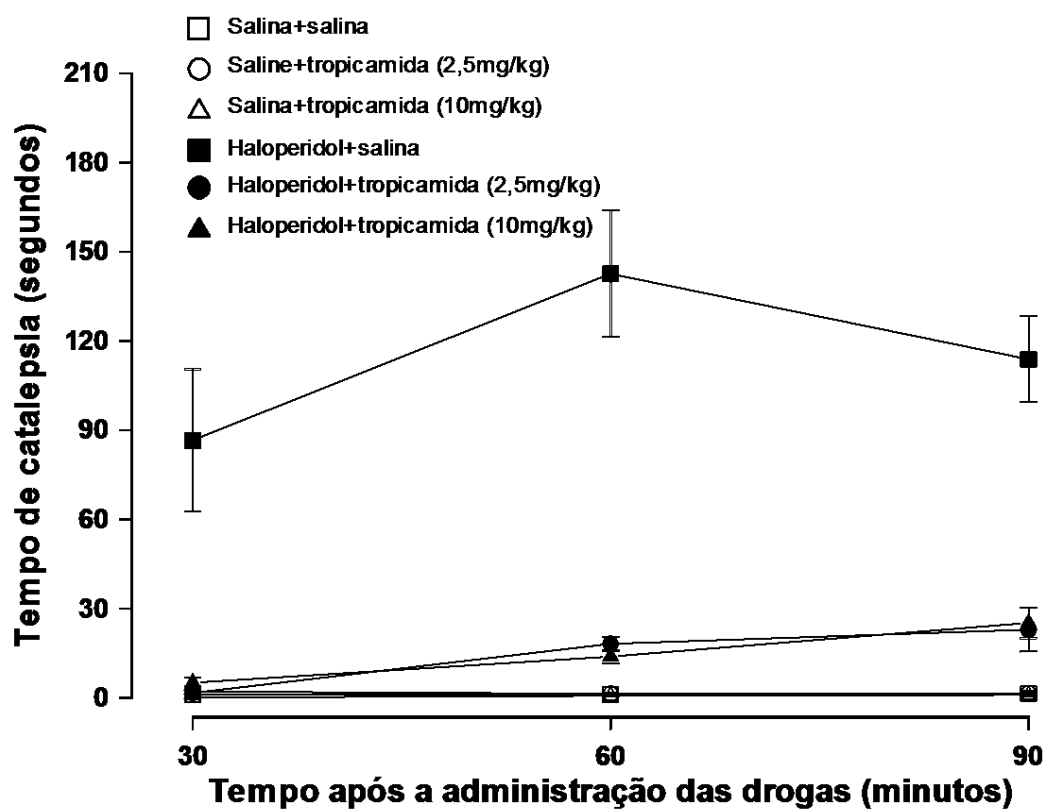


Figura 11: Gráfico ilustrando o tempo de catalepsia para os grupos do experimento III, mensurados 30, 60 e 90 minutos após a aplicação das drogas. Cada símbolo representa a média e a barra o erro padrão da média.

Tabela 6: Resultados referentes à exploração horizontal e vertical dos animais no campo aberto, 60 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do Experimento III.

Grupos experimentais	Exploração	
	Horizontal	Vertical
Salina+salina	77,25±6,65AB	40,25±3,23B
Salina+tropicamida(2,5mg/kg)	101,00±10,38A	60,00±6,34A
Salina+tropicamida(10mg/kg)	80,75±7,91AB	37,63±5,40BC
Haloperidol+salina	22,50±2,21C	9,75±1,00D
Haloperidol+tropicamida(2,5mg/k)	57,50±2,93B	22,25±3,23C
Haloperidol+tropicamida(10mg/kg)	60,63±3,58B	21,13±2,55C
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, $p<0,05$).

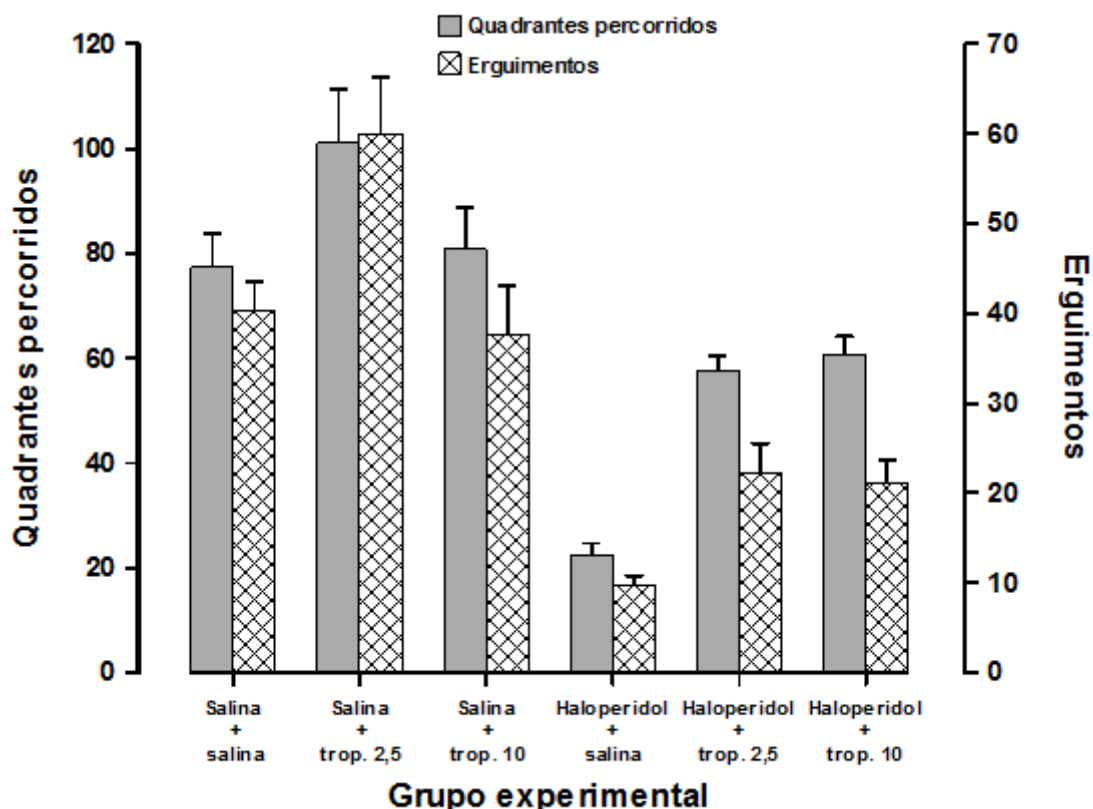


Figura 12: Gráfico ilustrando o número de quadrantes percorridos (exploração horizontal) e de erguimentos (exploração vertical) expressos pelos animais no campo aberto, 60 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do Experimento III. Cada coluna representa a média e a barra o erro padrão da média.

5 4 Experimento IV

Os resultados referentes ao tempo de catalepsia para os grupos do Experimento IV, mensurados 30, 60 e 90 minutos após a aplicação das drogas, estão apresentados na Tabela 7 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 IV, houve efeito do grupo experimental ($p < 0,001$), houve efeito do tempo ($p < 0,001$) houve interação entre grupo e tempo ($p < 0,001$).

Na comparação entre os momentos analisados, houve diferença significativa entre eles, em relação ao tempo de catalepsia nos animais, para os grupos L-NOARG+salina, L-NOARG+tropicamida (2,5mg/kg) e (10mg/kg) (pós-teste de Tukey,

$p<0,05$). Nos grupos L-NOARG+salina e L-NOARG+tropicamida (2,5mg/kg), o tempo de catalepsia no momento 90 minutos foi maior do que aquele observado no momento 30 minutos. No grupo L-NOARG+tropicamida (10mg/kg) o tempo de catalepsia no momento 90 minutos foi maior do que aquele observado nos momentos 30 e 60 minutos. Além disso, o tempo de catalepsia no momento 60 minutos foi maior do que aquele no momento 30 minutos ($p<0,05$).

Na comparação entre grupos experimentais, houve diferença significativa em todos os momentos analisados. Nos momentos 30, 60 e 90 minutos, os animais do grupo L-NOARG+salina apresentaram maior tempo de catalepsia em relação àqueles dos demais grupos experimentais, com exceção do momento 90 minutos, onde ele não diferiu do grupo L-NOARG+tropicamida (10mg/kg) (pós-teste de Tukey $p<0,05$). Foi observado também que o tempo de catalepsia nos animais dos grupos L-NOARG+tropicamida (2,5mg/kg) e (10mg/kg) apresentaram menor tempo de catalepsia (reversão) do que aquele observado para o grupo L-NOARG+salina (pós-teste de Tukey, $p<0,05$). Esta reversão foi total para os grupos L-NOARG+tropicamida (2,5mg/kg) e (10mg/kg) aos 30 e 60 minutos, com valores semelhantes àqueles do grupo Salina+salina (pós-teste de Tukey, $p>0,05$). Para os grupos L-NOARG+tropicamida (2,5mg/kg) esta reversão foi parcial aos 90 minutos (pós-teste de Tukey, $p<0,05$).

Os resultados referentes à exploração horizontal e vertical dos animais no campo aberto, 60 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do Experimento IV, estão apresentados na Tabela 8 e ilustrados na Figura 14. Na comparação entre os grupos experimentais, não houve diferença significativa entre eles, em relação aos comportamentos de exploração horizontal (quadrantes percorridos), expressos pelos animais (teste ANOVA de uma via, $p=0,097$), porém houve diferença significativa em relação aos comportamentos de exploração vertical (erguimentos) expressos pelos animais (teste ANOVA de uma via, $p<0,001$). Em relação à exploração vertical no campo aberto, os animais do grupo L-NOARG+salina, L-NOARG+tropicamida (2,5mg/kg) e (10mg/kg), realizaram um número menor de erguimentos que os animais dos grupos L-Salina+salina, Salina+tropicamida (2,5mg/kg) e (10mg/kg) (pós-teste de Tukey, $p<0,05$).

Tabela 7: Resultados referentes ao tempo de catalepsia para os grupos do Experimento IV, mensurados 30, 60 e 90 minutos após a aplicação das drogas.

Grupos experimentais	Catalepsia		
	Tempo após a aplicação das drogas (Minutos)		
	30	60	90
Salina+salina	1,13±0,35BCa	1,88±0,40Ba	1,25±0,41Ca
Salina+tropicamida (2,5mg/kg)	1,25±0,37BCa	1,38±0,60BCa	2,88±1,01BCa
Salina+tropicamida (10mg/kg)	0,00±0,00BCa	0,13±0,13Ca	0,63±0,38Ca
L-NOARG+salina	10,88±2,48Ab	19,25±4,82Aab	29,38±8,70Aa
L-NOARG+tropicamida (2,5mg/kg)	2,00±0,46Bb	2,75±0,45Bab	4,00±0,38Ba
L-NOARG+tropicamida (10mg/kg)	0,75±0,41BCc	3,63±1,07Bb	15,50±2,86Aa

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, $p<0,05$).

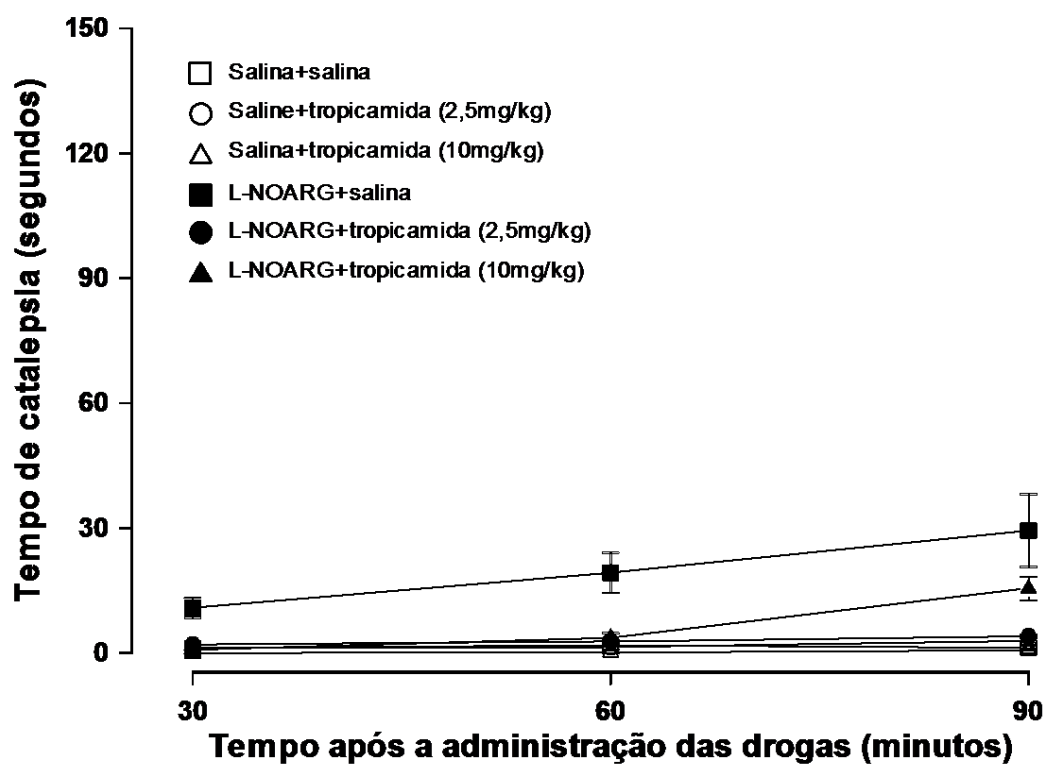


Figura 13: Gráfico ilustrando o tempo de catalepsia para os grupos do experimento IV, mensurados 30, 60 e 90 minutos após a aplicação das drogas. Cada símbolo representa a média e a barra o erro padrão da média.

Tabela 8: Resultados referentes à exploração horizontal e vertical dos animais no campo aberto, 60 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do Experimento IV.

Grupos experimentais	Exploração	
	Horizontal	Vertical
Salina+salina	98,63±9,36A	55,00±6,11A
Salina+tropicamida(2,5mg/kg)	124,25±12,84A	59,38±5,74A
Salina+tropicamida(10mg/kg)	146,63±6,84A	71,13±4,62A
L-NOARG+salina	137,88±18,93A	20,13±6,23B
L-NOARG+tropicamida(2,5mg/kg)	151,75±9,20A	27,75±4,88B
L-NOARG+tropicamida (10mg/kg)	136,63±18,79A	28,00±6,87B
Valor de p (entre grupos)	0,097	<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, $p<0,05$).

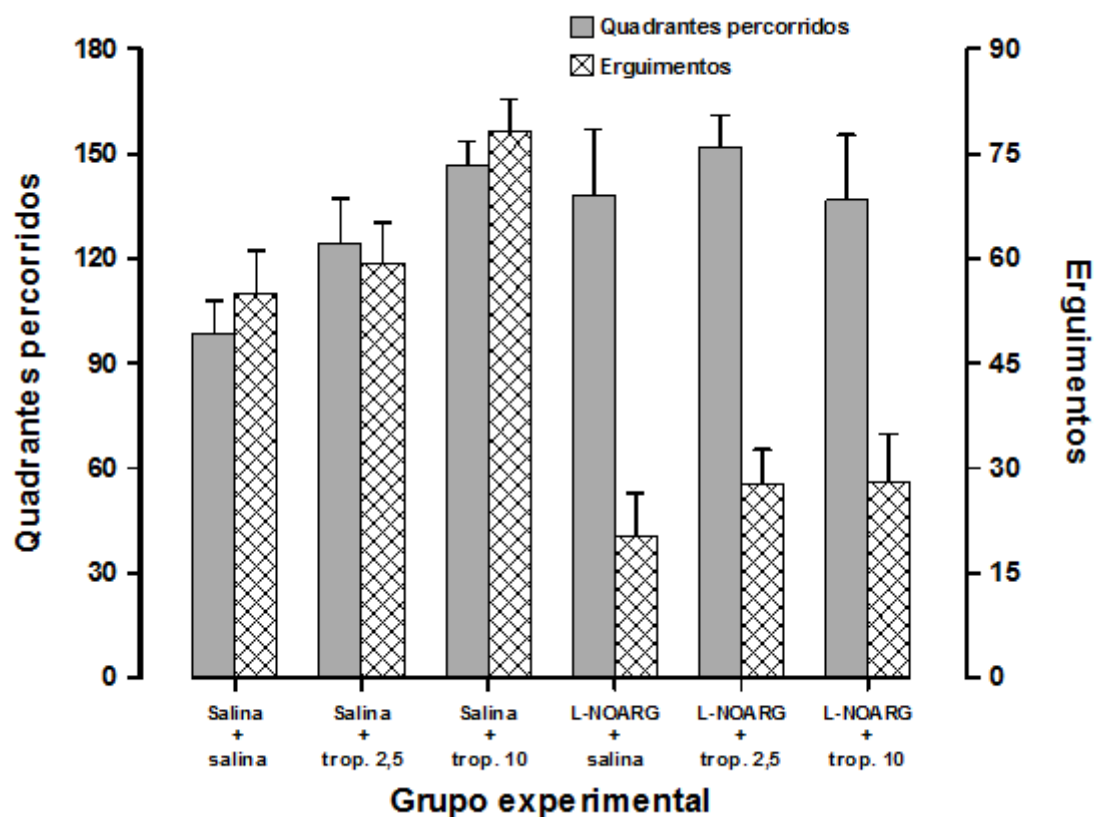


Figura 14: Gráfico ilustrando o número de quadrantes percorridos (exploração horizontal) e de erguimentos (exploração vertical) expressos pelos animais no campo aberto, 60 minutos após a aplicação das drogas, para cada um dos grupos do Experimento IV. Cada coluna representa a média e a barra o erro padrão da média.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, o antagonista de dopamina, haloperidol, causou alterações no comportamento motor, levando à catalepsia e diminuição na exploração horizontal e exploração vertical. O antagonista da sintase de óxido nítrico (NOS), L-NOARG causou as mesmas alterações, porém de maneira mais discreta. O antagonista de receptores muscarínicos de acetilcolina (mais seletivo para receptores tipo M1), biperideno e o antagonista de receptores muscarínicos de acetilcolina (mais seletivo para receptores tipo M4), tropicamida, reverteram a catalepsia e aumentaram a exploração horizontal e vertical induzida.

A doença de Parkinson (DP) é primariamente uma doença da função motora extrapiramidal, causada por degeneração severa de neurônios dopaminérgicos da substância nigra. Ela apresenta um conjunto de desordens motoras, cujos sintomas incluem a bradicinesia, rigidez e tremor (SALAMONE, 2010).

A terapia de reposição de dopamina com L-3,4 dihidroxifenilalanina (L-DOPA) permanece como o mais efetivo tratamento para a doença de Parkinson (FAHN, 2008; OLANOW, 2008). Entretanto, novos avanços para o tratamento das desordens dos movimentos baseadas na manipulação de sistemas não dopaminérgicos tais como glutamato, 5-hidroxitriptamine (5-HT), canabinóides, adenosina, adrenérgicos, histaminérgicos, opióides e receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos têm sido propostos (CHASE *et al.*, 2000; SILVERDALE *et al.*, 2003; BROTCHE, 2005; JENNER, 2008).

Na presente investigação, os resultados obtidos demonstraram que a inibição de receptores de dopamina, por meio de haloperidol, causou catalepsia, com aumento do tempo de permanência na barra, em todos os tempos analisados. Também foi observada, a diminuição da exploração horizontal e vertical, no teste de campo aberto nos animais analisados.

Estes achados hipocinéticos são coerentes com experimentos anteriores, os quais constataram que a inibição de receptores de dopamina dos núcleos basais do encéfalo produzem catalepsia e hipocinesia, sintomas semelhantes àqueles observados em pacientes com DP (DEL BEL *et al.*, 2002; HAUBER *et al.*, 2001).

Outro neurotransmissor que pode estar envolvido na prevenção de discinesias induzidas pela administração repetida de L-DOPA é o óxido nítrico.

Neste estudo, foi observado que o emprego do inibidor da NOS (L-NOARG) causou catalepsia e hipolocomoção, com a diminuição da exploração horizontal e da exploração vertical dos animais nos experimentos analisados, porém de maneira mais discreta.

Estes eventos permitem correlacionar interferências na formação do NO com a produção de déficits motores encontrados no comportamento motor de animais com Parkinson.

Corroboram com esses dados, estudos anteriores que constataram que os inibidores da NOS diminuem a 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).

O NO é uma molécula lipossolúvel de curta vida, gerada a partir do aminoácido L-Arginina, que pertence a família de enzimas chamadas de sintase do óxido nítrico (NOS). Embora a produção de interneurônios componha apenas 1%-2% da população de neurônios estriatais, evidências convincentes têm demonstrado que o NO controla o comportamento motor modulando a integração e informação processada pelos núcleos da base. Mecanismos nitrérgicos podem contribuir com a morte de neurônios de DA visto na doença de Parkinson (GOMES *et al.*, 2008). A modulação do NO libera vários neurotransmissores incluindo DA, 5- hidroxitriptamina (5-HT), acetilcolina e GABA (TRABACE e KENDRICK, 2000). Inibidores da sintase do óxido nítrico (NOS) diminuem os níveis de acetilcolina estriatal (HANANIA, JOHNSON, 1998). Porém, à nível de comportamento a interação entre NO e acetilcolina não está bem esclarecida.

Tem sido proposto que o NO desempenha um papel pivô no controle homeostático no processo que fornece estabilidade ao sistema DA-nigral. O bombardeio de neurônios dopaminérgicos causa a liberação de NO a partir de interneurônios GABAérgicos estriatais (SAMMUT *et al.*, 2006) o qual por sua vez influencia a indução a longo prazo da depressão do estriato (CALABRESI *et al.*, 1999). A terapia com L-DOPA tem demonstrado causar um aumento marcante na produção de NO (ITOKAWA *et al.*, 2006).

Padovan-Neto *et al.* (2009) hipotetizaram que a redução endógena tônica de nitrérgicos induzida pelo tratamento com inibidores da NOS poderiam diminuir os movimentos involuntários anormais induzidos pela L-DOPA, em ratos com lesões neurotóxicas da via dopaminérgica nigroestriatal. Observou-se que o inibidor seletivo

da sintase do NO (Nnos)7-NI, aumentou a performance motora de ratos com discinesia. Diante destes resultados, apontando que os inibidores da sintase de NOS são capazes de reduzir as discinesias induzidas pela terapia com L-DOPA, estes pesquisadores sugerem que a hiperatividade do sistema nitrérgico está envolvida nesta desordem.

West e Grace (2000) sugeriram que o NO ocupa um papel modulatório no estriado, mudando sua relação “input-output” (entrada-saída) e produzindo um impacto funcional significativo nos neurônios alvos. Também pela influência ao longo prazo da depressão no estriado pela via NO/cGMP tem sido proposta no controle da conectividade corticoestriatal (CALABRESI *et al.*, 1999). O lançamento de NO a partir de interneurônios estriatais facilitam concomitantemente o lançamento de DA (WEST e GALLOWAY, 1998; TRABACE e KENDRICK, 2000; GRACE, 2008) e a produção de NO pelos interneurônios estriatais que são regulados pela transmissão fásica de DA (WEST e GRACE, 2000).

A acetilcolina e dopamina interagem fortemente no estriado e desempenham um papel importante no controle motor normal. O desequilíbrio da transmissão de acetilcolina e dopamina no sistema nigro-estriatal é a base patogênica das desordens extrapiramidais, como no caso da DP. A diminuição da atividade do sistema dopaminérgico é paralela ao aumento da atividade do sistema colinérgico (THRELFELL *et al.*, 2010).

Evidências experimentais sugerem as propriedades anti-parkinsonianas de alguns antagonistas muscarínicos de acetilcolina, como a escopolamina, antagonista muscarínico de acetilcolina com maior afinidade com o receptor tipo M1, ao reduzir catalepsia induzida por haloperidol em camundongos (HARAGUCHI *et al.*, 1997). A administração de biperideno, anticolinérgico central, também com afinidade para o receptor tipo M1, foi investigada após indução de catalepsia por amoxapina, cinarizina e ciclosfamida em camundongos, onde a catalepsia foi significativamente revertida (NASU *et al.*, 2000).

Estes achados são similares aos resultados deste trabalho, onde a administração de biperideno reverteu a catalepsia induzida por inibição de receptores de dopamina com haloperidol em todos os tempos analisados. Esta reversão foi total na dose 10mg/kg, nos momentos 30 e 60 minutos e parcial no momento 90 minutos. Na dose 2,5mg/kg, a reversão foi total no momento 90 minutos e parcial nos momentos 30 e 60.

Foi observado também o aumento da exploração horizontal e da exploração vertical no teste de campo aberto. Os animais dos grupos experimentais que receberam Salina+salina, Salina+biperideno 2,5mg/kg, Salina+biperideno 10mg/kg apresentaram comportamento inesperado durante este teste, o número de quadrantes percorridos (exploração horizontal) pelos animais de cada grupo foi crescente à medida que a dose de biperideno aumentava, porém, o número de erguimentos (exploração vertical) foi decrescente à medida que a dose aumentava.

Em adição, a administração de biperideno reverteu totalmente a catalepsia induzida por inibição da sintase de óxido nítrico (NOS) com L-NOARG, em todos os momentos analisados, independente da dose utilizada.

Além disso, houve também o aumento da exploração horizontal e da exploração vertical no teste de campo aberto. Os animais dos grupos experimentais que receberam Salina+salina, Salina+biperideno 2,5mg/kg, Salina+biperideno 10mg/kg apresentaram comportamento inesperado durante este teste, o número de quadrantes percorridos (exploração horizontal) pelos animais de cada grupo foi crescente à medida que a dose de biperideno aumentava, porém, o número de erguimentos (exploração vertical) foi decrescente à medida que a dose aumentava.

Estes eventos reforçam o fato de antagonistas não seletivos de receptores muscarínicos de acetilcolina já serem utilizados como drogas anti-parkinsonianas.

No entanto, estudos têm demonstrado a abundância de receptores M4 encontrados no estriado. Por desempenharem um importante papel na função motora, supõe-se que antagonistas de receptores muscarínicos M4 poderiam também ser úteis na restauração do equilíbrio entre dopamina e acetilcolina (GUO *et al.*, 2010).

Foi revelado em um estudo de imunoprecipitação que 45% dos receptores muscarínicos do estriado são do subtipo M4 (KARASAWA *et al.*, 2003). Imunohistoquimicamente foi detectado 92% de receptores muscarínicos M4 nos neurônios estriato-nigrais, demonstrando que os neurônios estriato-nigrais co-expressam receptores muscarínicos M4 e receptores de dopamina D1 (INCE *et al.*, 1997).

Estes dois receptores desempenham papéis opostos no metabolismo de cAMP. A estimulação dos receptores de dopamina D1 ativam a adenilato ciclase, via proteína G, e a estimulação dos receptores muscarínicos M4 inibem a atividade enzimática, via proteína G, sugerindo o equilíbrio de acetilcolina-dopamina que

reflete os efeitos neutralizantes desses neurotransmissores à nível de cAMP (KARASAWA *et al.*, 2003).

Um estudo onde pilocarpina, agonista do receptor muscarínico tipo M3 de acetilcolina, gerou tremores em ratos, sugere que a ação central de antagonistas muscarínicos M4 poderia ser utilizada como tratamento de Parkinson (MAYORGA *et al.*, 1999).

Além disso, foi comparada a resposta cataléptica induzida por haloperidol em camundongos com vários tipos de receptores muscarínicos e em camundongos mutantes, estes apresentavam apenas receptores muscarínicos M4. A resposta cataléptica foi idêntica para os dois grupos, porém, a resposta do antimuscarínico escopolamina foi diferente entre os dois genótipos, abolindo catalepsia induzida por haloperidol nos camundongos com tipos variados de receptores. Em contraste, o efeito anti-cataléptico da escopolamina nos camundongos mutantes foi fraco, sugerindo que o efeito anti-cataléptico de agentes antimuscarínicos, depende do bloqueio do receptor muscarínico M4 (KARASAWA, *et al.*, 2003).

E por fim, também foi realizada mutação em camundongos, onde estes apresentavam somente receptores muscarínicos M4 e receptores de dopamina D1 na expressão de seus neurônios. Foi induzida catalepsia por haloperidol e risperidona, e escopolamina reduziu a resposta cataléptica nos camundongos mutantes (DENCKER *et al.*, 2009).

Betz *et al.*, (2007) sugeriram a possível utilidade terapêutica de antagonistas de receptores muscarínicos seletivos ao subtipo M4, e seus efeitos, já que os anticolinérgicos utilizados clinicamente não possuem seletividade particular.

Evidências experimentais têm demonstrado forte afinidade de tropicamida por receptores muscarínicos M4. A tropicamida, um antagonista de receptores muscarínicos que penetra facilmente na barreira hemato-encefálica, é utilizada clinicamente para fins oftálmicos e seus efeitos anti-parkinsonianos são pouco conhecidos. Foi realizada uma comparação dos efeitos da tropicamida e atropina na supressão de tremores induzidos por pilocarpina e pimozide em camundongos, onde a tropicamida e atropina suprimiram de forma equivalente os tremores induzidos por pilocarpina, porém a tropicamida suprimiu de forma mais potente os tremores induzidos por pimozide (BETZ *et al.*, 2007).

A fim de demonstrar a efetividade de antagonistas de receptores muscarínicos do subtipo M4 o presente estudo testou o efeito da tropicamida, onde

os resultados apresentam a reversão da catalepsia induzida por inibição de receptores de dopamina com haloperidol, em todos os momentos testados. Esta reversão foi total nas doses 2,5mg/kg e 10mg/kg no momento 30 minutos, e parcial nos momentos 60 e 90 minutos.

Também foi observado aumento da exploração horizontal e da exploração vertical no teste de campo aberto.

A catalepsia induzida por inibição da sintase de óxido nítrico (NOS) com L-NOARG foi revertida em todos os tempos analisados, com a administração de tropicamida, exceto no momento 90 minutos para o grupo L-NOARG+tropicamida 10mg/kg. Esta reversão foi total na dose 2,5mg/kg nos momentos 30 e 60 minutos e parcial no momento 90 minutos. Na dose 10mg/kg, esta reversão foi total nos momentos 30 e 60 minutos.

Além disso, foi observado o aumento da exploração horizontal no teste de campo aberto.

Tais resultados apontam que a utilização de doses experimentais de tropicamida demonstra alterações no comportamento motor nesse modelo animal de Parkinson, podendo exercer ações anti-parkinsonianas, sendo esta uma possível alternativa no tratamento clínico do Parkinsonismo.

Assim, a identificação de receptores muscarínicos de acetilcolina do tipo M4 nos núcleos basais, surge como uma maneira potencial de modificar o comportamento motor, por meio de um mecanismo não dopaminérgico, o que pode ter consequências terapêuticas importantes para o tratamento futuro da doença de Parkinson, porém, outros estudos precisam ser realizados para elucidarem os resultados obtidos nesta pesquisa.

Finalmente, os achados deste estudo corroboram aos que ressaltam que a modulação do comportamento motor é influenciada pela ação e interação de diversos neurotransmissores e que esta última vai além da ação da dopamina, nos núcleos da base do encéfalo.

7 CONCLUSÃO

O antagonista de dopamina, haloperidol, causou catalepsia e diminuição na exploração horizontal e exploração vertical. Entretanto, o antagonista de receptores muscarínicos de acetilcolina, biperideno reverteu a catalepsia totalmente na dose 2,5mg/kg, no momento 90 minutos e na dose 10mg/kg, nos momentos 30 e 60 minutos. E o antagonista de receptores muscarínicos de acetilcolina, tropicamida reverteu a catalepsia totalmente nas doses 2,5mg/kg e 10mg/kg no momento 30 minutos. Ambos aumentaram a exploração horizontal e vertical induzida.

O antagonista da sintase de óxido nítrico, L-NOARG causou as mesmas alterações, porém de maneira mais discreta. Entretanto, o antagonista de receptores muscarínicos de acetilcolina, biperideno reverteu totalmente a catalepsia em todos os momentos analisados, independente da dose utilizada. Este aumentou a exploração horizontal e vertical induzida. E o antagonista de receptores muscarínicos de acetilcolina, tropicamida reverteu totalmente a catalepsia na dose 2,5mg/kg e na dose 10mg/kg, nos momentos 30 e 60 minutos. Este aumentou a exploração horizontal induzida.

Estes resultados podem favorecer o entendimento da fisiologia dos Núcleos da Base e a fisiologia da doença de Parkinson, além de contribuir com a busca de novas manipulações farmacológicas para o tratamento da DP capazes de apresentar um potencial terapêutico em todas as fases da doença, sem o declínio da eficiência e que possam também prevenir o surgimento de complicações.

REFERÊNCIAS

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

Alfaro GLJ, Moo-Puc ER, Toledo VJ, Arankowsky-Sandoval G, Álvares-Cervera J, Pineda-Cortés CJ, *et al.* La cafeína y los antagonistas de los receptores A_{2a} de la adenosina como posibles adyuvantes de la terapia anticolinérgica em la enfermedad de parkinson. Rev. Biomed. 2005; 16(2): 99-111.

Barbosa E, Sallem F. Doença de Parkinson- Diagnóstico. Rev Neurociências. 2005; 13(3): 158-165.

Betz JA, McLaughlin P, Burgos M, Weber MS, Salamone DJ. The muscarinic receptor antagonist tropicamide suppresses tremulous jaw movements in a rodent model of parkinsonian tremor: possible role of M₄ receptors. Psychopharmacology. 2007; 194: 347-359.

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; 81(1-3): 82-86.

Brotchie JM. Adjuncts to dopamine replacement: a pragmatic approach to reducing the problem of dyskinesia in Parkinson's disease. Mov Disord. 1998; 13(6): 871-876.
Bujas-Bobanovic M, Bird PC, Robertson HA, Dursun SM. Blockade of phencyclidine-induced effects by a nitric oxide donor. Br.J.Pharmacol. 2000; 130(5): 1005-1012.

Calabresi P, Picconi B, Pametti L, DiFilippo M. A convergent model for cognitive dysfunctions in parkinson's disease: the critical dopamine-acetylcholine synaptic balance. *Lancet Neurol.* 2006; 5: 974-983.

Calabresi P, Gubellini P, Centoze D. A critical role of the nitric oxide/cGMP pathway in corticostriatal long-term depression. *J Neurosci.* 1999; 19(7): 2489-99.

Caulfield MP. Muscarinic receptors-characterization, coupling and function. *Pharmacol. Ther.* 1993; 58(3):319-79.

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

Chase TN, OH JD, Konitsiotis S. Influence of the therapy with pergolide mesylate plus L-DOPA and with L-DOPA alone on serum cGMP level in PD patients. *Pol J Pharmacol.* 2000; 56: 647-50.

Clarke KA, Still J. Gait analysis in the mouse. *Physiol Behav.* 1999; 66(5): 723-729.

Dagaev GS, Kosmachev AB, Solov'eva NE, Fil'ko OA, Sanotskii VI, Dolgo-Saburov VB. Effects of cholinoblockers on acetylcholine content in rat striatum in neuroleptic-induced parkinsonism. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2004; 137(2): 187-189.

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

Del Bel EA, da Silva CA, Guimaraes FS, Bermudéz-Echeverey M. Catalepsy induced by intra-striatal administration of nitric oxide synthase inhibitors in rats. *Eur.J.Pharmacol.* 2004; 485 (1-3): 175-181.

Del Bel EA, Souza AS, Guimaraes FS, da Silva CA, Nucci-da-Silva LP. et al. Motor effects of acute and chronic inhibition of nitric oxide synthesis in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2002; 161(1): 32-37.

Dencker D, Jeon J, Woldbye DPD, Wortwein G, Sager T, Mork A. Catalepsy is attenuated in mutant mice lacking M4 muscarinic acetylcholine receptors in D1 dopamine receptor- expressing cells. *Scandinavian Neuropsychopharmacol.* 2009; 2: 17.

Durcan MJ, Morgan PF. NECA-induced hypomotility in mice: evidence for a predominantly central site of action. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 1989; 32 (2): 487-490.

Fahn S. The history of dopamine and levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2008; 23:497-508.

Faradji H, Rousset C, Debilly G, Vergnes M, Cespuglio R. Sleep and epilepsy: A key role for nitric oxide? *Epilepsia.* 2000; 41(7):794-801.

Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, et al. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol.Rev.* 1994; 46(2):143-156.

Gomes MZ, Raisman- Vozari R, Del Bel EA. A nitric oxide synthase inhibitor decreases 6-OHDA effects on tyrosine hydroxylase and neuronal nitric oxide synthase in the rat nigrostriatal pathway. *Brain Res.* 2008; 1203: 160-69.

Grace AA. Physiology of the normal and dopamine-depleted basal ganglia: Insights into levodopa pharmacotherapy. *Mov Disord.* 2008; 23: 560-69.

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

Guo L-M, Fibuch EE, Lui X-Y, Choe ES, Buch S, Mao L-M, Jonh QW. CaMKII α interacts with M4 muscarinic receptor to control receptor and psychomotor function. *The Embo Journal.* 2010; 29: 2070-2081.

Guo L-M, Mao M-L, Wang Q.J. Modulation of M4 muscarinic acetylcholine receptors by interacting proteins. *Neurosci Bull.* 2010; 26(6): 469-473.

Halcák L, Pechánková O, Zigová Z, Klemová L, Novacký M. Inhibition of NO synthase activity in nervous tissue leads to decreased motor activity in the rat. *Physiol Res.* 2000; 49(1): 143-149.

Hanania T, Johnson MK. Regulation of neurotransmitter release by endogenous nitric oxide in striatal slices. *Eur.J.Pharmacol.* 1998; 359: 111-117.

Haraguchi K, Ito K, Kotaki H, Sawada Y, Iga T. Prediction of drug-induced catalepsy based on dopamine D1, D2, and muscarinic acetylcholine receptor occupancies. *Drug Metabolism and Dispos.* 1997; 25(6): 675-684.

Hauber W, Neuschelen P, Nagel J, Muller CE. 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; 14(8): 1287-93.

Hruska RE, Kennedy S, Silbergeld EK. Quantitative aspects of normal locomotion in rats. *Life Sci.* 1979; 25(2): 171-179.

Iadecola C, Zhang F, Casey R, Nagayama M, Ross ME. Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *J.Neurosci.* 1997; 17 (23): 9157-9164.

Ince E, Ciliax JB, Levey IA. Differential expression of D1 and D2 dopamine and M4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in identified striatonigral neurons. *Synapse.* 1997; 27: 357-366.

Itokawa K, Ohkuma A, Araki N, Tamura N, Shimazu K. Effect of L-DOPA on nitric oxide production in striatum of freely mobile mice. *Neurosci Lett.* 2006; 402(1-2): 142-44.

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

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

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

Jenner P. Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9:665-77.

Jensen A, Shimidt LS, Dencker D, Schulein C, Wess J, Wortwein G, Woldbye DP . Antipsychotic-induced catalepsy is attenuated in mice lacking the M₄ muscarinic acetylcholine receptor. *European Journal of Pharmacology.* 2011; (1-3): 39-44.

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; 131(2):167-173.

Juri C, Chaná P. Levodopa en la enfermedad de Parkinson. ¿Qué hemos aprendido? *Rev Méd Chile.* 2006; 134: 893-901.

Karasawa H, Taketo MM, Matsui M. Loss of anti-cataleptic effect scopolamine in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor subtype 4. *Eur.J.Pharmacol.* 2003; 468: 15-19.

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

Kunkel-Bagden E, Dai HN, Bregman BS. Methods to assess the development and recovery of locomotor function after spinal cord injury in rats. *Exp.Neurol.* 1993; 119(2): 153-164.

Lana RC, Álvares LMRS, Nasceutti-Prudente C, Goulart FRP, Teixeira-Salmela LF, Cardoso FE. Percepção da qualidade de vida dos indivíduos com Doença de Parkinson através do PDQ-39. *Rev. Bras Fisioterapia.* 2007; 11(5): 397-402.

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

Langmead JC, Watson J, Reavill C. Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. *Pharmacolol. & Therap.* 2008; 117: 232-243.

Lemongi JCP. Conhecendo melhor a Doença de Parkinson-Uma abordagem multidisciplinar com orientações práticas para o dia-a-dia. Sao Paulo: Plexius, 2001.

Lowdon IM, Seaber AV, Urbaniak JR. An improved method of recording rat tracks for measurement of the sciatic functional index of de Medinaceli. *Neurosci Methods.* 1988; 24(3): 279-281.

Marras RA, Martins Ap, Del Bel EA, Guimaraes PS. L-NOARG, an inhibitor of nitric oxide synthase, induces catalepsy in mice. *Neuroreport.* 1995; 7(1): 158-160.

Mattos JP, Mattos VMBC. Novos agonistas dopaminérgicos. Arq. Neuropsiquiatric. 1999; 57(2):329-32.

Mayorga JA, Cousins SM, Trevitt TJ, Conlan A, Gianutsos G, Salamone DJ. Characterization of the muscarinic receptor subtype mediating pilocarpine-induced tremulous jaw movements in rats. Eur.J.Pharmacol.1999; 364: 7-11.

Meneses MS, Teive HAG. Doença de Parkinson, aspectos clínicos e cirúrgicos. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1996.

Morris BJ, Simpson CS, Mundell S, Maceachern K, Johnston HM, Nolan AM. Dynamic changes in NADPH-diaphorase staining reflect activity of nitric oxide synthase: evidence for a dopaminergic regulation of striatal nitric oxide release. Neuropharmacology. 1997; 36(11-12):1589-1599.

Mullenix P, Norton S, Culver B. Locomotor damage in rats after x-irradiation in utero. Exp.Neurol. 1975; 48(2): 310-324.

Nasu R, Matsuo H, Takanaga H, Ohtani H, Sawada Y. Quantitative prediction of catalepsy induced by amoxapine, cinnarizine and cyclophosphamide in mice. Biopharm. Drug Dispos. 2000; 21: 129-138.

Norman GR, Streiner DL. Biostatistics the bare essentials. London: Mosby, 1994.

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

Olanow CW. Levodopa/dopamine replacement strategies in Parkinson's disease: future directions. *Mov Disord.* 2008; 23: 613-22.

Padovan-Neto FE, Echeverry MB, Tumas V, Del Bel EA. Nitric oxide synthase inhibition attenuates L-DOPA-induced dyskinesias in a rodent model of Parkinson's disease. *Neuroscience.* 2009;159: 927-35.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods.* 1985; 14(3): 149-167.

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

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

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

Salamone JD. Facing dyskinesia in Parkinson's Disease: Nondopaminergic approaches *Drugs of the Future.* 2010; 35(7): 567-573.

Sammur S, Dec A, Mitchell D, Linadarkis J, Ortiguella M, West AR. Phasic dopaminergic transmission increases NO efflux in the rat dorsal striatum via a

neuronal NOS and a dopamine D-1/5 receptor-dependent mechanism. *Neuropsychopharmacology*. 2006; 31(3): 493-505.

Sanberg PR, Bunsey MD, Giordano M, Norman AB. The catalepsy test: its ups and downs. *Behav. Neurosci.* 1988; 102(5): 748-759.

Sandiford S, Slepak V. G5- RGS7 selectively inhibits muscarinic M3 receptor signaling via the interaction loop of the receptor the DEP domain of RGS7. *Biochemistry*. 2009; 48(10): 2282-9.

Shih MC, Amaro E Jr, Ferraz HB, Hoexter MQ, Goulart FO, Wagner J. Neuroimagem do transportador de dopamina na doença de Parkinson: Primeiro estudo com [99mTc]-TRODAT-1 e SPECT no Brasil. *Arq Neuropsiquiatr*. 2006; 64(3-A): 628-34.

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

Silberman C, Marinho V, Lakes J, Engelhardt E. Demência e Doença de Parkinson. Revisão de publicações brasileiras de 1980 a 2000. *Ver Bras Neurologia*. 2002; 38(4): 23.

Silverdale MA, Fox SH, Crossman AR, Brotchie JM. Potential nondopaminergic drugs for Parkinson's disease. *Adv Neurol*. 2003; 91: 273-291.

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

Teive AG. Etiopatogenia da Doença de Parkinson. Rev Neurociencias; 2005; 13(4): 201-14.

Trabace L, Kendrick KM. Nitric oxide can differentially modulate striatal neurotransmitter concentrations via soluble guanylate cyclase and peroxynitrite formation. J Neurochem. 2000; 75: 1664-74.

Threlfell S, Clements AM, Khodai T, Pienaar S, Exley R, Wess J, et al. Striatal Muscarinic Receptors Promote Activity Dependence of Dopamine transmission via Distinct Receptor Subtypes versus Dorsal Striatum. The Journal of Neuroscience, 2010; 30(9):3398-3408.

Van Koppen CJ, Nathanson NM. The cysteine residue in the carboxylterminal domain of the M2 muscarinic acetylcholinereceptor is not required for receptor mediated inhibition ofadenylatecyclase. J Neurochem. 1991; 57(6):1873-7.

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

Wess J. Molecular basis of muscarinic acetylcholine receptor function. Trends Pharmacol. Sci. 1993; 14(8): 308-13.

West AR, Grace AA. Striatal nitric oxide signaling regulates the neuronal activity of midbrain dopamine neurons in vivo. J Neurophysiol. 2000; 83: 1796-1808.

West AR, Galloway MP. Nitric Oxide and potassium chloride facilitated striatal dopamine efflux in vivo: role of calcium-dependent release mechanisms. *Neurochem Int.* 1998; 33: 493-501.

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

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