



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



ÉRICA DE MORAES SANTOS CORRÊA

**EFEITO DA INIBIÇÃO INTRACEREBRAL DE RECEPTORES DE
ADENOSINA, COM AMINOFILINA, NAS ALTERAÇÕES MOTORAS
INDUZIDAS POR UM MODELO FARMACOLÓGICO DA DOENÇA DE
PARKINSON**

CAMPO GRANDE

2020



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



ÉRICA DE MORAES SANTOS CORRÊA

**EFEITO DA INIBIÇÃO INTRACEREBRAL DE RECEPTORES DE
ADENOSINA, COM AMINOFILINA, NAS ALTERAÇÕES MOTORAS
INDUZIDAS POR UM MODELO FARMACOLÓGICO DA DOENÇA DE
PARKINSON**

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

CAMPO GRANDE

2020



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



FOLHA DE APROVAÇÃO

ÉRICA DE MORAES SANTOS CORRÊA

EFEITO DA INIBIÇÃO INTRACEREBRAL DE RECEPTORES DE ADENOSINA, COM AMINOFILINA, NAS ALTERAÇÕES MOTORAS INDUZIDAS POR UM MODELO FARMACOLÓGICO DA DOENÇA DE PARKINSON

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

A banca examinadora, após a avaliação do trabalho, atribuiu o conceito _____.

Campo Grande, MS _____ de _____ de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Profº Drº Albert Schiaveto de Souza (Orientador)

Profª Drª Paula Felipe Martinez

Profª Drª Fátima Del Fava

AGRADECIMENTO

Desafio tão grande quanto escrever esta dissertação foi resumir em poucas palavras o meu imenso sentimento de gratidão a Deus e a todas as pessoas que fizeram parte desta minha trajetória na UFMS, pessoas estas, que estão ao meu lado desde bem antes do mestrado.

Início os agradecimentos por meu querido Deus, que sempre me sustentou em graça e saúde, por sempre me guiar em cada passo que dei até aqui.

Meu agradecimento especial vai as pessoas mais importantes da minha vida, meu esposo, Jefferson e aos meus filhos, Jéssica e Matheus. Vocês são para mim a exata expressão do que é sentir o maior amor do mundo, são o que há de mais belo, precioso e essencial para mim. Obrigada por serem meus apoiadores incondicionais, meus melhores amigos, minha base, meu alicerce. Agradeço por cada palavra de incentivo, de motivação e por acreditarem em mim mesmo quando nem eu acreditava. Peço perdão por todas as vezes que tive que me ausentar por causa dos estudos. Pois como diz Simone de Beauvoir, “Toda vitória oculta uma abdicação”. Agradeço a Deus pela vida de vocês e por termos construído uma família linda, abençoada e feliz. Vocês me enchem de orgulho e alegria. Obrigada, meu bem por ser o melhor esposo do mundo. Agradeço pelo cuidado tão amoroso que tens diariamente comigo e com nossos filhos. Minha filha, como você já me ouviu dizer várias vezes... Eu não seria completa se não tivesse uma filha como você, tão parceira, tão amiga. Nossa conexão é inexplicável, mesmo tão diferentes em tantas coisas, conseguimos ser quase que uma só. Obrigada, Jess! Minha princesa linda... Agradeço ao meu companheirinho de laboratório, meu filho Matheus que mesmo sendo um menino das exatas e nunca ter trabalhado com animais de laboratório, prontamente aceitou me auxiliar nos experimentos. Filho, você foi brilhante no laboratório, assim como é na vida, em tudo que faz. Sua ajuda foi essencial e deixou a mamãe cheia de orgulho da sua facilidade em aprender e da sua resolutividade.

Parabéns, meu futuro engenheiro preferido! Obrigada por ser esse filho maravilhoso! Família querida, amo cada um de vocês imensuravelmente.

Sou grata por meus pais, que primaram por me ensinar os melhores princípios e valores que sempre estiveram presentes em nosso lar. Obrigada, mãe, por me mostrar os caminhos de Deus e por ser esse exemplo de mulher de fé, guerreira e perseverante. Ao meu saudoso pai, que tão cedo foi morar ao lado de Deus, mas que desde de muito cedo me fez acreditar que o estudo é algo muito valioso na vida de qualquer pessoa. Obrigada, por sempre ter feito com que eu me sentisse a menininha mais inteligente do mundo. Pai, sei que se estivesse aqui, estaria repleto de alegria e orgulho da sua filha. Que falta você me faz! Saudades. Também, agradeço aos meus irmãos Day e Lucas, por serem meus amigos e parceiros nessa vida. Amo muito vocês.

Quero destacar a minha imensa gratidão a alguém que além de orientador, é um amigo, um pai na vida acadêmica e acima de tudo, um grande mestre por essência. Professor Albert Schiaveto de Souza, as palavras tornam-se pequenas para expressar a minha gratidão ao senhor. Agradeço a Deus por sua vida e por ter recebido a benção de ser sua aluna, desde o primeiro semestre da graduação. O senhor despertou em mim a paixão pelo saber e por estudar, que nem mesmo eu sabia que tinha. Pouco a pouco o senhor me mostrou o fascinante mundo da fisiologia, pelo qual eu sou apaixonada até hoje. Obrigada por todas as oportunidades que tem me dado, me ajudando a crescer e aprender, espero ter honrado a sua confiança. Professor, o senhor sempre foi e sempre será, um grande exemplo e uma inspiração para mim, como ser humano maravilhoso que é, como profissional ético e justo, mas principalmente, como professor que ensina com brilho nos olhos, com amor, dedicação, excelência e que sempre está com coração aberto para receber e dar oportunidades aos alunos. Obrigada por acreditar em mim, por me ensinar com tanta dedicação e paciência. Sou grata por todas as vezes em que eu estava ansiosa com os percalços da pesquisa e o senhor me acalmou, assim com um pai experiente que acalma seu filho. O senhor estava certo, professor! Com todas as dificuldades do caminho superadas, nós chegamos até aqui. Muito obrigada de coração!

Agradeço à minha querida amiga, Ana Paula Abrita que foi a joia preciosa que o mestrado me trouxe de presente. Obrigada, amiga por todos os momentos em que seu apoio e compreensão deixaram esses 2 anos mais leves e alegres. Conviver contigo me faz ser uma pessoa melhor. É uma alegria muito grande para mim e minha família ter você e seu esposo Mateus, como amigos! E para completar o nosso trio das *Power Girls*, agradeço a amiga mais meiga e doce, Camila Nogueira, obrigada por sempre nos trazer a sua paz e carinho. Amo vocês, meninas!

Agradeço ao meu amigo/irmão André Grégio, que por tantos anos foi meu parceiro de laboratório, que é e sempre será meu irmão do coração, que faz parte da minha vida, da minha história e da minha família. Amigo, essa vitória também é sua, só cheguei até aqui porque lá começo, na iniciação científica, você estava junto comigo, aprendemos juntos, crescemos juntos, nas alegrias e nos desafios do mundo das pesquisas, mas acima de tudo crescemos como pessoas. Confesso que agora, no mestrado, o laboratório não teve mesmo brilho porque você não estava lá. Te amo, amigo... Obrigada por tudo!

Também dedico minha gratidão a todos os professores do PPGSD, pelos ensinamentos passados neste mestrado, os quais foram, são e serão muito importantes para mim e para a minha vida profissional, assim como agradeço aos funcionários, que fazem com que tudo funcione da melhor maneira possível.

E por fim, gostaria de agradecer à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa e por desempenhar um papel fundamental na expansão e consolidação do curso de pós-graduação *stricto sensu*.

“Eu faço parte dos que pensam que a Ciência é belíssima. Um cientista em um laboratório não é apenas um técnico, ele é também uma criança diante de fenômenos naturais que o impressionam como um conto de fadas”.

Marie Curie

RESUMO

A doença de Parkinson é uma doença crônica, degenerativa do sistema nervoso central, que afeta a função motora extrapiramidal. É causada por degeneração severa de neurônios dopaminérgicos da substância negra compacta. Sua ocorrência se dá de forma lenta e progressiva, sendo caracterizada por sintomas como, bradicinesia, rigidez muscular, tremor em repouso. Assim, este trabalho testou o efeito da aminofilina, antagonista não seletivo de receptores de adenosina A₁ e A_{2A}, na catalepsia induzida por haloperidol (antagonista dopaminérgico). Além disso, foram analisadas as possíveis modificações no comportamento motor decorrentes da interação destes neurotransmissores, por meio do teste do Campo Aberto. Para realização do experimento, foram utilizados 60 camundongos suíços, adultos, machos, que foram divididos em 6 grupos experimentais. No primeiro dia, os animais foram submetidos a uma cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guia, na região do estriado, em ambos hemisférios cerebrais. Após sete dias do procedimento cirúrgico, os animais receberam injeção intraperitoneal de salina ou haloperidol e após 60 minutos, foi realizada a infusão intracerebral de salina ou aminofilina (60nM ou 120nM) antes do início dos testes de catalepsia e do Campo Aberto. Os resultados demonstraram que os animais tratados sistemicamente com haloperidol, apresentaram um aumento no tempo de permanência na barra no teste de catalepsia e também apresentaram uma diminuição na locomoção no teste do Campo Aberto, em comparação com os demais grupos experimentais. Todavia, a catalepsia foi totalmente revertida nos grupos tratados com haloperidol+aminofilina nas doses de 60nM e 120nM. A avaliação do comportamento locomotor dos animais, realizada pelo teste do Campo Aberto, demonstrou que os grupos tratados com haloperidol+aminofilina em ambas doses (60nM e 120nM), não apresentou eficácia na reversão das alterações motoras, nos animais. Nossos resultados demonstraram a forte interação dopaminérgica e adenosinérgica nos núcleos da base, confirmando que o estudo de novas terapia, que vão além da reposição de dopamina, podem ser uma opção de tratamento farmacológico viável para a DP.

Palavras-chave: Receptores dopaminérgicos; Receptores adenosinérgicos; Catalepsia; Núcleos da Base; Doença de Parkinson.

ABSTRACT

Parkinson's disease is a chronic degenerative disease of the central nervous system that affects extrapyramidal motor function. It is caused by severe degeneration of dopaminergic neurons of the compact substantia nigra. Its occurrence occurs slowly and progressively, being characterized by symptoms such as bradykinesia, muscle stiffness, tremor at rest. Thus, this work tested the effect of aminophylline, non-selective adenosine A₁ and A_{2A} receptor antagonist, on haloperidol-induced catalepsy (dopaminergic antagonist). In addition, possible changes in motor behavior resulting from the interaction of these neurotransmitters were analyzed through the Open Field test. For the experiment, 60 adult male Swiss mice were divided into 6 experimental groups. On the first day, the animals underwent stereotactic surgery for implantation of guide cannulas in the striatum in both cerebral hemispheres. Seven days after the surgical procedure, the animals received intraperitoneal saline or haloperidol injection and after 60 minutes, the intracerebral saline or aminophylline infusion (60nM or 120nM) was performed before the beginning of the catalepsy and open field tests. The results showed that the animals treated systemically with haloperidol showed an increase in the time spent in the bar in the catalepsy test and also showed a decrease in locomotion in the open field test, compared to the other experimental groups. However, catalepsy was fully reversed in the haloperidol + aminophylline treated groups at 60nM and 120nM doses. The evaluation of the locomotor behavior of the animals, performed by the Open Field test, showed that the groups treated with haloperidol + aminophylline at both doses (60nM and 120nM) did not show efficacy in reversing motor alterations in animals. Our results demonstrated the strong dopaminergic and adenosinergic interaction in the base nuclei, confirming that the study of new therapies, which go beyond dopamine replacement, may be a viable pharmacological treatment option for PD.

Keywords: Dopaminergic receptors; Adenosinergic receptors; Catalepsy; Basal nuclei; Parkinson's disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema ilustrativo demonstrando neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta*, lançando projeções axonais para o estriado.

Figura 2: Esquema ilustrativo da estrutura das metilxantinas.

Figura 3: Esquema ilustrativo da estrutura molecular da adenosina.

Figura 4: Esquema ilustrativo demonstrando complexos receptores heterodímeros A_{2A}-D₂.

Figura 5: Esquema ilustrativo da estrutura molecular da aminofilina.

Figura 6: Esquema ilustrativo do experimento. Cirurgia estereotáxica.

Figura 7: Esquema ilustrativo do experimento. Testes comportamentais.

Figura 8: Foto ilustrativa da cirurgia estereotáxica para implantação bilateral de cânulas.

Figura 9: Foto ilustrativa da bomba de microinfusão utilizada para injeção intracerebral de substâncias.

Figura 10: Foto ilustrativa do camundongo com a cânula de injeção inserida no hemisfério esquerdo, durante infusão de aminofilina.

Figura 11: Quadro ilustrativo demonstrando os grupos experimentais.

Figura 12: Foto ilustrativa do teste da catalepsia na barra, mostrando efeito cataléptico no animal pertencente ao grupo haloperidol+salina.

Figura 13: Foto ilustrativa do teste do Campo Aberto demonstrando comportamento de exploração horizontal.

Figura 14: Foto ilustrativa do teste do Campo Aberto demonstrando o comportamento de exploração vertical.

Figura 15: Gráfico referente ao tempo de catalepsia para os grupos experimentais, mensurados em 5, 35 e 65 minutos após a aplicação das drogas.

Figura 16: Gráfico referente ao número de quadrantes percorridos (exploração horizontal) e erguimentos (exploração vertical) para os grupos experimentais, mensurados 30 minutos após a aplicação das drogas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados referentes ao tempo de catalepsia em cada momento após a aplicação das drogas e em cada grupo experimental.

Tabela 2: Resultados referentes à quantidade de quadrantes percorridos e erguimentos, em cada grupo experimental.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP – Trifosfato de adenosina

°C – graus célsius

cAMP – Monofosfato cíclico de guanosina

CCPA – 2-cloro-N6-ciclopentiladenosina

cm² – centímetro ao quadrado

DA – Doença de Alzheimer

DP – Doença de Parkinson

DM2 – Diabetes Mellitus tipo 2

EP – Núcleo entopenducular

ERO – Espécie reativa de oxigênio

FDA – *Food and Drug Administration*

GABA – Ácido gama-aminobutírico

GP – Globo pálido

GPI - Globo pálido interno

GPe - Globo pálido externo

h – hora

i. c. - intracerebral

i.p. - intraperitoneal

Kg - quilograma

L-DOPA – Levodopa

LID – Discinesia induzida por levodopa

MAO-B – Monoaminaoxisase B

min - minutos

mg - miligrama

ml – mililitro

μl – microlitro

MFB – Feixe prosencefálico medial

MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina

MTXs – Metilxantinas

NB – Núcleos da base

NECA – 5-N-etilcarboxamida adenosina

nM - Nanomol

OHDA – 6-hidroxidopamina

OIC – Organização Mundial do Café

PI3K – Fosfoinositida-3-quinase-delta

SN – Substância negra

SNC – Substância negra *pars compacta*

SNC – Sistema nervoso central

SNr – Substância negra reticulada

STN – Núcleo subtalâmico

UFMS – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2. 1 Núcleos da Base.....	15
2. 2 Substância Negra.....	16
2. 3 Doença de Parkinson.....	17
2. 4 Tratamento farmacológico da doença de Parkinson.....	19
2.5 Efeitos estimulantes das metilxantinas e seus benefícios em doenças neurodegenerativas.....	20
2.6 Interação de receptores de adenosina e de dopamina no estriado.....	23
2. 7 Ação das metilxantinas no cérebro.....	28
2.8 Mecanismo de ação da Aminofilina.....	30
2.9 Ação da teofilina em modelos animais da doença de Parkinson.....	31
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivos gerais.....	33
3.2 Objetivos específicos.....	33
4. METODOLOGIA.....	34
4.1 Animais.....	34
4.2 Droga.....	34
4.3 Via de administração das drogas.....	35
4.3.1 Cirurgia estereotáxica e aplicação via intracerebral das drogas.....	35
4.4 Experimentos e grupos experimentais.....	40
4.4.1 Experimento: Efeito da aminofilina na catalepsia e nas alterações do comportamento motor induzidas pelo haloperidol.....	41

4.5 Avaliação funcional dos animais.....	42
4.5.1 Teste de catalepsia na barra.....	42
4.5.2 Teste do Campo Aberto.....	43
4.6 Descarte dos animais.....	45
4.7 Análise estatística.....	45
5 RESULTADOS.....	47
6 DISCUSSÃO.....	51
7 CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

1. INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é uma doença crônica, degenerativa do sistema nervoso central (SNC), com evolução lenta e progressiva, caracterizada por sintomas como, bradicinesia, rigidez muscular, tremor em repouso, entre outros sinais motores e não motores (NASROLAHI *et al.*, 2019). A DP é o principal distúrbio de movimento encontrado na população idosa e o segundo transtorno neurodegenerativo mais comum em todo o mundo, ficando atrás apenas da doença de Alzheimer (POEWE; MAHLKNECHT, 2009; TAURA *et al.*, 2018). Estima-se que esse distúrbio pode acometer cerca de 2% a 3% 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 (POEWE *et al.*, 2017). Assim, diante da crescente ocorrência da doença, as estimativas de prevalência e incidência podem ser superadas com o aumento do envelhecimento populacional e na elevação da expectativa média de vida da população mundial (TYSNES; STORSTEIN, 2017; NASROLAHI *et al.*, 2019). Com isso, a DP está próxima de superar os casos de câncer como principal causa de morte da população idosa (POEWE *et al.*, 2017).

A literatura tem relatado que a DP é uma doença que, na maioria dos casos, tem causa idiopática, contudo, algumas hipóteses etiológicas identificam uma origem genética em 5-10% dos pacientes. Além disso, os riscos ambientais como exposição a agrotóxicos, também podem ser associados ao surgimento da doença em alguns casos (SAVICA; CANNON-ALBRIGHT; PULST, 2016a). As taxas de mortalidade são aproximadamente 3 vezes maiores do que as da população em geral, ressaltando sua gravidade (LARSSON; TORISSON; LONDOS, 2018).

Fisiopatologicamente, a DP é caracterizada pela degeneração progressiva de várias estruturas encefálicas, com destaque para os núcleos da base (NB), especialmente da substância negra *pars compacta* (SNc), causando a morte de neurônios dopaminérgicos e comprometendo as vias dopaminérgicas nigro-estriatais. Esta degeneração, gera déficits na facilitação de movimentos voluntários de forma crônica e progressiva, determinados pela diminuição da neurotransmissão dopaminérgica no corpo estriado, em especial no putâmen (LESS; HARDY; REVESZ,

2009). Além disso, a DP é fortemente caracterizada como uma disfunção monoaminérgica múltipla, incluindo, além dos déficits nos sistemas dopaminérgicos, alterações em outros sistemas como os colinérgicos, serotoninérgicos, adenosinérgicos e noradrenérgicos, que além das alterações motoras, também podem estar ligados às perturbações cognitivas e à depressão que também pode acompanhar a DP ao longo da sua evolução. (JENNER, 2014; TEIVE, 2005). Com isso, torna-se necessário ampliar a compreensão neurofisiológica, através de estudos que visem outras vias, além das dopaminérgicas, já que estas têm se mostrados opções viáveis de tratamento na DP.

Considerando que a DP é uma doença de abrangência mundial, com alta incidência e prevalência e que há uma escassez de estudos sobre o efeito das terapias não dopaminérgica, este estudo propôs avaliar o efeito do antagonismo de receptores de adenosina com aminofilina, sobre as alterações motoras, induzidas por haloperidol, em um modelo farmacológico da DP, em camundongos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Núcleos da Base

Os NB são um grupo de núcleos subcorticais envolvidos no planejamento e iniciação de movimentos, os quais são organizados de forma anatômica e funcional em circuitos paralelos que processam diferentes tipos de informações. Os NB estão situados no cérebro e no mesencéfalo sendo divididos em: (a) núcleos de entrada, que recebem informações do córtex e do tálamo, constituídos pelos núcleos caudado, putâmen e accumbens; (b) núcleos de saída, que enviam informações dos NB para o tálamo, constituindo o globo pálido interno (GPi) e a substância negra parte reticulada (SNr); e (c) núcleos intrínsecos, conhecidos também como neoestriado, compostos pela divisão do globo pálido externo (GPe), do núcleo subtalâmico (STN) e da SNC (ARMENTERO *et al.*, 2011). O neoestriado é formado por um núcleo único em roedores, mas em vertebrados superiores, é dividido pela cápsula interna nos núcleos caudado e putâmen. O globo pálido (GP), como mencionado, consiste em duas partes principais, o segmento externo, GPe e o segmento interno GPi. Em roedores, o segmento externo é simplesmente chamado de GP e o segmento interno é equivalente (em termos de entradas e saídas) ao núcleo entopeduncular (EP) (TEPPER; ABERCROMBIE; BOLAM, 2007).

A composição dos NB se dá através da interconexão de vários núcleos e essas estruturas nervosas são responsáveis pelos ajustes das atividades nos tratos descendentes do SNC. Apesar da inexistência de conexões diretas destes núcleos basais com os neurônios motores inferiores, seu papel é primordial para manutenção da homeostase da função motora. Em relação à motricidade, estes núcleos atuam na regulação da contração e força muscular, os movimentos de várias articulações e as sequências de movimentos. Alguns desses núcleos são anatomicamente próximos e por isso recebem nomes comuns: o globo pálido e o putâmen formam o núcleo lenticular e o conjunto do caudado e do putâmen formam o estriado (KANDEL *et al.*, 2014).

2.2 Substância Negra

A substância negra (SN) é um núcleo localizado no mesencéfalo, e caracterizado macroscopicamente pela coloração escura de suas células, onde os neurônios são pigmentados por neuromelanina (VAN DOMBURG; DONKELAAR, 1991). No encéfalo humano foi demonstrada uma subdivisão anatômica do complexo nigral pautada em estudos que marcaram células dopaminérgicas (DAMIER; HIRSCH; GRAYBIEL, 1999). A SN é dividida em dois sub-núcleos: a parte compacta e a parte reticular. Essas duas partes da SN compartilham entradas semelhantes, mas têm saídas diferentes e são compostas por tipos de neurônios neuroquimicamente distintos. Essas divisões também são denominadas de porção dorsal e ventral dos NB; a divisão ventral consiste no núcleo accumbens, no globo pálido ventral (que provavelmente equivale a parte ventral do GPi) e na porção medial do STN e SN. A divisão dorsal dos NB está principalmente associada a funções motoras e associativas, enquanto a divisão ventral está mais relacionada a funções límbicas (TEPPER; ABERCROMBIE; BOLAM, 2007).

A grande maioria dos neurônios nos NB é GABAérgica de projeção, (aproximadamente 98,86%) e estes são os principais componentes dos segmentos do GP e da SNr. No neostriado de roedores e primatas, cerca de 95% e de 75-80% dos neurônios, respectivamente, também é GABAérgica de projeção. Enquanto que o STN contém neurônios de projeção glutamatérgicos, a SNc é composta, quase exclusivamente, de neurônios de projeção dopaminérgicos. Além disso, o neostriado também abrange, quase que majoritariamente (exceto por interneurônios colinérgicos), populações bem definidas de interneurônios GABAérgicos. Com isso, é natural que cada um desses núcleos expresse altos níveis de receptores GABA_A e GABA_B, pré e pós-sinápticos (TEPPER; ABERCROMBIE; BOLAM, 2007). Assim, as ações colinérgicas inibem as células estriatais da via direta e excitam as células estriatais da via indireta. Portanto, os efeitos da acetilcolina são opostos aos efeitos da dopamina nas vias diretas e indiretas, ao inibir a atividade motora.

A parte compacta da SN fornece dopamina essencial para o funcionamento do estriado. A dopamina atua principalmente como um neuromodulador no neostriado e é importante na modulação dos canais dependentes de voltagem para

os íons sódio, potássio e cálcio nos neurônios espinhosos médios e em interneurônios colinérgicos. Essa neuromodulação leva a alterações complexas e dependentes do estado de excitabilidade neuronal na região neostriatal (SURMEIER, 2006). A dopamina também atua para modular a liberação pré-sináptica de ácido gama-amino butírico (GABA) na SN. Com a produção de dopamina na *pars compacta* da SN a atividade do córtex motor aumenta pela ligação de dopamina a dois diferentes tipos de receptores dopaminérgicos, D₁ e D₂, no circuito dos NB. A ligação da dopamina a receptores D₁ facilita a atividade na via direta, enquanto a ligação de dopamina a receptores D₂ inibe a atividade na via indireta. Em outras palavras, a via direta (que aumenta a atividade motora) é excitada pela dopamina, enquanto a via indireta (que diminui a atividade motora) é inibida. Ambos os efeitos levam ao aumento da atividade motora (KANDEL *et al.*, 2014).

2.3 Doença de Parkinson

O distúrbio motor hipocinético mais comum dos NB é a doença de Parkinson, que é sintomaticamente caracterizada por, (1) rigidez muscular, que está presente em todos os grupos musculares, tanto flexores quanto extensores e, geralmente, é acompanhada por movimentos articulares bruscos; (2) marcha festinante devido à perda de reflexos posturais que resultam em problemas de equilíbrio e podem se manifestar com uma postura instável, curvada e uma deambulação embaralhada (marcha em tesoura) com pequenos passos, seguida pela necessidade de etapas mais rápidas para manter o equilíbrio; (3) o tremor muscular rítmico dos pacientes com DP, é um tremor estático ou em repouso, que se refere a movimentos involuntários de 4-5 Hz quando o membro é mantido em repouso, mas desaparece durante um movimento voluntário; (4) hipomímica facial com expressão facial semelhante a de uma máscara é ligada a hipocinesia; (5) alterações na fala como a disartria, afonia. Além disso, sintomas não motores também têm sido descritos, dentre eles a hiposmia, distúrbios do sono, sintomas gastrointestinais, incontinência urinária, bradifrenia, depressão e declínio cognitivo (NASROLAHI *et al.*, 2019).

A DP é uma patologia bioquímica central, resultando em uma desordem neurológica progressiva da função motora extrapiramidal causada pela degeneração

severa de neurônios dopaminérgicos da SNc. A morte neuronal se dá em decorrência aos danos ao complexo I do sistema de transferência de elétrons; a depleção de adenosina trifosfato (ATP) em consequência do bloqueio da oxidação mitocondrial e; alterações na homeostase do íon cálcio. Com a diminuição da neurotransmissão dopaminérgica ocorre a degeneração do estriado e a perda de receptores de dopamina (ROWLAND, 2007)

Os déficits causados pela depleção de dopamina incluem mais comumente sintomas motores (FANG *et al.*, 2006; TORIUMI *et al.*, 2009). Entretanto, um vasto conjunto de evidências sugerem que estes sejam apenas um dos aspectos de um distúrbio multifacetado. O que se observa é que cerca de 60% das pessoas com DP apresentam também sintomas não motores, tais como distúrbios psiquiátricos e cerca de 40% deles apresentam transtornos de ansiedade e/ou depressão. Com isso, tem sido realizados numerosos estudos destacando a importância dos sintomas não motores tanto na fase "pré-motora" da DP quanto no decorrer da doença (SAUERBIER *et al.*, 2016).

Normalmente, estes sintomas aparecem após a perda de pelo menos 80% dos neurônios dopaminérgicos na SNc, prejudicando assim a capacidade do paciente para executar tarefas diárias. Conforme a doença progride, comorbidades com sintomas não motores se manifestam (BRANCHI *et al.*, 2010).

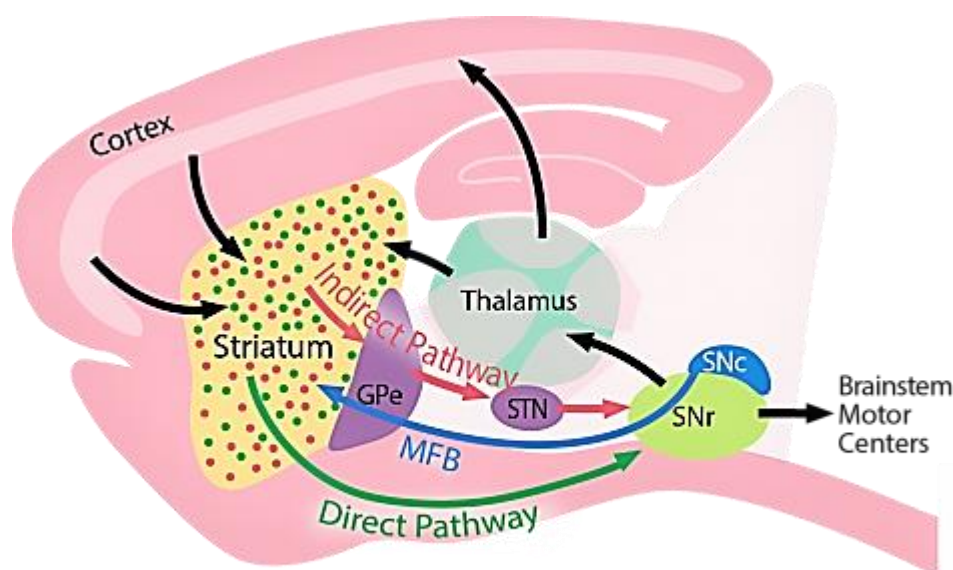


Figura 1 - Neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta*, lançando projeções axonais para o estriado. Fonte: <http://nelsonlab.ucsf.edu/publications/publications>

2.4 Tratamento farmacológico da doença de Parkinson

A DP foi originalmente descrita pelo médico inglês, James Parkinson, em 1817. Desde então, ocorreram importantes avanços sobre a compreensão da etiologia, fisiopatologia e prognóstico da DP. Tais avanços, propiciaram o desenvolvimento de terapias farmacológicas altamente eficazes para o tratamento da doença (SMITH; ISACSON; DUNNETT, 2012; ELKOUZI *et al.*, 2019).

O amplo, preciso e pioneiro trabalho de Hornykiewicz trouxe a proposta de terapias farmacológicas baseadas em levodopa (L-DOPA). A L-DOPA é um precursor de dopamina que continua sendo uma das principais estratégias terapêuticas para pacientes com DP, considerada como “padrão ouro” de tratamento farmacológico (HORNYKIEWICZ, 1973; HORNYKIEWICZ, 2006). Embora o L-DOPA seja um medicamento altamente efetivo em tratar os estágios iniciais da doença, complicações motoras (fenômenos on-off, discinesia ou distonia) aparecem em mais de 50% dos pacientes após 5 a 10 anos de administração contínua (SCOTTISH INTERCOLLEGIATE GUIDELINES, 2016). As discinesias induzidas por levodopa (LID), associadas ao tratamento de longo prazo, podem se manifestar na forma de movimentos coreiformes, distonia, atetose, tiques e mioclonias. Logo que aparecem, as discinesias, normalmente, afetam a musculatura orobucolingual e podem não apresentar uma relação nítida com a administração das diversas doses diárias de L-DOPA. Com a progressão da doença e do tratamento, as discinesias podem se tornar mais severas e atingir outras regiões do corpo (ZHANG *et al.*, 2013). Além disso, todas as terapias utilizadas atualmente tratam os sintomas e não modificam significativamente a progressão da doença (MUNHOZ *et al.*, 2015). Como consequência disso, há a necessidade do desenvolvimento de novas manipulações farmacológicas para o tratamento da DP. Do mesmo modo, a introdução de drogas dopaminérgicas está associada com efeitos colaterais agudos, tais como náusea, vômito, hipotensão, alucinação e insônia (MUNHOZ *et al.*, 2015).

Os agonistas dopaminérgicos (pramipexol, ropinirol e rotigotina) são menos eficazes que a L-DOPA, mas geram menos efeitos motores adversos (TARSY, 2016). Finalmente, os inibidores da monoamina oxidase B (MAO-B), selegilina e rasagilina, que impedem o metabolismo da dopamina no SNC e são geralmente usados como coadjuvantes do tratamento com L-DOPA para melhorar os sintomas motores (INFAC, 2010). Os efeitos colaterais indesejáveis gerados pelos medicamentos atualmente

prescritos, mostram que o desenvolvimento de novas terapias é essencial para melhorar a qualidade de vida das pessoas acometidas pela doença. Bem como também é necessário que estes medicamentos apresentem mecanismos de ação voltados para a proteção de neurônios nigrais (MUNHOZ *et al.*, 2015).

Desta maneira, é importante que as novas manipulações farmacológicas produzam agentes com ação anti-parkinsoniana em todas as fases da doença, sem perda da eficácia da droga e que previnam o surgimento de efeitos colaterais, como as discinesias. Diversos agentes que demonstram um potencial terapêutico têm sido descritos, incluindo agentes que atuam em receptores adenosinérgicos, glutamatérgicos, canabinóides, opióides, α 2-adrenérgicos e receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos. Diante do conhecimento de que outras vias também são acometidas na DP, é importante que os estudos de novas drogas foquem nos sistemas não dopaminérgicos nos núcleos basais, indo além das vias nigroestriatais lesionadas (JENNER, 2003; SMITH *et al.*, 2014).

2.5 Efeitos estimulantes das metilxantinas e seus benefícios em doenças neurodegenerativas

As metilxantinas (MTXs) são substâncias originadas das purinas, derivadas de metilados da xantina. As MTXs formam o principal constituinte de várias bebidas e alimentos amplamente consumidos mundialmente, preparados artesanalmente ou de forma industrial, como café, chá, erva mate, bebidas com cola ou guaraná, estimulantes não alcóolicos (conhecidos como energéticos) e o cacau. Enquanto a cafeína está presente em concentrações relativamente altas no café e no chá, vários outros metabólitos de purina também estão presentes em quantidades menores incluindo teobromina, teofilina e paraxantina. Por outro lado, teobromina e teofilina estão presentes em altas concentrações no cacau (CAMANDOLA; PLICK; MATTSON, 2019).

Em 1902, o químico Emil Fischer recebeu o prêmio Nobel por seu trabalho no metabolismo de purinas e açúcar, incluindo a descoberta de que a cafeína é um componente purinérgico. De fato, durante o século seguinte à descoberta de Fischer, estudos sobre os efeitos da cafeína no SNC, estabeleceram o potencial

psicoestimulante da cafeína, elucidando seus mecanismos celulares e moleculares de ação nas células nervosas (KUNZ, 2002).

Durante vários séculos, o chá e o café foram as bebidas de maior consumo mundial, e as bebidas feitas com cola encontram-se entre os primeiros analgésicos prescritos, quando os tratamentos farmacológicos eram praticamente inexistentes (FRANCO; OÑATIBIA; MARTÍNEZ, 2013; OÑATIBIA; MARTÍNEZ; FRANCO, 2016). As primeiras evidências sobre o consumo de chá e café são datadas do século XV, em mosteiros, onde os monges faziam uso de café como estimulante com intuito de permanecerem acordados para realizarem suas orações noturnas. As propriedades revitalizantes da bebida logo ficaram conhecidas em outros países, principalmente, nos países árabes e do Império Otomano, onde os comerciantes venezianos começaram introduzir a palavra *caffè*, da palavra turca *kahveh*, na Itália por volta de 1570 (DICUM; LUTTINGER, 1999). Atualmente, dados do relatório da Organização Internacional do Café (OIC), apontaram um consumo mundial de cerca de 165,18 milhões sacas de café (aproximadamente 16,518 bilhões de litros), em 2018. Segundo previsões da OIC, o Brasil continuará a ser o líder mundial de produção, estimando-se que produzirá 58,5 milhões de sacas no ano-safra (abril-março) de 2019/20 (OIC, 2018).

No que se refere ao estudo científico de substâncias do grupo das MTXs, como a cafeína, teobromina, teofilina e paraxantina, dados epidemiológicos sólidos mostram que o seu consumo pode prevenir doenças neurodegenerativas graves, como a DP e a doença de Alzheimer (DA). Além disso, foi descrito que as MTXs também podem prevenir a diabetes mellitus tipo II (DM2), classificando esses compostos como agentes de prevenção de doenças (FRANCO; OÑATIBIA; MARTÍNEZ, 2013; OÑATIBIA; MARTÍNEZ; FRANCO, 2016).

O processo de neurodegeneração é caracterizado pelos danos anômicos, estruturais, por alterações fisiológicas que levam à disfunção das células neurais e morte neuronal prematura. Em geral, a prática clínica estabelece que a neurodegeneração seja atribuída como origem de qualquer patologia que apresente sintomas neurológicos prematuros na ausência de lesões ou eventos cardiovasculares. A neurodegeneração pode se dar em nervos periféricos e centrais e engloba mais de 100 doenças distintas. Apesar da etiologia complexa e da fisiopatologia diversificada, essas doenças podem ter características comuns, por

exemplo, deposição de agregados de proteínas, inflamação, deficiências motoras e déficits cognitivos (PRZEDBORSKI; VILA; JACKSON, 2003; KOVACS, 2016).

Estudos realizados em mamíferos concluíram que as MTXs atuam por meio de uma variedade de mecanismos moleculares diferentes: mobilização de cálcio intracelular, inibição de fosfodiesterases, modulação de receptores GABAérgicos, inibição de transportadores de nucleotídeos cíclicos dependentes de ATP de alta afinidade e antagonismo dos receptores de adenosina (ARONSEN *et al.*, 2014; FRANCO; OÑATIBIA; MARTÍNEZ, 2013).

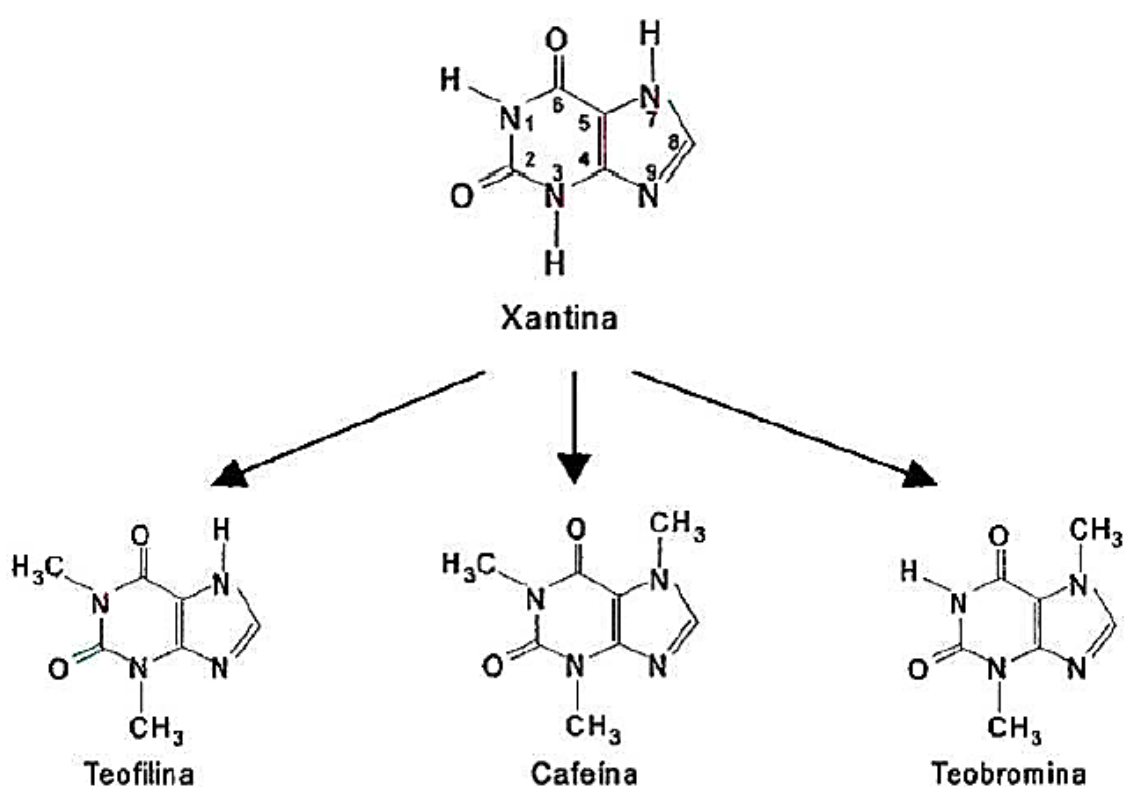


Figura 2: Estrutura das metilxantinas (Fonte: Sigma Aldrich)

2.6 Interação de receptores de adenosina e de dopamina no estriado

No SNC existem vários neurotransmissores responsáveis por agir como moduladores endógenos, alterando o funcionamento celular, proporcionando a regulação das atividades fisiológicas em diversos órgãos, tecidos e células (FREDHOLM *et al.*, 2011).

Estudos pioneiros como o de Fuxe e Ungerstedt (1974), demonstraram os efeitos moduladores que a adenosina exerce sobre o sistema dopaminérgico, e isso continua sendo alvo de investigações por sua relevância em patologias humanas, como por exemplo, a esquizofrenia e a DP. O estudo evidenciou que há interações antagônicas entre adenosina e dopamina, comprovando que adenosina pode inibir vários efeitos da dopamina no córtex cerebral e nos NB.

Nesse contexto, sabe-se que a adenosina é um importante metabólito intermediário, caracterizado como um componente intracelular essencial, atuando como elemento básico dos ácidos nucleicos e componente da moeda energética biológica, o ATP (CHEN, ELTZSCHIG, FREDHOLM, 2013). Além disso, a adenosina funciona como molécula sinalizadora através da ativação de receptores distintos e que são amplamente expressos. Esses receptores estão envolvidos em várias funções biológicas, tanto fisiológicas quanto patológicas. Dentre elas, incluem-se o ritmo e a circulação cardíaca, lipólise, fluxo sanguíneo renal, função imune e a angiogênese, além de doenças inflamatórias, isquemia-reperfusão e distúrbios neurodegenerativos. Especificamente, no SNC, a adenosina atua na modulação do sono, excitação, locomoção, nocicepção, neuroproteção e em vários outros processos fisiológicos vitais (CHEN; ELTZSCHIG; FREDHOLM, 2013; SCHWARZSCHILD *et al.*, 2003; EL YACOUBI *et al.*, 2000).

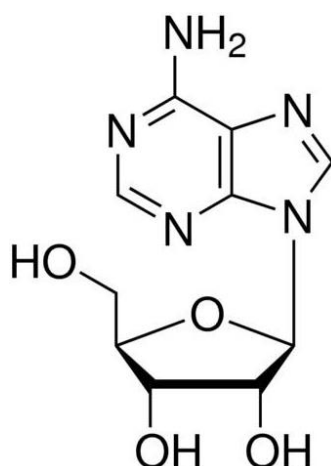


Figura 3: Estrutura molecular da adenosina (Fonte: Sigma Aldrich)

Molecularmente, a adenosina é um nucleosídeo proveniente do ATP. Sua ação se dá por meio de receptores purinérgicos do tipo P1, que são divididos em quatro subtipos distintos, A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃, os quais são classificados com receptores do tipo metabotrópicos, isto é, possuem sete domínios transmembrana e são acoplados à proteína G. Sendo os receptores A₁ e A₃ acoplados à proteína G do tipo Gi/o, enquanto os receptores A_{2A} e A_{2B} são acoplados à proteína G do tipo Gs. Ademais, eles também podem apresentar-se na forma de monômeros, homodímeros, heterodímeros e oligômeros, com por exemplo, A₁-A₁, A_{2A}-CB₁, A_{2A}-D₂ (FREDHOLM *et al.*, 2011).

As substâncias com origem nas metilxantinas atuam principalmente no sistema adenosinérgico e são consideradas uma classe de substâncias psicoestimulantes e neuroprotetoras, por reduzirem o estresse oxidativo e inflamatório no SNC (GOŁEMBIOWSKA *et al.*, 2013; DORÉ *et al.*, 2011). A cafeína e a teofilina foram os primeiros alcaloides naturais, com ação antagonista sobre o sistema adenosinérgico descritos na literatura, ao demonstrarem uma grande afinidade por estes receptores (MÜLLER; JACOBSON, 2014).

Evidências experimentais sugerem que as propriedades estimulantes centrais desempenhadas pelas metilxantinas, demonstram efeitos terapêuticos benéficos no tratamento preventivo da DP (CHEN *et al.*, 2007; GOETZ *et al.*, 2005; FREDHOLM *et al.*, 1999). Tais propriedades anti-parkinsonianas se dão por meio do bloqueio de receptores estriatais de adenosina (FERRÉ *et al.*, 2001; SVENNINGSSON *et al.*, 1999). Com isso, adenosina fornece um tono inibitório a várias regiões cerebrais e a

estimulação de comportamentos motores promovidos pela cafeína e teofilina são atribuídos ao antagonismo não seletivo dos receptores de adenosina A₁ e A_{2A} (BRUNDEGE; DUNWIDDIE, 1997; OÑATIBIA; MARTÍNEZ; FRANCO, 2016).

Um estudo precursor, realizado em modelo animal com macacos, demonstrou que os animais tratados sistemicamente, com doses baixas e intermediárias de 8-fenilteofilina, teofilina, cafeína, 8-ciclopentena-teofilina e isobutil-l-metilxantina, apresentaram melhora na atividade locomotora que foi suprimida por altas doses de 5'-N-etilcarboxamida adenosina (NECA), indicando que esta droga pode antagonizar os efeitos supressores comportamentais de análogos da adenosina, como NECA. Com isso, sugere-se que os efeitos estimuladores psicomotores das metilxantinas estão ligados às suas ações antagônicas nos receptores de adenosina (SPEALMAN, 1988).

A neuroproteção e a ativação motora são efeitos característicos das substâncias do grupo das metilxantinas, demonstrando seu importante potencial terapêutico em doenças neurodegenerativas, além de ajudar no entendimento fisiológico de cada uma dessas vias. Estudos também demonstraram que o estímulo da atividade motora exercida por antagonistas de adenosina é inibida pelo bloqueio dos receptores de dopamina ou através da depleção desse neurotransmissor. Bem como, a estimulação motora que é induzida pelos agonistas dopaminérgicos são inibidas por agonistas adenosinérgicos e potencializadas pelos antagonistas de adenosina (FERRÉ *et al.*, 1997; FRANCO *et al.*, 2000).

A ativação de receptores adenosinérgicos A₁ e A_{2A}, pode modular o sistema dopaminérgico (DUNWIDDIE; MASINO, 2001; FISONE; BORGKVIST; USIELLO, 2004). Os receptores do tipo A₁ são vastamente distribuídos em todas as partes do cérebro (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, adenosina suprime a liberação de vários neurotransmissores (incluindo glutamato e dopamina), enquanto que a ativação pós-sináptica destes receptores induz hiperpolarização neuronal. Esta atividade inibitória aumenta sob condições neurotóxicas e assim, coloca a adenosina como um importante agente em mecanismos de neuroproteção (BRUNDEGE; DUNWIDDIE, 1997; RALEVIC; BURNSTOCK, 1998).

Os receptores A_{2A} são particularmente expressados em regiões ricas em receptores de dopamina, onde se co-localizam com receptores do tipo D_2 (FERRÉ *et al.*, 2016; FERRÉ *et al.*, 2018). A ativação de receptores A_{2A} de adenosina reduz a atividade de receptores D_2 a agonistas dopaminérgicos, incluindo o ligante endógeno dopamina (FERRÉ *et al.*, 1997; FERRÉ *et al.*, 1991b). Nos NB, a neuromodulação pela adenosina desempenha um papel crucial no controle motor (FERRÉ *et al.*, 1997). Vários estudos sobre comportamento indicam que ativação ou bloqueio de receptores A_{2A} de adenosina inibe ou estimula, respectivamente, efeitos mediados por receptores D_2 de dopamina, provavelmente por meio de interação direta entre os receptores A_{2A} de adenosina e D_2 de dopamina (BARRACO *et al.*, 1993; FERRÉ *et al.*, 1992; MORELLI *et al.*, 1994; ONGINI; FREDHOLM, 1996).

No estriado, que é a estrutura de maior entrada dos NB, receptores A_{2A} são seletivamente expressos e co-localizados com receptores D_2 de dopamina, em uma sub-população de neurônios projetados para o GP (FINK *et al.*, 1992; SCHIFFMANN *et al.*, 1991; FERRÉ *et al.*, 2016; FERRÉ *et al.*, 2018). Estes neurônios estriato-palidais constituem a via indireta, uma das duas maiores vias de saída do estriado que controla a atividade dos núcleos de saída dos NB, SNr e o núcleo entopeduncular.

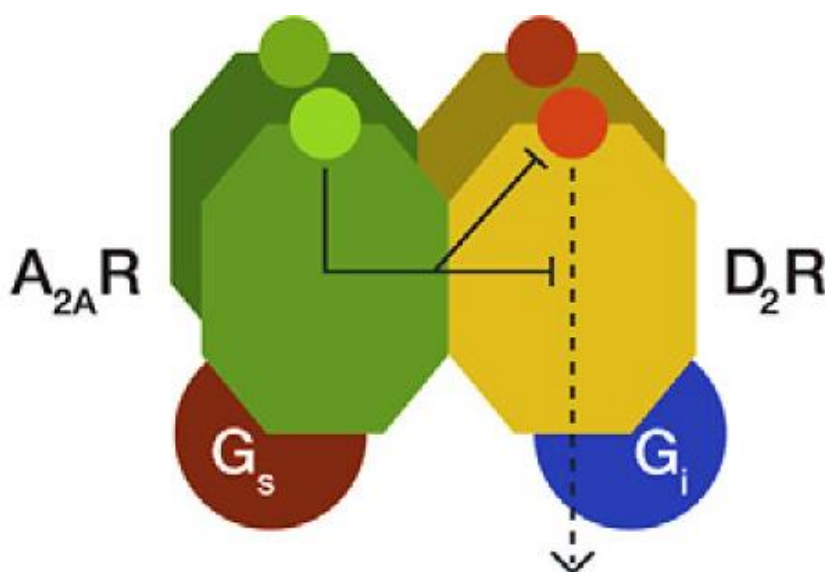


Figura 4: Esquema ilustrativo demonstrando a existência de complexos de receptores formando heterodímeros A_{2A} - D_2 , co-localizados no estriado.

Fonte: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390815002099?via%3Dihub>.

Em contraste, neurônios estriato-nigrais e estriato-entopedunculares, regulados por receptores A₁ e D₁ (FERRÉ *et al.*, 1997), constituem a via direta dos NB. As vias direta e indireta têm efeitos opostos na atividade motora (ALBIN; YOUNG; PENNEY, 1989).

Estudos que realizaram o bloqueio sistêmico de receptores A_{2A} estimularam rotações contralaterais dependentes de receptores D₁ e D₂ em ratos lesados com 6-hidroxidopamina (FENU *et al.*, 1997; PINNA *et al.*, 1996; POLLACK; FINK, 1996). Além disso, administração sistêmica de antagonistas de receptores A_{2A} reverteu catalepsia induzida por bloqueio de receptores ou depleção de dopamina e potencializou os efeitos anti-catalépticos da L-DOPA (HAUBER *et al.*, 1998; HAUBER *et al.*, 2001; KANDA *et al.*, 1994; KANDA *et al.*, 1998; SHIOZAKI *et al.*, 1999).

Os efeitos motores sinérgicos ou antagônicos mediados por ligantes de receptores A_{2A} e D₂ poderia ser explicado por interações diretas entre receptores A_{2A}-D₂ nos neurônios estriato-palidais (FERRÉ *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 A_{2A} e D₁ (FERRÉ *et al.*, 1997; PINNA *et al.*, 1996), já que os respectivos receptores estão localizados em populações separadas de neurônios estriatais. Dados de comportamento sugerem que interações entre receptores A_{2A}-D₁ (POPOLI; REGGIO; PEZZOLA, 2000) podem não ser tão fortes como as interações entre os receptores A_{2A}-D₂ (FENU *et al.*, 1997; STROMBERG *et al.*, 2000).

Por outro lado, tem sido demonstrado que agonistas de receptores de adenosina produzem hipomobilidade (DURCAN; MORGAN, 1989) e têm efeito ansiolítico em camundongos, sendo o efeito motor atribuído a receptores do A_{2A} e o efeito ansiolítico a receptores A₁ (JAIN *et al.*, 1995). Todavia, alguns agonistas induzem modificações no comportamento de forma bifásica, como por exemplo, 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 (FERRÉ *et al.*, 1991a; ZARRINDAST;

MODABBER; SABETKASAI, 1993) ou potencializar catalepsia induzida por antagonistas de dopamina (KHISTI; CHOPDE; ABRAHAM, 2000).

Normalmente, os estudos optam por utilizar vários modelos experimentais da DP, como por exemplo, a indução dos sintomas por neurotoxinas como MPTP, 6-hidroxidopamina (6-OHDA) e fármacos que bloqueiam os receptores dopaminérgicos centrais no corpo estriado, como o haloperidol, que é amplamente utilizado para induzir a DP em modelos farmacológicos da DP em animais. Esses modelos animais são bastante eficazes em induzir certos aspectos da doença, como catalepsia, desequilíbrio motor e lentidão de movimento que podem ser reproduzidos experimentalmente (FERRÉ *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2009).

O teste de catalepsia na barra é um teste simples e bastante utilizado para avaliar o estado cataléptico em roedores. A catalepsia, que é caracterizada como um estado de imobilidade muito semelhante ao observado na doença de Parkinson, é marcada pela incapacidade de um animal de se corrigir de uma postura imposta anormalmente. Embora, tal característica não está diretamente associada a DP, a catalepsia pode ser comparada à incapacidade dos pacientes de iniciar novos movimentos voluntários e, portanto, pode ser considerada como uma medida viável para experimentos em animais (MORELLI; DI CHIARA, 1985).

Outro teste bastante empregado para avaliar o desempenho locomotor em animais é o teste do Campo Aberto. Este teste baseia-se na avaliação do comportamento apresentado após a introdução do animal em um ambiente novo e aberto. Com isso, observa-se o padrão comportamental por meio da análise do número de cruzamentos e erguimentos do animal durante o teste (WALSH; CUMMINS, 1976).

2.7 Ação das metilxantinas no cérebro

As substâncias derivadas das MTXs são rapidamente absorvidas no sistema gastrointestinal e são distribuídas no sangue e nos tecidos do corpo cerca de 45 minutos após a ingestão (ARNAUD, 2011). É importante ressaltar que a cafeína pode atravessar a barreira hematoencefálica e entrar no cérebro por difusão simples ou

facilitada, da mesma maneira, a teofilina e a teobromina também podem penetrar no SNC (LIU *et al.*, 2005).

No SNC, o antagonismo de receptores de adenosina pelas MTXs parece ser o principal meio de atuação dessas substâncias, resultando em efeitos psicoestimulantes e anti-inflamatórios neurais pela antagonização de receptores adenosinérgicos (GOŁEMBIOWSKA *et al.*, 2013). Nessa perspectiva, as MTXs podem regular a ação das células microgliais e, conseqüentemente, suprimir a liberação de mediadores pró-inflamatórios e espécies reativas de oxigênio (ERO) resultantes da estimulação das células da glia (GAO *et al.*, 2002; QIN *et al.*, 2002). O estudo de Matos e colaboradores (2012), demonstrou que a exposição aguda ao agonista de receptores de adenosina A_{2A} , o CGS 21680, inibiu a recaptação sináptica de glutamato nos astrócitos, um efeito evitado pelo antagonista de receptores de adenosina A_{2A} , SCH 58261 (MATOS *et al.*, 2012).

Na última década, outras potencialidades apresentadas pelas MTXs foram descritas (RIVERA; DÍAZ, 2014), como por exemplo, foi relatado que os antagonistas dos receptores A_{2A} impedem a peroxidação lipídica e aumentam a atividade de enzimas antioxidantes nas regiões cerebrais de diferentes modelos de toxicidade neural e neurodegeneração (NOBRE *et al.*, 2010; NOSCHANG *et al.*, 2009).

As MTXs são substâncias com semelhanças químicas e que se diferenciam por seu grau de potência em estimular o SNC, seguindo uma ordem de potência: teofilina > cafeína > teobromina (ALTIMARI *et al.*, 2001; GOODMAN; GILMAN, 2006). No que se refere a drogas compostas por teofilina, destaca-se a aminofilina que é um fármaco aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) para aliviar os sintomas de obstrução reversível das vias aéreas devido a asma ou outras doenças pulmonares crônicas, como bronquite crônica e enfisema (GONDAL; ZULFIQAR, 2019), mas que também apresenta outras características consideráveis como seu efeito excitatório sobre o SNC.

2.8 Mecanismo de ação da Aminofilina

A aminofilina é uma droga do grupo das MTXs e sua ação farmacológica ainda não está completamente compreendida. Sua constituição se dá por uma combinação medicamentosa de aproximadamente 80% de teofilina e etilenodiamina, compondo assim, um sal de etilenodiamina da teofilina. A aminofilina, um complexo da teofilina com etilenodiamina, libera prontamente a teofilina no organismo. Isso ocorre pelo fato das xantinas, especificamente a teofilina, apresentarem uma solubilidade muito baixa a qual é melhorada pela formação de complexos salínicos (GOODMAN; GILMAN, 2006; BUENO, 2003).

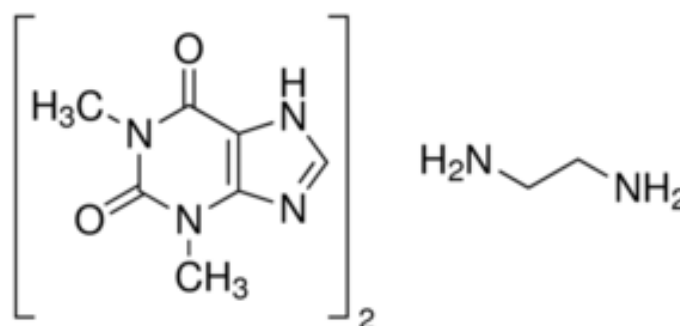


Figura 5: Estrutura molecular da aminofilina. (Fonte: Sigma Aldrich)

A estrutura química básica da teofilina consiste de um anel xantina com metilações nas posições um e três, fazendo assim parte do grupo das xantinas (ou metilxantinas) (KATZUNG, 2010). A teofilina age de três formas distintas como descrito a seguir.

(1) A teofilina causa inibição não seletiva das isoenzimas do tipo III e tipo IV da fosfodiesterase, o que leva ao aumento tecidual da adenina monofosfato cíclica (cAMP) e as concentrações de monofosfato cíclico de guanosina 3', 5', resultando em relaxamento da musculatura lisa nos pulmões e vasos pulmonares, diurese e estimulação do SNC e cardíaco (GONDAL; ZULFIQAR, 2019). (2) Além disso, em condições inflamatórias, a ação da enzima histona desacetilase (modula a inflamação) diminui por conta do estresse oxidativo, através da ativação da fosfoinositida-3-

quinase-delta (PI3K-delta) (RANJANI; VINOTHA, 2017). A teofilina aumenta a atividade e o recrutamento da enzima histona desacetilase para o local da inflamação em concentrações terapêuticas (TO *et al.*, 2010). Tal atuação diminui a transcrição de genes inflamatórios que requerem acetilação das histonas para ativar sua transcrição e também diminui a resistência aos esteróides nos macrófagos (COSIO *et al.*, 2004).

(3) Em relação ao mecanismo de ação no sistema adenosinérgico, a teofilina antagoniza fortemente o receptor de adenosina A₁, A_{2A} e com menor intensidade, antagoniza os receptores A₃. A teofilina também eleva a captação de cálcio através dos canais de cálcio mediados por adenosina no diafragma, levando a maior contração e reversão da fadiga do diafragma (POLOSA; BLACKBURN, 2009).

2.9 Ação da teofilina em modelos animais da doença de Parkinson

As evidências de que a teofilina fornece neuroproteção em pacientes com DP são limitadas, e os ensaios clínicos fornecem resultados positivos (MALLY; STONE, 1994) e negativos (KULISEVSKY *et al.*, 2002). Portanto, são necessários mais estudos em humanos. Já os benefícios neuroprotetores do consumo de teofilina demonstrados em modelos animais de DP foram atribuídos principalmente às propriedades antioxidantes de seus constituintes polifenólicos (WEINREB; MANDEL; AMIT, 2004; GUO *et al.*, 2007). No entanto, Xu *et al.* (2010) relataram que a teofilina, como antagonista dos receptores da adenosina A₁ e A_{2A}, atenuou significativamente a perda de dopamina estriatal em camundongos modelo de DP com 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), semelhante ao que a cafeína faz (XU *et al.*, 2010).

De maneira geral, a literatura mostra que o antagonismo exercido pelas MTXs tem se destacado pelo seu potencial terapêutico, não apenas por seus efeitos anti-parkinsonianos, mas também pelos interessantes conceitos que emergem desses estudos que é a capacidade do receptor A_{2A} de modular as funções neuronais e gliais para produzir efeitos neuroprotetores. Embora os dados apresentados por esses estudos destaquem claramente a complexidade envolvida na utilização terapêutica de

agentes adenosinérgicos na DP e em outros distúrbios neurodegenerativos, faz com que o tema necessite de investigação adicional (CHEN *et al.*, 2007).

Assim sendo, nosso estudo propôs testar o efeito de um antagonista não seletivo A_1 e A_{2A} de adenosina, a aminofilina, como tratamento farmacológico administrado para reverter catalepsia induzida por inibidor seletivo de receptor de dopamina D_2 , haloperidol. A catalepsia foi avaliada pelo teste de catalepsia na barra. Além disso, foram estudadas as possíveis modificações no comportamento motor decorrentes da interação destes neurotransmissores, por meio do teste do Campo Aberto.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da inibição intracerebral de receptores de adenosina com aminofilina, antagonista de adenosina A₁ e A_{2A}, nas alterações motoras induzidas em um modelo farmacológico da doença de Parkinson.

3.2 Objetivos específicos

- a) - Avaliar o efeito do antagonista de receptores de adenosina não seletivo A₁ e A_{2A} aminofilina, aplicado por via intracerebral (i.c.), no comportamento de catalepsia em camundongos, induzida por inibição de receptores de dopamina por haloperidol;
- b) - Estudar a interação entre os neurotransmissores adenosina e dopamina, sobre o comportamento motor em camundongos, por meio do teste do Campo Aberto.

4 METODOLOGIA

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

4.1 Animais

Neste experimento foram utilizados 60 camundongos Suíços, machos, oriundos do Biotério Central da UFMS, pesando entre 30-40g. Os animais foram mantidos, no biotério, com água e comida *ad libitum* até o início dos testes. O ciclo de luz (12/12hs, luzes ligadas às 6:00h e desligadas às 18:00h) e a temperatura ambiente ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$) foram controlados. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMS, sob nº 1.079/2019 (Anexo 1).

4.2 Drogas

Antagonista de receptores D₂ de dopamina: Haloperidol (Haldol-Janssen-Cilag) foi administrado por via intraperitoneal; antagonista não seletivo de receptor de adenosina A₁ e A_{2A}: Aminofilina (Aminophylline-Research Biochemicals International), nas doses de 60nM e 120nM. Como não foram encontrados artigos que utilizassem esta droga por via intracerebral, as doses de aplicação da aminofilina foram calculadas a partir da utilização da mesma proporção de conversão entre uma dose intraperitoneal e uma dose intracerebral, usando como base outras drogas que foram usadas pelas duas vias de administração (DEL BEL *et al.*, 2004). Todas as drogas foram dissolvidas em solução salina a 0,9%.

4.3 Via de administração das drogas

As drogas foram administradas por via intraperitoneal (i.p.) ou por via intracerebral (i.c.), conforme técnica descrita a seguir.

4.3.1 Cirurgia estereotáxica e aplicação via intracerebral das drogas

Os animais foram submetidos a uma cirurgia estereotáxica, sete dias antes da realização dos testes, para implantação bilateral de cânulas guia de aço inoxidável. Para isso, os animais foram anestesiados, via i.p., com cetamina (100mg/kg) e xylasina (10mg/kg), em volume de aplicação de 10mL/kg para cada animal. Em seguida, realizou-se a tricotomia na cabeça do animal para facilitar a cirurgia e evitar possíveis infecções. Os camundongos foram adaptados a um aparelho estereotáxico (Insight Equipamentos, Pesquisa e Ensino. Ribeirão Preto, Brasil) e com o auxílio de duas barras auriculares, a cabeça do animal foi colocada em posição fixa. Após a assepsia da pele da cabeça com solução de álcool iodado, foi feita uma incisão longitudinal para exposição da calota craniana, expondo a linha do bregma que foi utilizada como parâmetro para que o estriado fosse localizado. A introdução das cânulas guia foi realizada segundo as coordenadas obtidas do Atlas de Paxinos e Watson (1986): anterior 0,5 mm, lateral 2,5mm e, vertical 2,7mm do bregma. As cânulas guias (10 mm) foram confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas (25x0,6 mm) e fixadas ao crânio do animal com resina acrílica de uso odontológico (Figura 8), ancorada por pequenos parafusos de aço inox, previamente introduzidos no osso. Nestes pontos, foi feita uma trepanação do osso do crânio com uma broca odontológica esférica acoplada a um motor de baixa rotação, abrindo um orifício de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro. Após a completa secagem e fixação da cânula, a torre do estereotáxico foi removida e, para impedir a obstrução da cânula guia até a realização dos experimentos, foi introduzida na mesma um mandril (10 mm) também de aço inoxidável. Terminada a cirurgia cerebral, cada animal foi devolvido em sua gaiola individual.

Logo após a cirurgia e até o terceiro dia subsequente a ela, os animais receberam terapia analgésica, via i.p., por meio de injeções de buprenorfina, na dose de 0,05mg/kg, a cada 8 horas. No sétimo dia após a cirurgia, com o animal acordado, a injeção da droga ou salina foi administrada e para isso, os obturadores foram retirados e uma cânula de injeção, ligada a uma bomba de microinfusão, foi baixada pela cânula guia até o estriado. Aminofilina ou salina foi infundida bilateralmente no estriado (1µl por hemisfério), com uma taxa de infusão de 0,5µl/minuto (Figura 10). Após o término da infusão da droga, foi realizada uma pausa de 1 minuto para retirada cânula de injeção. Na sequência, o animal seguiu para realização dos testes comportamentais.

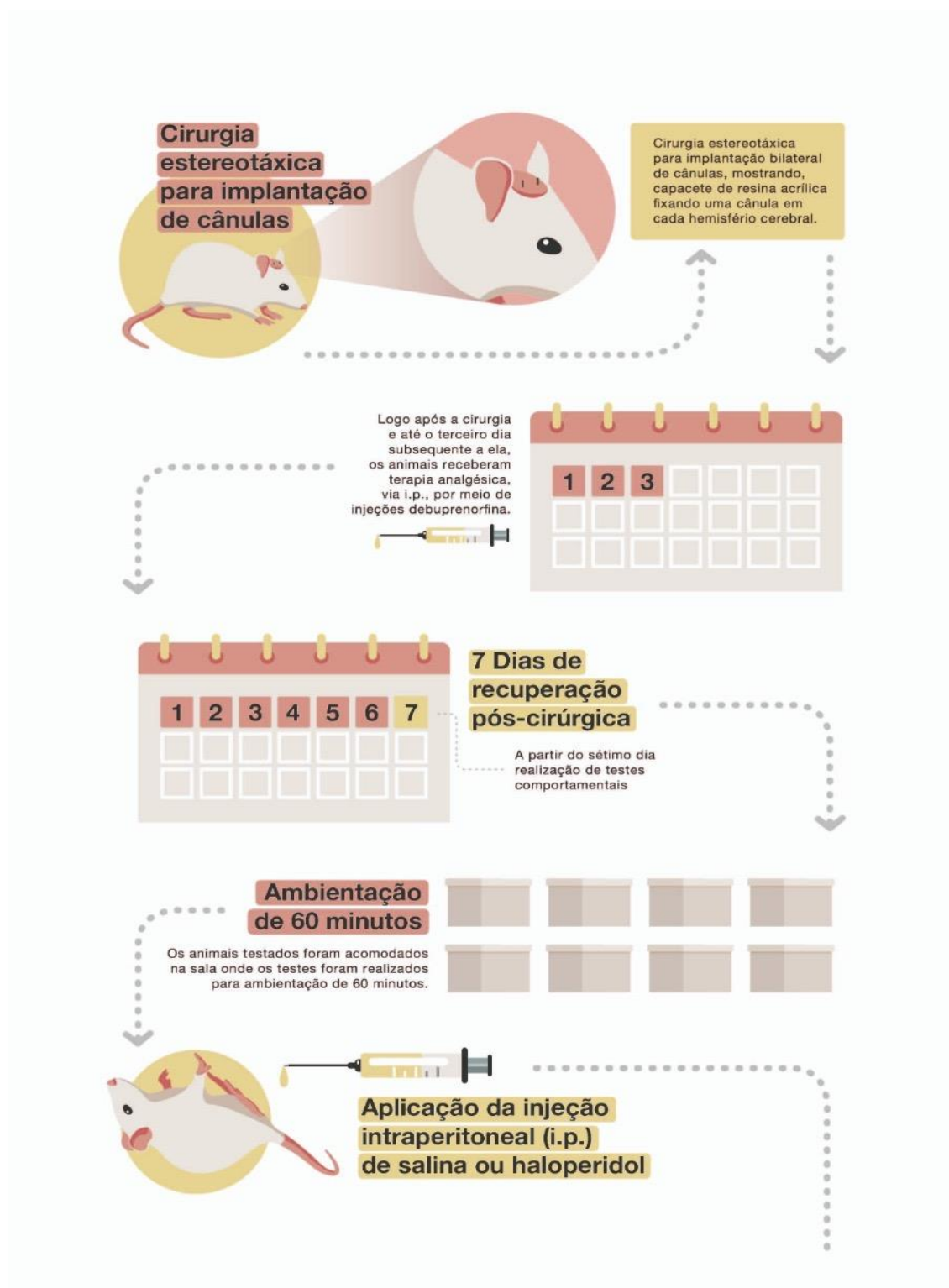


Figura 6 – Esquema ilustrativo do experimento. Cirurgia estereotáxica. Arte: Lucas Santos

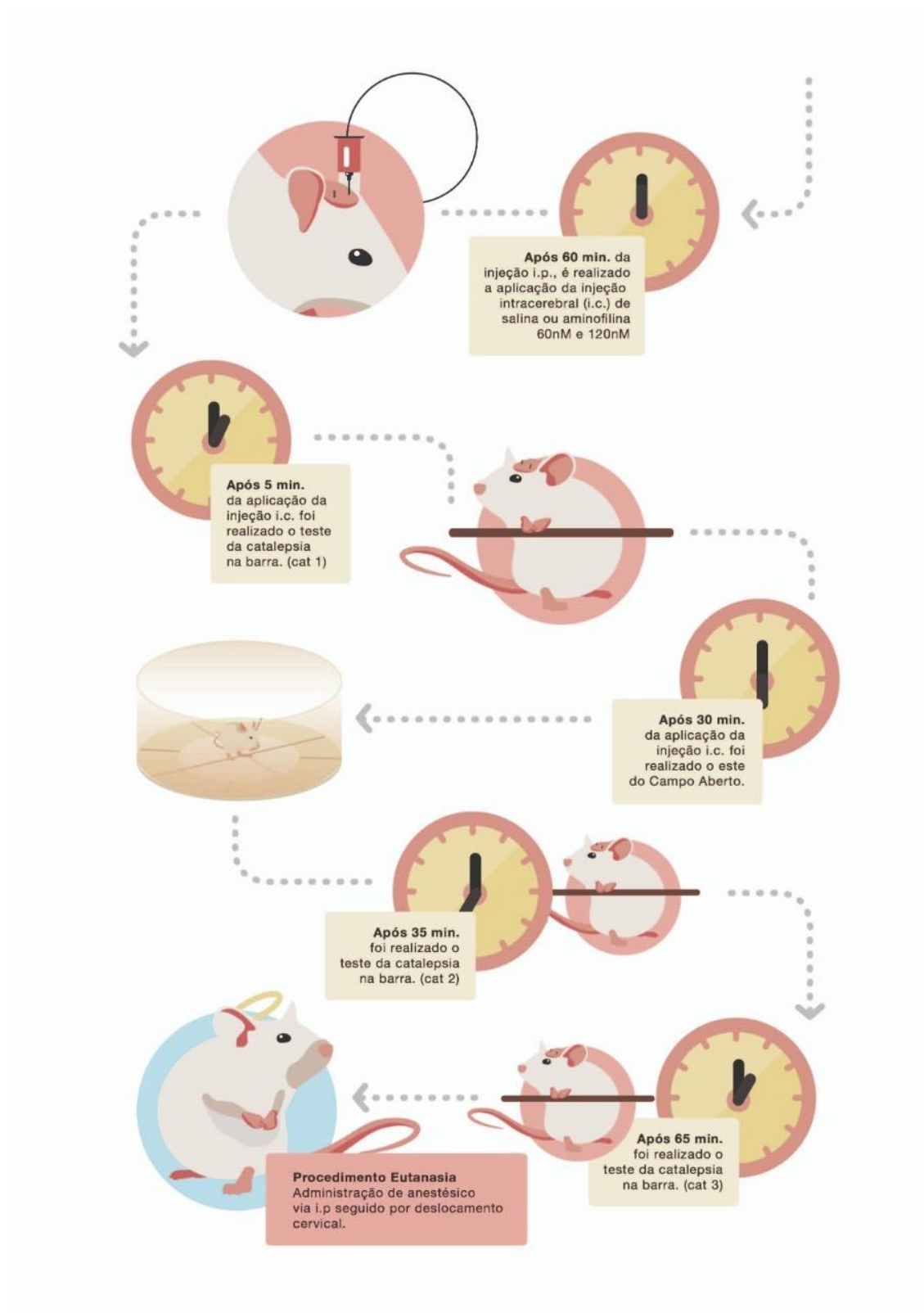


Figura 7 – Esquema ilustrativo do experimento. Testes comportamentais. Arte: Lucas Santos.

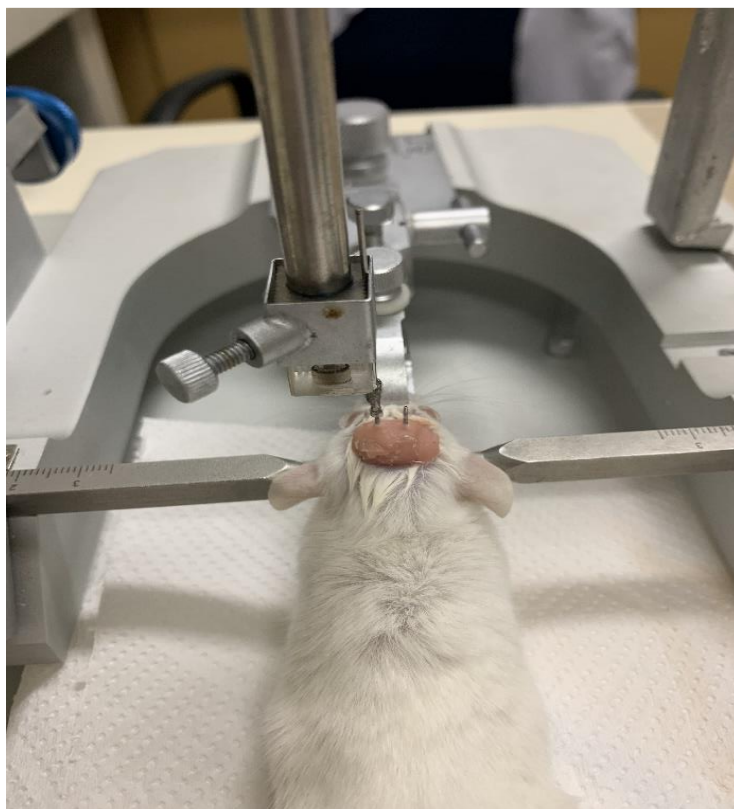


Figura 8: Cirurgia estereotáxica para implantação bilateral de cânulas, mostrando, capacete de resina acrílica fixando uma cânula em cada hemisfério cerebral. Fonte: Própria.

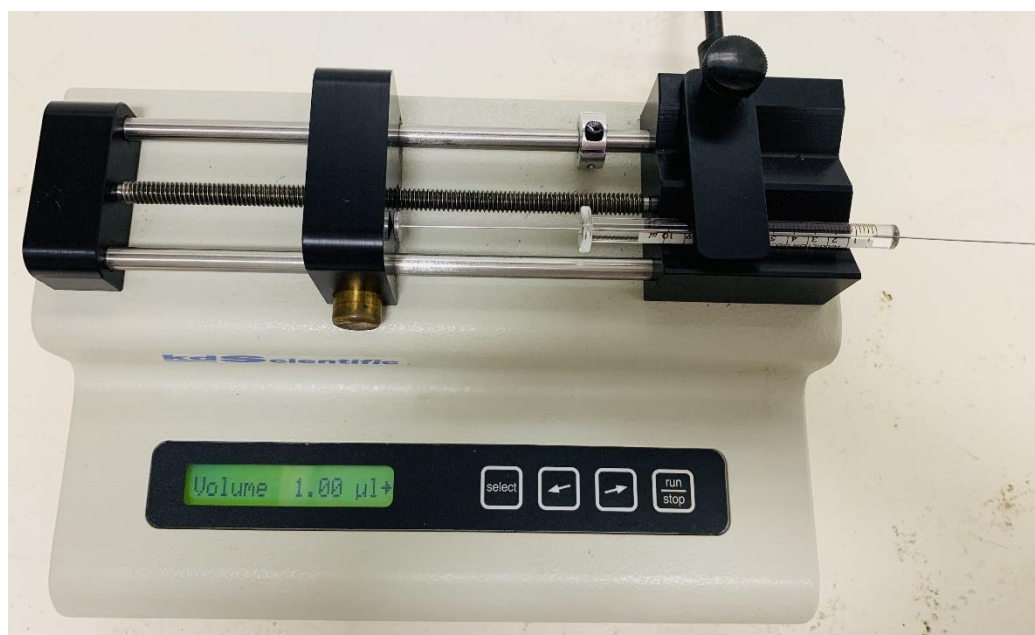


Figura 9: Bomba de microinfusão, utilizada injeção intracerebral de substâncias. Programada para aplicação de 1 µl. (Fonte: Própria)



Figura 10: Animal com a cânula de injeção inserida no hemisfério esquerdo, durante infusão de aminofilina na dose 120nM. Fonte: Própria

4.4 Experimentos e grupos experimentais

O protocolo experimental foi realizado com 6 grupos, como descritos a seguir, sendo cada grupo constituído de 10 camundongos, que foram distribuídos randomicamente em cada um dos grupos experimentais. Cada animal foi utilizado somente em um dos grupos experimentais.

4.4.1 Experimento: Efeito da aminofilina na catalepsia e nas alterações do comportamento motor induzidas pelo haloperidol

Neste experimento os animais receberam injeção i.p. de solução salina, ou haloperidol (1mg/kg), seguida pela aplicação i.c. de solução salina ou de aminofilina (60 e 120nM). As aplicações i.c. foram sempre no volume de 1 µl por hemisfério. Foram realizados os seguintes grupos experimentais.

Grupo 1 – Sal/sal (n=10): os animais receberam injeção i.p. de solução salina e após 60 minutos, outra injeção i.c. de solução salina;

Grupo 2 – Sal/amino 60nM (n=10): os animais receberam injeção i.p. de solução salina e após 60 minutos, injeção i.c. de aminofilina na dose de 60nM;

Grupo 3 - Sal/amino 120nM (n=10): os animais receberam injeção i.p. de solução salina e após 60 minutos, injeção i.c. de aminofilina na dose de 120nM;

Grupo 4 – Hal/sal (n=10): os animais receberam injeção i.p. de haloperidol (1mg/kg) e após 60 minutos, injeção i.c. de solução salina;

Grupo 5 – Hal/amino 60nM (n=10): os animais receberam injeção i.p. de haloperidol (1mg/kg) e após 60 minutos, injeção i.c. de aminofilina na dose de 60nM;

Grupo 6 - Hal/amino 120nM (n=10): os animais receberam injeção i.p. de haloperidol (1mg/kg) e após 60 minutos, injeção i.c. de aminofilina na dose de 120nM.

Injeção intraperitoneal	Injeção intracerebral
Salina	Salina (G1)
	Aminofilina 60nM (G2)
	Aminofilina 120nM (G3)
Haloperidol	Salina (G4)
	Aminofilina 60nM (G5)
	Aminofilina 120nM (G6)

Figura 11 – Quadro ilustrativo demonstrando os grupos experimentais.

4.5 Avaliação funcional dos animais

A avaliação funcional dos animais após a aplicação da droga ou de solução salina, foi realizada por meio do teste de catalepsia (ZARRINDAST; MODABBER; SABETKASAI, 1993) e do teste do Campo Aberto (WALSH; CUMMINS, 1976; WHIMBEY; DENENBERG, 1967). Os testes de comportamento foram realizados no Laboratório de Biofisiofarmacologia Inbio/UFMS, sempre no mesmo período do dia e horário (das 13h às 16h), na mesma sala de testes e pelo mesmo avaliador treinado, como descritos a seguir.

4.5.1 Teste de catalepsia na barra

A catalepsia foi avaliada de acordo com método da barra (Figura 12), no qual o camundongo foi posicionado com ambas as patas anteriores sobre uma barra de metal, 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 permaneceu 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 i.c. de salina ou aminofilina.



Figura 12: Avaliação funcional pelo teste da catalepsia na barra. Fonte: Própria

4.5.2 Teste do Campo Aberto

Este teste foi utilizado para avaliar o estado motor do animal e foi realizado após 35 minutos da retirada da cânula de injeção i.c. da droga ou solução salina. 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, demonstrou que a quantidade de bolos fecais expelidos pelo animal eram relacionados 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 deambulação e o comportamento exploratório do animal, e negativamente relacionados com o medo e a quantidade de bolos fecais expelidos durante o teste (GRAY, 1987). Outros parâmetros de avaliação foram sendo gradativamente acrescentados ao teste, sendo que atualmente, mais de 30 itens são listados neste teste (WALSH; CUMMINS 1976).

Em nosso laboratório, os parâmetros avaliados durante a realização do teste do Campo Aberto foram: (1) a frequência dos comportamentos de exploração horizontal – número de quadrantes percorridos – (Figura 13) e (2) a exploração vertical – número de erguimentos – (Figura 14), com duração de 300 segundos. O teste foi realizado após 30 minutos da aplicação i.c. da droga ou de solução salina. Para o início do teste, os animais avaliados foram posicionados na região central de 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 13: Teste do Campo Aberto. Exploração horizontal. (Fonte: Própria)

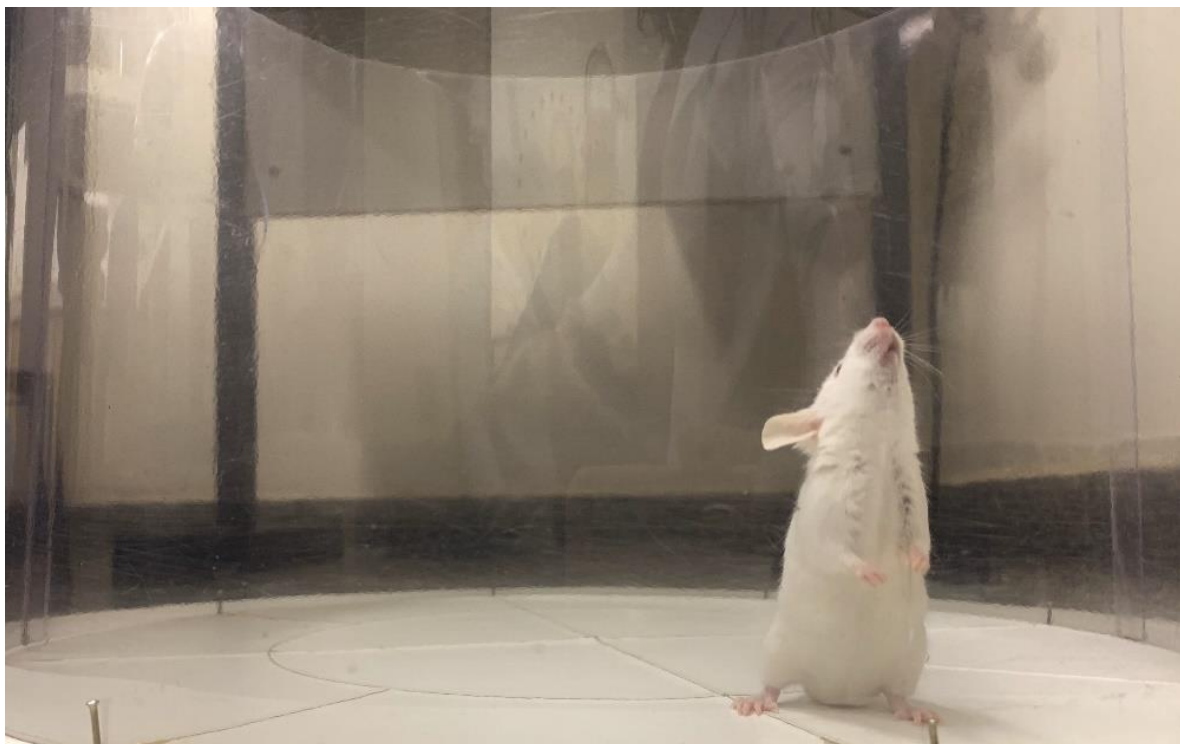


Figura 14: Teste do Campo Aberto. Exploração vertical. (Fonte: Própria)

4.6 Descarte dos animais

Após os procedimentos experimentais, os animais foram anestesiados, via i.p., com cetamina (100mg/kg) e xilasina (10mg/kg), em volume de aplicação de 10mL/kg para cada animal. Então, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e em seguida encaminhado para incineração, que foi realizada pela equipe responsável pelo lixo biológico da UFMS.

4.7 Análise estatística

A avaliação do efeito do grupo experimental (salina ou haloperidol), o efeito do momento de análise (5, 35 e 65 minutos) e a interação entre estes fatores, em relação ao tempo de catalepsia na barra, 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 (quadrantes percorridos) e de exploração vertical (erguimentos), no teste

do Campo Aberto, foi realizada por meio do teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey. Os demais resultados deste estudo foram apresentados na forma de estatística descritiva ou na forma de tabelas e gráficos. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SigmaPlot, versão 12.5, considerando um nível de significância de 5% (NORMAN, 1994; SHOTT, 1990).

5 RESULTADOS

Os resultados referentes ao tempo de catalepsia em cada momento após a aplicação das drogas e em cada grupo experimental, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados referentes ao tempo de catalepsia em cada momento após a aplicação das drogas e em cada grupo experimental.

Grupo	Momento após a aplicação das drogas			Difer.
	5'	35'	65'	
Sal.+sal.	5,50±2,30	6,20±2,10	15,80±8,89	b
Sal.+aminof. 60nM	0,30±0,21	0,00±0,00	0,90±0,60	b
Sal.+aminof. 120nM	1,60±0,79	0,90±0,48	6,90±4,67	b
Halop.+sal.	70,40±21,63	149,50±27,51	172,90±27,69	A
Halop.+aminof. 60nM	28,90±23,63	22,00±12,81	36,10±22,06	b
Halop.+aminof. 120nM	13,00±8,11	13,30±7,34	23,50±13,60	B

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

Na análise dos dados, houve efeito do grupo experimental (teste ANOVA de duas vias de medidas repetitivas, efeito do grupo: $p<0,001$), porém, sem efeito significativo do momento de análise ($p=0,209$) e sem interação significativa entre grupo e momento de análise ($p=0,831$). De forma geral, o tempo de catalepsia nos animais que receberam haloperidol+salina foi maior do que aquele observado nos animais dos demais grupos experimentais, incluindo os animais dos grupos haloperidol+aminofilina, tanto na dose de 60nM, como na dose de 120nM. Estes resultados indicam assim, uma reversão total da catalepsia induzida por haloperidol, nos três momentos avaliados (5, 35 e 65 minutos). Estes resultados estão ilustrados na Figura 15.

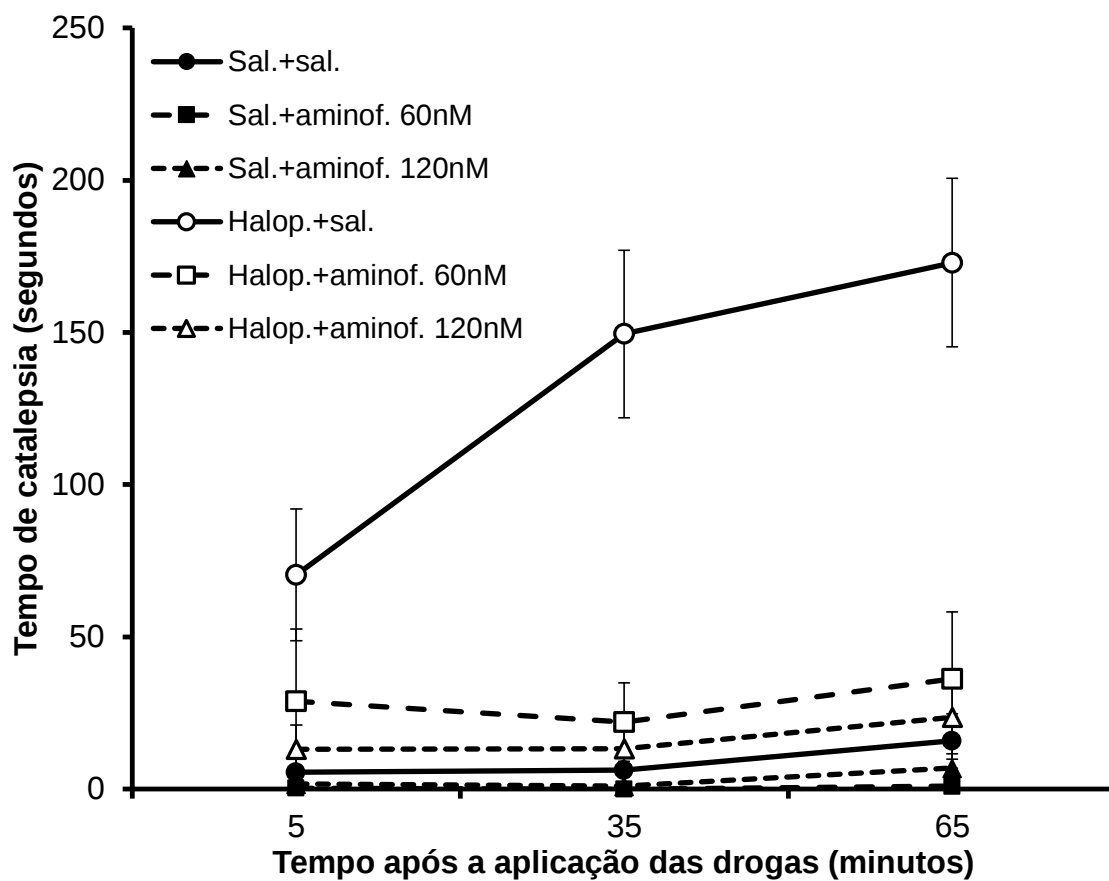


Figura 15: Gráfico ilustrando o tempo de catalepsia para os grupos experimentais, mensurados em 5, 35 e 65 minutos após a aplicação das drogas. Cada símbolo representa a média e a barra o erro padrão da média.

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados referentes à quantidade de quadrantes percorridos e erguimentos, em cada grupo experimental.

Tabela 2: Resultados referentes à quantidade de quadrantes percorridos e erguimentos, em cada grupo experimental.

Grupo experimental	Comportamento	
	Quadrantes percorridos	Erguimentos
Sal.+sal.	113,40±11,88b	41,50±6,68a
Sal.+aminof. 60nM	154,20±6,87a	51,90±8,09a
Sal.+aminof. 120nM	92,70±7,39b	14,40±3,10b
Halop.+sal.	18,40±3,53c	6,80±2,53b
Halop.+aminof. 60nM	38,50±11,38c	10,50±3,73b
Halop.+aminof. 120nM	36,10±4,15c	4,60±0,86b
Valor p	<0,001	<0,001

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão da média. Valor de p no teste ANOVA de uma via. Letras minúscula diferentes na coluna indicam diferença significativa entre os grupos experimentais, no mesmo comportamento (pós-teste de Tukey, $p<0,05$).

Houve diferença significativa entre os grupos experimentais, em relação ao número de quadrantes percorridos pelos animais (teste ANOVA de uma via, $p<0,001$), sendo que os animais do grupo salina+aminofilina, na dose de 60nM percorreram mais quadrantes que os animais dos demais grupos experimentais (pós-teste de Tukey, $p<0,05$). Além disso, os animais dos grupos haloperidol+salina, haloperidol+aminofilina 60nM e haloperidol+aminofilina 120nM, percorreram menos quadrantes que os animais dos grupos salina+salina e salina+aminofilina, na dose de 120nM ($p<0,05$). Estes resultados indicam um efeito estimulante da aminofilina na dose de 60nM e que ambas as doses de aminofilina não foram capazes de reverter os efeitos motores induzidos pelo haloperidol.

Em relação ao número de erguimentos no campo aberto, também houve diferença entre os grupos experimentais (teste ANOVA de uma via, $p<0,001$), sendo que os animais dos grupos salina+aminofilina 120nM, haloperidol+salina, haloperidol+aminofilina 60nM e haloperidol+aminofilina 120nM, realizaram menos

erguimentos que aqueles dos grupos salina+salina e salina+aminofilina 60nM (pós-teste de Tukey, $p < 0,05$) (Figura 16). Estes resultados indicam que ambas as doses de aminofilina não foram capazes de reverter os efeitos motores induzidos pelo haloperidol, além do que aminofilina sozinha diminuiu o número de erguimentos na dose de 120nM.

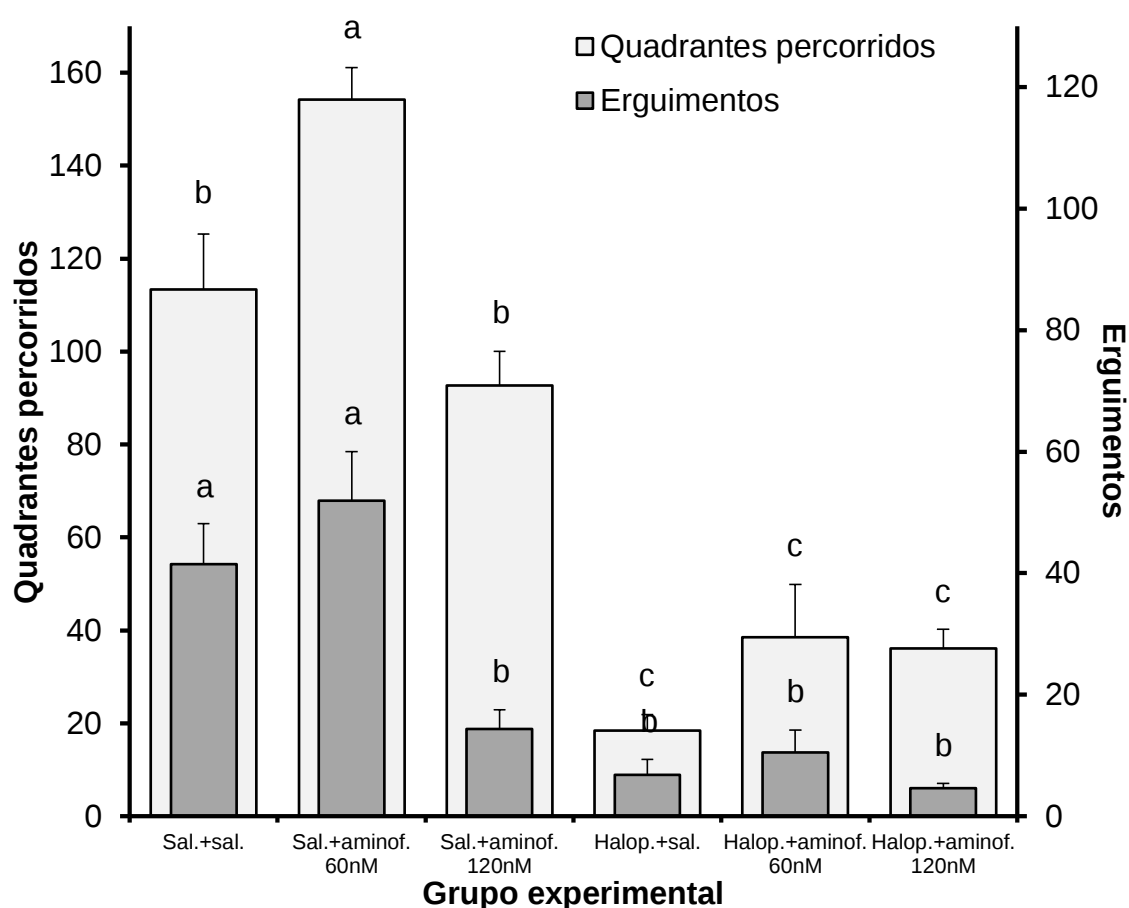


Figura 16: Gráfico ilustrando o número de quadrantes percorridos (exploração horizontal) e erguimentos (exploração vertical) para os grupos experimentais, mensurados 30 minutos após a aplicação das drogas.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, o antagonista seletivo de receptores dopaminérgicos D₂, haloperidol, causou catalepsia e outras alterações motoras nos animais. A catalepsia, que foi avaliada pelo teste de catalepsia na barra, foi totalmente revertida por aminofilina, um antagonista não seletivo de receptores adenosinérgicos dos subtipos A₁ e A_{2A}, nas doses de 60nM e 120nM. Entretanto, o teste do Campo Aberto evidenciou que as alterações motoras, apresentadas pelos animais, em decorrência ao tratamento com haloperidol, não foram revertidas após a aplicação i. c. de aminofilina, em ambas as doses testadas (60nM e 120nM).

A DP é uma doença da função motora extrapiramidal, causada por degeneração severa e morte de neurônios dopaminérgicos da substância negra. Essa perda neuronal dopaminérgica e o acúmulo intraneuronal de proteínas alfa-sinucleína (α -Syn) desempenham um papel primordial na fisiopatologia da DP. Esta condição neurodegenerativa crônica afeta cerca de 1% de todos os indivíduos com idade superior a 60 anos (NASROLAHI *et al.*, 2019) e apresenta um conjunto de distúrbios motoras e não motoras, cujos sintomas podem incluir a bradicinesia, rigidez, tremor em repouso (sinais cardinais), instabilidade postural, hiposmia, distúrbios no sono, sintomas gastrointestinais e depressão (SALAMONE, 2010; NASROLAHI *et al.*, 2019).

Apesar de se passarem 200 anos desde a primeira descrição da DP, sua etiologia e o mecanismo de perda neuronal na doença ainda não estão bem esclarecidos. Bem como, os tratamentos capazes de retardar ou interromper a progressão da doença ainda não foram desenvolvidos. Além disso, o diagnóstico preciso em indivíduos com a DP é difícil, especialmente em pacientes que estão em estágios iniciais, pois, cerca de 60-80% dos neurônios dopaminérgicos mesencefálicos são perdidos antes da aparição de sintomas motores da DP (SVEINBJORNSDOTTIR, 2016).

A terapia de reposição de dopamina com L-DOPA permanece como o mais efetivo tratamento para a DP (FAHN, 2008; OLANOW, 2008; LIN; LAURENO, 2019). Entretanto, novos avanços para o tratamento das distúrbios de movimentos, baseados em manipulações de sistemas não dopaminérgicos, têm sido propostos,

dentre os quais destacam-se os sistemas glutamatérgicos, canabinóides, adenosinérgicos, adrenérgicos, histaminérgicos, opióides e colinérgicos nicotínicos e muscarínicos. (BROTCHIE, 2005; JENNER, 2008; CACCIATORE *et al.*, 2018). Com isso, o desenvolvimento de novas terapias medicamentosas tem foco em fármacos que sejam capazes de prevenir os efeitos adversos apresentados pelo uso prolongado de L-DOPA, que sejam neuroprotetores e que interrompam ou retardem a progressão da DP (MUNHOZ *et al.*, 2015).

Na presente investigação, foi observado que o emprego do antagonista dopaminérgico haloperidol causou catalepsia e hipolocomoção, com diminuição da exploração horizontal e da exploração vertical apresentadas pelos animais do grupo haloperidol+salina. Assim, como observado em nossos resultados, o estudo de González *et al.* (2010) e de Sharma *et al.* (2018), também demonstraram que os grupos tratados com haloperidol, por via i.p., apresentaram um aumento no tempo do teste de catalepsia na barra, em comparação com o grupo de controle. Os achados hipocinéticos observados em nosso estudo também são coerentes com experimentos anteriores, os quais constataram que a inibição de receptores de dopamina dos núcleos basais do encéfalo produz catalepsia e hipocinesia em animais (HAUBER *et al.*, 2001; DEL BEL *et al.*, 2002). Estes sintomas são semelhantes àqueles observados em pacientes com DP (WANG *et al.*, 2009).

Um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa utilizou haloperidol por via i. p. para induzir catalepsia em camundongos e administrou aminofilina, também por via i. p., nas doses (6 e 12mg/kg), para reversão dos sintomas. Com isso, os resultados obtidos demonstraram que a inibição de receptores de dopamina produziu catalepsia nos animais, a qual foi totalmente revertida pela aplicação de aminofilina (6 e 12mg/kg) no tempo de 30 minutos e parcialmente revertida nos tempos de 60 e 90 minutos após a aplicação das drogas. O que sugeriu a potencialidade desse fármaco em tratar os sintomas da DP em modelos animais (Dados não publicados).

No presente estudo a aminofilina mostrou-se eficaz na reversão da catalepsia induzida por haloperidol, sendo que esta reversão foi total em ambas as doses utilizadas (60nM e 120nM) para os grupos haloperidol+aminofilina, não apresentando diferença entre os tempos avaliados, demonstrando que o efeito da aplicação i.c. de aminofilina se manteve estável nos três momentos avaliados (5, 35 e 65 min.).

Diferentemente, os resultados obtidos com o teste do Campo Aberto, referentes à quantidade de quadrantes percorridos e erguimentos, constatou que houve diferença entre os grupos experimentais, com um aumento no número de quadrantes percorridos pelos animais do grupo salina+aminofilina, na dose de 60nM em relação aos demais grupos experimentais. Além disso, os animais dos grupos que foram tratados sistemicamente com haloperidol, percorreram um número menor de quadrantes e realizaram menos erguimentos do que os animais que não receberam haloperidol, mesmo os grupos que receberam injeção i.c. com aminofilina nas doses de 60nM e 120nM. Assim, estes resultados indicam o efeito obtido em ambas as doses de aminofilina não foi capaz de reverter os efeitos motores induzidos pelo haloperidol avaliados pelo teste do Campo Aberto.

Estudos pioneiros sobre as interações entre os sistemas adenosinérgico e dopaminérgico, demonstraram que as alterações nessas neurotransmissões no sistema nigro-estriatal podem ser umas das bases patogênicas das desordens extrapiramidais, assim como ocorre na DP (DUNWIDDIE; MASINO, 2001; FISONE; BORGKVIST; USIELLO, 2004). Nos NB, a adenosina é um importante neuromodulador, desempenhando um papel crucial no controle motor e promovendo a atividade locomotora (FERRÉ *et al.*, 1997). Estudos sobre comportamento indicam que ativação ou bloqueio de receptores A_{2A} de adenosina pode inibir ou estimular, respectivamente, efeitos mediados por receptores D_2 de dopamina, provavelmente por meio de interação direta entre os receptores A_{2A} de adenosina e D_2 de dopamina (BARRACO *et al.*, 1993; FERRÉ *et al.*, 1992; MORELLI *et al.*, 1994; ONGINI; FREDHOLM, 1996).

No SNC, os receptores de adenosina desempenham um papel fundamental na modulação da neurotransmissão dopaminérgica. Isto ocorre, principalmente, pela co-localização estratégica de diferentes subtipos de receptores de adenosina e dopamina nas duas populações de neurônios estriatais eferentes, estriatonigral e estriatopalidal, que dão origem às vias eferentes diretas e indiretas, respectivamente. Assim, o neurônio estriatopalidal expressa seletivamente os receptores D_2 de dopamina e os receptores de adenosina A_{2A} , vários experimentos usando múltiplas abordagens genéticas e farmacológicas *in vitro*, *in situ* e *in vivo*, demonstram que receptores A_{2A} e D_2 podem formar heterômeros (FERRÉ *et al.*, 2018).

O estudo de Mandhane *et al.* (1997), induziu a catalepsia com haloperidol e testou os efeitos anti-catalépticos de antagonistas e agonistas de receptores A₁ e A₂ de adenosina. Os animais foram pré-tratados (i.p.) com o antagonista não seletivo do receptor de adenosina, teofilina ou com o antagonista seletivo do receptor de adenosina A₂, o 3,7-dimetil-1-propargilxantina (DMPX), como resultado desse tratamento, obteve-se uma reversão significativa da catalepsia induzida por haloperidol, o que corrobora com os nossos resultados, em que a aminofilina (fármaco composto por teofilina) apresentou uma reversão total no estado cataléptico dos animais que receberam haloperidol por via i. p.

Ainda no estudo Mandhane *et al.* (1997), outro experimento avaliou os efeitos dos antagonistas seletivos dos receptores de adenosina A₁, o 8-fenilteofilina e o 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina, demonstrou que essas drogas não produziram efeitos anti-catalépticos. Já a administração dos agonistas de receptores de adenosina A₂, o 5'- (N-ciclopropil)-carboxamidoadenosina e o 5'-N-etilcarboxamidoadenosina (NECA), potencializaram a catalepsia induzida por haloperidol. Além disso, em doses mais altas dos agonistas de receptores adenosinérgicos, produziram catalepsia quando administrados isoladamente. No entanto, a N6-ciclopentiladenosina, um agonista altamente seletivo do receptor de adenosina A₁, foi ineficaz nesse aspecto. Dessa maneira, tais achados demonstram a diferente influência dos receptores de adenosina A₁ e A₂ na catalepsia induzida por haloperidol (MANDHANE *et al.*, 1997).

O estudo de Trevitt *et al.* (2009), realizou dois experimentos, os quais compararam os efeitos sistêmicos de antagonistas de adenosina em um modelo de roedores com sintomas parkinsonianos. No primeiro experimento, foram avaliados os efeitos do antagonista de receptores de dopamina D₂, haloperidol, que foi utilizado para induzir catalepsia nos animais. Assim, o estudo evidenciou que o tratamento com cafeína, antagonista de receptores de adenosina, reduziu significativamente a catalepsia. Da mesma maneira, o tratamento com o CPT, antagonista seletivo para receptores adenosinérgicos A₁ e o SCH58261, antagonista seletivo para receptores de adenosina A_{2A}, também produziram uma redução significativa na catalepsia. Este mesmo estudo, realizou um segundo experimento, onde o haloperidol foi usado para suprimir a atividade locomotora avaliada pelo teste do Campo Aberto. O tratamento com cafeína aumentou significativamente a locomoção reduzida pelo haloperidol, mas não em todas as doses testadas (TREVITT *et al.*, 2009). Tal achado, foi

diferente do observado em nosso estudo, que demonstrou que a aminofilina, antagonista de receptores de adenosina do A₁ e A_{2A}, que assim como a cafeína, também derivada das MTXs, não foi capaz de reverter as alterações motoras induzidas por haloperidol, avaliadas no teste do Campo Aberto.

Entretanto, os mesmos autores apontaram que tratamento com SCH58261 não foi capaz de aumentar significativamente a atividade locomotora em animais tratados com haloperidol em qualquer dose testada, o que demonstrou resultados inesperados, pois o padrão geral sugere que os antagonistas de adenosina seriam terapias úteis para tratar sintomas parkinsonianos, pois eles parecem aumentar a atividade locomotora (TREVITT *et al.*, 2009).

Outro estudo que apoia nossos achados foi realizado por Gonzaléz *et al.* (2010), realizado em 118 ratos Wistar e demonstrou que a catalepsia induzida por haloperidol, foi revertida pela administração sistêmica de altas doses de teofilina associada a benztropina (antagonista colinérgico), resultando em significativa redução na intensidade da catalepsia (reversão parcial), nos animais avaliados pelo teste de catalepsia na barra. Já em nosso estudo, a administração de aminofilina, foi capaz de reverter totalmente a catalepsia mesmo sem a associação com droga anticolinérgica (também apresenta ação anti-cataléptica), o que pode indicar uma maior eficácia devido a via de aplicação i.c.

No ensaio realizado por Ferré *et al.* (2018) as evidências indicaram que as interações adenosinérgicas e dopaminérgicas podem ser explicadas pela predominante população de receptores heterômeros estriatais, A_{2A}-D₂, formando complexos com adenilil ciclase, subtipo 5. O heterômero A_{2A}-D₂ possui uma estrutura tetramérica, com dois homodímeros, o que permite múltiplas interações alostéricas entre diferentes ligantes, agonistas e antagonistas. O modelo apresentado no estudo pode explicar a maioria dos efeitos comportamentais dos ligantes de receptores A_{2A} e D₂, incluindo os efeitos psicoestimulantes da cafeína e da teofilina. (FERRÉ *et al.*, 2018).

Atualmente, o conhecimento acumulado sobre propriedades bioquímicas do complexo de receptores heterotetrâmero A_{2A}-D₂, oferece novas possibilidades terapêuticas para a doença de Parkinson e outros distúrbios neuropsiquiátricos que apresentam disfunção dos neurônios estriatopálidais (FERRÉ *et al.*, 2018). Assim,

fornecendo dados essenciais para realização de novas pesquisas que aumente a compreensão neurofisiologia dos NB.

7 CONCLUSÃO

O Haloperidol, como antagonista dopaminérgico, teve efeito cataléptico e alterou significativamente a exploração horizontal e vertical dos animais reproduzindo os sintomas da Doença de Parkinson nos animais, confirmando esse modelo farmacológico da DP. O efeito cataléptico foi revertido pela aplicação de aminofilina por via intracerebral, no estriado dos animais. Entretanto, a aminofilina não mostrou-se eficaz para reverter os sintomas hipocinéticos, nos animais, avaliados pelo teste do Campo Aberto, nas doses administradas por este estudo. Tal achado, sugere que outras doses de aminofilina sejam testadas com intuito de reverter as alterações motoras induzidas por modelo farmacológico da DP com haloperidol.

Portanto, mais estudos são necessários para demonstrar a efetividade de antagonistas de receptores de adenosina, assim como a aminofilina, na reversão das alterações motoras em modelos animais da doença de Parkinson e na melhor compreensão dos mecanismos de ação dessa droga nos núcleos da base do encéfalo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBIN, R. L.; Young, A. B.; Penney, J. B. The functional anatomy of basal ganglia disorders. **Trends Neurosci**, v. 12, n. 10, p. 366-375, 1989.
- ALTIMARI, L.R.; CYRINO, E.S.; ZUCAS, S.M.; OKANO, A.H.; BURINI, R.C. Cafeína: ergogênico nutricional no esporte. **Rev. Bras. Ciên. e Mov.**, v. 9, p. 57-64, 2001.
- ARMENTERO, M. T.; Pinna A.; Ferré, S.; Lanciego, J. L.; Müller, C. E.; Franco, R. Past, present and future of A(2A) adenosine receptor antagonists in the therapy of Parkinson's disease. **Pharmacology & Therapeutics**., v. 132, n. 3, p. 280-299, 2011.
- ARNAUD, M. J. Pharmacokinetics and metabolism of natural Methylxanthines in animal and man. **Handb Expr Pharmacol**, v. 200, p. 33-91, 2011.
- ARONSEN, L.; Orvoll, E.; Lysaa, R.; Ravna, A.W.; Sager, G. Modulation of high affinity ATP-dependent cyclic nucleotide transporters by specific and non-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. **Eur J Pharmacol**, 745, 249-253, 2014.
- BARRACO, R. A.; Martens, K.A.; Parizon, M.; Normile, H.J. Adenosine A2a receptors in the nucleus accumbens mediate locomotor depression. **Brain Res.Bull.** v. 31, n. 3-4, pp. 397-404, 1993.
- BRANCHI, I.; D'Andrea, I.; Armida, M.; Carnevale, D.; Ajmone, C. M. A.; Pèzzola, A., Potenza, R. L.; Morgese, M. G.; Cassano, T.; Minghetti, L.; Popoli, P.; Alleva, E. Striatal 6-OHDA lesion in mice: Investigating early neurochemical changes underlying Parkinson's disease. **Behav Brain Res**, v. 208, n. 1, p. 137-43, 2010.
- BROTCHIE, J. M. Nondopaminergic mechanisms in levodopa-induced dyskinesia. **Mov Disord.** v. 20, n. 8, p. 919, 2005.
- BRUNDEGE, J. M.; Dunwiddie, T. V. Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. **Adv.Pharmacol.** v. 39, p. 353-391, 1997.
- BUENO, M. A. S. Papel atual das metilxantinas (aminofilina e teofilina) nas doenças respiratórias. **Einstein**, v. 1, p. 141-142, 2003.

CACCIATORE, I.; Ciulla, M.; Marinelli, L.; Eusepi, P.; Di, Stefano. Advances in prodrug design for Parkinson's disease. **Expert Opinion on Drug Discovery**; v. 13, p. 295–305. 2018.

CAMANDOLA, S.; Plick, N.; Mattson, M. P. Impact of Coffee and Cacao Purine Metabolites on Neuroplasticity and Neurodegenerative Disease. **Neurochemical Research**., v. 44, n. 1, p. 214-227, 2019.

CHEN, J. F.; Sonsalla, P.K.; Pedata, F.; Melani, A.; Domenici, M.R.; Popoli, P.; Geiger, J.; Lopes, L.V.; de Mendonca, A. Adenosine A2A receptors and brain injury: broad spectrum of neuroprotection, multifaceted actions and "fine tuning" modulation. **Prog Neurobiol**, v. 83, p. 310-331, 2007.

CHEN, J. F.; Eltzschig, H. K.; Fredholm, B. B. Adenosine receptors as drug targets--what are the challenges? **Nature reviews. Drug discovery**, v. 12, n.4, p. 265–286, 2013.

COSIO, B. G.; Tsaprouni, L.; Ito, K.; Jazrawi, E.; Adcock, I. M.; Barnes, P.J. Theophylline restores histone deacetylase activity and steroid responses in COPD macrophages. **Journal Experimental Medicine**, v. 200, n. 5, p. 689-695, 2004.

DAMIER, P.; Hirsch, E. C.; Graybiel, A. M. The substantia nigra of the human brain. I. Nigrosomes and the nigral matrix, a compartmental organization based on calbindin D (28K) **Immunohistochemistry. Brain**, v. 122, p. 1436, 1999.

DEL BEL, E. A.; Souza, A. S.; Guimarães, F. S.; da-Silva, C. A.; Nucci-da-Silva, L. P. Motor effects of acute and chronic inhibition of nitric oxide synthesis in mice. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 161, n. 1, p. 32-37, 2002.

DEL BEL, E. A.; da Silva C. A.; Guimarães, F. S. Bermúdez-Echeverry, M. Catalepsy induced by intra-striatal administration of nitric oxide synthase inhibitors in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 485, p. 175-181, 2004.

DICUM, G.; Luttinger, N. The coffee book: anatomy of an industry from crop to the last drop. **The New Press**, New York, 1999.

DORÉ, A. S.; Robertson, N.; Errey, J. C.; Ng, I.; Hollenstein, K.; Tehan, B.; Hurrell, E.; Bennett, K.; Congreve, M.; Magnani, F.; Tate, C. G.; Weir, M.; Marshall, F. H. Structure of the adenosine A2A receptor in complex with ZM241385 and the xanthines XAC and caffeine. **Structure**. v. 19, n. 9, p. 1283-1293, 2011.

DUNWIDDIE T. V.; Masino S. A. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. **Annu Rev Neuroscience**. V. 24, p. 31-55, 2001.

DURCAN, M. J.; Morgan, P. F. NECA-induced hypomotility in mice: evidence for a predominantly central site of action. **Pharmacol.Biochem.Behav**. v. 32, n. 2, p. 487-490. 1989.

EL YACOUBI, M.; Ledent, C.; Ménard, J. F.; Parmentier, M.; Costentin, J.; Vaugeois, J. M. The stimulant effects of caffeine on locomotor behaviour in mice are mediated through its blockade of adenosine A2A receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 129, n. 7, p. 1465-1473, 2000.

ELKOUZI, A.; Vedam-Mai, V.; Eisinger, R. S.; Okun, M. S. Emerging therapies in Parkinson disease — repurposed drugs and new approaches. **Nature Reviews Neurology**, v. 15, p. 204-223, 2019.

FAHN, S. The history of dopamine and levodopa in the treatment of Parkinson's disease. **Mov Disord**. v. 23, p. 497-508, 2008.

FANG, X.; Sugiyama, K.; Akamine, S.; Namba, H. Improvements in motor behavioral tests during deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in rats with different degrees of unilateral parkinsonism. **Brain Res**, v. 1120, n. 1, p. 202-210, 2006.

FENU, S.; Pinna, A.; Ongini, E.; Morelli, M. Adenosine A2A receptor antagonism potentiates L-DOPA-induced turning behaviour and c-fos expression in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. **Eur.J.Pharmacol**, v. 321, n. 2, p. 143-147, 1997.

FERRÉ, S., Fredholm, B.B., Morelli, M., Popoli, P., Fuxe, K. Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. **Trends Neurosci**. v. 20, n. 10, p. 482-487, 1997.

FERRÉ, S., Fuxe, K., Von Euler, G., Johansson, B., Fredholm, B. B. Adenosine-dopamine interactions in the brain. **Neuroscience**, v. 51, n. 3, p. 501-512, 1992.

FERRÉ, S. Herrera, M. M.; Grabowska, A. M.; Ungerstedt, U.; Casas, M.; Andén, N. E. Postsynaptic dopamine/adenosine interaction: I. Adenosine analogues inhibit dopamine D2-mediated behaviour in short-term reserpinized mice. **Eur.J.Pharmacol.** v. 192, n. 1, p. 25-30, 1991a.

FERRÉ, S.; Herrera M. M.; Grabowska-A. M.; Ungerstedt, U.; Casas, M.; Andén, N. E. Postsynaptic dopamine/adenosine interaction: II. Postsynaptic dopamine agonism and adenosine antagonism of methylxanthines in short-term reserpinized mice. **Eur.J.Pharmacol.** v. 192, n. 1, p. 31-37, 1991b.

FERRÉ, S.; Popoli, P.; Gimenez-Llort, L.; Rimondini, R.; Müller, C.E.; Stromberg, I.; Orgen, O.; Fuxe, K. Adenosine/dopamine interaction: implications for the treatment of Parkinson's disease. **Parkinsonism.Relat Disord.** v. 7, n. 3, p. 235-241, 2001.

FERRÉ, S.; Bonaventura, J; Tomasi, D; Navarro, G.; Moreno, E.; Cortes, A.; Lluís, C.; Casado, V.; Volkow, D. N. Allosteric mechanisms within the adenosine A2A e dopamine D2 receptor heterotetramer. **Neuropharmacology**, v. 104, p. 154-160, 2016.

FERRÉ, S.; Bonaventura, J; Zhu, W.; Solis, H. C.; Taura, J.; Quiroz, C.; Cai, N. S.; Moreno, E.; Anguera, C. V.; Kravitz, A. V.; Thompson, R. K.; Tomasi, G. D.; Navarro, G. Cordoní, A.; Pardo, L.; Lluís, C.; Dessauer, W. C.; Volkow, D. N.; Casadó, V.; Ciruela, F.; Diomedes E. Logothetis, D. E.; and Zwillig, D. Essential Control of the Function of the Striatopallidal Neuron by Pre-coupled Complexes of Adenosine A2A-Dopamine D2 Receptor Heterotetramers and Adenylyl Cyclase. **Front. Pharmacol.** v. 9, p. 243, 2018.

FINK, J. S. Weaver, D. R. Rivkees, S. A.; Peterfreund, R. A.; Pollack, A. E.; Adler, E. M.; Reppert, S. M. Molecular cloning of the rat A2 adenosine receptor: selective co-expression with D2 dopamine receptors in rat striatum. **Molecular Brain Research.** v. 14, n. 3, p. 186-195, 1992.

FISONE, G.; Borgkvist, A.; Usiello, A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. **Cell.Mol. Life Sci**; v. 61, p. 857-872, 2004.

FLORIO, C.; Rosati, A. M.; Traversa, U.; Vertua, R. Inhibitory and excitatory effects of adenosine antagonists on spontaneous locomotor activity in mice. **Life sciences**, v. 60, p. 1477-1486, 1997.

FRANCO, R., Oñatibia, A. A., Martínez, P. E. Health benefits of Methylxanthines in cacao and chocolate. **Nutrients**, v. 5, p. 4159-4173, 2013.

FRANCO, R.; Ferré, S.; Agnati, L.; Gines, M. T. S.; Hillion, J.; Casado, V.; Lledo, P. M.; Zoli, M.; Lluís C.; Fuxe, K. Evidence for Adenosine/Dopamine Receptor Interactions: Indications for Heteromerization. **Neuropsychopharmacology**, v. 23, p. 50–59, 2000.

FREDHOLM, B. B., Bättig, K., Holmén, J., Nehlig, A., Zvartau, E.E. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacol. Rev.**, v. 51, n. 1, p. 83-133, 1999.

FREDHOLM, B. B.; IJzerman, A. P.; Jacobson, K.A.; Linden, J.; Muller, C.E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors- An Update. **Pharmacol Rev.** v. 63, p. 1-34, 2011.

FUXE, K.; Ungerstedt, U. Action of caffeine and theophyllamine on supersensitive dopamine receptors: considerable enhancement of receptor response to treatment with DOPA and dopamine receptor agonists. **Med Biol**, v. 52(1), p. 48-54, 1974.

GAO, H. M.; Jiang, J.; Wilson, B.; Zhang, W.; Hong, J. S.; Liu, B. Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. **J Neurochem**, v. 81, p. 1285–1297, 2002.

GOETZ, C. G.; Poewe, W.; Rascol, O.; Sampaio, C.; Evidence-based medical review update: pharmacological and surgical treatments of Parkinson's disease: 2001 to 2004. **Mov. Disord.** v. 20, p. 523-539, 2005.

GOŁEMBIOWSKA, K.; Wardas, J.; Noworyta S. K.; Kamińska, K.; Górska, A. Effects of adenosine receptor antagonists on the in vivo LPS-induced inflammation model of Parkinson's disease. **Neurotox Res**, v. 24, p. 29–40, 2013.

GONDAL, A. Z., Zulfiqar, H. Aminophylline. A service of the National Library of Medicine, National Institutes of Health. **NCBI Bookshelf**, 2019.

GONZÁLEZ, L. O. E.; Ceballos-H. F.; Jiménez, C. M. E.; Arankowsky-S. G.; Góngora, A. J. L. Synergism of theophylline and anticholinergics to inhibit haloperidol-induced catalepsy: A potential treatment for extrapyramidal syndromes. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 34, p.1465–1471, 2010.

GOODMAN, L.S.; Gilman, A. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 10ª ed. Rio de Janeiro: **McGraw Hill**, 2006.

GRAY, J. A. The psychology of fear and stress. **Cambridge University Press**, London, 1987.

GUO, S.; Yan, J.; Yang, T.; Yang, X.; Bezard, E. Protective effects of green tea polyphenols in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease through inhibition of ROS-NO pathway. **Biol Psychiatry**, v. 62, p. 1353–1362, 2007.

HAUBER, W., Nagel, J., Sauer, R., Müller, C.E. Motor effects induced by a blockade of adenosine A2A receptors in the caudate-putamen. **Neuroreport**. v. 9, n. 8, p. 1803-1806. 1998.

HAUBER, W., Neuscheler, P., Nagel, J., Müller, C.E. 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**. v. 14, n. 8, p. 1287-1293, 2001.

HORNYKIEWICZ, O. Dopamine in the basal ganglia. Its role and therapeutic implications (including the clinical use of L-DOPA). **Br Med Bull**, v. 29, p.172–178, 1973.

HORNYKIEWICZ, O. The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain. **J Neural Transm Suppl**, v. 70, p. 9–15, 2006.

ICO. International Coffee Organization. **Coffee Market Report** - December 2018. <http://www.ico.org/documents/cy2018-19/cmr-1218-p.pdf>

INFAC. Eskualdeko Farmakoterapi Informazioa. Información Farmacoterapéutica De La Comarca. Enfermedad de Parkinson: Aspectos prácticos, 2010.

JAIN, N.; Kemp, N.; Adeyemo, O.; Buchanan, P.; Stone, T. W. Anxiolytic activity of adenosine receptor activation in mice. **Br.J.Pharmacol**. v. 116, n. 3, p. 2127-2133, 1995.

JENNER, P. A_{2A} antagonists as novel non-dopaminergic therapy for motor dysfunction in PD. **Neurology**. v. 61, n. 11 Suppl 6, p. S32-S38, 2003.

JENNER, P. Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. **Nat Rev Neurosci.** v. 9, p. 9665-9677, 2008.

JENNER, P. An Overview of Adenosine A_{2A} Receptor Antagonists in Parkinson's Disease. Adenosine Receptors. **Neurology and Psychiatry**, v. 119, p. 71–86, 2014.

KANDA, T.; Shiozaki, S.; Shimada, J.; Suzuki, F.; Nakamura, J. KF17837: a novel selective adenosine A_{2A} receptor antagonist with anticataleptic activity. **Eur.J.Pharmacol.** v. 256, n. 3, p. 263-268, 1994.

KANDA, T., Tashiro, T., Kuwana, Y., Jenner, P. Adenosine A_{2A} receptors modify motor function in MPTP-treated common marmosets. **Neuroreport.** v. 9, n. 12, p. 2857-2860, 1998.

KANDEL, E. R.; Schwartz, J. H.; Jessel, T. M.; Siegelbaum, S. A.; Hudspeth, A. J. Principles of Neural Science. 5th ed., New York City, **McGraw-Hill Medical**, 2014.

KATZUNG, B. G. Farmacologia Básica e Clínica. 10^a ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill-Artmed, 2010.

KHISTI, R. T.; Chopde, C. T.; Abraham, E. GABAergic involvement in motor effects of an adenosine A(2A) receptor agonist in mice. **Neuropharmacology.** v. 39, n. 6, p. 1004-1015, 2000.

KOVACS, G. Molecular Pathological Classification of Neurodegenerative Diseases: Turning towards Precision Medicine. **Int J Mol Sci**, v. 17, pii: E189, 2016.

KULISEVSKY, J.; Barbanoj, M.; Gironell, A.; Antonijuan, R.; Casas, M.; Pascual-Sedano, B. A double-blind crossover, placebo-controlled study of the adenosine A_{2A} antagonist theophylline in Parkinson's disease. **Clin Neuropharmacol**, v. 25, p. 25–31, 2002.

KUNZ, H. Emil Fischer – unequalled classicist, master of organic chemistry research, and inspired trailblazer of biological chemistry. **Angew Chem Int Ed**, v. 41, p. 4439–445, 2002.

LARSSON, V.; Torisson, G.; Londos, E. Relative survival in patients with dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease dementia. **PloS One**, v. 13, n. 8, p. 1-12, 2018.

LEES, A. J., Hardy, J.; Revesz, T. Parkinson's disease. **Lancet**. v. 373, p. 2055-2066. 2009.

LIN, M. M.; Laurenno, R. Less Pulsatile Levodopa Therapy (6 Doses Daily) Is Associated with a Reduced Incidence of Dyskinesia. **J Mov Disord**, v. 12, n. 1, p. 37-42, 2019.

LIU, X.; Smith, B.J.; Chen, C.; Callegari, E. Becker S.L.; Chen, X.; Cianfroga, J.; Doran, A. C.; Doran, S.D.; Gibbs, J.P.; Hosea, N. Liu, J.; Nelson, F.R.; Szewc, M. A.; Van D. J. Use of a physiologically based pharmacokinetic model to study the time to reach brain equilibrium: an experimental analysis of the role of blood-brain barrier permeability, plasma protein binding, and brain tissue binding. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 313, p. 1254-1262, 2005.

MALLY, J.; Stone, T. The effect of theophylline on parkinsonian symptoms. **J Pharm Pharmacol**, v. 46, p. 515–517, 1994.

MANDHANE, S. N.; Chandrabhan T. Chopde, T.; Ghosh, T. A. Adenosine A₂ receptors modulate haloperidol-induced catalepsy in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 328, p. 135–141, 1997.

MATOS, M.; Augusto, E.; Santos-Rodrigues, A.D.; Schwarzschild, M.A.; Chen J. F.; Cunha, R. A.; Agostinho, P. Adenosine A_{2A} receptors modulate glutamate uptake in cultured astrocytes and gliosomes. **Glia**, v. 60, p. 702-716, 2012.

MORELLI, M. Fenu, S., Pinna, A., Di Chiara, G. Adenosine A₂ receptors interact negatively with dopamine D₁ and D₂ receptors in unilaterally 6-hydroxydopamine-lesioned rats. **Eur.J.Pharmacol.** v. 251, n. 1, pp. 21-25, 1994.

MORELLI, M; Di Chiara, G. Catalepsy induced by SCH 23390 in rats. **European Journal Pharmacology**, v. 117, p. 117-185, 1985.

MÜLLER, C. E.; Jacobson, K. A. Xanthines as adenosine receptor antagonists. *Handb Exp Pharmacol*. v. 200, p. 151-99, 2014.

MUNHOZ, R. P.; Moro, A.; Silveira-Moriyama, L.; Teive, H. A. Non-motor signs in Parkinson's disease: a review. **Arq. Neuropsiquiatr**, v.73, n. 5, p. 454-62, 2015.

NASROLAHI, A.; Safari, F.; Farhoudi, M.; Khosravi, A.; Farajdokht, F.; Bastaminejad, S.; Shotorbani S.; Mahmoudi, J. Immune system and new avenues in Parkinson's

disease research and treatment. *Reviews in the Neurosciences*; v. 30, n. 7, p. 709–727, 2019.

NOBRE, H.V. Jr.; Cunha, G.M.; de Vasconcelos, L.M.; Magalhães, H.I.; Oliveira Neto, R.N.; Maia, F.D.; de Moraes, M.O.; Leal, L.K.; Viana, G. Caffeine and CSC adenosine A2A antagonists., offer neuroprotection against 6-OHDA-induced neurotoxicity in rat mesencephalic cells. **Neurochem Int**, v. 56, p. 51–58, 2010.

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

NOSCHANG, C.G.; Krolowm R.; Pettenuzzom L.F.; Avilam M.C.; Fachinm A.; Arcego, D.; Von, P. T. E.; Crema, L. M.; Diehl, L. A.; Venditem, D.; Dalmazm, C. Interactions between chronic stress and chronic consumption of caffeine on the enzymatic antioxidant system. **Neurochem Res**, v. 34, p. 1568–1574, 2009.

OIC - Organização Internacional De Café. Relatório sobre o Mercado de café.

Disponível em:

http://consorciopesquisacafe.com.br/arquivos/consorcio/publicacoes_tecnicas/relatorio_oic_dezembro_2018.pdf, 2018.

OLANOW, C.W. Levodopa/dopamine replacement strategies in Parkinson's disease: future directions. **Mov. Disord.** v. 23, p. 613-622, 2008.

OÑATIBIA, A. A.; Martínez, P. E.; Franco, R. The potential of methylxanthine-based therapies in pediatric respiratory tract diseases. **Respir Med**, v. 112, p. 1-9, 2016.

ONGINI, E.; Fredholm, B. B. Pharmacology of adenosine A2A receptors. **Trends Pharmacol.Sci.** v. 17, n. 10, p. 364-372, 1996.

PINNA, A.; di Chiara, G.;Wardas, J.; Morelli, M. Blockade of A2a adenosine receptors positively modulates turning behaviour and c-Fos expression induced by D1 agonists in dopamine-denervated rats. *Eur.J.Neurosci.* v. 8, n. 6, pp. 1176-1181, 1996.

POEWE, W.; Mahlknecht, P. The clinical progression of Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 15, n. 4, p. 28-32. 2009.

POEWE, W.; Seppi, K.; Tanner, C. M.; Halliday, G. M.; Brundin, P.; Volkman, J.; Schrag, A. E.; Lang, A. E. Parkinson disease. **Nat Rev Dis Primers**, v. 3, p. 170-183, 2017.

POLLACK, A. E.; Fink, J. S. 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.** v. 743, n. 1-2, p. 124-130, 1996.

POLOSA, R.; Blackburn, M. R. Adenosine receptors as targets for therapeutic intervention in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 30, n.10, p. 528-535, 2009.

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.** v. 22, n. 5, p. 522-529, 2000.

PAXINOS, G.; Watson, C.R.R.; Emson, P.C. Ache-Stained Horizontal Sections of the Rat-Brain in Stereotaxic Coordinates. **J Neurosci Meth**, 1986.

PRZEDBORSKI, S.; Vila, M.; Jackson, L. V. Series Introduction: Neurodegeneration: What is it and where are we? **J Clin Invest**, v. 111, p. 3-10, 2003.

QIN, L.; Liu, Y.; Cooper, C.; Liu, B.; Wilson, B.; Hong, J. S. Microglia enhance beta-amyloid peptide-induced toxicity in cortical and mesencephalic neurons by producing reactive oxygen species. **J Neurochem**, 83, pp. 973–983, 2002.

RALEVIC, V.; Burnstock, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacol. Rev.** v. 50, n. 3, p. 413-492, 1998.

RANJANI, R.; Vinotha A. T. S. A prospective randomized controlled study: Theophylline on oxidative stress and steroid sensitivity in chronic obstructive pulmonary disease patients. **Int J Pharm Investig.**, v 7, n. 3, p. 119-124, 2017.

RIVERA, O. M.; Díaz, R. M. Using caffeine and other adenosine receptor antagonists and agonists as therapeutic tools against neurodegenerative diseases: a review. **Life Sci**, v. 101, p. 1-9, 2014.

ROWLAND, L. P. Merrit – Tratado de Neurologia. 11.ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2007.

SALAMONE, J. Motor function e motivation. **Encyclopedia of Behavioral Neuroscience**, p. 267-272, 2010.

SANBERG, P. R. Bunsey M. D.; Giordano, M.; Norman, A. B. The catalepsy test: its ups and downs. **Behav.Neurosci.** v. 102, n. 5, p. 748-759, 1988.

SAUERBIER A.; JENNER P.; TODOROVA A.; CHAUDHURI K. R. Non motor subtypes and Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders.** v. 22, suppl 1, p. 41-46. 2016.

SAVICA, R.; Cannon-Albright, L. A.; Pulst, S. Familial aggregation of Parkinson disease in Utah: a population-based analysis using death certificates. **Neurol Genet,** v. 2, n. 2, p.65, 2016a.

SCHIFFMANN, S. N.; Libert, F., Vassart, G.; Vanderhaeghen, J.J. Distribution of adenosine A2 receptor mRNA in the human brain. **Neurosci.Lett.** v. 130, n. 2, pp. 177-181, 1991.

SCHWARZSCHILD, M. A.; Xu K.; Oztas E.; Petzer J. P.; Castagnoli K.; Castagnoli N. Jr.; Chen J. F. Neuroprotection by caffeine and more specific A_{2A} receptor antagonists in animal models of Parkinson's disease. **Neurology,** v. 61, n. 11, suppl. 6, p. 55-61. 2003.

SCOTTISH INTERCOLLEGIATE GUIDELINES NETWORK. Diagnosis and pharmacological management of Parkinson's disease: a national clinical guideline. 2016. Disponível em: <http://www.sign.ac.uk>

SHARMA, A.; Gupta, S.; Patel, R.; Wardhan, N. Haloperidol-induced parkinsonism is attenuated by varenicline in mice. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology,** v. 29, n.4, p. 395-401. 2018.

SHIOZAKI, S., Ichikawa, S., Nakamura, J., Kitamura, S., Yamada, K., Kuwana, Y. Actions of adenosine A_{2A} receptor antagonist KW-6002 on drug-induced catalepsy and hypokinesia caused by reserpine or MPTP. **Psychopharmacology (Berl).** v. 147, n. 1, p. 90-95, 1999.

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

SMITH, K. M.; Browne, S. E.; Jayaraman, S.; Bleickardt, C. J.; Hodge, L. M.; Lis, E.; Yao, L.; Rittle, S. L.; Innocent, N.; Mullins, D. E.; Boykow, G.; Reynolds, I. J.; Hill, D.; Parker, E. M.; Hodgson, R. A. Effects of the selective adenosine A_{2A} receptor antagonist, SCH 412348, on the parkinsonian phenotype of MitoPark mice. **Eur J Pharmacol**, v. 8, p. 728-731, 2014.

SMITH, G. A.; Isacson, O.; Dunnett, S. B. The search for genetic mouse models of prodromal Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 237, n. 2, p. 267-73, 2012.

SPEALMAN, R.D. Psychomotor stimulant effects of methylxanthines in squirrel monkeys: relation to adenosine antagonism. **Psychopharmacology**, v. 95, p. 19-24, 1988.

STROMBERG, I.; Popoli, P.; Müller, C.E.; Ferré, S.; Fuxe, K. Electrophysiological and behavioural evidence for an antagonistic modulatory role of adenosine A_{2A} receptors in dopamine D₂ receptor regulation in the rat dopamine-denervated striatum. **Eur.J.Neurosci**. v. 12, n. 11, pp. 4033-4037, 2000.

SURMEIER, D.J. Microcircuits in the striatum: Cell types, intrinsic properties and Neuromodulation. In: Grillner S. and Graybiel A.M. (Eds.), Microcircuits — The Interface Between Neurons and Global Brain Function. **MIT Press Cambridge**, p. 105–112, 2006.

SVEINBJORNSDOTTIR, S. The clinical symptoms of Parkinson's disease. **J Neurochem**, v. 139, Suppl 1, p. 318-324, 2016.

SVENNINGSSON, P.; Le Moine, C.; Fisone, G.; Fredholm, B. B. Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A_{2A} receptors. **Prog.Neurobiol**. v. 59, n. 4, pp. 355-396, 1999.

TARSY, D. Initial treatment of Parkinson's disease. **Curr Treat Options Neurol**, v. 8, p. 224-235, 2016.

TAURA, J.; Nolen, E. G., Cabré, G.; Hernando, J.; Squarcialupi, L.; López-Cano, M.; Ciruela, F. Remote control of movement disorders using a photoactive adenosine A_{2A} receptor antagonist. **Journal of Controlled Releas**. v. 283, p. 135-142 2018.

TEIVE, A.G. H. Etiopathogenesis of Parkinson Disease. **Rev Neurociencias**. v. 13, n. 4, p. 201-14. 2005.

TEPPER, J. M.; Abercrombie, E. D.; Bolam, J. P. Basal ganglia macrocircuits. **Progress in brain research**. V. 160, p. 3-7, 2007.

TO, Y.; Ito, K.; Kizawa, Y.; Failla, M.; Ito, M.; Kusama, T.; Elliott, W.M.; Hogg, J.C.; Adcock, I.M.; Barnes, P.J. Targeting phosphoinositide-3-kinase-delta with theophylline reverses corticosteroid insensitivity in chronic obstructive pulmonary disease. **Am. J. Respir. Crit.** v.182, n. 7, p. 897-904, 2010.

TORIUMI, H.; Yoshikawa, M.; Matsuda, R.; Nishimura, F.; Yamada, S.; Hirabayashi, H.; Nakase, H.; Nonaka, J.; Oujii, Y.; Ishizaka, S.; Sakaki, T. Treatment of Parkinson's disease model mice with allogeneic embryonic stem cells: necessity of immunosuppressive treatment for sustained improvement. **Neurol Res**, v. 31, n. 3, p. 220-227, 2009.

TREVITT, J.; Vallance, C.; Allison Harris, A.; Goode, T. Adenosine antagonists reverse the cataleptic effects of haloperidol: Implications for the treatment of Parkinson's disease. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 92, p. 521–527, 2009.

TYSNES, O. B.; Storstein, A. Epidemiology of Parkinson's disease. **J Neural Transm.** v. 124, n. 8, p. 901-905, 2017.

VAN DOMBURG, P. H.; Tem Donkelaar H. J. The human substantia nigra and ventral tegmental area. A neuroanatomical study with on aging and aging diseases. **Adv Anat Embryol Cell Biol**, v. 121, p. 132, 1991.

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

WANG, W. F.; Wu, S. L.; Liou, Y. M.; Wang, A. L.; Pawlak, C. R.; Ho, Y. J. MPTP lesion causes neuroinflammation and deficits in object recognition in Wistar rats. *Behav Neurosci*. v. 123, n. 6, p. 1261-70. 2009.

WEINREB, O.; Mandel, S.; Amit, T. Y.M. Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **J Nutr Biochem**, v.15, p. 506–516, 2004.

WHIMBEY, A. E.; Denenberg, V. H. Two independent behavioral dimensions in open-field performance. **J.Comp Physiol Psychol.**, v. 63, n.3, p. 500-504, 1967.

XU, K.; Xu, Y.H.; Chen, J.F.; Schwarzschild, M. Neuroprotection by caffeine: time course and role of its metabolites in the MPTP model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 167, p. 475–481, 2010.

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

ZHANG, Y. H.; Tang, B. S.; Song, C. Y.; Xu, Q.; Lou, M. X.; Liu, Z. H.; Yu, R. H.; Yan, X. X.; Guo, J. F. The relationship between the phenotype of Parkinson's disease and levodopa-induced dyskinesia, **Neuroscience Letters**, v. 556, p. 109-112, 2013.

ANEXO 1



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Efeito da inibição intracerebral de receptores de adenosina, com 8-fenilteofilina, nas alterações motoras induzidas por um modelo farmacológico da doença de Parkinson”, registrada com o nº 1.079/2019, sob a responsabilidade de **Albert Schiaveto de Souza** – que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 7ª reunião ordinária do dia 26/09/2019.

FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	25/10/2019 a 25/10/2020
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Mus musculus</i> / Swiss
Nº de animais	48
Peso/Idade	30 g / Adulto
Sexo	Machos
Origem	UT-Biotério/UFMS

Fábio José Carvalho Faria
Coordenador da CEUA/UFMS
Campo Grande, 27 de setembro de 2019.



Documento assinado eletronicamente por **Fabio Jose Carvalho Faria**, Professor do Magisterio Superior, em 30/09/2019, às 10:35, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site
https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?