

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Neurociências**

CRISTIANE BATASSINI

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DA GUANOSINA EM UM MODELO
ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR 6-OHDA**

**Porto Alegre
2010**

CRISTIANE BATASSINI

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DA GUANOSINA EM UM MODELO
ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR 6-OHDA**

Dissertação a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Tadeu Mello e Souza
Co-orientadora: Prof. Dr. Carmem Juracy Silveira Gottfried

Porto Alegre
2010

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Tadeu, por toda a ajuda durante a realização desse trabalho. Agradeço pela atenção, pela disponibilidade e pelo ensinamento de encarar os dados experimentais sempre com muita honestidade. Agradeço por confiar em meu trabalho e permitir o meu crescimento durante o mestrado. Agradeço à minha co-orientadora, Prof. Carmem, pela ajuda e pela disponibilidade, em todos os momentos.

Agradeço aos colegas de laboratório, pela ajuda e companhia ao longo desse período. Meu agradecimento especial à Júlia, com quem pude contar sempre, pelo apoio e amizade. Cami, Mile e Beta, conviver com vocês ao longo do meu mestrado foi um presente. Agradeço pela amizade, por estarem sempre presentes, pela ajuda e, principalmente, pelos momentos de alegria e descontração, por me ensinarem a ver sempre o lado divertido da vida. Muito aprendi com a objetividade da Beta, com a praticidade da Mile e com a espontaneidade da Cami. Agradeço aos colegas do laboratório 22 pela acolhida, durante a mudança de laboratório, e aos do antigo 35, grupo do Dioguinho, pela amizade e apoio, em todos os momentos.

À minha família, por estar sempre presente. Em especial à minha irmã Érica, à minha mãe e meu pai, por me mostrarem que tudo sempre é possível quando acreditamos.

À UFRGS e ao PPG Neurociências por possibilitarem a realização desse trabalho e todo o meu aprendizado durante o mestrado. Ao CNPq, pelo suporte financeiro através da bolsa de mestrado.

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença multifatorial. Seu tratamento é apenas sintomático, o que salienta a importância do estudo de novas terapias. Há evidências de que a excitotoxicidade atribuída ao aumento da atividade glutamatérgica nos núcleos da base seja uma das causas da DP. A guanosina extracelular tem efeitos sobre parâmetros glutamatérgicos e é neuroprotetora: quando administrada oralmente, ela protege ratos contra convulsões induzidas por ácido quinolínico, bem como protege fatias de hipocampo submetidas à combinação de hipóxia e hipoglicemia. O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos do consumo crônico oral de guanosina no modelo animal da DP induzido por 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Ratos Wistar machos (250-350g, 100-115 dias de idade) receberam solução de guanosina 0,5mg/ml (n=20) ou água destilada (n=16) para beber durante 4 semanas. Após as duas primeiras semanas de tratamento, receberam infusão de 6-OHDA (5,5 µl, 3 µg/µl) no feixe prosencefálico medial direito. Depois de 2 semanas do término do tratamento, os animais foram submetidos ao Teste de Motricidade sobre Grade (TMG), com duração de 3 minutos e, após uma semana, foram desafiados com metilfenidato (MF) 20 mg/kg, durante 30 minutos, para verificação do grau de lesão dos animais. Imunoistoquímica para TH em células nigrais também foi realizada. Treze de 16 animais do grupo controle apresentaram comportamento rotacional ipsilateral espontâneo no TMG, o que diferiu do grupo tratado, onde apenas nove, dentre os vinte utilizados apresentaram o mesmo comportamento (teste exato de Fisher, $p=0,041$). Entretanto, não verificamos uma diminuição do número das rotações induzidas por MF 20 mg/kg em animais tratados com guanosina, quando comparado com o grupo controle (teste t para amostras independentes, $P = 0,716$). Houve tendência a uma menor perda de neurônios positivos para TH na parte compacta da substância nigra no grupo tratado com guanosina (teste t para amostras independentes, $p=0,064$; grupo controle, $n=8$, $90\% \pm 5$, média \pm E.P.; grupo tratado, $n=5$, $70\% \pm 11$). Podemos concluir, a partir desses resultados, que a guanosina previne a expressão comportamental no TMG típica de animais lesionados com 6-OHDA e, talvez, diminua a morte de células nigrais positivas para TH.

ABSTRACT

Parkinson's Disease (PD) is a multifactorial disorder and the treatment is only symptomatic, which stresses the importance of studying new therapies. There is some evidence that excitotoxicity attributed to increased glutamatergic activity in the basal ganglia could be one of the causes of PD. Extracellular guanosine has effects on glutamatergic parameters and is neuroprotective: when orally administered, protect against seizures induced by quinolinic acid in rats, and protect brain slices exposed to hypoxia/hypoglycemia. The aim of this work is to investigate the effects of a chronic oral administration of guanosine in the 6-hydroxydopamine (6-OHDA) animal model of PD. Male Wistar rats (250-350 g, 100-115 days old) drank a 0.5 mg/ml guanosine (n=20) or distilled water (n=16) during 4 weeks. After the two first weeks of treatment, they received a stereotaxic infusion of 6-OHDA (16.5 μ g, 5.5 μ l) into the right medial forebrain bundle (MFB). Two weeks after the end of the treatment, animals were exposed to the footfault apparatus for three minutes; and two weeks after, they were challenged with 20 mg/kg of methylphenidate and were observed for 30 minutes, to verify the degree of lesion. Immunohistochemistry for tyrosine hydroxylase (TH) was also performed. Thirteen of 16 control animals showed spontaneous rotational behavior in the footfault test, which differed from the treated group where only 9 of 20 animals showed the same behavior (Fisher Exact Test, $P=0.041$). However, the number of rotations induced by MF 20 mg/kg in animals treated with guanosine didn't change, when compared with the control group (t test for independent samples, $P = 0.716$). There was a trend towards a smaller decrease of TH-positive nigral neurons in the guanosine-treated animals when compared to controls (independent *t* test, $P=0.064$, control group, $n=8$, $90\% \pm 5$. average \pm S.E.M.; treated group, $n=5$, $70\% \pm 11$) Our results show that guanosine prevents, in some 6-OHDA-lesioned animals, the behavioral pattern of context-induced rotations in the footfault test. Our preliminary results suggest that guanosine may also have a neuroprotective effect in the 6-OHDA PD model, since we found a trend towards a smaller decrease in the number of TH-positive cells in guanosine-treated animals relative to control animals.

LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA – 6-hidroxidopamina
DP – doença de Parkinson
FPM – feixe prosencefálico medial
i.p. – intra-peritoneal
MF - metilfenidato
NM - neuromelanina
NST – núcleo subtalâmico
SN – substância nigra
SNC – sistema nervoso central
SNpc – parte compacta da substância nigra
SNr – parte reticulada da substância nigra
TH – tirosina hidroxilase
TMG – teste de motricidade sobre grade

ÍNDICE

| | |
|---|------------|
| AGRADECIMENTOS | III |
| RESUMO | IV |
| ABSTRACT | V |
| LISTA DE ABREVIATURAS | VI |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Doença de Parkinson | 1 |
| 1.2 Causas da DP | 4 |
| 1.3 Purinas | 8 |
| 1.3.1 Efeitos neurotróficos das purinas derivadas de guanina | 10 |
| 1.3.2 Hidrólise estriatal de purinas derivadas de adenina e guanina em ratos lesionados por 6-OHDA | 11 |
| 1.4 Tratamento da DP | 12 |
| 1.5 Modelos animais | 12 |
| 1.5.1 6-Hidroxidopamina (6-OHDA) | 12 |
| 1.5.2 Avaliação do comportamento motor | 13 |
| 2 JUSTIFICATIVA | 16 |
| 3 OBJETIVO | 17 |
| 3.1 Objetivos específicos | 17 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 18 |
| 4.1 Animais | 18 |
| 4.2 Infusão de 6-OHDA e tratamento com guanosina | 18 |
| 4.3 Testes Comportamentais | 19 |
| 4.4 Imunoistoquímica para tirosina hidroxilase (TH) | 20 |
| 4.5 Análise estatística | 21 |
| 5 RESULTADOS | 22 |
| 6 DISCUSSÃO | 25 |
| 7 PERSPECTIVAS | 29 |
| 8 REFERÊNCIAS | 30 |
| 9 APÊNDICE | 36 |
| 9.1 Publicações durante o período | 36 |
| 9.1.1 Artigos científicos | 36 |
| 9.1.2 Capítulo de livro | 37 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (DP) apresenta uma prevalência de 0,5% nas pessoas com mais de 50 anos (Stoof, Winogrodzka *et al.*, 1999). O número de indivíduos afetados deve aumentar dramaticamente em função do aumento da expectativa de vida (Dorsey, Constantinescu *et al.*, 2007). Seus sintomas são principalmente motores, como tremor, rigidez muscular, bradicinesia, acinesia e alterações da postura e da marcha (Obeso, Olanow *et al.*, 2000). Outros sintomas não motores, como depressão, distúrbios do sono e déficits cognitivos também podem aparecer. Uma das características da DP é a perda de neurônios dopaminérgicos da substância nigra (SN) e conseqüente depleção de dopamina no corpo estriado (Obeso, Olanow *et al.*, 2000). Outra característica é a presença, nos neurônios dopaminérgicos sobreviventes, de inclusões eosinofílicas intracitoplasmáticas chamadas de corpos de Lewy (Fahn e Sulzer, 2004).

A SN, através da via nigroestriatal, libera dopamina no corpo estriado, modulando a atividade dos núcleos da base. A expressão “núcleos da base” refere-se a vários núcleos subcorticais, incluindo o corpo estriado (caudado e putâmen), a parte externa do globo pálido, a parte interna do globo pálido, o núcleo subtalâmico (NST) e a SN (Svenningsson, Le Moine *et al.*, 1999), que são importantes para o controle e iniciação dos movimentos (Marsden e Obeso, 1994), bem como para o aprendizado de habilidades motoras e o surgimento de hábitos (Graybiel, 1995). Os componentes motores dos núcleos da base promovem um controle supervisor da atividade dos neurônios motores superiores (Purves, 2005).

A circuitaria dos núcleos da base apresenta-se como um circuito parcialmente fechado que se origina em múltiplas áreas corticais (sensoriais e motoras) e termina, após a retransmissão pelos núcleos da base e tálamo, em áreas específicas do lobo frontal, tais como as motoras e pré-motoras. Acredita-se que os núcleos da base desempenham um papel permissivo ao movimento, uma vez que promovam uma inibição tônica do tálamo, sendo a sua desinibição necessária para o início de um movimento (Purves, 2005), embora haja evidências em contrário (Galvan e Wichmann, 2008)(Graybiel, 2005).

Os neurônios do corpo estriado possuem uma alta densidade de espinhos dendríticos. Recebem muitas aferências, predominando as aferências glutamatérgicas de áreas corticais, límbicas e talâmicas, e as aferências dopaminérgicas do mesencéfalo, tanto da parte compacta da SN (SNpc) quanto da área tegmentar ventral. Enquanto as sinapses glutamatérgicas servem para engatilhar os circuitos estriatais, as sinapses dopaminérgicas têm um papel modulatório crucial, regulando a neurotransmissão glutamatérgica (Schiffmann, Fisone *et al.*, 2007).

Acredita-se, então, que as projeções dos neurônios espinhosos médios do corpo estriado ao segmento interno do globo pálido e a parte reticular da SN (SNr) constituam uma “via direta” e causem uma desinibição dos neurônios do tálamo. Uma segunda via serviria para aumentar o nível de inibição tônica do tálamo e é chamada de “via indireta”, pois ainda há a participação de mais um componente nessa circuitaria, o segmento externo do globo pálido. Como os neurônios glutamatérgicos do tálamo facilitam a estimulação de movimentos via córtex, o resultado da via indireta seria uma redução e da via direta uma acentuação do movimento (Richardson, Kase *et al.*, 1997; Purves, 2005) (Fig. 1).

Os neurônios espinhosos médios constituem a porta de saída do corpo estriado. São neurônios gabaérgicos e podem ser distinguidos pelos neuropeptídeos que expressam: os neurônios estriatonigrais, que fazem parte da via direta (também enviam eferências à SN, daí a denominação) e expressam dinorfina, enquanto os neurônios estriatopalidais fazem parte da via indireta e expressam encefalina (Richardson, Kase *et al.*, 1997). Postula-se que a dopamina possa excitar os neurônios estriatonigrais, que expressam receptores de dopamina do tipo D₁, e inibir os neurônios estriatopalidais, que expressam receptores do tipo D₂. Como as ações das vias direta e indiretas sobre as eferências dos núcleos da base seriam antagonicas, a dopamina acabaria por produzir o mesmo efeito, ou seja, uma diminuição do efluxo inibitório dos núcleos da base no tálamo (Richardson, Kase *et al.*, 1997; Purves, 2005) (Fig. 1). A morte dos neurônios dopaminérgicos da SN leva a uma atividade anormal dos núcleos da base, sendo responsável pelos sintomas motores da DP.

O modelo descrito acima tem sido bastante útil em estudos da anatomia e funções da circuitaria dos núcleos da base, mas representa, claramente, uma visão simplificada. Muitas conexões potencialmente importantes entre os núcleos da base

e o tronco encefálico ou núcleos talâmicos não são incluídas nesse modelo. Além disso, a separação das vias estriatais em direta e indireta não são absolutas. A perda crônica de dopamina resulta em mudanças significativas nas taxas de disparo dos neurônios dos núcleos da base, além de um aumento significativo de sincronia entre células vizinhas e mesmo entre núcleos (Galvan e Wichmann, 2008).

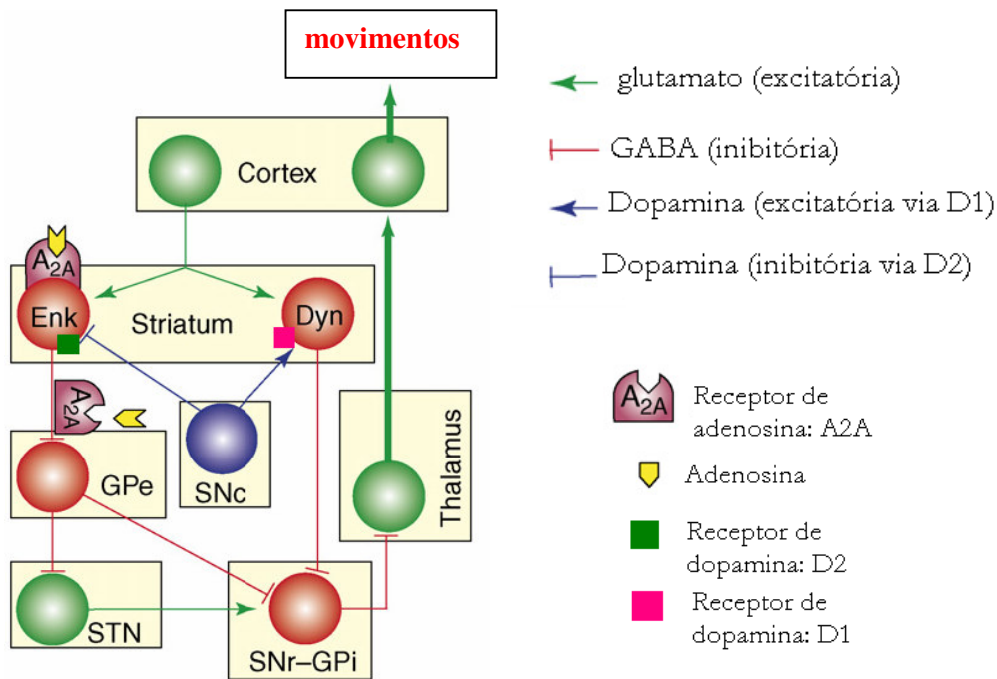


Figura 1. Esquema da circuitaria dos gânglios da base. Dopamina (azul) dos neurônios da parte compacta da substância nigra (SNc) liga-se aos receptores D₁ na via direta e aos receptores D₂ na via indireta, facilitando o movimento. A adenosina, via receptores A_{2A} nos neurônios da via indireta, age em oposição à ativação de receptores D₂. (Adaptada de Schwarzschild, Agnati *et al.*, 2006). Abreviações: Enk, encefalina; Dyn, dinorfina; GPe, segmento externo do globo pálido; Gpi, segmento interno do globo pálido; NST, núcleo subtalâmico; SNr, parte reticular da substância nigra.

Importante enfatizar que a neuropatologia da doença de Parkinson não está restrita à via nigroestriatal e anormalidades histológicas podem ser encontradas em muitos outros grupos de células dopaminérgicas e não-dopaminérgicas, explicando a presença de outros sintomas, além dos motores. Neurônios pouco mielinizados e com longas projeções são mais suscetíveis à patologia da doença (Braak, Ghebremedhin *et al.*, 2004).

Em função de fenômenos compensatórios, os sintomas motores da DP só aparecem quando aproximadamente 80% da dopamina estriatal já foi depletada e aproximadamente 60% dos neurônios da SNpc já foram perdidos (Deumens, Blokland *et al.*, 2002).

1.2 Causas da DP

As causas da morte dos neurônios dopaminérgicos não são bem compreendidas, mas parecem resultar de vários fatores, como estresse oxidativo, processos inflamatórios, proteínas mal-enoveladas e excitotoxicidade glutamatérgica (Esposito, Di Matteo *et al.*, 2007; Yuan, Zheng *et al.*, 2007). Estudos com fluído cerebrospinal de indivíduos com DP sugerem que anormalidades nas purinas também podem estar presentes nessa doença (Loeffler, Camp *et al.*, 2000).

Estudos *post mortem* na SNpc de pacientes com DP mostraram anormalidades na atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, bem como um aumento de vários marcadores biológicos de dano oxidativo, além de uma redução da molécula antioxidante glutathione (Dauer e Przedborski, 2003). Esses dados demonstram o envolvimento do estresse oxidativo na degeneração dessa estrutura encefálica.

A mitocôndria é uma das principais fontes de espécies reativas de oxigênio, além de ser altamente suscetível a dano oxidativo, uma vez que as espécies reativas de oxigênio danificam diretamente as enzimas mitocondriais, causam mutações do ADN mitocondrial e alteram a permeabilidade da sua membrana, levando a célula à morte. Vale destacar que o processo de envelhecimento afeta negativamente o funcionamento da mitocôndria (Lin, Liou *et al.*, 2009).

A deposição de proteínas em tecidos encefálicos é uma característica de muitas doenças neurodegenerativas, incluindo a DP. A formação de agregados protéicos pode ser o resultado de mutações genéticas, ou mesmo da interação de proteínas funcionais com espécies reativas de oxigênio que provocam modificações conformacionais nas proteínas. Além disso, pode haver uma disfunção no sistema proteossomal, o que impede a degradação das proteínas não-funcionais, fazendo com que estas se acumulem (Dauer e Przedborski, 2003).

Proteínas mal-enoveladas agregadas ou solúveis podem ser neurotóxicas através de uma variedade de mecanismos. Agregados protéicos podem causar dano diretamente, talvez por deformar a célula ou interferir com o tráfego intracelular nos neurônios. Inclusões protéicas também podem seqüestrar proteínas importantes para a sobrevivência celular (Dauer e Przedborski, 2003). Além disso, durante os estágios iniciais de agregação protéica, ocorre a geração de espécies reativas de oxigênio (Tabner, El-Agnaf *et al.*, 2005).

A própria dopamina é uma molécula bastante reativa, que prontamente se oxida ao reagir com proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos. Os neurônios dopaminérgicos possuem uma série de mecanismos úteis para a proteção contra o estresse citosólico provocado pela dopamina: entre eles, o armazenamento desse neurotransmissor em vesículas, através do transportador vesicular de monoaminas (VMAT2), o metabolismo pela monoamina oxidase, a redução de dopamina quinona pela glutatona (Sulzer, 2007) e a síntese de neuromelanina (Zecca, Zucca *et al.*, 2003).

Observou-se que em pacientes com DP, o número de astrócitos na SN é menor do que em outras áreas do encéfalo. Os astrócitos apresentam a propriedade de diminuir os radicais livres. Uma vez que os neurônios dopaminérgicos geram espontaneamente radicais livres durante o metabolismo da dopamina, o número reduzido de células gliais faz com que os neurônios sejam ainda mais vulneráveis à degeneração (Mena e Garcia De Yebenes, 2008).

Os neurônios dopaminérgicos da SN são pigmentados em função da presença de neuromelanina (NM). Não se sabe se a NM é sintetizada a partir da oxidação enzimática ou da auto-oxidação da dopamina. A síntese de NM remove o excesso de dopamina citosólica que não foi estocada nas vesículas sinápticas e poderia iniciar um processo de dano celular. Além disso, a NM é capaz de seqüestrar metais potencialmente tóxicos, presentes no citosol devido à exposição ambiental, formando complexos estáveis. A NM acumula nos neurônios da SN durante o envelhecimento normal, indicando que esses neurônios estão sob estresse oxidativo da dopamina citosólica mesmo em pessoas normais (Zecca, Zucca *et al.*, 2003).

No entanto, quando um neurônio que contém NM morre, esta é liberada no citosol, e induz a ativação da microglia. Essa ativação da microglia provoca a morte de mais neurônios dopaminérgicos e, assim, a liberação de mais NM. Proteínas mal-

enoveladas ou agregados de proteínas, como os encontrados nos corpos de Lewy, também são liberados com a morte dos neurônios da SN, e também podem ativar uma resposta imune local (Sulzer, 2007). Estudos recentes sugerem que neuroinflamação e a ativação da microglia têm um papel importante na patogênese da DP (Tansey e Goldberg, 2009).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC), o que inclui os núcleos da base (Greenamyre, 2001), e age em receptores ionotrópicos (NMDA e AMPA) ou metabotrópicos (mGluR). Quando os níveis de glutamato extracelular aumentam além da taxa fisiológica, ocorre a excitotoxicidade do glutamato (Caudle e Zhang, 2009), que está envolvida em várias doenças crônicas ou agudas do sistema nervoso, incluindo a DP. A excitotoxicidade do glutamato gera um massivo influxo de cálcio extracelular como resultado da excessiva ativação do receptor NMDA, ativando enzimas dependentes de cálcio envolvidas no catabolismo de proteínas, fosfolipídeos, e ácidos nucleicos, o que leva à disfunção mitocondrial, rompimento da membrana plasmática e alterações no citoesqueleto (Greenamyre, 2001).

A redução da liberação dopaminérgica no corpo estriado resulta na superativação do NST, causando um aumento na liberação de glutamato nos corpos celulares dos neurônios glutamatérgicos localizados na SNpc, os quais são ricos em receptores NMDA e AMPA, bem como em mGluR1 e mGluR2/3 (Rodriguez, Obeso *et al.*, 1998), provocando excitotoxicidade. Pode haver excitotoxicidade também no corpo estriado, onde há redução na expressão das proteínas dos transportadores de glutamato GLT1 e GLAST após lesão por 6-OHDA (Chung, Chen *et al.*, 2008), o que potencialmente leva a um aumento de glutamato extracelular.

Na maioria dos casos, a DP acomete pessoas com mais de 50 anos (Van Den Eeden, Tanner *et al.*, 2003) e é idiopática, ou seja, de causa desconhecida. Casos raros da DP são provocados por mutações em genes específicos e apresentam um início precoce, correspondendo às formas herdadas da doença. No entanto, os sintomas clínicos e a histopatologia são essencialmente iguais aos vistos na forma idiopática da doença, o que sugere que mutações genéticas aceleram as mesmas cascatas moleculares e celulares que ocorrem nas formas tardias da doença (Mattson e Magnus, 2006).

No ano de 1997, descobriu-se a primeira mutação relacionada com a doença no gene da proteína α -sinucleína (Polymeropoulos, Lavedan *et al.*, 1997). A α -

sinucleína é uma proteína de membrana e parece modular a função de vesículas sinápticas (Kahle, Haass *et al.*, 2002), sendo o principal componente dos corpos de Lewy. Após a descoberta desse gene, foram identificados muitos outros que estão relacionados com as formas herdadas da doença (Bonifati, Rizzu *et al.*, 2003), como a parkina (Kitada, Asakawa *et al.*, 1998). Mutações nesse gene são as mais comuns entre as formas recessivas e respondem pela maioria dos casos com início antes dos 30 anos (Bonifati, 2007). Ele codifica uma E3 ubiquitina ligase responsável por direcionar proteínas não-funcionais para degradação proteossomal (Kitada, Asakawa *et al.*, 1998).

A forma idiopática da doença parece ser determinada pelo envelhecimento. Sabe-se que as células do sistema nervoso são mais afetadas pelo envelhecimento do que outras células do corpo, devido a um aumento de estresse oxidativo, perturbação da homeostase energética e acúmulo de proteínas danificadas. Essas mudanças que ocorrem durante o envelhecimento normal são exacerbadas em populações vulneráveis de neurônios relacionadas às doenças neurodegenerativas. O desenvolvimento de uma doença neurodegenerativa durante envelhecimento é determinado por fatores genéticos e ambientais que interagem com esses mecanismos moleculares e celulares relacionados ao envelhecimento (Mattson e Magnus, 2006).

A idéia que fatores ambientais possam contribuir para a patogênese da DP ganhou força quando se descobriu que a utilização de uma droga contendo a toxina MPTP causou um estado agudo e permanente de parkinsonismo em humanos (Langston, Ballard *et al.*, 1983) através da geração de disfunção mitocondrial e aumento de estresse oxidativo (Dauer e Przedborski, 2003). Vários estudos epidemiológicos e em animais confirmam o envolvimento de pesticidas e toxinas ambientais na patogênese da DP (Bueler, 2009).

Evidências apontam que o ambiente rural e exposição a pesticidas estão associados com a DP (Migliore e Coppede, 2009), embora não se conheça a taxa de exposição que pode levar à doença. Traumas repetidos na cabeça, com perda de consciência, e uso de medicação psicoativa também parecem ser fatores de risco (Dick, De Palma *et al.*, 2007).

1.3 Purinas

O sistema purinérgico inclui as purinas derivadas de adenina (os nucleotídeos ATP, ADP e AMP e o nucleosídeo adenosina), as purinas derivadas de guanina (os nucleotídeos GTP, GDP e GMP e o nucleosídeo guanosina), além dos metabólitos xantina, hipoxantina, ácido úrico e o nucleosídeo inosina, bem como receptores, transportadores e enzimas. São moléculas comuns, encontradas em todas as células de animais e vegetais. As purinas, junto com as pirimidinas, formam o ácido desoxirribonucléico (ADN) e o ácido ribonucléico (ARN) (Rathbone, Middlemiss *et al.*, 1999).

Sabe-se que o metabolismo das purinas está envolvido na DP. Os primeiros estudos que demonstraram o envolvimento dos metabolismos da dopamina e purinas vieram de estudos com a adenosina. A adenosina inibe a síntese e liberação de dopamina dos nervos terminais (Harms, Wardeh *et al.*, 1979). Além disso, sabe-se que, quinze dias após a lesão unilateral dos neurônios dopaminérgicos por 6-OHDA, há um decréscimo de 35% no conteúdo de adenosina no corpo estriado ipsilateral à lesão (Pinna, Corsi *et al.*, 2002). Além disso, verificou-se que as concentrações de algumas purinas no líquor estão alteradas em pacientes com a DP (Lewitt, 1992).

As purinas derivadas de guanina têm sido estudadas como moduladoras de processos intracelulares, como aqueles mediados por proteína G. Entretanto, elas também têm sido relacionadas com efeitos extracelulares não relacionados à proteína G, como: (i) efeitos inibitórios na atividade do sistema glutamatérgico em condições fisiológicas e patológicas; (ii) efeitos na memória e comportamento; (iii) efeitos tróficos em células neurais (Schmidt, Lara *et al.*, 2007). O metabolismo das purinas é complexo, e guanina e guanosina podem ser produzidas de uma variedade de fontes (Fig. 2).

O metabolismo das purinas ocorre em parte pelas enzimas nucleotidases e ectonucleotidases. Elas catalisam a transformação de nucleotídeos púricos trifosfatados em nucleotídeos di e monofosfatados e, no final, em nucleosídeos (GTP → GDP → GMP → guanosina) (Schmidt, Lara *et al.*, 2007).

Os astrócitos são a principal fonte de purinas do encéfalo (Ciccarelli, Ballerini *et al.*, 2001). Em doenças do SNC, como convulsões, traumas, isquemia e hipóxia,

tanto neurônios quanto astrócitos aumentam grandemente a liberação de nucleotídeos e nucleosídeos derivados de purinas (Ciccarelli, Ballerini *et al.*, 2001).

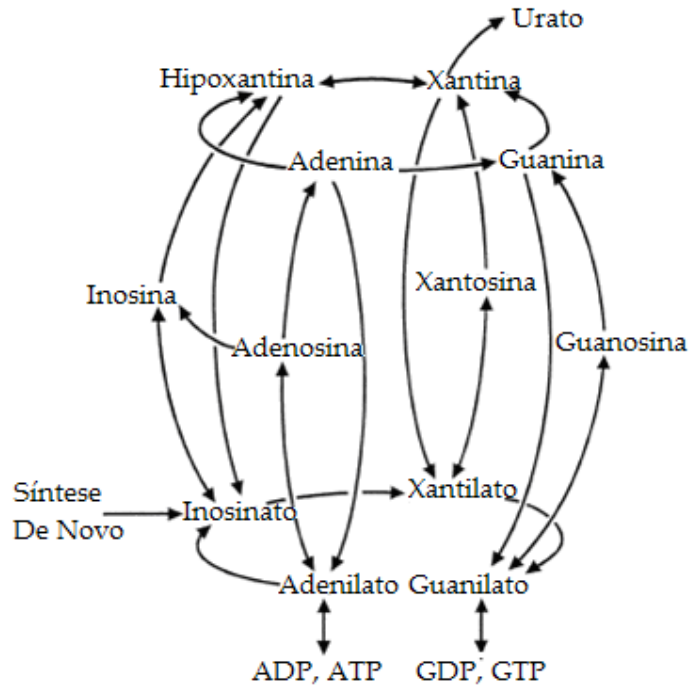


Figura 2. Esquema ilustrando vias metabólicas purinérgicas. A base nitrogenada guanina pode ser gerada pela hidrólise do guanilato em guanosina, seguido pela remoção de ribose pela enzima purina nucleosídeo fosforilase (Adaptato de Loeffler, Lewitt *et al.*, 1998).

O papel da guanosina parece ser bastante significativo: uma vez liberada extracelularmente, tem uma meia-vida longa e exerce múltiplos efeitos na proliferação de astrócitos, liberação de purinas derivadas de adenina, produção de neurotrofinas por astrócitos, brotamento de neuritos e sobrevivência neuronal. Assim, a guanosina pode afetar a evolução do quadro clínico após danos, tanto por agir diretamente nos neurônios quanto por exercer efeitos tróficos nos astrócitos que reforçam e amplificam os efeitos protetores da guanosina (Ciccarelli, Ballerini *et al.*, 2001).

Vários estudos demonstraram que a guanosina pode ser um componente neuroprotetor endógeno, liberado em situações de excitotoxicidade, prevenindo os neurônios de um aumento na toxicidade (Schmidt, Lara *et al.*, 2007).

Administração intracerebroventricular (i.c.v.), intraperitoneal (i.p.) ou oral de guanosina ou GMP protege contra convulsões induzidas pelos agentes

glutamatérgicos ácido quinolínico, cainato e α -dendrotoxina em roedores adultos e jovens (Schmidt, Lara *et al.*, 2007). A ação anti-glutamatérgica da guanosina tem sido bastante estudada (De Oliveira, Horn *et al.*, 2004; Schmidt, Avila *et al.*, 2005; Soares, Schmidt *et al.*, 2004). Poderíamos pensar que ela age como antagonista direto dos receptores glutamatérgicos. Porém, parece não existir uma interação direta da guanosina com os receptores de glutamato. Esse efeito anti-glutamatérgico parece ser mediado por astrócitos, uma vez que a guanosina aumenta a captação de glutamato por astrócitos em cultura (Frizzo, Lara *et al.*, 2001) e em fatias encefálicas (Frizzo, Lara *et al.*, 2002).

As purinas derivadas de guanina têm apresentado perfis neuroprotetores similares em vários protocolos *in vivo* e *in vitro*. Entretanto, a maioria dos efeitos das purinas derivadas de guanina, principalmente o GMP, parece ser devido à sua conversão para guanosina (Schmidt, Lara *et al.*, 2007).

Apesar dos seus efeitos biológicos bem descritos, não há evidências de receptores ou sítios de ligação para a guanosina. Sabe-se que nem a guanosina, nem o GTP ligam-se com alta afinidade aos receptores de purinas derivados de adenina (Muller e Scior, 1993), sugerindo que as purinas derivadas de guanina possuam alvos celulares distintos das purinas derivadas de adenina. Algumas das ações tróficas das purinas derivadas de guanina podem ser indiretas, ocorrendo como resultado da estimulação da síntese e liberação de fatores tróficos (Schmidt, Lara *et al.*, 2007).

1.3.1 Efeitos neurotróficos das purinas derivadas de guanina

Substâncias tróficas afetam o desenvolvimento, estrutura ou manutenção de uma célula-alvo durante um período de tempo maior do que aquele envolvido na neurotransmissão. Efeitos tróficos incluem as mudanças plásticas envolvidas na memória e aprendizado, brotamento de processos neurais, neuroproteção contra estímulos nocivos e mesmo regulação do número de células através da indução de apoptose (Rathbone, Middlemiss *et al.*, 1999).

As purinas podem afetar a resposta do sistema nervoso a danos através de efeitos diretos nas células-alvo. Entretanto, as purinas podem exercer seus efeitos

indiretamente, estimulando um ou mais tipos celulares a produzir ou liberar fatores tróficos. Além disso, as purinas podem acentuar os efeitos dos fatores tróficos em suas células alvo (Rathbone, Middlemiss *et al.*, 1999).

As purinas derivadas de guanina afetam o desenvolvimento, estrutura e manutenção de células neurais. Alguns efeitos tróficos das purinas são mediados através de receptores de superfície, enquanto outros requerem a captação de purinas (Rathbone, Middlemiss *et al.*, 1999).

Embora alguns dos efeitos extracelulares do GTP parecem ser relacionados à sua conversão para guanosina, alguns estudos indicam que um mecanismo de ação diferente possa estar presente (Schmidt, Lara *et al.*, 2007).

1.3.2 Hidrólise estriatal de purinas derivadas de adenina e guanina em ratos lesionados por 6-OHDA

ATP e adenosina parecem ter efeitos protetores e deletérios, respectivamente, nos neurônios dopaminérgicos (Sorimachi, Yamagami *et al.*, 2002; Alcaçaga, Retamal *et al.*, 2003; Newman, 2003). Já a guanosina, como abordamos anteriormente, tem um papel protetor no encéfalo (Schmidt, Lara *et al.*, 2007). Assim, a regulação dos níveis dessas purinas pela atividade enzimática pode ser relevante para as características clínicas da DP.

Em um trabalho realizado por nosso grupo (Oses *et al.*, dados não publicados) (detalhes também no Apêndice), usamos o mesmo modelo experimental de lesão deste trabalho e verificamos que a infusão de 6-OHDA provoca aumento na hidrólise de ADP, AMP e GTP, e diminuição na hidrólise de GDP de 60%, não tendo sido encontradas mudanças na transcrição das enzimas NTPDases 1, 2, 3, 5, 6 e 5'-nucleotidase.

Podemos especular que os efeitos combinados das modificações nas hidrólises de GTP e GDP resultem em uma redução da produção de guanosina extracelular, o que também contribuiria para a degeneração dos neurônios.

Portanto, a depleção de dopamina altera a hidrólise dos nucleotídeos regulando, assim, seus níveis no estriado. Essas modificações podem contribuir para os sintomas observados no modelo da DP ou mesmo nos pacientes, caso

extrapolamos nossos resultados para humanos. Esses resultados reforçam o envolvimento do metabolismo das purinas na DP, o que inclui a guanosina.

1.4 Tratamento da DP

Os tratamentos disponíveis para a DP são puramente sintomáticos e paliativos. O tratamento farmacológico clássico da DP consiste da administração de levodopa, substância precursora da dopamina, e a combinação com agonistas dopaminérgicos e inibidores da monoamina oxidase e DOPA-descarboxilase, enzimas que degradam a dopamina liberada.

Outras possibilidades envolvem tratamento cirúrgico e estimulação cerebral profunda que geralmente são utilizados em casos graves e refratários ao tratamento farmacológico (Weiner, 2004; Rajput e Rajput, 2006).

1.5 Modelos animais

Para o estudo da DP, diversos modelos animais têm sido desenvolvidos. Os principais objetivos são a busca da compreensão patofisiológica da DP e a testagem da eficácia de potenciais tratamentos para esta doença. Os modelos podem ser genéticos ou baseados em neurotoxinas. Entre as neurotoxinas utilizadas para induzir neurodegeneração dopaminérgica, estão a 6-OHDA, o MPTP, o paraquat e a rotenona. Todas elas provocam a geração de espécies reativas de oxigênio (Dauer e Przedborski, 2003).

1.5.1 6-Hidroxidopamina (6-OHDA)

A toxicidade induzida pela 6-OHDA é relativamente seletiva para neurônios monoaminérgicos, uma vez que é captada preferencialmente por transportadores

dopaminérgicos e noradrenérgicos (Dauer e Przedborski, 2003). Sua neurotoxicidade é baseada no efeito inibitório sobre as enzimas da cadeia respiratória mitocondrial (complexos I e IV) (Glinka, Gassen *et al.*, 1997) bem como na produção de radicais livres (Inden, Kitamura *et al.*, 2005). Causa a degeneração dos terminais nervosos, podendo afetar também os corpos celulares, particularmente quando administrada na região onde eles estejam localizados (Deumens, Blokland *et al.*, 2002).

Uma vez que a 6-OHDA não pode atravessar a barreira hematoencefálica, ela deve ser administrada através de injeção estereotáxica na SN, FPM (onde está a via nigroestriatal) ou corpo estriado. A lesão geralmente é feita unilateralmente e o lado contralateral pode servir de controle (Dauer e Przedborski, 2003).

1.5.2 Avaliação do comportamento motor

No modelo unilateral da DP, a infusão de 6-OHDA no FPM resulta na perda ipsilateral de dopamina no corpo estriado e núcleo acumbens, bem como em outras áreas, como os tubérculos olfatórios, septo e córtex pré-frontal. Tanto no corpo estriado quanto no núcleo acumbens há, no hemisfério lesionado, um aumento no número e na sensibilidade dos receptores de dopamina (Torres e Dunnett, 2007).

As lesões unilaterais provocam uma assimetria na liberação de dopamina e, conseqüentemente, uma assimetria no comportamento motor que leva a um comportamento rotacional assimétrico nos animais. A magnitude desse comportamento depende do grau de lesão (Przedborski, Levivier *et al.*, 1995). A lesão unilateral pode ser acessada quantitativamente; assim, a vantagem desse modelo é a habilidade de acessar as propriedades anti-parkinsonianas de novas drogas (Jiang, Jackson-Lewis *et al.*, 1993). Para inferir o grau de lesão unilateral provocado pela 6-OHDA, pode-se utilizar drogas dopaminomiméticas, como a anfetamina, a apomorfina e o metilfenidato (MF).

A anfetamina é um agonista indireto da dopamina, pois provoca um aumento na liberação de dopamina e uma redução da sua recaptção. Sua ação exacerba o desbalanço de dopamina, favorecendo a projeção nigroestriatal não-lesionada e, assim, faz com que os animais apresentem rotações ipsilaterais (Fig. 3). Há um

cruzamento na saída motora do corpo estriado, ou seja, o lado direito controla os membros esquerdos e o lado esquerdo controla os membros direitos. Ou seja, se não houvesse decussação, um rato lesionado unilateralmente apresentaria rotações contralaterais em vez de ipsilaterais. Acredita-se que a natureza da assimetria deve-se à preferência de posição no espaço bilateral. Uma vez que o rato lesionado negligencia o espaço contralateral (afetado pela lesão), ele apresenta uma tendência para o lado ipsilateral à lesão, e, assim, gira em direção a esse lado (Torres e Dunnett, 2007). A anfetamina é capaz de proporcionar esse desbalanço na liberação de dopamina mesmo quando há morte de apenas 50 % dos neurônios no lado lesionado (Ungerstedt, 1971). Já o MF liga-se no transportador de dopamina e inibe a recaptação de dopamina, promovendo um perfil comportamental que é comparável àquele da anfetamina, sendo que sua dose de 20 mg/kg corresponde, em termos de efeitos comportamentais, a 2,5 mg/kg de anfetamina (Kuczenski e Segal, 1997).

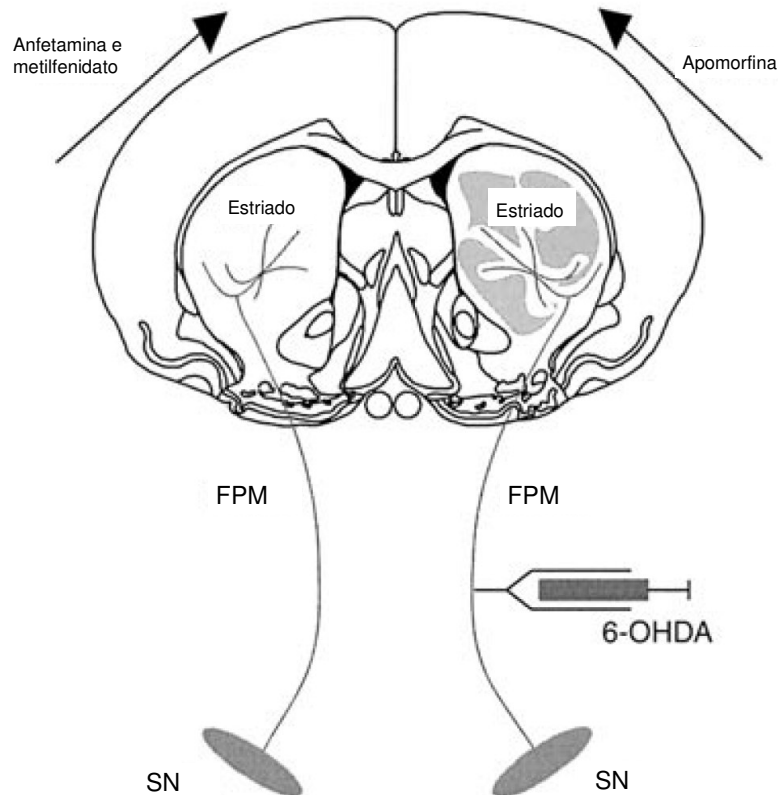


Figura 3. Diagrama da via nigroestriatal e respostas rotacionais produzidas por apomorfina (rotações contralaterais), anfetamina e metilfenidato (rotações ipsilaterais). Área em cinza no corpo estriado indica a perda de dopamina devido à injeção de 6-OHDA no FPM. SN, substância nigra; FPM, feixe prosencefálico medial. (Adaptada de Deumens, Blokland *et al.*, 2002).

Em contraste, agonistas diretos como a apomorfina provocam rotações contralaterais à lesão, através da ação nos receptores de dopamina sensibilizados no hemisfério lesionado (Ungerstedt, 1971) (Fig 3). Entretanto, para que apresentem rotações após administração de apomorfina, os animais devem apresentar uma redução de 90% dos neurônios dopaminérgicos da SN (Hefti, Melamed *et al.*, 1980).

Além da administração de drogas dopaminomiméticas, o teste de motricidade sobre grade (TMG ou, em inglês, *footfault test*) pode ser utilizado para selecionar animais com alto grau de lesão unilateral, assim como faz o teste de rotações induzidas por desafio com apomorfina (Hefti, Melamed *et al.*, 1980). Nesse teste, a atividade rotacional ipsilateral é induzida pelo contexto, quando o animal é colocado sobre o aparato. Apresenta algumas vantagens quando comparado com os testes que utilizam drogas dopaminomiméticas, pois requer apenas uma curta sessão de três minutos e não necessita a administração de drogas para mostrar assimetria motora. Assim, o TMG é menos invasivo, provocando menores alterações bioquímicas e comportamentais nos animais. Porém, são necessários mais estudos para entender os mecanismos envolvidos nas rotações induzidas pela exposição a referido aparato (Silvestrin, De Oliveira *et al.*, 2009).

2 JUSTIFICATIVA

Ainda não existem tratamentos capazes de impedir ou diminuir a degeneração dos neurônios dopaminérgicos na DP. Os tratamentos disponíveis, como levodopa (precursor de dopamina), agonistas de dopamina e inibidores da enzima monoamina oxidase-B, são apenas sintomáticos e agem promovendo a manutenção dos níveis dopaminérgicos. Tais tratamentos não têm plena eficácia e geram efeitos colaterais. Assim, a busca por novas terapias aplicáveis à DP é de extrema importância. Além disso, a eficácia ou não de uma determinada droga pode ajudar a explicar os mecanismos de degeneração dos neurônios dopaminérgicos, ainda não bem compreendidos, apesar do esforço de pesquisadores das mais diferentes áreas.

3 OBJETIVO

Tendo em vista que as purinas derivadas da guanina, principalmente o GMP e a guanosina, apresentam perfis neuroprotetores similares, em vários protocolos, *in vivo* e *in vitro* (Schmidt, Lara *et al.*, 2007), e que o efeito do GMP parece ser devido à sua conversão para guanosina (Stoof, Winogrodzka *et al.*, 1999; Schmidt, Lara *et al.*, 2007), tivemos como objetivo investigar os efeitos de uma administração oral crônica de guanosina sobre parâmetros motores e bioquímicos em modelo animal da DP induzido por 6-OHDA.

3.1 Objetivos específicos

Tivemos como objetivo avaliar o efeito da administração oral de guanosina em ratos com lesão unilateral provocada pela infusão de 6-OHDA no FPM sobre os seguintes parâmetros:

- 1) comportamento rotacional induzido por MF;
- 2) comportamento rotacional no TMG;
- 3) conteúdo de tirosina hidroxilase (TH) na SNpc.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Ratos Wistar machos foram obtidos do biotério do Departamento de Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os animais foram mantidos em ciclo claro / escuro de 12h, sob temperatura ambiental controlada (22°C). Foram mantidos em gaiolas, cada uma com cinco animais. Receberam ração e água (ou solução de guanosina) *ad libitum*. Esse projeto, com o número 2007985, foi aprovado pelo comitê de ética desta Universidade.

4.2 Infusão de 6-OHDA e tratamento com guanosina

Ratos Wistar machos (250-350g, 100-115 dias de idade) beberam uma solução de 0,5 mg/ml (Vinade, Schmidt *et al.*, 2005) (n=20) ou água destilada (n=16) durante 4 semanas.

Depois das duas primeiras semanas de tratamento, foram submetidos à cirurgia estereotáxica, após terem sido anestesiados com tiopental (40 mg/kg). Receberam duas infusões de 6-OHDA (16,5µg; 5,5 µl) no FPM direito de forma a promover a morte dos neurônios mesencefálicos dopaminérgicos unilateralmente (2,5 µl a 0,5µl/min, AP: -4,4 mm, LL: -1,8 mm, DV: -8,8 mm do bregma; e 3,0 µl a 0,5 µl/min, AP: -4,0 mm; LL: -1,6 mm; DV: -9,0 mm do bregma; bucal: -3,3 mm).

Para a realização das infusões, utilizamos agulha ligada a uma microseringa de 10 µl (Hamilton, 701 N) e uma bomba de infusão (Insight). A agulha foi mantida no encéfalo por 4 min após cada infusão para permitir a difusão da droga. Os ratos receberam cuidados pós-operatórios até acordarem e foram então colocados de volta às suas gaiolas.

Antes da cirurgia e um dia depois dela, os ratos receberam injeção i.p. de guanosina (7,5 mg/kg) (Soares, Schmidt *et al.*, 2004). Injetamos guanosina no dia da

cirurgia e um dia após para corrigir um possível declínio na ingestão de guanosina pelos animais em função da anestesia e recuperação.

O cronograma experimental pode ser visualizado na Fig. 4.

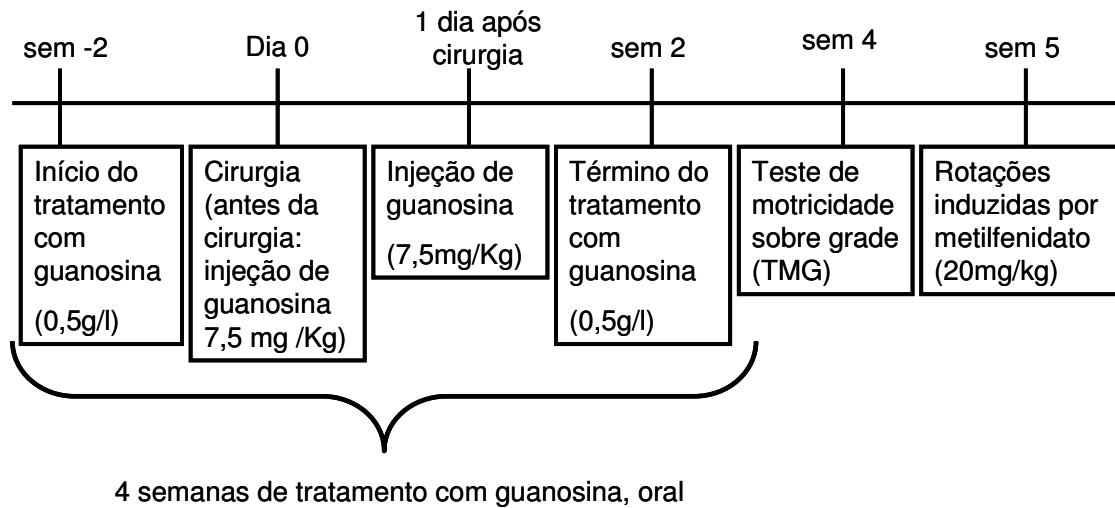


Figura 4. Cronograma experimental.

4.3 Testes Comportamentais

Duas semanas após o final do tratamento, os animais foram submetidos ao TMG (ou, em inglês, *footfault test*), o qual consiste de uma grade de 80 x 60 cm com aberturas de 3 x 3 cm e elevada a 76,5 cm do chão (Silvestrin, De Oliveira *et al.*, 2009) (Fig. 5).

Os animais foram colocados na sala de comportamento 30 minutos antes do teste a fim de se habituarem. Depois disso, um de cada vez, foram colocados no centro da grade e tiveram três minutos para explorá-la livremente. A ocorrência de comportamento rotacional induzido pelo contexto era, então, registrada (Silvestrin, De Oliveira *et al.*, 2009). Ou seja, avaliamos apenas a presença ou ausência desse giro, não sua intensidade (número de giros ou velocidade).

Uma semana após o TMG, os animais foram desafiados com MF na dose de 20 mg/kg. Após a habituação na sala de comportamento durante 30 minutos, os

ratos receberam injeção i.p. da droga e, então, foram colocados numa arena circular por 30 minutos. O número de rotações ipsilaterais à lesão foi registrado.

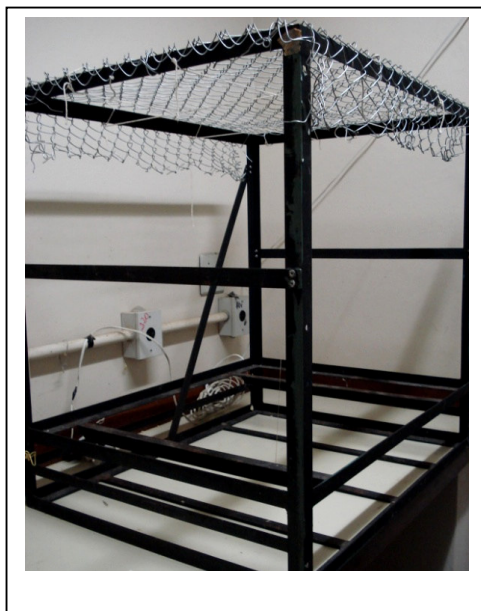


Figura 5. Aparato do TMG.

4.4 Imunoistoquímica para tirosina hidroxilase (TH)

Uma semana após as rotações induzidas por MF, os animais foram sacrificados individualmente por decapitação. Análises imunoistoquímicas do conteúdo da enzima TH para quantificação da lesão foram realizadas de acordo com a literatura (Castaneda, Fleming *et al.*, 2005), com pequenas modificações. A enzima TH é limitante no processo de síntese da dopamina e catalisa a hidroxilação de L-tirosina para DOPA (Dunkley, Bobrovskaya *et al.*, 2004), podendo ser utilizada como um marcador de neurônios dopaminérgicos.

Os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (0,7 ml/kg) e xilazina (0,6ml/kg) e perfundidos transcárdialmente com 150 mL de solução de NaCl 0,9% seguidos de 150 mL de solução de paraformaldeído 4%. Após a perfusão, os encéfalos foram isolados e mantidos em geladeira, mergulhados em solução de paraformaldeído 4% por 12 horas. Feito isso, os encéfalos foram colocados em

solução de sacarose 30% e mantidos em geladeira até submersão completa. Após, foram aclimatizados e seccionados a -20°C em criostato (Leica Microsystems GmbH). Fatias do mesencéfalo em secções coronais de $45\ \mu\text{m}$ foram obtidas e colocadas em tampão salina-fosfato (TSF). As fatias foram lavadas cinco vezes em TSF filtrado, onde cada lavagem foi de cinco minutos em agitador à temperatura ambiente. Após as lavagens, as fatias foram incubadas em anticorpo policlonal de coelho para TH 1:750 (AB 152, Chemicon International) à temperatura ambiente e por 18 horas. As fatias foram novamente lavadas cinco vezes e, então, incubadas com anticorpo secundário (anti-coelho) fluorescente (AlexaFluor 568 A11036, Molecular Probes, USA) à temperatura ambiente durante 1 hora. Após nova lavagem com TSF filtrado, as fatias foram colocadas entre lâmina e lamínula com Fluorsave (Calbiochem, USA) para se evitar a perda da fluorescência e, então, observadas em microscópio. As imagens obtidas foram analisadas usando o programa Scion Image para Windows através do pareamento da quantidade de TH de ambos os hemisférios. Para cada rato, o hemisfério contralateral à lesão foi utilizado como controle. Como foram feitas duplicatas de cada hemisfério, a média do hemisfério controle era normalizada a 100% e a média dos valores do hemisfério tratado era considerada para a análise estatística (item 4.5).

4.5 Análise estatística

A análise estatística foi feita pelo programa SPSS 10.0 para Windows.

Para se verificar a diferença entre os grupos quanto ao número de ratos que giram, os dados referentes ao TMG foram analisados utilizando-se o teste exato de Fisher. Já os dados referentes às rotações induzidas por MF e à imunoistoquímica para TH foram analisados através do teste t para amostras independentes. No caso das rotações, os dados são apresentados como média \pm EP. Para todos os resultados, $p \leq 0,05$ foi considerado como diferença significativa entre os grupos.

5 RESULTADOS

Treze dos 16 animais controles mostraram comportamento rotacional espontâneo no TMG, o que diferiu dos animais do grupo tratado, onde somente 9 dos 20 animais mostraram o mesmo comportamento (teste exato de Fisher, $P=0,041$) (Tabela 1). Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos controle e tratado no número de rotações induzidas por metilfenidato 20 mg/kg (teste t para amostras independentes, $P = 0,716$; grupo controle, $n=16$; grupo tratado, $n=20$) (Fig.6).

Encontramos uma tendência para uma menor diminuição dos neurônios nigrais positivos para TH nos animais tratados com guanossina quando comparados aos controles (teste t para amostras independentes, $P=0,064$; Figs. 7 e 8).

Tabela 1. Correlação entre tratamento e comportamento rotacional no TMG. Teste exato de Fisher, $p = 0,041$.

| Comportamento rotacional espontâneo no Teste de Motricidade sobre Grade (TMG) | Tratamento | | Total |
|---|------------|----------|-------|
| | Guanossina | Controle | |
| Sim | 09 | 13 | 22 |
| Não | 11 | 03 | 14 |
| Total | 20 | 16 | 36 |

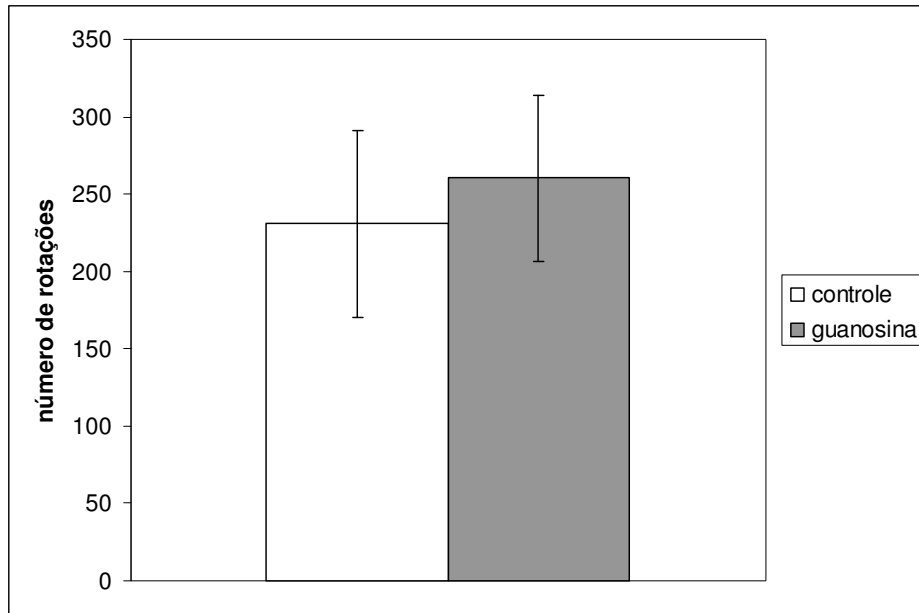


Figura 6. Rotações com metilfenidato nos grupos controle e guanosina. Teste t para amostras independentes ($P= 0,716$; média \pm E.P.; grupo controle, $n=16$; grupo tratado, $n=20$).

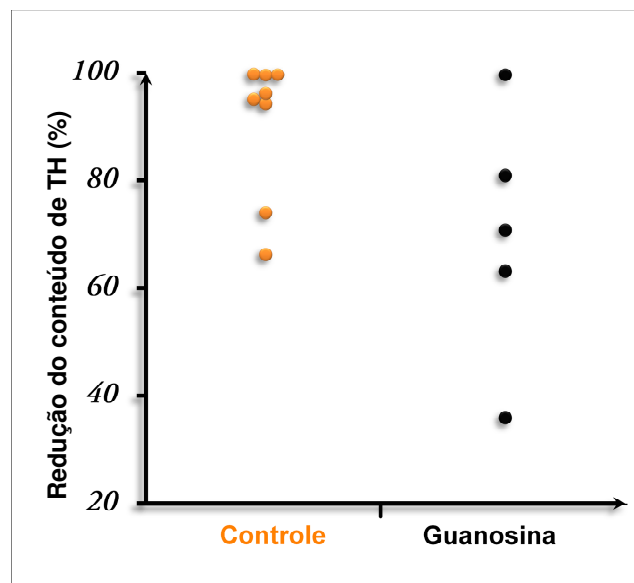


Figura 7. Comparação da perda de TH na parte compacta da substância nigra entre os grupos Controle e Tratado (Guanosina). Teste t para amostras independentes, $p=0,064$.

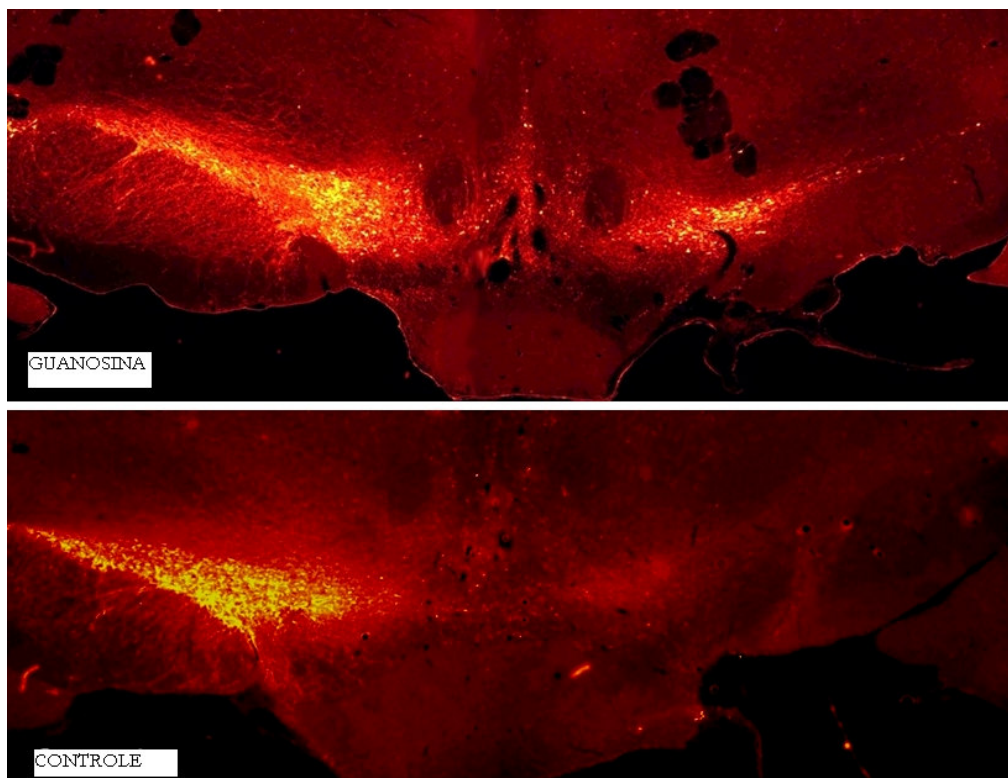


Figura 8. Imunoistoquímica mostrando a diminuição no conteúdo de TH na SN ipsilateral ao FPM que recebeu a infusão de 6-OHDA (lado direito). As fatias vieram de animais representativos de cada grupo.

6 DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram que a administração oral de guanosina previne, em alguns animais lesionados com 6-OHDA, o padrão comportamental de rotações induzidas pelo contexto no TMG, mas não afeta o número de rotações induzidas pelo desafio de MF 20 mg/kg. Em acréscimo, encontramos uma tendência a uma menor diminuição provocada pela 6-OHDA no conteúdo de TH nos animais tratados com guanosina.

Existem diferenças notáveis entre os modelos animais que utilizam 6-OHDA e a DP. A DP é uma doença progressiva, subdividida em vários estágios, sendo os iniciais sem sintomas motores. Os estágios da doença são caracterizados por uma progressiva degeneração da via nigroestriatal e correspondente declínio progressivo nos níveis de dopamina estriatal (Deumens, Blokland *et al.*, 2002). Já a injeção da toxina é um modelo de morte rápida dos neurônios dopaminérgicos (Dauer e Przedborski, 2003). Outro aspecto que deve ser ressaltado é que nenhum modelo baseado na infusão de 6-OHDA leva à formação de corpos de Lewy (Lane e Dunnett, 2008). Apesar dessas diferenças, o modelo animal da DP induzido por 6-OHDA tem possibilitado avanços no entendimento dos mecanismos patológicos da doença e permitido que novos fármacos e estratégias de tratamento sejam avaliados, inclusive por usarem o comportamento rotacional como ferramenta para quantificar os níveis de lesão (Schwartzing e Huston, 1996).

Animais lesionados unilateralmente com 6-OHDA apresentam atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto quando colocados no aparato do TMG. Por sinal, essas rotações são causadas e estão positivamente correlacionadas com o grau de lesão (Silvestrin, De Oliveira *et al.*, 2009). Sabe-se que a direção das rotações é regulada pela dopamina liberada pela SNpc, enquanto o número de rotações é regulado pela dopamina liberada pela área tegmentar ventral (Van Oosten e Cools, 2002). Assim, o fato de um número menor de animais do grupo guanosina apresentar comportamento rotacional no TMG, quando comparados com animais do grupo controle, nos leva a supor que exista uma assimetria menor na atividade estriatal nos animais do primeiro grupo. Ou seja, o efeito da guanosina sobre o comportamento rotacional no TMG juntamente com nossos resultados preliminares da imunistoquímica para TH pode nos sugerir que a guanosina possa ter um efeito

neuroprotetor no modelo de DP induzido por 6-OHDA, uma vez que encontramos uma tendência a uma menor diminuição do conteúdo de TH nos animais tratados com guanosina. Importante salientar que existe uma correlação positiva linear ($r=0,94$) entre o conteúdo de TH e o número de células positivas para TH (Hefti, Melamed *et al.*, 1980). A princípio, esse efeito poderia se tornar mais evidente se aumentarmos o número amostral, o que é uma das perspectivas de continuação desse trabalho. Outra possibilidade seria que a guanosina pelo menos proporciona um quadro de melhora motora no modelo de DP induzido por 6-OHDA sem necessariamente promover neuroproteção.

As diferenças observadas entre os animais, principalmente dentro do grupo guanosina quanto à redução do conteúdo de TH, podem estar relacionadas a diferenças intrínsecas de cada animal, bem como a variações no consumo de água com guanosina entre eles. Uma vez que cada caixa continha cinco animais, não tínhamos como determinar a dose para cada indivíduo. Entretanto, a referida solução era oferecida à vontade, sem qualquer limitação de volume. Além disso, devemos levar em conta o fato que as lesões provocadas pela injeção de 6-OHDA apresentam alguma variabilidade entre os animais.

Sabe-se que um dos efeitos da degeneração dos neurônios dopaminérgicos é uma superativação do sistema glutamatérgico nos núcleos da base (Greenamyre, 2001). Além disso, a desnervação de dopamina provoca uma redução da quantidade de transportadores de glutamato gliais no corpo estriado (Chung, Chen *et al.*, 2008). Assim, a excitotoxicidade parece ser uma via final comum às diferentes causas da neurodegeneração na DP (Fornai, Vaglini *et al.*, 1997).

A concentração de algumas purinas no líquido estão alteradas na DP (Lewitt, 1992) e o metabolismo da dopamina está relacionado com o das purinas (Loeffler, Lewitt *et al.*, 1998; Loeffler, Camp *et al.*, 2000), o que sugere um provável envolvimento destas no processo patológico da DP. Estudos mostram que a guanosina protege contra danos excitotóxicos (Schmidt, Avila *et al.*, 2005) provavelmente devido a um papel fundamental na captação de glutamato quando os níveis desse neurotransmissor encontram-se em condições tóxicas para as células neurais (Frizzo, Lara *et al.*, 2002). Uma vez que a administração oral de guanosina resulta em um aumento de duas vezes na concentração de guanosina no líquido (Vinade, Schmidt *et al.*, 2005), a concentração extracelular desse nucleosídeo provavelmente tenha aumentado nos núcleos da base do grupo de animais que

recebeu o nosso tratamento, possivelmente exercendo seus efeitos neuroprotetores nas células dopaminérgicas da SNpc, possivelmente por alterar a captação do glutamato pelas células gliais, dentre outros mecanismos. Esta hipótese requer futura comprovação, sendo esta uma perspectiva aberta por nosso trabalho. Como próximo passo, pretendemos avaliar o efeito da guanosina oral na captação de glutamato em corpo estriado de ratos submetidos à lesão por 6-OHDA.

Em muitas doenças do SNC os astrócitos e oligodendrócitos sofrem um processo chamado astrogliose reativa, em que ocorre aumento da proteína glial fibrilar ácida (GFAP). Essa hipertrofia das células gliais já foi demonstrada após injeção estriatal de 6-OHDA em ratos (Gomide, Bibancos *et al.*, 2005). Levando-se em conta que a guanosina estimula a proliferação de astrócitos em cultura (Cicarelli, Di Iorio *et al.*, 2000), o tratamento crônico com guanosina poderia potencializar essa astrogliose. As células gliais têm um papel na sobrevivência e resistência neuronal, através de múltiplos mecanismos, incluindo proteção contra estresse oxidativo - através da síntese de glutathione - e secreção de fatores tróficos (Mena e Garcia De Yebenes, 2008). A astrogliose pode refletir um mecanismo compensatório contra o dano neuronal causado pela toxicidade da 6-OHDA (Mu, He *et al.*, 2009). Assim, uma futura avaliação do efeito da guanosina na expressão de GFAP em animais lesionados com 6-OHDA pode ajudar a elucidar o possível mecanismo de proteção exercido por essa molécula.

O efeito da guanosina sobre as rotações induzidas pelo contexto no TMG provavelmente não se deva à interferência motora, uma vez que a guanosina não afeta o desempenho locomotor no “rotarod” e no teste do campo aberto (Lara, Schmidt *et al.*, 2001; Vinade, Schmidt *et al.*, 2003). Por sinal, é importante salientar que a ação da guanosina não afeta a hiperlocomoção induzida pela anfetamina (Tort, Mantese *et al.*, 2004) e, muito provavelmente, também não afete a hiperlocomoção induzida por MF, uma vez que as duas drogas provocam hiperlocomoção por mecanismos semelhantes (Kuczenski e Segal, 1997).

Sabe-se que o TMG é capaz de detectar animais lesionados quando há perda de aproximadamente 86% dos neurônios dopaminérgicos da SNpc (Silvestrin, De Oliveira *et al.*, 2009). Devemos destacar que as rotações induzidas pelo TMG foram analisadas considerando-se apenas a sua presença ou não (isto é, não avaliamos o número de giros ou sua velocidade), o que diferiu da análise das rotações induzidas por MF 20 mg/kg, as quais foram registradas quanto ao número de ocorrências, não

meramente quanto a sua presença ou não. Essa diferença na análise dos dados deve-se aos seguintes fatos: (1) a partir de resultados anteriores de nosso grupo, mostramos que somente animais com alto grau de lesão podem rodar no TMG, mas que o número de rotações não é importante (Silvestrin, De Oliveira *et al.*, 2009); e (2) o teste de anfetamina, cujo mecanismo de detecção de lesão é similar ao do MF, apenas detecta diferentes faixas de grau de lesão e não lesões ligeiramente próximas, isto é, as rotações não se correlacionam linearmente com o grau de depleção dopaminérgica. (Hefti, Melamed *et al.*, 1980). Por sinal, o fato de não termos encontrado efeito da guanosina sobre o comportamento rotacional induzido pelo desafio de MF 20 mg/kg pode estar relacionado com o fato desse teste só detectar faixas de lesão e não pequenas diferenças. Entretanto, apenas temos resultados preliminares de imunistoquímica para dar suporte a essa hipótese.

Em resumo, mostramos que a guanosina proporciona um quadro de melhora motora no modelo de DP induzido por 6-OHDA, o que foi evidenciado por seu efeito em diminuir o comportamento rotacional no TMG. Além disso, talvez promova uma redução da perda de TH na SN. A guanosina, apesar das suas propriedades neuroprotetoras já demonstradas em vários protocolos *in vivo* e *in vitro*, ainda não havia sido testada no modelo da 6-OHDA. Destacamos ainda a importância do nosso trabalho por abrir uma série de perspectivas que busquem uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no efeito da guanosina sobre o comportamento rotacional no TMG. Tal objeto de estudo pode, inclusive, ter relevância clínica no futuro.

7 PERSPECTIVAS

Como perspectivas desse trabalho, pretendemos avaliar o efeito da guanosina em animais com lesão unilateral de 6-OHDA no FPM sobre:

- o conteúdo de TH na SN, a fim de podermos verificar se ocorre confirmação da tendência já demonstrada, de menor redução de células TH-positivas nos animais tratados com guanosina (completar dados já existentes);
- o conteúdo de GFAP em corpo estriado e SN ;
- a captação de glutamato em fatias de corpo estriado.

8 REFERÊNCIAS

ALCAYAGA, J. et al. Dopamine inhibits ATP-induced responses in the cat petrosal ganglion in vitro. **Brain Res**, v. 966, n. 2, p. 283-7, Mar 21 2003.

BONIFATI, V. Genetics of parkinsonism. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 13 Suppl 3, p. S233-41, 2007. ISSN 1353-8020 (Print).

BONIFATI, V. et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. **Science**, v. 299, n. 5604, p. 256-9, Jan 10 2003. ISSN 1095-9203 (Electronic).

BRAAK, H. et al. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. **Cell Tissue Res**, v. 318, n. 1, p. 121-34, Oct 2004.

BUELER, H. Impaired mitochondrial dynamics and function in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Exp Neurol**, v. 218, n. 2, p. 235-46, Aug 2009.

CASTANEDA, E. et al. Assessment of recovery in the hemiparkinson rat: drug-induced rotation is inadequate. **Physiol Behav**, v. 84, n. 4, p. 525-35, Mar 31 2005

CAUDLE, W. M.; ZHANG, J. Glutamate, excitotoxicity, and programmed cell death in Parkinson disease. **Exp Neurol**, v. 220, n. 2, p. 230-3, Dec 2009.

CHUNG, E. K. et al. Downregulation of glial glutamate transporters after dopamine denervation in the striatum of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. **J Comp Neurol**, v. 511, n. 4, p. 421-37, Dec 1 2008.

CICCARELLI, R. et al. Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain. **Int J Dev Neurosci**, v. 19, n. 4, p. 395-414, Jul 2001.

_____. Cultured astrocyte proliferation induced by extracellular guanosine involves endogenous adenosine and is raised by the co-presence of microglia. **Glia**, v. 29, n. 3, p. 202-11, Feb 1 2000.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, v. 39, n. 6, p. 889-909, Sep 11 2003.

DE OLIVEIRA, D. L. et al. Quinolinic acid promotes seizures and decreases glutamate uptake in young rats: reversal by orally administered guanosine. **Brain Res**, v. 1018, n. 1, p. 48-54, Aug 20 2004.

DEUMENS, R.; BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Exp Neurol**, v. 175, n. 2, p. 303-17, Jun 2002.

DICK, F. D. et al. Environmental risk factors for Parkinson's disease and parkinsonism: the Geoparkinson study. **Occup Environ Med**, v. 64, n. 10, p. 666-72, Oct 2007.

- DORSEY, E. R. et al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. **Neurology**, v. 68, n. 5, p. 384-6, Jan 30 2007.
- DUNKLEY, P. R. et al. Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. **J Neurochem**, v. 91, n. 5, p. 1025-43, Dec 2004.
- ESPOSITO, E.; DI MATTEO, V.; DI GIOVANNI, G. Death in the substantia nigra: a motor tragedy. **Expert Rev Neurother**, v. 7, n. 6, p. 677-97, Jun 2007.
- FAHN, S.; SULZER, D. Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease. **NeuroRx**, v. 1, n. 1, p. 139-54, Jan 2004.
- FORNAI, F. et al. Species differences in the role of excitatory amino acids in experimental parkinsonism. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 21, n. 4, p. 401-15, Jul 1997.
- FRIZZO, M. E. et al. Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures. **Neuroreport**, v. 12, n. 4, p. 879-81, Mar 26 2001.
- _____. Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions. **Cell Mol Neurobiol**, v. 22, n. 3, p. 353-63, Jun 2002.
- GALVAN, A.; WICHMANN, T. Pathophysiology of parkinsonism. **Clin Neurophysiol**, v. 119, n. 7, p. 1459-74, Jul 2008. ISSN 1388-2457 (Print).
- GLINKA, Y.; GASSEN, M.; YODIM, M. B. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. **J Neural Transm Suppl**, v. 50, p. 55-66, 1997.
- GOMIDE, V.; BIBANCOS, T.; CHADI, G. Dopamine cell morphology and glial cell hypertrophy and process branching in the nigrostriatal system after striatal 6-OHDA analyzed by specific stereological tools. **Int J Neurosci**, v. 115, n. 4, p. 557-82, Apr 2005.
- GRAYBIEL, A. M. Building action repertoires: memory and learning functions of the basal ganglia. **Curr Opin Neurobiol**, v. 5, n. 6, p. 733-41, Dec 1995.
- _____. The basal ganglia: learning new tricks and loving it. **Curr Opin Neurobiol**, v. 15, n. 6, p. 638-44, Dec 2005.
- GREENAMYRE, J. T. Glutamatergic influences on the basal ganglia. **Clin Neuropharmacol**, v. 24, n. 2, p. 65-70, Mar-Apr 2001.
- HARMS, H. H.; WARDEH, G.; MULDER, A. H. Effect of adenosine on depolarization-induced release of various radiolabelled neurotransmitters from slices of rat corpus striatum. **Neuropharmacology**, v. 18, n. 7, p. 577-80, Jul 1979.
- HEFTI, F. et al. Circling behavior in rats with partial, unilateral nigro-striatal lesions: effect of amphetamine, apomorphine, and DOPA. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 12, n. 2, p. 185-8, Feb 1980.

- INDEN, M. et al. Serofendic acid prevents 6-hydroxydopamine-induced nigral neurodegeneration and drug-induced rotational asymmetry in hemi-parkinsonian rats. **J Neurochem**, v. 95, n. 4, p. 950-61, Nov 2005.
- JIANG, H. et al. Adenosine receptor antagonists potentiate dopamine receptor agonist-induced rotational behavior in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. **Brain Res**, v. 613, n. 2, p. 347-51, Jun 11 1993.
- KAHLE, P. J. et al. Structure/function of alpha-synuclein in health and disease: rational development of animal models for Parkinson's and related diseases. **J Neurochem**, v. 82, n. 3, p. 449-57, Aug 2002.
- KITADA, T. et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. **Nature**, v. 392, n. 6676, p. 605-8, Apr 9 1998.
- KUCZENSKI, R.; SEGAL, D. S. Effects of methylphenidate on extracellular dopamine, serotonin, and norepinephrine: comparison with amphetamine. **J Neurochem**, v. 68, n. 5, p. 2032-7, May 1997.
- LANE, E.; DUNNETT, S. Animal models of Parkinson's disease and L-dopa induced dyskinesia: how close are we to the clinic? **Psychopharmacology (Berl)**, v. 199, n. 3, p. 303-12, Aug 2008.
- LANGSTON, J. W. et al. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. **Science**, v. 219, n. 4587, p. 979-80, Feb 25 1983.
- LARA, D. R. et al. Effect of orally administered guanosine on seizures and death induced by glutamatergic agents. **Brain Res**, v. 912, n. 2, p. 176-80, Sep 7 2001.
- LEWITT, P. A. CSF studies in unmedicated Parkinson disease: dopamine metabolism and xanthine. . **Soc. Neurosci. Abstr.**, v. 18, p. 1248, 1992.
- LIN, T. K. et al. Mitochondrial dysfunction and biogenesis in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Chang Gung Med J**, v. 32, n. 6, p. 589-99, Nov-Dec 2009.
- LOEFFLER, D. A. et al. Purine-induced alterations of dopamine metabolism in rat pheochromocytoma PC12 cells. **Brain Res Bull**, v. 52, n. 6, p. 553-8, Aug 2000.
- _____. Altered guanosine and guanine concentrations in rabbit striatum following increased dopamine turnover. **Brain Res Bull**, v. 45, n. 3, p. 297-9, 1998.
- MARSDEN, C. D.; OBESO, J. A. The functions of the basal ganglia and the paradox of stereotaxic surgery in Parkinson's disease. **Brain**, v. 117 (Pt 4), p. 877-97, Aug 1994. ISSN 0006-8950 (Print).
- MATTSON, M. P.; MAGNUS, T. Ageing and neuronal vulnerability. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 4, p. 278-94, Apr 2006.
- MENA, M. A.; GARCIA DE YEBENES, J. Glial cells as players in parkinsonism: the "good," the "bad," and the "mysterious" glia. **Neuroscientist**, v. 14, n. 6, p. 544-60, Dec 2008.

- MIGLIORE, L.; COPPEDE, F. Genetics, environmental factors and the emerging role of epigenetics in neurodegenerative diseases. **Mutat Res**, v. 667, n. 1-2, p. 82-97, Jul 10 2009.
- MU, X. et al. Baicalein exerts neuroprotective effects in 6-hydroxydopamine-induced experimental parkinsonism in vivo and in vitro. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 92, n. 4, p. 642-8, Jun 2009.
- MULLER, C. E.; SCIOR, T. Adenosine receptors and their modulators. **Pharm Acta Helv**, v. 68, n. 2, p. 77-111, Sep 1993.
- NEWMAN, E. A. Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. **J Neurosci**, v. 23, n. 5, p. 1659-66, Mar 1 2003.
- OBESO, J. A.; OLANOW, C. W.; NUTT, J. G. Levodopa motor complications in Parkinson's disease. **Trends Neurosci**, v. 23, n. 10 Suppl, p. S2-7, Oct 2000.
- PINNA, A. et al. Modification of adenosine extracellular levels and adenosine A(2A) receptor mRNA by dopamine denervation. **Eur J Pharmacol**, v. 446, n. 1-3, p. 75-82, Jun 20 2002.
- POLYMEROPOULOS, M. H. et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. **Science**, v. 276, n. 5321, p. 2045-7, Jun 27 1997.
- PRZEDBORSKI, S. et al. Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. **Neuroscience**, v. 67, n. 3, p. 631-47, Aug 1995.
- PURVES, D. et al. Modulação do movimento pelos núcleos da base. In: _____. **Neurociência**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 728p. p.391-407.
- RAJPUT, A.; RAJPUT, A. H. Parkinson's disease management strategies. **Expert Rev Neurother**, v. 6, n. 1, p. 91-9, Jan 2006.
- RATHBONE, M. P. et al. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. **Prog Neurobiol**, v. 59, n. 6, p. 663-90, Dec 1999.
- RICHARDSON, P. J.; KASE, H.; JENNER, P. G. Adenosine A2A receptor antagonists as new agents for the treatment of Parkinson's disease. **Trends Pharmacol Sci**, v. 18, n. 9, p. 338-44, Sep 1997.
- RODRIGUEZ, M. C.; OBESO, J. A.; OLANOW, C. W. Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection. **Ann Neurol**, v. 44, n. 3 Suppl 1, p. S175-88, Sep 1998.
- SCHIFFMANN, S. N. et al. Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. **Prog Neurobiol**, v. 83, n. 5, p. 277-92, Dec 2007.

- SCHMIDT, A. P.; AVILA, T. T.; SOUZA, D. O. Intracerebroventricular guanine-based purines protect against seizures induced by quinolinic acid in mice. **Neurochem Res**, v. 30, n. 1, p. 69-73, Jan 2005.
- SCHMIDT, A. P.; LARA, D. R.; SOUZA, D. O. Proposal of a guanine-based purinergic system in the mammalian central nervous system. **Pharmacol Ther**, v. 116, n. 3, p. 401-16, Dec 2007.
- SCHWARTING, R. K.; HUSTON, J. P. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. **Prog Neurobiol**, v. 50, n. 2-3, p. 275-331, Oct 1996.
- SCHWARZSCHILD, M. A. et al. Targeting adenosine A2A receptors in Parkinson's disease. **Trends Neurosci**, v. 29, n. 11, p. 647-54, Nov 2006.
- SILVESTRO, R. B. et al. The footfault test as a screening tool in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. **J Neurosci Methods**, v. 177, n. 2, p. 317-21, Mar 15 2009.
- SOARES, F. A. et al. Anticonvulsant effect of GMP depends on its conversion to guanosine. **Brain Res**, v. 1005, n. 1-2, p. 182-6, Apr 16 2004.
- SORIMACHI, M.; YAMAGAMI, K.; WAKOMORI, M. Activation of ATP receptor increases the cytosolic Ca(2+) concentration in ventral tegmental area neurons of rat brain. **Brain Res**, v. 935, n. 1-2, p. 129-33, May 10 2002.
- STOOF, J. C. et al. Leads for the development of neuroprotective treatment in Parkinson's disease and brain imaging methods for estimating treatment efficacy. **Eur J Pharmacol**, v. 375, n. 1-3, p. 75-86, Jun 30 1999.
- SULZER, D. Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. **Trends Neurosci**, v. 30, n. 5, p. 244-50, May 2007.
- SVENNINGSSON, P. et al. Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A2A receptors. **Prog Neurobiol**, v. 59, n. 4, p. 355-96, Nov 1999.
- TABNER, B. J. et al. Protein aggregation, metals and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Biochem Soc Trans**, v. 33, n. Pt 5, p. 1082-6, Nov 2005.
- TANSEY, M. G.; GOLDBERG, M. S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: Its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. **Neurobiol Dis**, Nov 10 2009.
- TORRES, E. M.; DUNNETT, S. B. Amphetamine induced rotation in the assessment of lesions and grafts in the unilateral rat model of Parkinson's disease. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 17, n. 3, p. 206-14, Feb 2007.
- TORT, A. B. et al. Guanosine selectively inhibits locomotor stimulation induced by the NMDA antagonist dizocilpine. **Behav Brain Res**, v. 154, n. 2, p. 417-22, Oct 5 2004.

UNGERSTEDT, U. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. **Acta Physiol Scand Suppl**, v. 367, p. 69-93, 1971.

VAN DEN EEDEN, S. K. et al. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. **Am J Epidemiol**, v. 157, n. 11, p. 1015-22, Jun 1 2003.

VAN OOSTEN, R. V.; COOLS, A. R. Differential effects of a small, unilateral, 6-hydroxydopamine-induced nigral lesion on behavior in high and low responders to novelty. **Exp Neurol**, v. 173, n. 2, p. 245-55, Feb 2002.

VINADE, E. R. et al. Chronically administered guanosine is anticonvulsant, amnesic and anxiolytic in mice. **Brain Res**, v. 977, n. 1, p. 97-102, Jul 4 2003.

_____. Effects of chronic administered guanosine on behavioral parameters and brain glutamate uptake in rats. **J Neurosci Res**, v. 79, n. 1-2, p. 248-53, Jan 1-15 2005.

WEINER, W. J. Initial treatment of Parkinson disease: levodopa or dopamine agonists. **Arch Neurol**, v. 61, n. 12, p. 1966-9, Dec 2004.

YUAN, H. et al. Pathogenesis of Parkinson's disease: oxidative stress, environmental impact factors and inflammatory processes. **Neurosci Bull**, v. 23, n. 2, p. 125-30, Mar 2007.

ZECCA, L. et al. Neuromelanin of the substantia nigra: a neuronal black hole with protective and toxic characteristics. **Trends Neurosci**, v. 26, n. 11, p. 578-80, Nov 2003.

9 APÊNDICE

9.1 Publicações durante o período

9.1.1 Artigos científicos

O Teste de Motricidade sobre Grade como ferramenta de triagem no modelo de Parkinsonismo induzido por 6-hidroxidopamina em ratos.

Esse trabalho foi publicado em 2009 na revista *Journal of Neuroscience Methods* :

Journal of Neuroscience Methods 177 (2009) 317–321



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Neuroscience Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jneumeth



The footfault test as a screening tool in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease

Roberta Bristot Silvestrin^{a,1}, Lucas Fürstenau de Oliveira^{b,2}, Cristiane Batassini^{a,1}, Alcyr Oliveira^{c,3}, Tadeu Mello e Souza^{d,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Neurociências – ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, Sala 107, CEP 90.046-900, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Complexo de Ensino Superior de Cachoeirinha, Silvério Manoel da Silva, 160, Colinas 94940-243, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Departamento de Saúde Coletiva, Rua Sarmento Leite, 245 Centro 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

^d Departamento de Bioquímica – ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600 – anexo CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 8 February 2008
Received in revised form
19 September 2008
Accepted 15 October 2008

Keywords:
Parkinson
6-Hydroxydopamine
Footfault
Rat
Screening

ABSTRACT

The administration of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) into the nigrostriatal pathway is a rat model of Parkinson's disease (PD). The footfault test is a behavioural task in which rodents have their motor functions assessed. Here, we observed that unilaterally 6-OHDA-lesioned animals show a context-induced ipsilateral rotational behaviour when placed on the footfault apparatus for 3 min and this may be used as index to detect lesioned animals. Our results showed a sensitivity and specificity of 100% for lesions higher than 94% and 64%, respectively (ROC curve: AUC= 0.988). A binary logistic regression model showed an $\exp B = 1.116$ (95% CI, 1.007–1.236) and $C = -9.081 \pm 4.554$ ($p = 0.046$) using the nigral tyrosine hydroxylase immunoccontent as standard (each unit represents a 10%-lesion extension). Additionally, the footfault test was more sensitive than apomorphine challenging at 1 mg/kg when these tests were carried out days apart and it was less sensitive than methylphenidate at 40 mg/kg (sign test, $p < 0.05$). Therefore, the footfault test may be very useful in the PD animal model for screening animals since it is fast and simple and it does not require a drug to induce rotational activity.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Atividade de ectonucleotidases em modelo animal da Doença de Parkinson induzido por 6-OHDA.

O artigo *The hydrolysis of striatal adenine- and guanine-based purines in a 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's Disease*, de autoria de Jean P. Oses, Cristiane Batassini, Daniela Pochmann, Ana E. Böhmer, Fernanda C. Vuaden, Roberta B. Silvestrin, Alcyr Oliveira, Carla D. Bonan, Maurício R. Bogo, Diogo O. Souza, Luis V. Cruz Portela, João J. de Freitas Sarkis e Tadeu Mello e Souza, foi submetido para a revista *Neurochemical Research*.

Resumo (em inglês): "Parkinson's disease (PD) is characterized by a progressive neurodegeneration in the substantia nigra and a striatal dopamine decrease. Striatal extracellular adenosine and ATP modulate the dopaminergic neurotransmission whereas guanosine has a protective role in the brain. Therefore, the regulation of their levels by enzymatic activity may be relevant to the clinical feature of PD. Here we evaluated the extracellular nucleotide hydrolysis from striatal slices 4 weeks after a unilateral infusion with 6-OHDA into the medial forebrain bundle. This infusion increased ADP, AMP, and GTP hydrolysis by 15%, 25%, and 41%, respectively, and decreased GDP hydrolysis by 60%. There was no change in NTPDases 1, 2, 3, 5, 6, and 5'-nucleotidase transcription. Therefore, a dopamine depletion changes nucleotide hydrolysis and, then, the regulation of striatal nucleotide levels. These changes might contribute to the symptoms observed in the model or even in PD patients, if we extrapolate these results to humans."

9.1.2 Capítulo de livro

Escrevi sobre modelos genéticos da DP, parte de um capítulo sobre modelos animais da DP em um livro que está para ser publicado.