

HUDMAN CUNHA ORTIZ

**EFEITO DA CAFEÍNA NOS SINTOMAS NÃO MOTORES EM UM MODELO
ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON**

**CAMPO GRANDE
2017**

HUDMAN CUNHA ORTIZ

**EFEITO DA CAFEÍNA NOS SINTOMAS NÃO MOTORES EM UM MODELO
ANIMAL 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
2017**

HUDMAN CUNHA ORTIZ

EFEITO DA CAFEÍNA NOS SINTOMAS NÃO MOTORES EM UM MODELO ANIMAL 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 atribuiu ao candidato o conceito _____.

Campo Grande, de de 2017.

BANCA EXAMINADORA

NOTA/CONCEITO

Professor Dr Albert Schiaveto de Souza

Professora Dra Paula Felipe Martinez

Professora Dra Maria Araujo Teixeira

Professora Dra landara Schettert da Silva

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de crescimento e por ter me dado forças para concluir mais essa etapa do meu caminhar.

Agradeço ao meu orientador Albert por ter me acolhido de maneira tão despretensiosa e por ter me guiado de maneira tão primorosa dentro da pesquisa básica, pela qual me apaixonei e pretendo ainda me aventurar.

Agradeço a Karla de Michelis Mograbi por me incentivar principalmente no início de tudo, ao Ricardo Saravy e a Ana Luiza Ferreira Donatti, por compartilharem seus conhecimentos e me ensinarem pacientemente a arte do manejo com os animais nas diferentes fases desta pesquisa.

Agradeço a Gustavo Agrímpio Fonseca pela força e compreensão durante todo o processo de elaboração e finalização da pesquisa.

Agradeço aos meus pais, familiares e amigos, antigos e novos, pelo apoio e carinho nos momentos mais difíceis, sem os quais a finalização desse projeto não se teria cumprido, e pela compreensão pelo sumiço repentino e temporário de suas vidas.

A todos minha sincera gratidão.

“O que mais na vida me apaixona é contribuir para uma realidade mais durável do que eu”.

M. Waltmann

RESUMO

Tem sido demonstrado que drogas antagonistas dos receptores A2A como a cafeína têm efeitos benéficos na neuroproteção e controle dos sintomas motores da doença de Parkinson. Todavia, seus efeitos sobre os sintomas não motores são praticamente desconhecidos. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da cafeína nos sintomas não motores em um modelo animal da doença de Parkinson. O experimento realizado foi composto por dois grupos, o grupo salina e o grupo MPTP, cada um composto por três subgrupos contendo de sete a oito animais cada. Os animais receberam por cinco dias consecutivos salina ou MPTP, no sétimo dia iniciou-se o tratamento com salina, cafeína 10 mg/kg ou 20 mg/kg por quinze dias consecutivos; posteriormente foram realizados e gravados os testes de Labirinto em Cruz Elevada (LCE), Campo Aberto (CA) e Suspensão pela Cauda, além do teste de Discriminação Olfatória. Após compilação dos dados e análise estatística realizada pelo teste de Kruskal-Wallis com pós- teste de Dunn, com nível de significância de $p < 0,05$, foi observado que houve pequena diferença significativa apenas nos teste do LCE, nas variáveis tempo de permanência no centro e nos braços fechados, e no teste do CA, nas variáveis bolos fecais, auto limpeza, erguimento, numero de quadrantes percorridos na parte central, periférica, número total e porcentagem de quadrantes periféricos percorridos. Ainda assim não foi possível verificar a eficácia da cafeína sobre estes sintomas e nem mesmo a capacidade deste modelo animal em reproduzir os sintomas não motores da doença de Parkinson.

Palavras Chave: Doença de Parkinson, Sintomas não motores, MPTP, Cafeína, Núcleos da base.

ABSTRACT

It has been shown that A2A receptor antagonist drugs such as caffeine have beneficial effects on Parkinson's disease neuroprotection and motor symptoms control; however, its effects on non-motor symptoms are virtually unknown. This study aimed to evaluate caffeine effect of on non-motor symptoms in a Parkinson's disease's animal model. The experiment was composed of two groups, the saline and the MPTP group, each composed of three subgroups containing seven to eight animals each. The animals received saline or MPTP for five consecutive days and at the seventh day they were treated with saline, caffeine 10 mg / kg or 20 mg / kg; afterwards, the tests of Elevated plus maze (EPM), Open field test (OFT) and Tail suspension test (TST) beside the Discrimination Olfactory test were performed and recorded. After compiling the data and statistical analysis performed by the Kruskal-Wallis test with Dunn post-test, with a significance level of $p < 0.05$, it was observed that there was a small significant difference only in the LCE test, in the variables permanence time in the center and in the closed arms, and in the CA test, in the variables fecal boli, grooming, rearing, number of quadrants roamed in the central, peripheral and the total number and percentage of peripheral quadrants roamed. Nevertheless, it was not possible to verify neither the efficacy of caffeine on these symptoms nor even the capacity of this animal model to reproduce the Parkinson's disease's non-motor symptoms.

Key words: Parkinson's disease, Non-motor symptoms, MPTP, Caffeine, Basal ganglia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema ilustrativo do experimento

Figura 2 – Foto ilustrativa Teste do Labirinto em Cruz Elevado

Figura 3 – Foto ilustrativa do Teste do Campo Aberto

Figura 4 – Foto ilustrativa do Teste de Suspensão pela Cauda

Figura 5 – Foto ilustrativa do Teste de discriminação Olfatória

Figura 6 – Gráfico referente ao número de entradas nos Braços Abertos, em cada grupo experimental, no Teste do Labirinto em Cruz Elevada.

Figura 7 – Gráfico referente ao número de entradas nos Braços Fechados, em cada grupo experimental, no Teste do Labirinto em Cruz Elevada.

Figura 8 – Gráfico referente ao percentual de entradas nos Braços Abertos, em cada grupo experimental, no teste do Labirinto em Cruz Elevada.

Figura 9 – Gráfico referente ao tempo de permanência no centro, em cada grupo experimental, no Teste do Labirinto em Cruz Elevada.

Figura 10 – Gráfico referente ao tempo de permanência no Braço Fechado, em cada grupo experimental, no Teste do Labirinto em Cruz Elevada.

Figura 11 – Gráfico referente ao tempo de permanência no Braço Aberto, em cada grupo experimental, no Teste do Labirinto em Cruz Elevada.

Figura 12 – Gráfico referente ao percentual de tempo de permanência no Braço Aberto, em cada grupo experimental, no Teste do Labirinto em Cruz Elevada.

Figura 13 – Gráfico referente ao número de bolos fecais em cada grupo experimental no Teste de Campo Aberto.

Figura 14 – Gráfico referente ao número de Auto Limpeza em cada grupo experimental no Teste de Campo Aberto.

Figura 15 – Gráfico referente ao número de Erguimentos em cada grupo experimental no Teste de Campo Aberto.

Figura 16 – Gráfico referente ao número de quadrantes centrais percorridos, em cada grupo experimental, no Teste de Campo Aberto.

Figura 17 – Gráfico referente ao número de quadrantes periféricos percorridos, em cada grupo experimental, no Teste de Campo Aberto.

Figura 18 – Gráfico referente ao número total de quadrantes percorridos, em cada grupo experimental, no Teste de Campo Aberto.

Figura 19 – Gráfico referente ao percentual de quadrantes periféricos percorridos, em cada grupo experimental, no Teste de Campo Aberto.

Figura 20 – Gráfico referente ao percentual de quadrantes periféricos percorridos, em cada grupo experimental, no Teste de Campo Aberto.

Figura 21 - Gráfico referente ao tempo de permanência na periferia, em cada grupo experimental, no Teste de Campo Aberto.

Figura 22 - Gráfico referente ao percentual de quadrantes periféricos percorridos, em cada grupo experimental, no Teste de Campo Aberto.

Figura 23 - Gráfico referente ao tempo de dispendido Teste de Discriminação Olfatória, em cada grupo experimental.

Figura 24 – Gráfico referente ao tempo de Latência, em cada grupo experimental, no Teste de Suspensão pela Cauda.

Figura 25 – Gráfico referente ao tempo de Mobilidade, em cada grupo experimental, no Teste de Suspensão pela Cauda.

Figura 26 – Gráfico referente ao tempo de Imobilidade, em cada grupo experimental, no Teste de Suspensão pela Cauda.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados referentes a três variáveis analisadas no teste LCE: número de entradas nos braços abertos, número de entradas nos braços fechados e percentual de entradas nos braços abertos em relação ao número total de entradas, em cada um dos grupos experimentais.

Tabela 2 – Resultados referentes a quatro variáveis analisadas no teste do LCE: tempo de permanência na parte central, nos braços abertos, nos braços fechado e percentual de tempo de permanência nos braços abertos em relação ao total, em cada um dos grupos experimentais.

Tabela 3 – Resultados referentes a três variáveis analisadas no teste de CA, número de bolos fecais, número de erguimentos e número de limpezas, em cada um dos grupos experimentais.

Tabela 4 – Resultados referentes a quatro variáveis analisadas no teste de CA: número de quadrantes centrais percorridos, número de quadrantes periféricos percorridos, número total de quadrantes percorrido e percentual de quadrantes periféricos percorridos em relação ao total, em cada um dos grupos experimentais.

Tabela 5 – Resultados referentes a três variáveis analisadas no teste de CA: tempo de permanência nos quadrantes centrais, tempo de permanência nos quadrantes periféricos e porcentagem do tempo de permanência na periferia em relação ao total, em cada um dos grupos experimentais.

Tabela 6 – Resultados referentes ao teste de Discriminação Olfatória e as variáveis analisadas no Teste de Suspensão pela Cauda: tempo de latência entre a tentativa de escape e a imobilidade, tempo de mobilidade e tempo de imobilidade, em cada um dos grupos experimentais.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

5-HT - serotonina
6-OHDA – 6-hydroxydopamina
ADK – adenosina quinase
BA – braço aberto
BF – bolo fecal
BrF- braço fechado
°C – graus célsius
CA – campo aberto
CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais
cm - centímetro
cm² – centímetro ao quadrado
DAT - transportador de dopamina
DMSO - dimetilsulfóxido
DO – discriminação olfatória
DP – doença de Parkinson
EntBA – entrada no braço aberto
EntBF – entrada no braço fechado
GPe – globo pálido externo
GPi – globo pálido interno
h - hora
i.p. - intraperitoneal
Kg - quilograma
LCE – Labirinto em cruz elevada
L-DOPA - Levodopa
MAO – B – monoaminoxidase-b
min - minutos
mg - miligrama
MPDP+ - 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridíio
MPP+ - 1-metil- 4 fenilpiridínio
MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NMDA – N-metil D-Aspartato
QC – quadrante central

QP – quadrante periférico

SNc – substância negra *pars compacta*

SNC – Sistema Nervoso Central

SNM – sintomas não motores

SNr – substancia negra reticulada

STN – núcleo subtalâmico

TH+ - tirosina hidroxilase

TSC – Teste de suspensão pela cauda

UFMS – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
3. OBJETIVOS	24
3.1 Geral	24
3.2 Específicos	24
4.0 METODOLOGIA	25
4.1 Animais	25
4.2 Drogas	25
4.3 Experimento	25
4.4 Avaliação dos animais	27
<u>4.4.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevada</u>	27
<u>4.4.2 Teste do Campo Aberto</u>	28
<u>4.4.3 Teste de Suspensão pela Cauda</u>	29
<u>4.4.4 Teste de Discriminação Olfatória</u>	31
4.5 Descarte dos animais	32
4.6 Análise estatística	32
4.7 Aspectos éticos	32
5.0 RESULTADOS	33
5.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevada	33
<u>5.1.1 Entrada no braço aberto e no braço fechado</u>	35
<u>5.1.2 Percentual de entradas no braço aberto</u>	36
<u>5.1.3 Tempo de permanência no centro</u>	37
<u>5.1.4 Tempo de permanência no braço aberto</u>	38
<u>5.1.5 Tempo de permanência no braço fechado</u>	39
<u>5.1.6 Percentual de tempo de permanência no braço aberto</u>	40
5.2 Teste do Campo Aberto	40
<u>5.2.1 Bolos Fecais</u>	43
<u>5.2.2 Limpeza</u>	44
<u>5.2.3 Erguimento</u>	45
<u>5.2.4 Quadrantes centrais</u>	46
<u>5.2.5 Quadrantes periféricos</u>	47
<u>5.2.6 Total de quadrantes percorridos</u>	48

<u>5.2.7 Percentual de Quadrantes Periféricos Percorridos</u>	49
<u>5.2.8 Tempo de permanência no centro</u>	50
<u>5.2.9 Tempo de permanência na Periferia</u>	51
<u>5.2.10 Percentual do tempo de permanência na periferia</u>	52
5.3 Teste de Discriminação Olfatória e Teste de Suspensão pela Cauda ..	53
6. DISCUSSÃO	56
7. CONCLUSÃO	61
8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
ANEXO A	70

1. INTRODUÇÃO

Os sintomas motores da doença de Parkinson (DP), tais como tremor, instabilidade postural, bradicinesia e rigidez, que aparecem após a perda de aproximadamente 50-70% dos neurônios da substância negra *pars compacta* (SNc), no sistema nervoso central e da dopamina no corpo estriado (BLESA *et al.*, 2012), são sua marca registrada com base na qual o diagnóstico e o tratamento são iniciados e são agora reconhecidos como sendo precedidos por uma fase “pré-motora” composta em grande parte por uma gama de diferentes sintomas não motores (SNM) (SAUBIER *et al.*, 2016).

A neuroinflamação tem sido implicada na sua patogênese. Para tanto, neurotoxinas como a 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina (MPTP) e a 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) são amplamente utilizadas para reproduzir o padrão de morte celular evidente em pacientes com DP (DUTY; JENNER, 2011).

Os SNM podem aparecer anos, talvez até décadas, antes dos sintomas motores (TAYLOR; GREENE; MILLER, 2010) incluindo-se: perda olfativa (UBEDA-BAÑON *et al.*, 2014), disfunção cognitiva (LINDGREN; DUNNETT, 2012), demência (ZURKOVSKY *et al.*, 2013), distúrbio do sono, constipação intestinal, depressão, ansiedade (BONITO-OLIVA, MASINI, FISONE, 2014) e alteração no ciclo circadiano (HAYASHI *et al.*, 2013), além de manifestações em outros sistemas ou órgãos mais externos como por exemplo a pele (PLANKEN *et al.*, 2017).

Com a crescente conscientização da presença destes, nasce também a percepção de que estas características desempenham um papel extremamente importante, e por vezes dominante na condução e até mesmo no diagnóstico da doença (PFEIFFER, 2016). Para todo o corpo substancial da literatura sobre estudos terapêuticos de sintomas e complicações motoras, dificilmente existe um ensaio clínico controlado que aborda os vários sintomas não motores ou aborda um sintoma não motor como parâmetro de avaliação primária, ou seja, de indicação para terapia em DP (OERTEL; SCHULZ, 2016).

O fato de que a maioria dos fármacos atualmente disponíveis para o tratamento da DP (como a levodopa - L-DOPA) é mais eficiente no alívio das deficiências motoras do que nos SNM levou muitos pesquisadores a postular

mecanismos não dopaminérgicos para os mesmos e parece que a cafeína e antagonistas seletivos dos receptores A2A da adenosina podem ser particularmente úteis para restaurar processos de aprendizagem e memória e até mesmo no processo olfatório (PREDIGER *et al.*, 2010).

Considerando o conhecimento da fisiologia dos núcleos da base e da fisiopatologia da DP, sua alta incidência e prevalência, os efeitos colaterais da terapia dopaminérgica atual e a escassez de estudos sobre o efeito da terapia não dopaminérgica sobre os SNM, além de um modelo animal que consiga reproduzir um número maior desses sintomas, o presente trabalho analisou o efeito da cafeína, um antagonista não seletivo dos receptores de adenosina, sobre os sintomas não motores da DP, mais especificamente a ansiedade, depressão e distúrbio olfatório, em um modelo animal da doença de Parkinson (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina - MPTP + probenecida) em camundongos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A Doença de Parkinson é a segunda doença neurodegenerativa mais comum acometendo 1% da população acima dos 55 anos, e é caracterizada pela degeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos da substância negra, que faz parte dos núcleos da base, das vias dopaminérgicas nigro-estriatais e pelo aparecimento de sintomas clássicos da DP (LEES; HARDY; REVESZ, 2009).

Os gânglios basais são um grupo de núcleos subcorticais envolvidos no planejamento e iniciação do movimento e são organizados anatomicamente e funcionalmente em circuitos paralelos que processam diferentes tipos de informação. Os núcleos basais são divididos em: (i) núcleos de entrada, que recebem informações do córtex e do tálamo, constituídos pelos núcleos caudado, putamen e accumbens; (ii) núcleos de saída, que enviam informações dos gânglios da base para o tálamo, compreendendo o globo pálido interno (GPi) e a substância negra pars reticulada (SNr); e (iii) núcleos intrínsecos, compostos pela divisão do globo pálido externo (GPe), do núcleo subtalâmico (STN) e da substância negra pars compacta (SNc) (ARMANTERO *et al.*, 2011).

A dopamina se caracteriza como um neurotransmissor, do grupo das monoaminas, que modula a atividade de várias regiões do cérebro, aumentando ou diminuindo a ação de determinadas funções. É produzida principalmente por neurônios dopaminérgicos situados na SNc e na Área Tegmental Ventral que alimenta outra importante área do cérebro, a Amígdala, ligada à aquisição, consolidação e recuperação do condicionamento do medo aprendido (CHO; FUDGE, 2010).

Existem duas formas principais pelas quais a informação estriatal pode atingir os núcleos de saída dos gânglios basais associadas à participação da dopamina: por meio de uma projeção monossináptica chamada "via direta" que expressa o receptor tipo 1 da dopamina (D1R) e termina em núcleos do GPi / SNr; e por meio de um circuito multissináptico denominado "via indireta", expressando receptores de dopamina tipo 2 (D2R) que se projetam para o GPe. Assim, a dopamina exerce um efeito dicotômico no nível estriatal, a ativação da via direta é proposta para facilitar o movimento, enquanto a

ativação da via indireta é pensada para resultar em inibição de movimento (STAYTE; VISSEL, 2014).

Modelos animais são utilizados para reprodução dos sinais e sintomas da DP para seu melhor entendimento. Em 1982, a neurotoxina MPTP foi acidentalmente descoberta e hoje representa a toxina parkinsoniana mais importante e mais frequentemente aplicada em modelos animais. Jovens toxicodependentes desenvolveram uma síndrome parkinsoniana idiopática após injeção intravenosa deste composto. Após investigar a etiologia da sua condição, verificou-se que a MPTP era o contaminante neurotóxico responsável pelo efeito parkinsoniano (BLESA *et al.*, 2012).

Após sua administração, a MPTP atravessa a barreira hemato-encefálica e, uma vez no cérebro, o MPTP é metabolizado pela enzima MAOB em 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridíio (MPDP+), que depois desprotona para gerar uma espécie correspondente de pirídium, 1-metil-4 fenilpiridínio (MPP+) em células gliais. O MPP+ é liberado para o espaço extracelular e recaptado nas células dopaminérgicas pelo transportador de dopamina (DAT). Uma vez na célula, o MPP+ entra na mitocôndria onde interfere com o complexo I da cadeia de transporte de elétrons, o que provoca diminuições na síntese de adenosina 5'-trifosfato e a geração de radicais livres, e leva à morte celular. O modelo MPTP de DP induz a características patológicas semelhantes às observadas nos seres humanos (HAYASHI *et al.*, 2013).

Alguns agentes são utilizados para aumentar a neurotoxicidade da MPTP, dentre eles está a Probenecida que quando co-administrada com esta neurotoxina potencializa sua ação por meio da redução da depuração da mesma e dos seus metabolitos a partir do cérebro, causando maior dano cerebral (PETROSKE, *et al.*, 2001).

Além dos sintomas motores clássicos, existem sintomas não motores generalizados, originados além dos gânglios da base, que provavelmente resultam da desregulação dos núcleos específicos que não fazem parte da substância negra ou dos neurônios serotoninérgicos (5-HT) do tronco cerebral, que representam a região inicial de patologia (SMITH; ISACSON; DUNNETT, 2012).

Somente no século XXI, a DP foi mais bem conceituada como uma doença neurodegenerativa com sintomas neurocognitivos, não motores, que se

desenvolvem gradualmente comprometendo progressivamente a qualidade de vida e independência dos indivíduos (LAGEMAN; CASH; MICKENS, 2014).

Há uma forte relutância em tratar os SNM, que continuam sendo subvalorizados pelos profissionais de saúde, pois os mesmos centram-se essencialmente sobre os aspectos motores da doença. Além disso, os pacientes deixam de relatá-los por não perceberem que estes estão ligados a DP, sendo assim pouco investigados (BOSTANTJOPOULOU *et al.*, 2013; SANTOS-GARCÍA; DE LA FUENTE-FERNÁNDEZ, 2013; PFEIFFER, 2016).

Tais sintomas têm um impacto negativo em relação à saúde, contribuindo com grave deficiência, institucionalização e piora na percepção da qualidade de vida pelos pacientes (BOSTANTJOPOULOU *et al.*, 2013; SANTOS-GARCÍA & DE LA FUENTE-FERNÁNDEZ, 2013).

Em seu estudo sobre a progressão dos SNM e qualidade de vida na DP, Antonini *et al.* (2012) concluíram que a sua progressão global não segue o mesmo ritmo dos sintomas motores, tendo uma maneira específica de evolução, ressaltando a necessidade da realização de estudos com medicamentos direcionados a estes sintomas.

Os sintomas de ansiedade e depressão estão altamente correlacionados em pacientes com DP, sugerindo que os mesmos podem compartilhar mecanismos etiológicos subjacentes, já que a terapia de reposição de dopamina é por vezes parcialmente eficaz para o tratamento dos mesmos, ou pode até promover o seu surgimento como também potencializá-los (MÜLLER, 2012; MUNHOZ *et al.* 2015).

Tais sintomas afetivos podem estar principalmente associados aos déficits de sinalização serotoninérgica (BLUM; LESCH, 2015), devido à presença dos próprios marcadores de degeneração da DP também em estruturas noradrenérgicas como os núcleos rafe e as estruturas límbicas (LINDGREN; DUNNETT, 2012; MUNHOZ *et al.* 2015). Tanto a depressão como a ansiedade pode estar relacionadas especificamente ao receptor de dopamina D3, conforme dados obtidos pelo estudo realizado por Moraga-Amaro *et al.* (2014).

Em uma análise retrospectiva recente de 93 pacientes, foram registrados em média 7,6 SNM diferentes por paciente, 10 anos antes do diagnóstico (GAENSLEN *et al.*, 2011). Além disso, em um período de cinco anos antes do

início das características motoras da DP, uma maior proporção de homens foi tratada para ansiedade e depressão do que na população geral (JACOB *et al.*, 2010).

Na DP, a degeneração dos neurônios dopaminérgicos afeta uma parte das estruturas mesolímbicas como o hipocampo, que está criticamente envolvido na plasticidade da cognição, aprendizagem e memória (BONITO-OLIVA *et al.*, 2014). Enquanto a doença progride, as complicações não motoras predominantes são muitas vezes refratárias às intervenções terapêuticas (PREDIGER, 2010).

Várias estratégias de tratamento têm sido identificadas como eficazes em diferentes revisões baseadas em evidências e têm sido incorporadas em protocolos nacionais e internacionais de tratamento para DP (SPRENGER; POEWE, 2013).

Desde que James Parkinson descreveu a doença, que assim foi chamada, em 1817, houve grandes avanços em nossa compreensão da etiologia, fisiopatologia e genética desta doença, que acarretou no desenvolvimento de novas terapias altamente eficazes para a DP (SMITH *et al.*, 2012).

Pela melhora drástica da função motora nos primeiros estágios da doença, a administração do precursor da dopamina, a L-dopa, tem padrão ouro no tratamento dos sintomas motores. Não obstante, seu uso crônico pode produzir efeitos adversos como alucinação, insônia, náusea e discinesia (MUNHOZ, *et al.*, 2015). Assim como a L-dopa, a monoaminoxidase-B (MAO-B)-inibidora e o antagonista de N-metil D-Aspartato (NMDA), que se associam à dopamina, melhoram principalmente os sintomas motores e apenas parcialmente o surgimento e ocorrência dos SNM (MÜLLER, 2012).

Assim, têm-se desenvolvido estudos de novas terapias para a DP voltados para sistemas não dopaminérgicos dentro dos núcleos basais que vão além das vias nigro-estriatais lesionadas (JENNER, 2003).

A terapia com antagonistas de receptores de adenosina A2A vem sendo proposta para o tratamento de doenças neurodegenerativas como Alzheimer e DP (SCHWARZSCHILD *et al.*, 2003; JACOBSON, 2009), e o potencial terapêutico da cafeína no controle dos sintomas da DP tem sido comprovado por estudos clínicos e experimentais (ACUÑA-LIZAMA *et al.*, 2013).

A Adenosina não é apenas um elemento intracelular essencial, mas também um neuromodulador que atua por intermédio dos seus distintos receptores localizados na superfície celular nas condições fisiológicas e patológicas. No sistema nervoso central (SNC), adenosina modula o sono, excitação, locomoção, nocicepção, neuroproteção e outros processos de importância vital (SCHWARZSCHILD *et al.*, 2003; EL YACOUBI *et al.*, 2000).

Em contraste com a ampla distribuição de outros subtipos de receptores de adenosina (A1, A2B, e A3), os subtipos de receptores A2A mostram específica localização nos gânglios basais se restringindo ainda mais ao núcleo estriado (SMITH *et al.*, 2012).

Pelo fato dos receptores D2 e A2A atuarem de forma antagônica, de apresentarem uma estreita ligação, por conta de suas localizações nos gânglios da base, e de dados eletrofisiológicos básicos mostrarem que a ativação dos receptores A2A regula a transmissão gabaérgica no estriado modulando ambas as transmissões glutamatérgicas e gabaérgicas, há um grande interesse na interação de drogas que modulam a função dos receptores de adenosina no tratamento de doenças como a DP (SMITH *et al.*, 2012; ARMENTERO *et al.*, 2011; RANDALL *et al.*, 2011).

A farmacologia dos receptores D2 é afetada pela ativação dos análogos de receptores A2A. Além disso, e sua co-imunoprecipitação, co-agregação, e co-internalização foi recentemente descrita em linhas celulares co-transfectadas, demonstrando que a interação entre estes receptores ocorre de maneira oligomérica, na qual ocorrem mudanças conformacionais transmissíveis de proteína a proteína, por interações diretas, constituindo um primeiro nível de regulação de um receptor, e heteromérica, na qual a intercomunicação entre receptores ocorre dentro de agrupamentos representando um segundo nível de regulação (FERNANDEZ-DUENHA *et al.*, 2015).

As relações entre os receptores A2A e D2 foram demonstradas em nível bioquímico, funcional e comportamental, quando tem sido sugerido que essa inter-relação adenosina/dopamina no sistema nervoso central pode fornecer novas abordagens terapêuticas para a doença de Parkinson, Esquizofrenia e dependência de drogas. A interação intramembrana destes receptores implica em uma interação física estreita entre eles (CANALS *et al.*, 2003).

O sistema adenosinérgico é o principal alvo para metil xantinas entre as quais se incluem a cafeína (extraída do grão do café), teofilina (extraídas das folhas do chá mate) e a teobromina (retirada do grão do cacau), que é considerada uma classe de substâncias psicoestimulantes (SCHIFFMANN *et al.*, 2007; DORÉ *et al.*, 2011).

Esses alcaloides naturais são os primeiros antagonistas de adenosina descritos na literatura, exibindo uma afinidade micro molar e não seletiva por estes receptores (MÜLLER; JACOBSON, 2014).

A cafeína é o psicoestimulante mais consumido no mundo e é conhecido por afetar processos humanos básicos como sono, excitação, cognição, memória e aprendizado, além de atuar na regulação da frequência cardíaca, contração e relaxamento cardíaco e da musculatura lisa, assim como em sinais neurológicos do SNC (RIVERA-OLIVER; DIAZ-RIOS, 2014).

Estudos sugerem que a cafeína e seus metabólitos atuam como neuroprotetor contra a DP, atenuando lesões neuroquímicas e anatômicas induzidas por MPTP, 6-hidroxidopamina (6-OHDA), ou a combinação dos pesticidas paraquat e maneb (XU *et al.*, 2010), por meio da redução da liberação de neurotransmissores excitatórios, por retardar a neuroinflamação causada pela ativação da micróglia, por reduzir o glutamato extracelular no cérebro, pela redução da apoptose entre outros (RIVERA-OLIVER; DIAZ-RIOS, 2014; BAGGA; CHUGANI; PATEL, 2016).

Em um estudo que analisaram a neuroproteção da cafeína, bem como os efeitos da teofilina e da paraxantina em um modelo animal da DP com a utilização da MPTP, Xu *et al.* (2010) chegaram a conclusão que todos esses fármacos, sendo utilizados antes ou depois da aplicação da neurotoxina foram capazes de desempenhar a proteção neuronal.

Xu *et al.* (2016) também colocam que a cafeína quando co-administrada com MPTP em camundongos, com doses comparáveis com as que os humanos tipicamente se expõem, atenua a perda da dopamina no estriado que é desencadeada pelo MPTP em variadas espécies de roedores.

Há também estudos como os de Zhu *et al.* (2007), Bichler *et al.* (2013), Li *et al.* (2013), Zengin-Toktas *et al.* (2013) e Bonito-Oliva *et al.* (2014) que avaliam o comportamento não motor de modelos animais (camundongos) com

DP, apenas com o intuito de comprovar se os modelos por eles testados podem ser utilizados em pesquisas com novas drogas.

Há alguns anos, evidências indicam que os neurônios de adenosina desempenham um papel importante na regulação da função motora nos gânglios da base e uma série de testes em roedores é utilizada para estudar a ação dos antagonistas de A2A quanto aos seus efeitos em vários procedimentos (ISHIWARI *et al.*, 2007).

Há poucos trabalhos que demonstram os efeitos de substâncias não dopaminérgicas como as xantinas, nos SNM em modelos animais da DP, assim, neste trabalho foram testados os efeitos do antagonista de receptores de adenosina, a cafeína, aplicados por via intraperitoneal, no SNM de um modelo animal no qual foi realizada a injeção intra-peritoneal de MPTP, com o uso de testes já validados como os de Discriminação Olfatória (DO), o Teste do Campo Aberto (CA), Labirinto em Cruz Elevada (LCE) e Teste de Suspensão pela Cauda (TSC), no qual podem ser avaliados distúrbio olfatório, alterações motoras, ansiedade e depressão.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral:

Avaliar o efeito da cafeína nos sintomas não motores em um modelo animal da Doença de Parkinson.

3.2 Específicos:

a) Analisar a reprodutibilidade dos sintomas não motores da DP no modelo animal MPTP.

b) Analisar a interação dos receptores de dopamina e adenosina nos sintomas não motores da DP.

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

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

4.2 Drogas

Antagonista não seletivo do receptor de adenosina: cafeína (1,3,7 trimetilxantina), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), ambas dissolvidas em solução salina a 0,9%, além de probenecida, que foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO). Todas as drogas foram administradas por via intraperitoneal (i.p.).

4.3 Experimento

Os animais foram divididos em dois grupos:

a) Grupo Salina:

Este grupo foi composto por três subgrupos: Salina+salina, Salina+cafeína 10mg/kg, Salina+cafeína 20mg/kg, cada um composto por sete ou oito animais, sendo administrada solução salina a 0,9%, via i.p., por cinco dias consecutivos, uma vez ao dia no período matutino. Os animais foram pesados no primeiro e no quinto dias. No sétimo dia foi realizada nova pesagem para início do tratamento com administração de salina ou cafeína (10 ou 20 mg/kg) uma vez por dia, via i.p., durante 15 dias consecutivos, a cada cinco dias de tratamento foi realizada nova pesagem para correção da quantidade a ser administrada de salina ou cafeína. No vigésimo segundo dia, foram realizados os testes de LCE, CA e TSC, e somente no vigésimo terceiro

dia, foi realizado o teste de DO, para não haver interferência nos testes anteriores pelo jejum ao qual os animais foram submetidos para realização do mesmo, conforme demonstrado na figura 1.

b) Grupo MPTP:

Este grupo foi composto por três subgrupos: MPTP+salina, MPTP+cafeína 10mg/kg, MPTP+cafeína 20mg/kg, cada um composto por sete animais, sendo administrada a probenecida (250 mg/kg) 30 minutos antes do MPTP (25 mg/kg) i.p. por 5 dias consecutivos, uma vez ao dia no período matutino. Os animais foram pesados no primeiro e no quinto dias. No sétimo dia, foi realizada nova pesagem para início do tratamento com administração de salina ou cafeína (10 ou 20 mg/kg) uma vez por dia, via i.p., durante 15 dias consecutivos, a cada cinco dias de tratamento foi realizada nova pesagem para correção da quantidade a ser administrada de salina ou cafeína. No vigésimo segundo dia, foram realizados os testes de LCE, CA e TSC, e somente no vigésimo terceiro dia, foi realizado o teste de DO, para não haver interferência nos testes anteriores pelo jejum ao qual os animais foram submetidos para realização do mesmo, conforme demonstrado na figura 1.

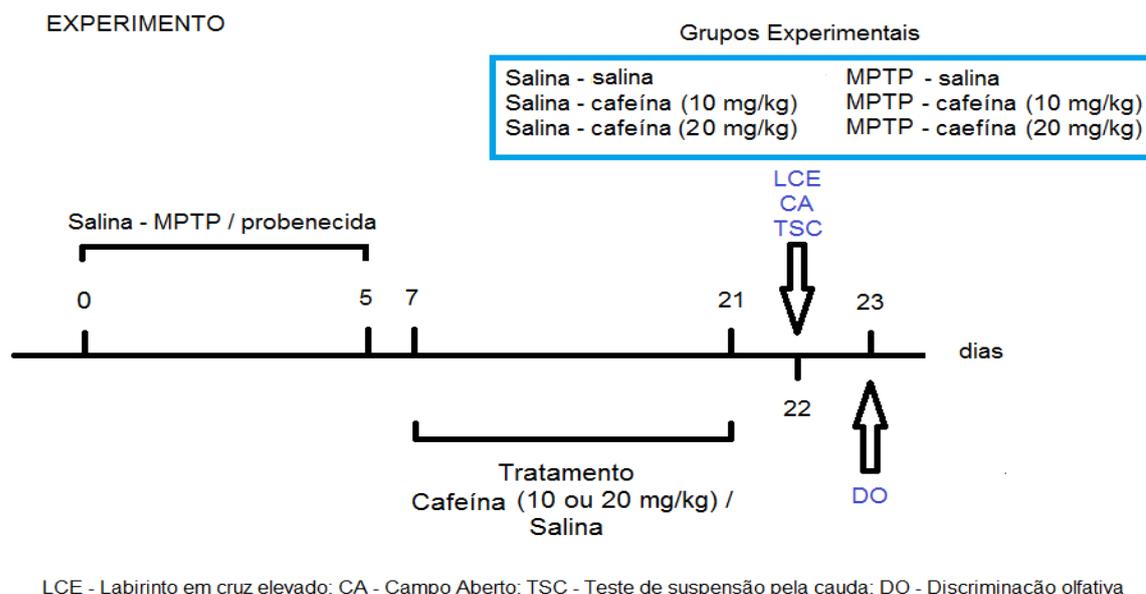


Figura 1 – Esquema ilustrativo do experimento.

4.4 Avaliação dos animais

A avaliação dos animais após a aplicação das drogas foi realizado por meio do teste do LCE (KOMADA; TAKAO; MIYAKAWA, 2008; WALF; FRYE, 2007), do teste do CA (WALSH & CUMMINS, 1976; WHIMBEY, 1967), do TSC (STÉRU *et al.*, 1985; CAN *et al.*, 2012) e do teste de DO (CUNHA *et al.* 2012). Todos os testes foram realizados no laboratório de Biofisiofarmacologia da UFMS.

4.4.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

Dentre os modelos mais utilizados para análise da ansiedade, destaca-se o LCE, considerado como método padrão-ouro para avaliação de ansiedade em pesquisa básica (KOMADA; TAKAO; MIYAKAWA, 2008), que foi desenvolvido por Handley e Mithani em 1984, a partir do labirinto em Y usado por Montgomery em 1955. Trata-se de uma plataforma em forma de cruz, composta de dois braços abertos (33 X 6 cm) em perpendicular com 2 braços da mesma dimensão, mas cercados por paredes de 16 cm de altura (denominados braços fechados), elevada 50 cm em relação ao solo. O comportamento dos roedores neste teste reflete um conflito entre a preferência do animal pelas áreas protegidas (braços fechados) e sua motivação inata para explorar novos ambientes (braços abertos). Quando colocados no labirinto, os camundongos permanecem naturalmente por mais tempo nos braços fechados onde se sentem mais seguros. Por outro lado, sob efeito de drogas ansiolíticas, os animais exploram os braços abertos mais frequentemente e por mais tempo. Neste estudo, cada animal permaneceu no labirinto pelo tempo de 5 min, sendo inicialmente colocado no labirinto com a face voltada para um dos braços fechados. Os testes foram gravados e o número de entradas, tempo despendido nos braços fechados e nos braços abertos assim como o percentual de tempo gasto e entradas nos braços abertos foram mensurados posteriormente. Uma ilustração do labirinto em cruz elevado utilizado neste estudo está representada na figura 2.

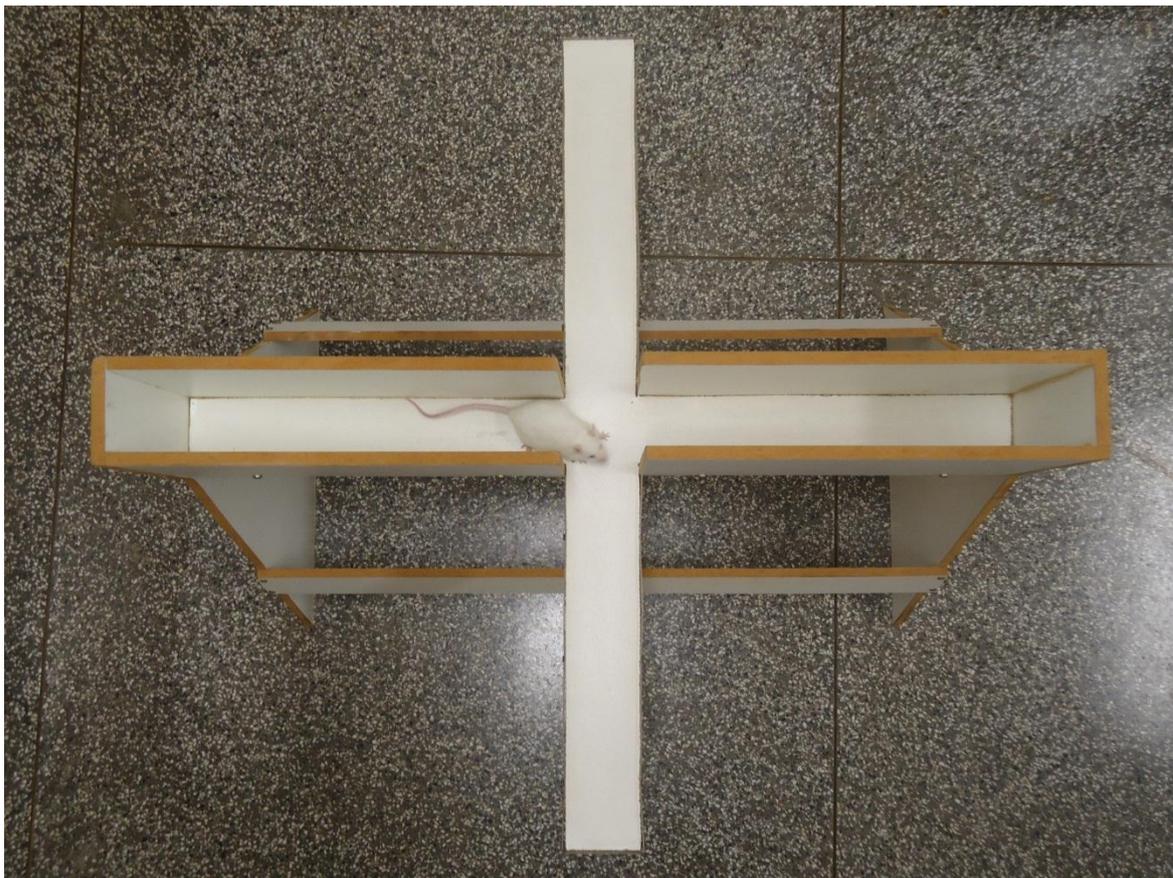


Figura 2: Teste do Labirinto em Cruz Elevado; Fonte: própria.

4.4.2 Teste do Campo Aberto:

Este teste foi primeiramente descrito por Calvin S. Hall na década de 30, sendo modificado, posteriormente na década de 1960 por P.L. Broaderhurst que evidenciou que o número de bolos fecais eliminados pelos ratos estava relacionado com o medo. Whimbey e Denenberg (1967) demonstraram que o teste do campo aberto, estava, na verdade, relacionado com o comportamento de deambulação e exploratório do rato, e não com o medo. Gradativamente, outros parâmetros de avaliação foram sendo acrescentados no teste e, atualmente, já são mais de 30 itens avaliados (WALSH; CUMMINS, 1976).

O teste do CA foi realizado em uma arena cilíndrica de 40 cm de diâmetro, com paredes de acrílico translúcido de 30 cm de altura, colocada sobre uma base de madeira recoberta de fórmica de cor branca, a qual é subdividida em 12 quadrantes de aproximadamente $104,7 \text{ cm}^2$. Cada animal foi colocado no centro da arena uma única vez, durante 5 minutos, sendo todos os

testes filmados para posterior análise. Em nosso estudo, avaliamos os seguintes parâmetros: a frequência dos comportamentos de exploração horizontal, que é a quantidade de quadrantes percorridos na área central, periférica e total, exploração vertical pela quantidade de erguimentos realizados pelo animal (Rearing), quantidade de bolos fecais e número de vezes que o animal realizou a auto limpeza (Grooming), tempo de permanência nas áreas central e periférica e percentual de tempo gasto nos quadrantes periféricos.

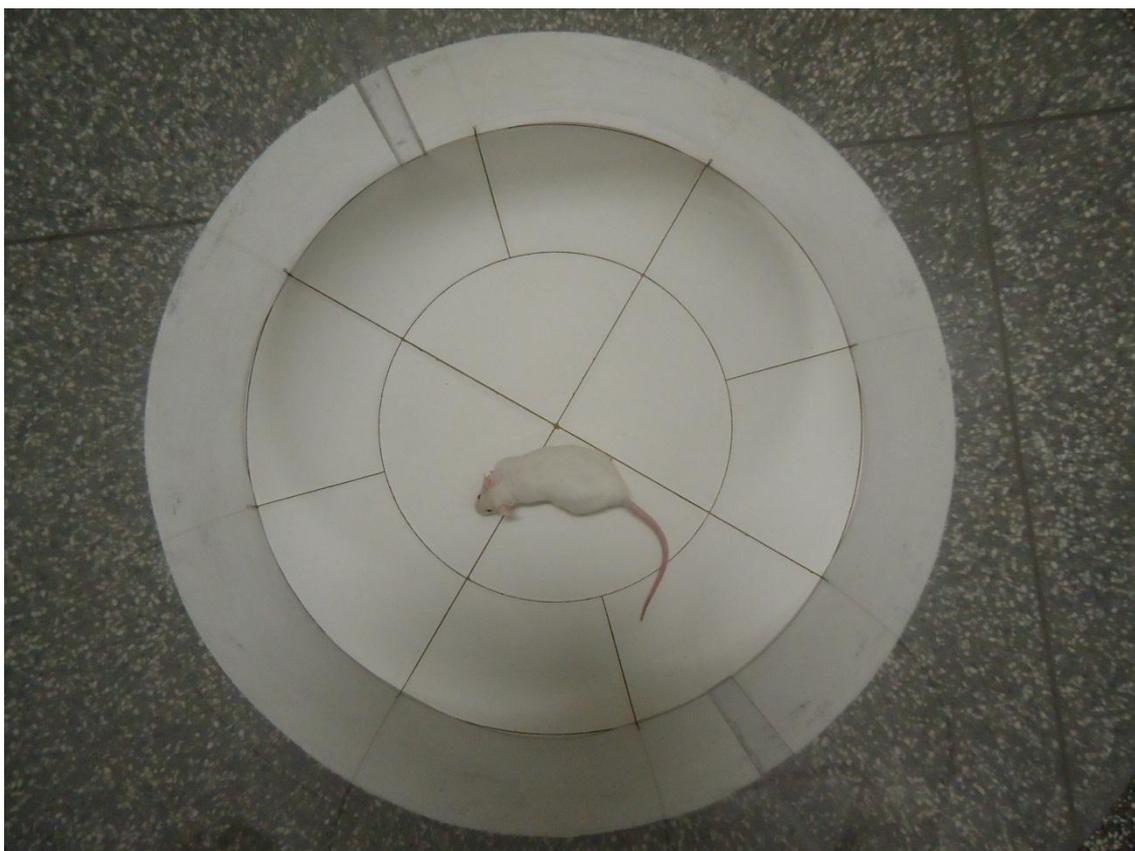


Figura 3: Teste do Campo Aberto; Fonte: própria.

4.4.3 Teste de Suspensão pela Cauda

O TSC foi proposto por Stéru *et al.* (1985) e é um teste validado para avaliação da eficácia de drogas antidepressivas e coloca os camundongos em uma situação moderada mas inevitável de estresse (CAN *et al.*, 2012). O Teste da Suspensão pela Cauda consiste na suspensão do animal pela cauda com o uso de fita adesiva, num aparato construído de acordo as medidas mencionadas no estudo de Can *et al.* (2012) (55 cm altura X 60 cm largura X

11,5 cm) no qual os animais são suspensos pela cauda a uma barra de metal, na bancada do laboratório e deixado nesta posição por 6 min. O camundongo inicialmente apresenta um comportamento de fuga com movimentos de “corrida”, de empurrões ou torções como tentativa de alcançar o aparelho que o suspende, seguido por grandes períodos de imobilidade, o que é chamado de período de latência (CRYAN et al, 2004). Os testes foram gravados para posterior mensuração do tempo de latência entre os movimentos de escape até o primeiro momento em que o animal se rende, permanecendo imóvel e o seu tempo total de imobilidade e mobilidade quando pendurado. O menor tempo de latência e o aumento do tempo de imobilidade são indicativos de depressão (BONITO-OLIVA, 2014; MORAGA-AMARO et al, 2014).



Figura 4: Teste de Suspensão pela Cauda

4.4.4 Teste de Discriminação Olfatória

Este teste (figura 5) mede a habilidade do animal para encontrar alimentos enterrados usando pistas olfativas e segue o protocolo utilizado no estudo de Cunha *et al.* (2012). Os animais foram privados de alimento durante a noite com livre acesso à água, entre 17:00 do dia anterior ao teste e o início do mesmo, às 8:00 da manhã do dia seguinte. Para evitar problemas associados com neofobia, os animais foram acostumados ao cheiro do novo alimento, colocando-se uvas passa dentro de suas caixas durante a noite, por um período três de dias antes do teste. No dia do teste, uma uva passa foi colocada debaixo da maravalha no interior de uma gaiola com uma profundidade de aproximadamente 2,5 cm sendo, então, completamente coberta com a maravalha. O tempo dispendido para encontrar o alimento e começar a comê-lo foi mensurado. Cada teste foi gravado para posterior contagem do tempo com a utilização de um cronômetro. Utilizou-se um tempo máximo de 15 min para o corte e camundongos atingindo o ponto de corte foram incluídos na análise como se tivessem encontrado o alimento após 15 min.



Figura 5: Teste de Discriminação Olfatória

4.5 Descarte dos animais

Após os testes de comportamento, os animais foram sacrificados com uso da técnica de deslocamento cervical e encaminhados para incineração por meio do sistema de coleta de lixo biológico da UFMS.

4.6 Análise estatística

As variáveis analisadas não passaram no teste estatístico de Shapiro-Wilk, levando-se em consideração o $p < 0,05$ e foram classificadas como não normais (não paramétricas) utilizando-se assim, para comparação dos dados entre os grupos experimentais, o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn. Os demais resultados foram apresentados na forma de estatística descritiva ou na forma de tabelas e gráficos. A análise estatística foi realizada por meio do programa SigmaPlot, versão 12.5, considerando um nível de significância de 5% (NORMAN, 1994; SHOTT, 1990).

4.7 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais/CEUA da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, com protocolo número 670/2015 (Anexo A).

5. RESULTADOS

Houve grande número de mortes dos animais que foram expostos a neurotoxina, de 45 animais que receberam a droga 24 morreram antes da administração da quinta dose, o que corresponde a aproximadamente 53% dos animais que receberam a MPTP, restando apenas 21 animais que foram distribuídos nos três subgrupos do grupo MPTP.

5.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

Os resultados referentes ao Teste do Labirinto em Cruz Elevado nos diferentes grupos estudados estão apresentados nas Tabelas 1 e 2 e ilustrados nas figuras 6,7,8,9 e 10.

Tabela 1 – Resultados referentes a três variáveis analisadas no teste LCE: número de entradas nos braços abertos (EntBF), número de entradas nos braços fechados (EntBA) e percentual de entradas nos braços abertos em relação ao número total de entradas, em cada um dos grupos experimentais.

LCE			
Grupos	EntBF	EntBA	% EntBA
SAL - SAL	11,14±0,71	4,29±0,97	30,33±7,88
SAL – Caf 10 mg	11,88±1,26	8,25±1,73	39,67±6,82
SAL – Caf 20 mg	10,63±0,84	2,25±0,8	15,79±4,91
MPTP - SAL	10,43±1,40	4,00±1,18	27,04±7,92
MPTP - Caf 10 mg	12,43±0,95	2,86±1,06	16,36±5,34
MPTP - Caf 20 mg	10,14±1,20	3,71±1,17	23,27±6,53
p	0,585	0,093	0,195

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão. Variáveis expressas em número absoluto. Não houve diferença significativa entre os grupos (pós-teste de Dunn, $p < 0,05$).

Tabela 2 – Resultados referentes a quatro variáveis analisadas no teste do LCE: tempo de permanência na parte central, nos braços abertos (BA), nos braços fechados (BrF) e percentual de tempo de permanência nos braços abertos em relação ao total, em cada um dos grupos experimentais.

LCE				
Grupos	Centro	BrF	BA	% Tempo BA
SAL - SAL	71,46±9,85ab	181,06±12,59ab	47,53±9,41	15,80±3,14
SAL – Caf 10 mg	83,09±8,11ab	126,18±13,21b	90,74±18,04	30,20±6,02
SAL – Caf 20 mg	72,6±7,09ab	202,99±12,00a	24,41±9,61	8,10±3,20
MPTP - SAL	79,57±6,93ab	156,36±24,51ab	64,07±22,73	21,33±7,58
MPTP - Caf 10 mg	101,51±2,64a	168,6±9,76ab	29,89±11,40	9,94±3,79
MPTP - Caf 20 mg	69,24±16,32b	191,14±25,24ab	39,57±17,09	13,19±5,69
p	0,027	0,034	0,080	0,080

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão. Tempo das variáveis expresso em segundos. Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (pós-teste de Dunn, $p < 0,05$).

5.1.1 Entrada no braço aberto e no braço fechado

O número de entradas nos braços abertos e fechados não apresentou diferença significativa entre os grupos segundo o teste de Kruskal-Wallis ($p=0,093$ e $p=0,585$), conforme demonstrado nas figuras 6 e 7.

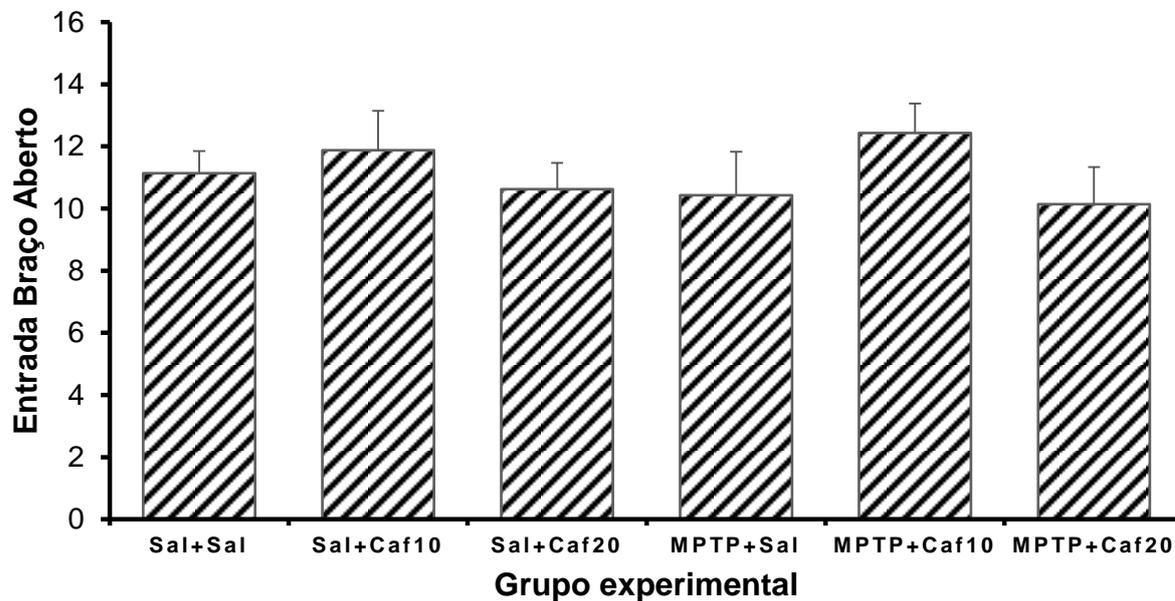


Figura 6 – Gráfico referente ao número de entradas nos Braços Abertos, em cada grupo experimental, no teste do LCE. As colunas se referem à média e as barras ao erro padrão da média.

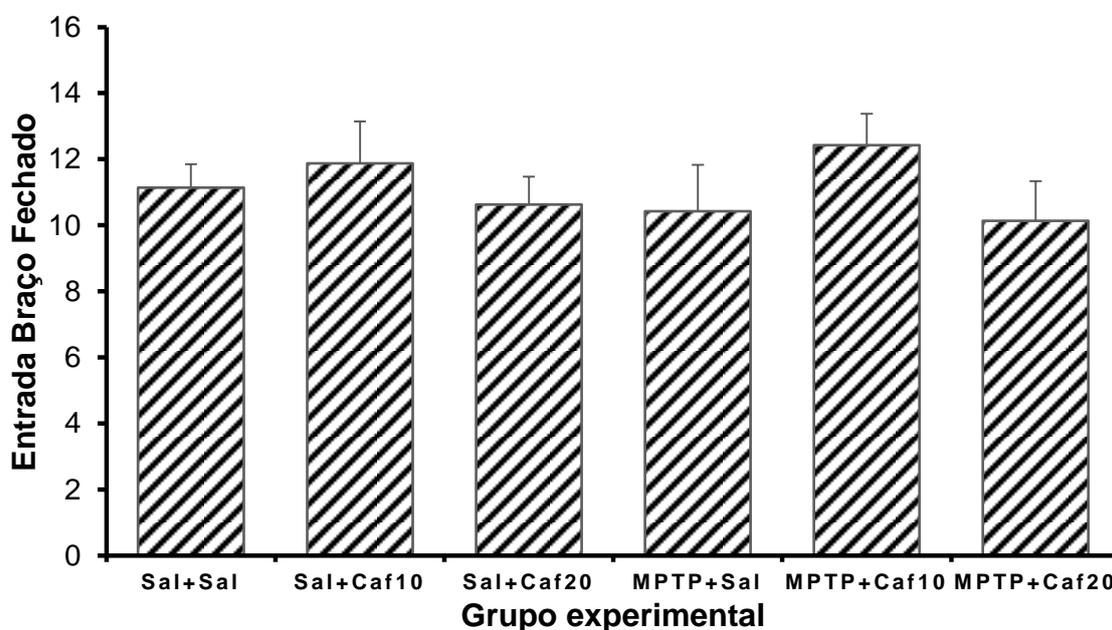


Figura 7 – Gráfico referente ao número de entradas nos Braços Fechados, em cada grupo experimental, no Teste do Labirinto em Cruz Elevada. As colunas se referem à média e as barras ao erro padrão da média.

5.1.2 Percentual de entradas no braço aberto

No que diz respeito a esta variável, não houve diferença significativa entre os grupos analisados segundo o teste de Kruskal-Wallis ($p=0,195$), como demonstrado na figura 8.

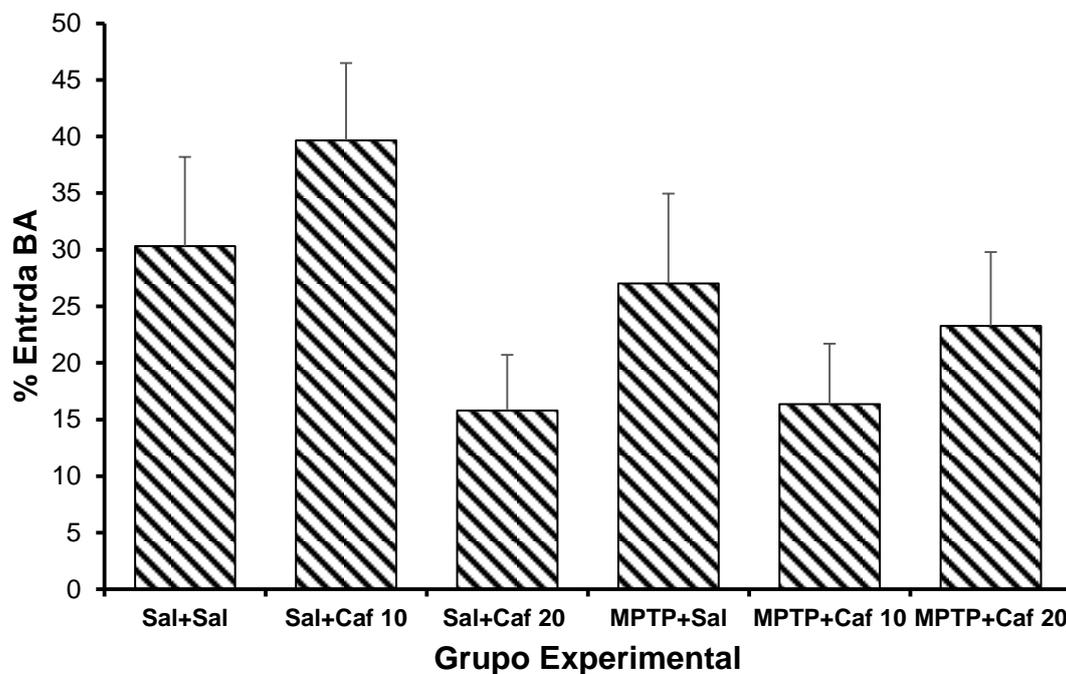


Figura 8 – Gráfico referente ao percentual de entradas nos Braços Abertos, em cada grupo experimental, no Teste do Labirinto em Cruz Elevada. As colunas se referem à média e as barras ao erro padrão da média.

5.1.3 Tempo de permanência no centro

Em relação ao tempo de permanência no Centro do aparato, houve diferença significativa somente entre os grupos MPTP+Cafeína 10 mg/kg e MPTP+Cafeína 20 mg/kg segundo o teste de Kruskal-Wallis ($p=0,027$), conforme ilustrado na figura 9.

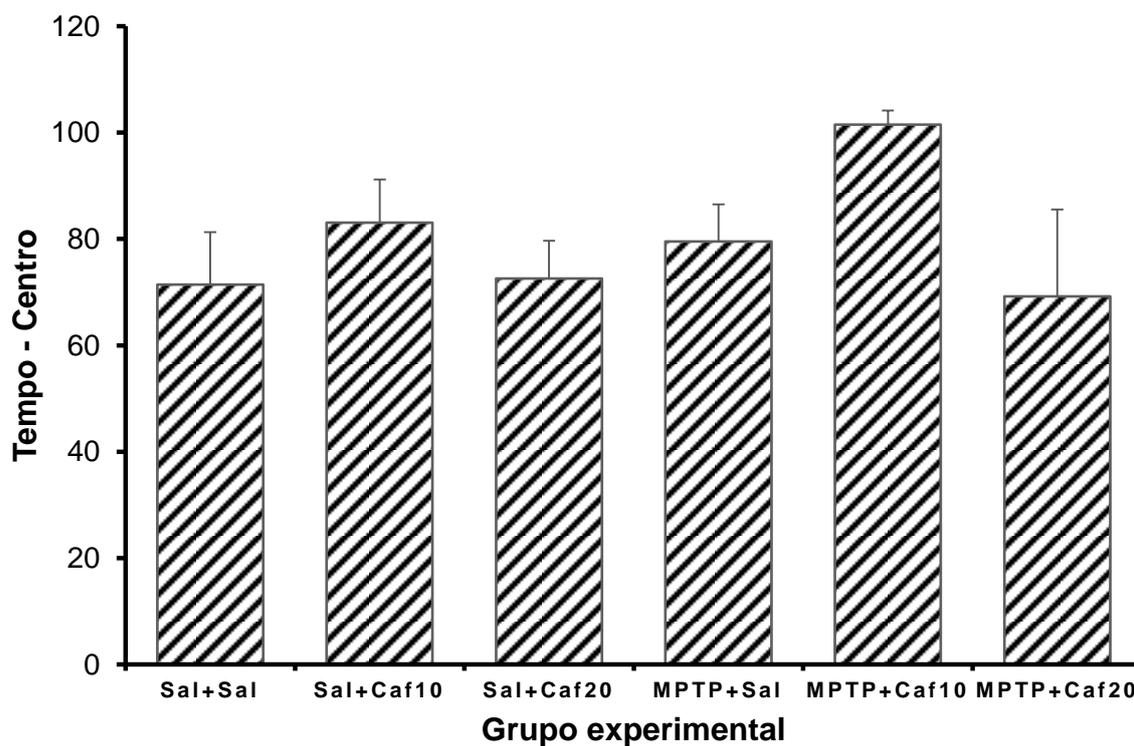


Figura 9 – Gráfico referente ao tempo de permanência no centro, em cada grupo experimental, no teste do LCE. As colunas se referem à média e as barras ao erro padrão da média.

5.1.4 Tempo de permanência no braço fechado

Em relação ao tempo de permanência no Braço Fechado do aparato, houve diferença significativa somente entre os grupos Salina+Cafeína 10 mg/kg e Salina+Cafeína 20 mg/kg segundo o teste de Kruskal-Wallis ($p=0,034$), conforme ilustrado na figura 10.

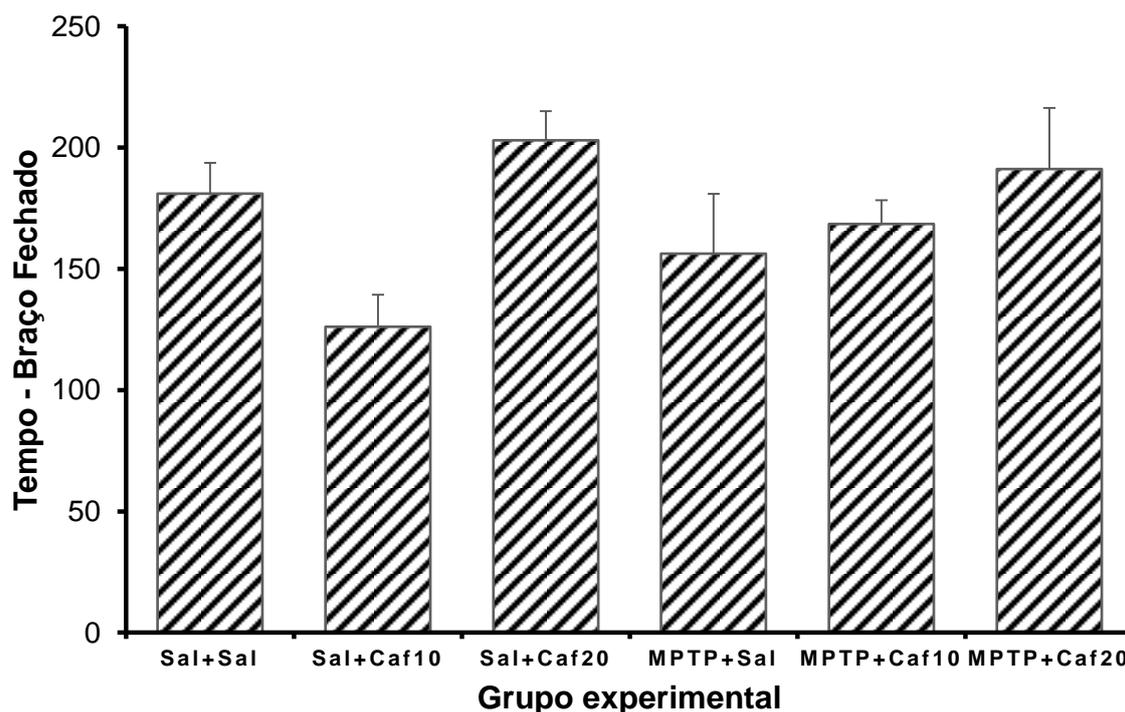


Figura 10 – Gráfico referente ao tempo de permanência no Braço Fechado, em cada grupo experimental, no teste do LCE. As colunas se referem à média e as barras ao erro padrão da média.

5.1.5 Tempo de permanência no braço aberto

Esta variável não apresentou diferença significativa entre os grupos segundo o teste de Kruskal-Wallis ($p=0,080$). Resultado ilustrado na figura 11.

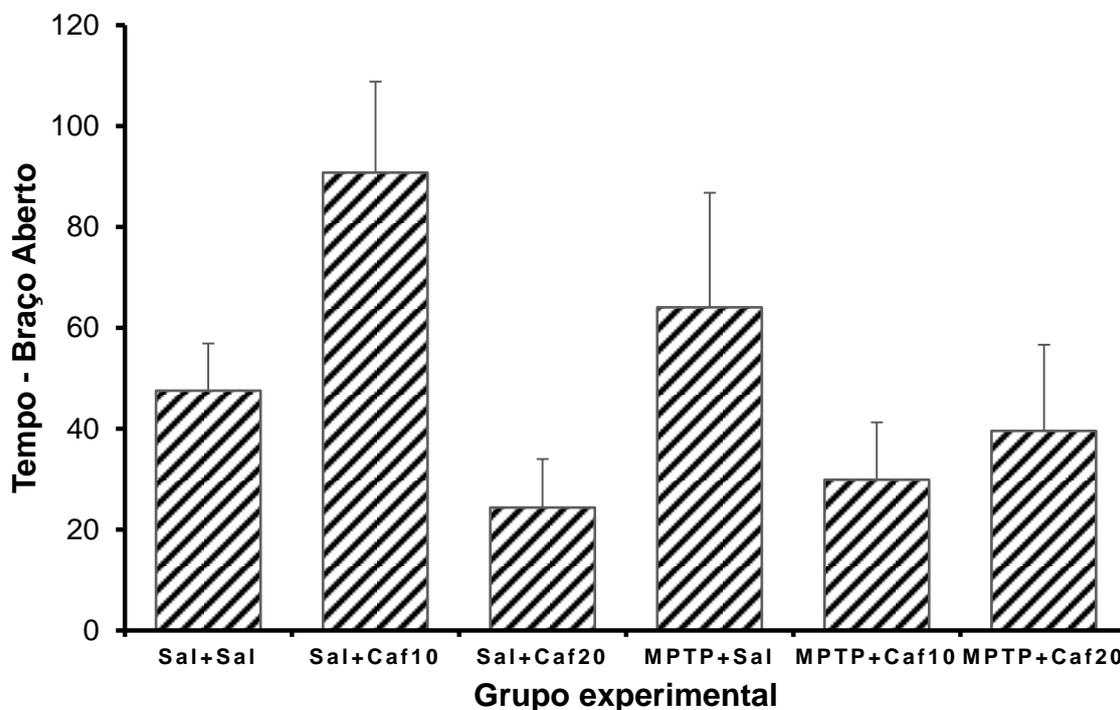


Figura 11 – Gráfico referente ao tempo de permanência no Braço Aberto, em cada grupo experimental, no teste do LCE.

5.1.6 Percentual de tempo de permanência no braço aberto

Esta variável também não apresentou diferença significativa entre os grupos segundo o teste de Kruskal-Wallis ($p=0,080$). Resultado ilustrado na figura 12.

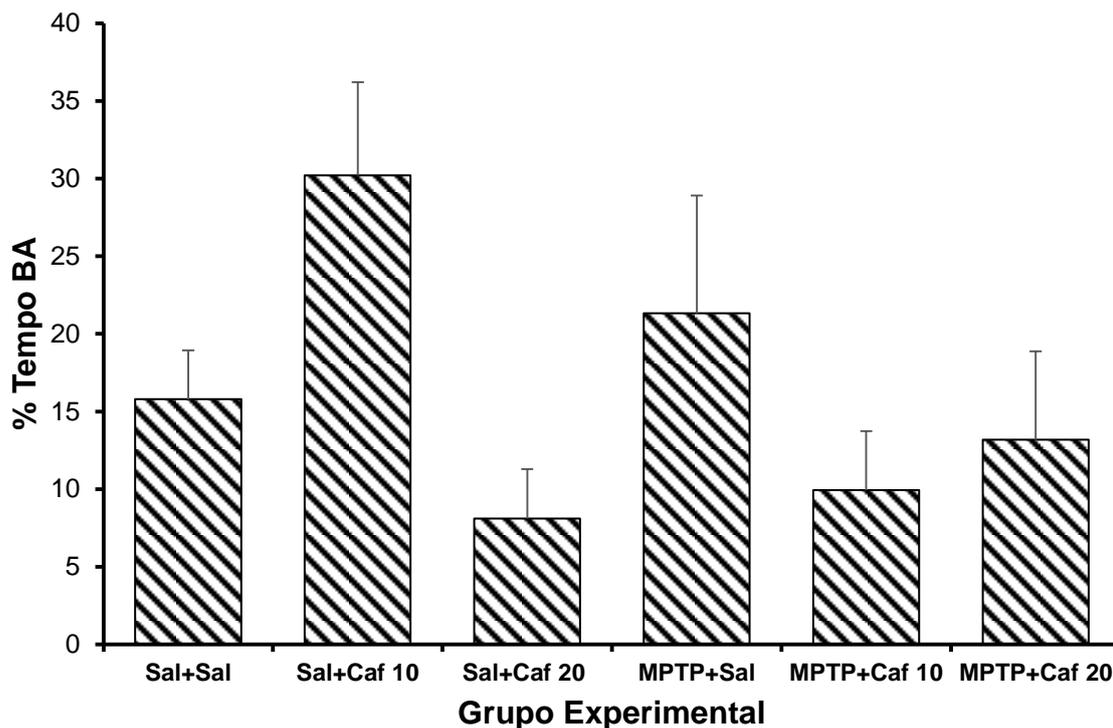


Figura 12 – Gráfico referente ao percentual de tempo de permanência no Braço Aberto, em cada grupo experimental, no teste do LCE.

5.2 Teste do Campo Aberto

Os resultados referentes ao teste do Campo Aberto nos diferentes grupos estudados estão apresentados nas Tabelas 3, 4 e 5.

Tabela 3 – Resultados referentes a três variáveis analisadas no teste de CA, número de bolos fecais (BF), número de erguimentos e número de limpezas, em cada um dos grupos experimentais.

CAMPO ABERTO			
GRUPOS	BF	Limpeza	Erguimento
SAL - SAL	4,14±0,83ab	3,14±0,55a	32,71±6,23ab
SAL – Caf 10mg	4,00±0,60a	1,63±0,18ab	53,38±6,26a
SAL – Caf 20mg	3,88±0,77ab	3,75±0,86a	27,75±6,34ab
MPTP - SAL	2,86±0,4ab	1,00±0,22b	38,14±8,59ab
MPTP - Caf 10mg	2,14±0,51ab	2,00±0,44ab	26,29±7,34ab
MPTP - Caf 20mg	1,00±0,49b	1,71±0,89ab	15,00±4,05b
p	0,010	0,002	0,011

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão. Variáveis expressas em número absoluto. Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (pós-teste de Dunn, $p < 0,05$).

Tabela 4 – Resultados referentes a quatro variáveis analisadas no teste de CA: número de quadrantes centrais percorridos, número de quadrantes periféricos percorridos, número total de quadrantes percorrido e percentual de quadrantes periféricos percorridos em relação ao total, em cada um dos grupos experimentais.

CAMPO ABERTO				
Grupos	QC	QP	Total	% QP
SAL - SAL	22,71±2,85ab	83,57±9,26ab	106,29±11,61ab	77,74±1,91a
SAL – Caf 10mg	36,63±3,05a	92,00±4,56a	131,13±7,02a	70,37±1,77a
SAL – Caf 20mg	23,00±5,87ab	64,00±6,16b	87,00±11,00ab	76,70±3,93a
MPTP - SAL	35,57±2,65a	81,29±7,26ab	116,86±7,89ab	68,96±2,77a
MPTP - Caf 10mg	27,14±4,49ab	79,14±9,72ab	06,29±11,36ab	73,91±3,86a
MPTP - Caf 20mg	15,71±3,98b	66,29±8,01ab	82,00±9,83b	80,76±3,83a
p	0,005	0,037	0,010	0,036

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão. Variáveis expressas em número absoluto. Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (pós-teste de Dunn, $p < 0,05$).

Tabela 5 – Resultados referentes a três variáveis analisadas no teste de CA: tempo de permanência nos quadrantes centrais, tempo de permanência nos quadrantes periféricos e porcentagem do tempo de permanência na periferia em relação ao total, em cada um dos grupos experimentais.

CAMPO ABERTO			
GRUPOS	Tempo Centro	Tempo Periferia	% Tempo Periferia
SAL - SAL	61,64±10,29	238,36±10,29	79,15±3,39
SAL – Caf 10mg	65,69±6,54	234,31±6,54	78,06±2,18
SAL – Caf 20mg	67,95±16,95	232,05±16,95	77,31±5,65
MPTP - SAL	85,30±8,18	214,74±8,18	71,54±2,73
MPTP - Caf 10mg	66,40±11,35	233,53±11,33	77,81±3,77
MPTP - Caf 20mg	49,54±15,18	250,46±15,18	83,46±5,06
p	0,295	0,299	0,304

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão. Variáveis expressas em número absoluto. Não houve diferença significativa entre os grupos (pós-teste de Dunn, $p < 0,05$).

5.2.1 – Bolos Fecais

Sobre esta variável, houve diferença significativa apenas entre os grupos Salina+Cafeína 10 mg/kg e MPTP+Cafeína 20 mg/kg (teste de Kruskal-Wallis, $p=0,010$) sendo o maior número de bolos fecais do grupo Salina+Cafeína 10 mg/kg, conforme ilustrado na figura 13.

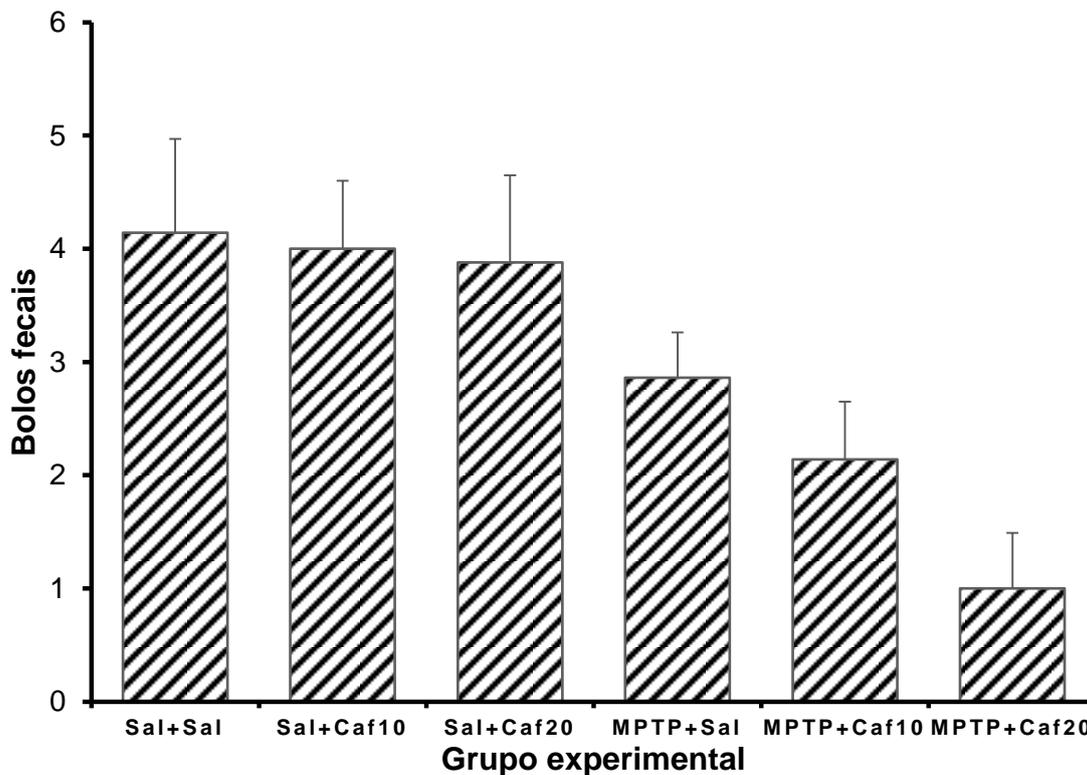


Figura 13 – Gráfico referente ao número de bolos fecais em cada grupo experimental no teste CA. As colunas se referem à média e as barras ao erro padrão da média.

5.2.2 Limpeza

Em relação a variável Auto Limpeza, houve diferença significativa apenas entre os grupos Salina+Salina, Salina+Cafeína 20 mg/kg e MPTP+Salina (teste de Kruskal-Wallis, $p=0,002$) sendo que o maior número desta variável ocorreu no grupo Salina+Salina e Salina+Cafeína 20 mg/kg, conforme ilustrado na figura 14.

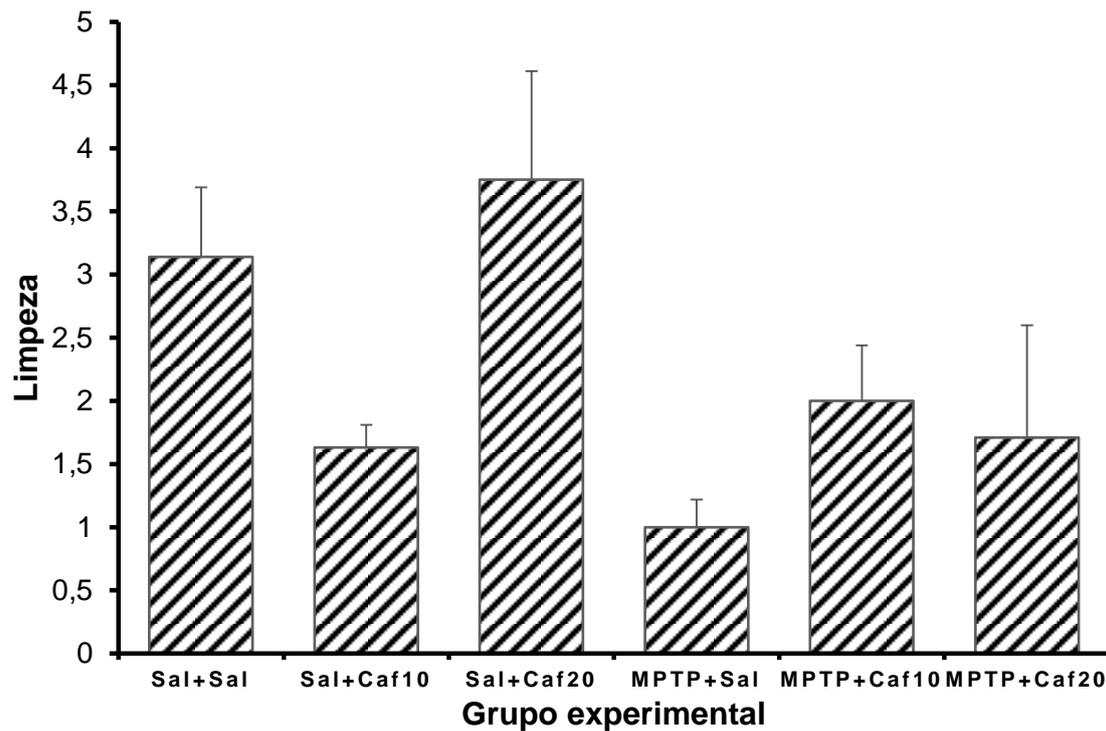


Figura 14 – Gráfico referente ao número de auto limpeza em cada grupo experimental no teste de CA. As colunas se referem à média e as barras ao erro padrão da média.

5.2.3 Erguimento

Nesta variável, houve diferença significativa apenas entre os grupos Salina+Cafeína 10 mg/kg e MPTP+Cafeína 20 mg/kg (teste de Kruskal-Wallis, $p=0,011$) sendo que o maior número desta variável ocorreu no grupo Salina+Cafeína 10 mg/kg, conforme ilustrado na figura 15.

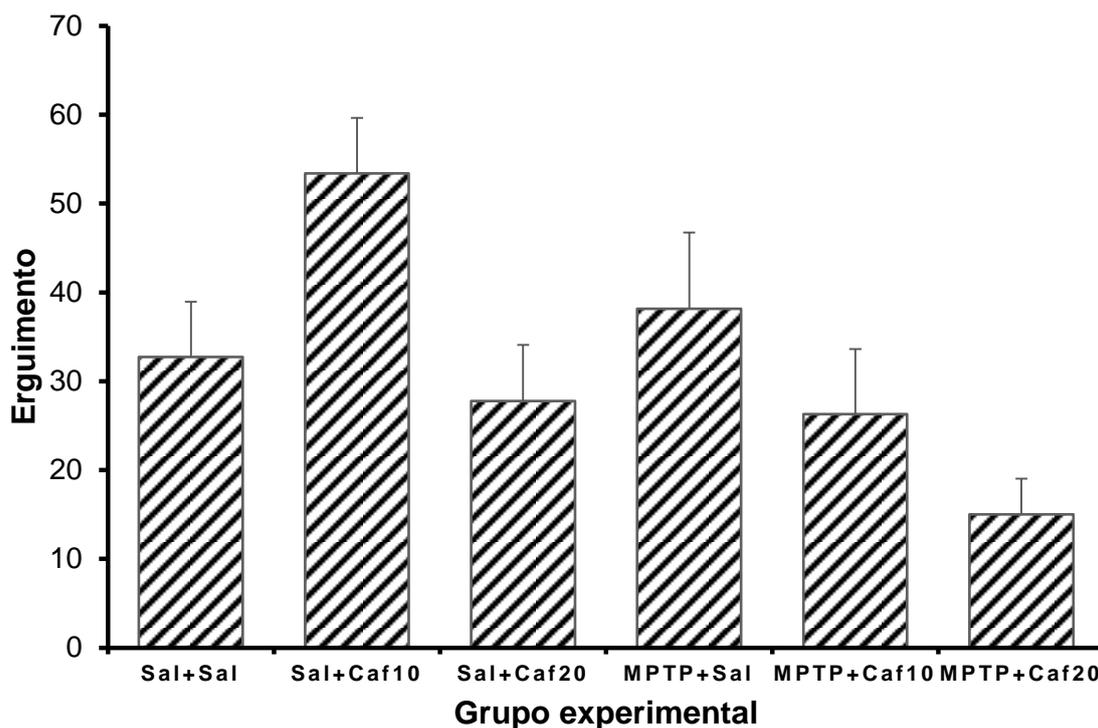


Figura 15 – Gráfico referente ao número de erguimentos em cada grupo experimental no teste de CA. As colunas se referem à média e as barras ao erro padrão da média.

5.2.4 Quadrantes Centrais

De acordo com teste estatístico utilizado (Kruskal-Wallis), houve diferença significativa entre os grupos Salina+Cafeína 10 mg/kg, MPTP+Salina e MPTP+Cafeína 20 mg/kg ($p=0,005$), sendo que os animais dos grupos Salina+Cafeína 10 mg/kg e MPTP+Salina percorreram um número maior de quadrantes centrais que o grupo Salina+Cafeína 20 mg/kg. Estes resultados estão ilustrados na figura 16.

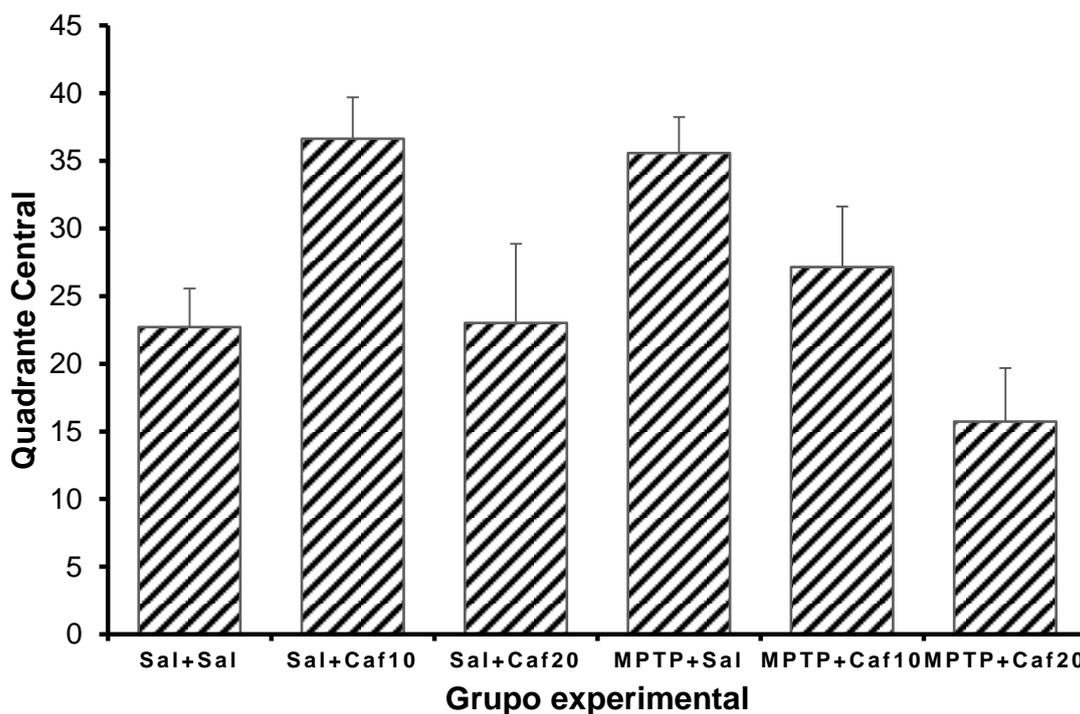


Figura 16 – Gráfico referente ao número de quadrantes centrais percorridos, em cada grupo experimental, no teste CA. As colunas se referem à média e as barras ao erro padrão da média.

5.2.5 Quadrantes Periféricos

Em relação ao número de Quadrantes Periféricos percorridos, houve diferença significativa apenas entre os grupos Salina+Cafeína 10 mg/kg e Salina+Cafeína 20 mg/kg (teste de Kruskal-Wallis, $p=0,037$), sendo que os animais do grupo Salina+Cafeína 10 mg/kg percorreram um número maior de quadrantes periféricos que o grupo Salina+Cafeína 20 mg/kg, conforme demonstrado na figura 17.

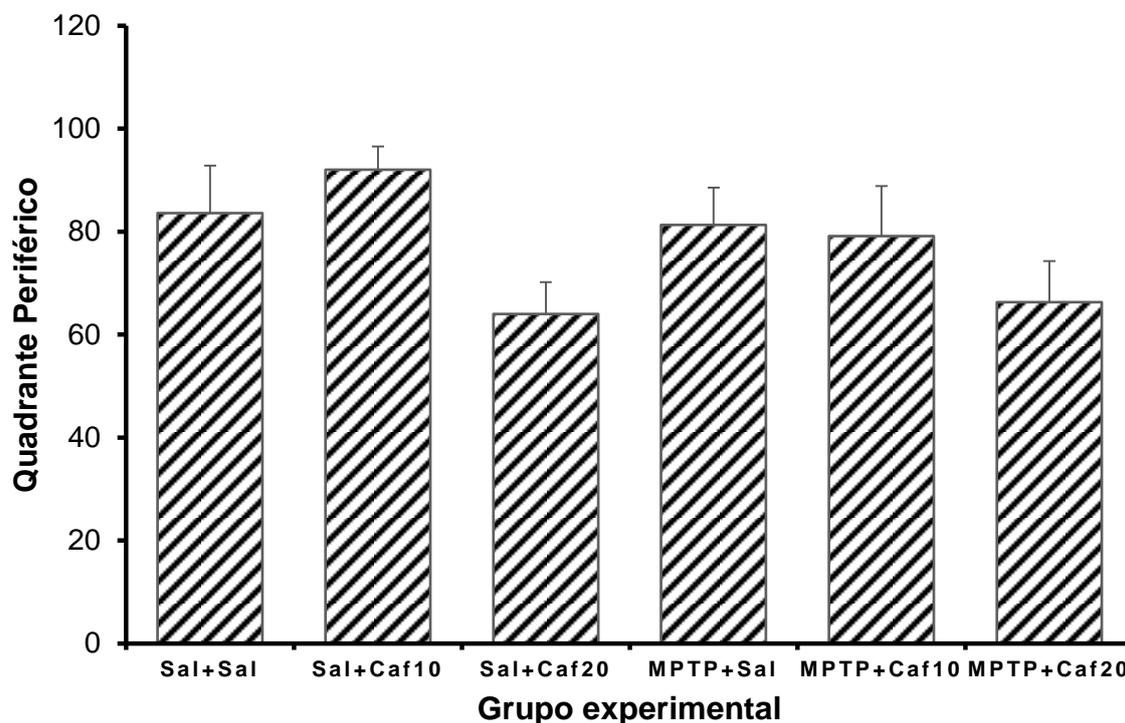


Figura 17 – Gráfico referente ao número de quadrantes periféricos percorridos, em cada grupo experimental, no teste de CA. As colunas se referem à média e as barras ao erro padrão da média.

5.2.6 Total de Quadrantes Percorridos

Esta variável apresentou diferença significativa apenas entre os grupos Salina+Cafeína 10 mg/kg e MPTP+Cafeína 20 mg/kg (teste de Kruskal-Wallis, $p=0,037$), sendo que os animais do grupo Salina+Cafeína 10 mg/kg percorreram um número total maior de quadrantes que o grupo MPTP+Cafeína 20 mg/kg, conforme demonstrado na figura 18.

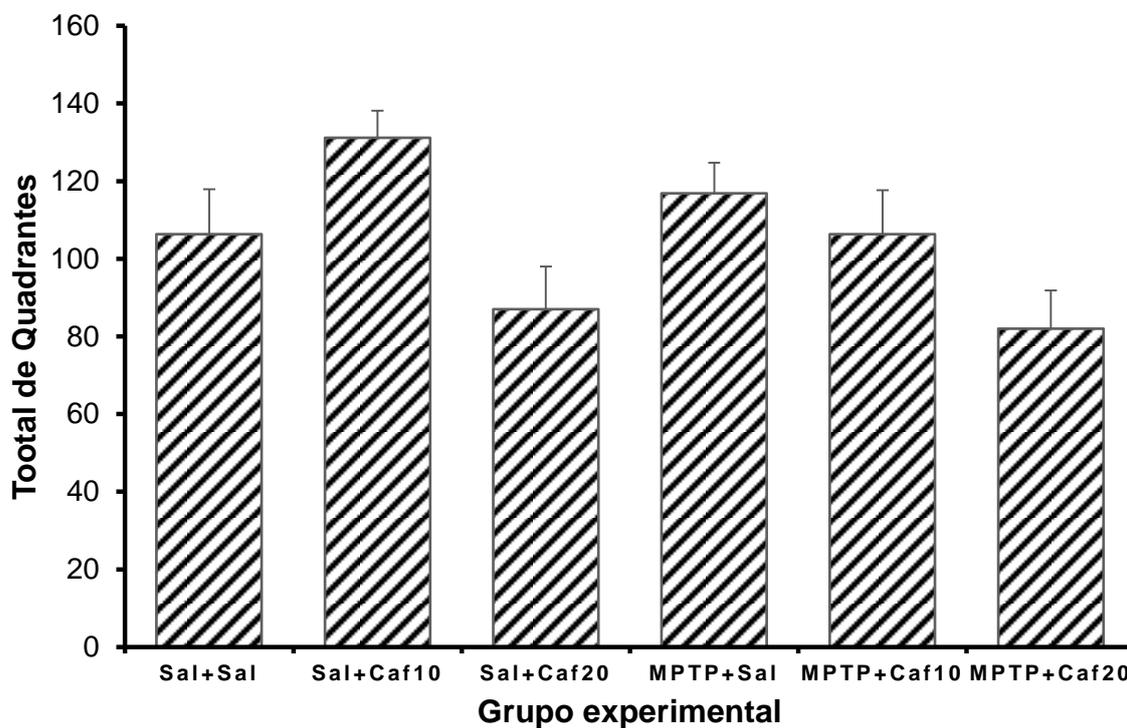


Figura 18 – Gráfico referente ao número total de quadrantes percorridos, em cada grupo experimental, no teste CA. As colunas se referem à média e as barras ao erro padrão da média.

5.2.7 Percentual de Quadrantes Periféricos Percorridos

Esta variável não apresentou diferença significativa entre os grupos segundo o teste de Kruskal-Wallis ($p=0,080$). Resultado ilustrado na figura 19.

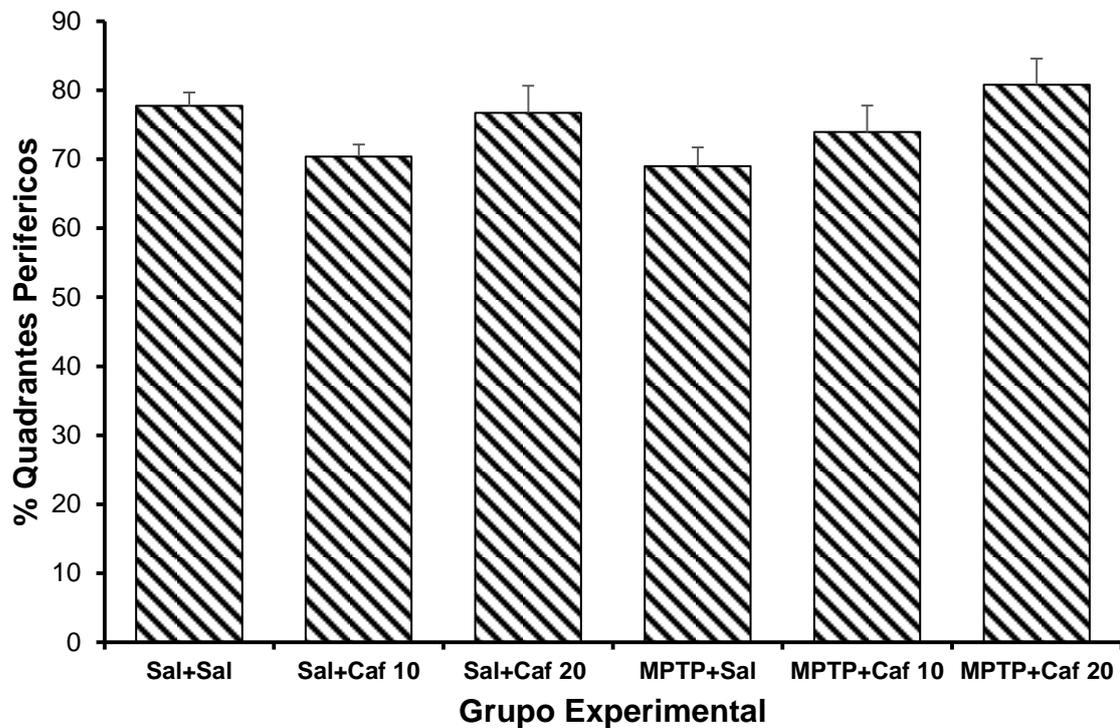


Figura 19 – Gráfico referente ao percentual de quadrantes periféricos percorridos, em cada grupo experimental, no teste de CA. As colunas se referem à média e as barras ao erro padrão da média.

5.2.8 Tempo de permanência no centro

Esta variável não apresentou diferença significativa entre os grupos segundo o teste de Kruskal-Wallis ($p=0,080$). Resultado ilustrado na figura 20.

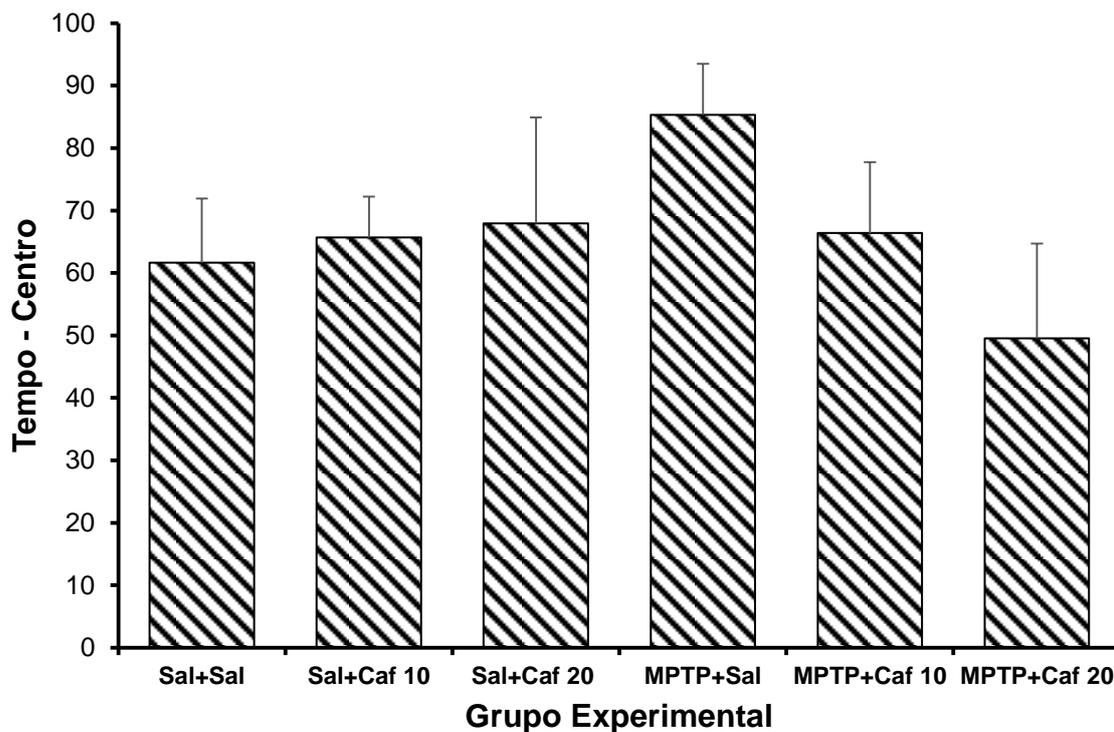


Figura 20 – Gráfico referente ao percentual de quadrantes periféricos percorridos, em cada grupo experimental, no teste de CA. As colunas se referem à média e as barras ao erro padrão da média

5.2.9 Tempo de permanência na Periferia

Esta variável não apresentou diferença significativa entre os grupos segundo o teste de Kruskal-Wallis ($p=0,080$). Resultado ilustrado na figura 21.

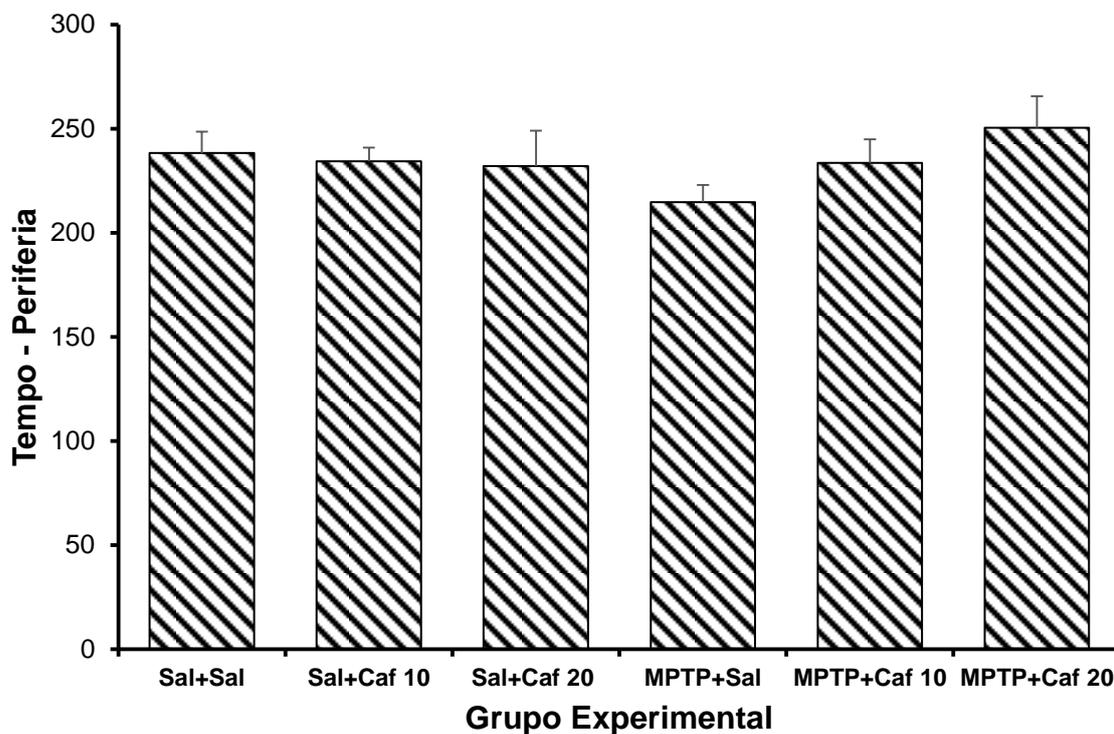


Figura 21 – Gráfico referente ao tempo de permanência na periferia, em cada grupo experimental, no teste de CA. As colunas se referem à média e as barras ao erro padrão da média.

5.2.10 Percentual do tempo de permanência na periferia

Esta variável não apresentou diferença significativa entre os grupos segundo o teste de Kruskal-Wallis ($p=0,080$). Resultado ilustrado na figura 22.

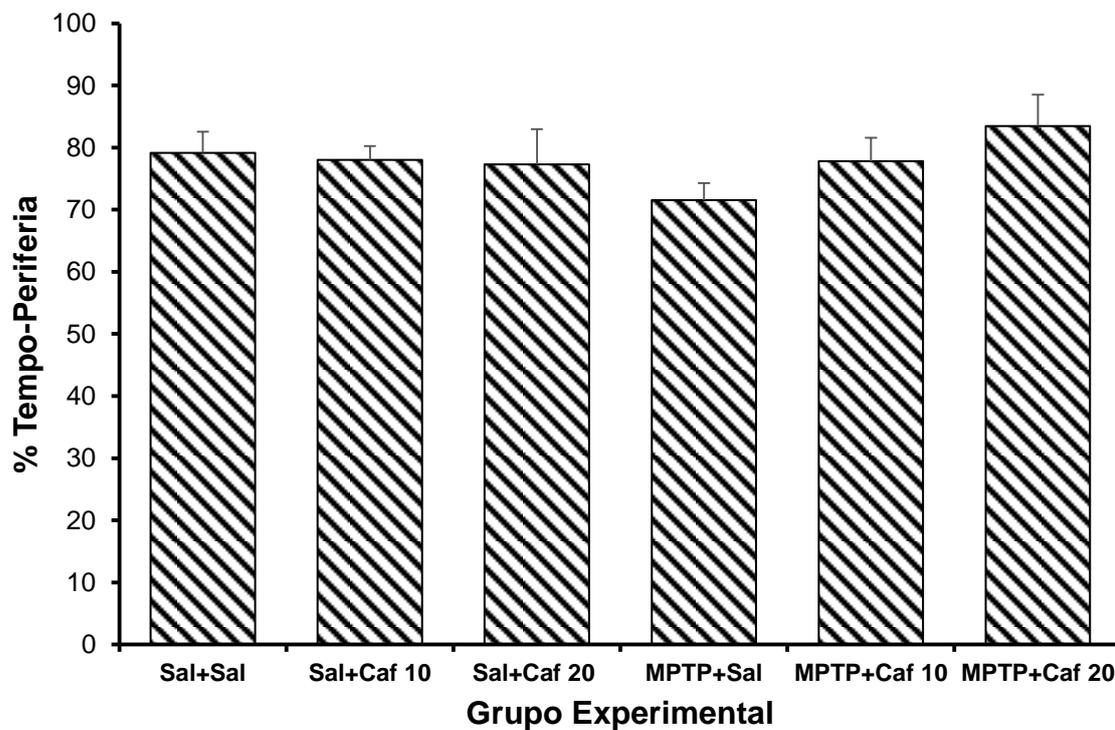


Figura 22 – Gráfico referente ao percentual de quadrantes periféricos percorridos, em cada grupo experimental, no teste de CA. As colunas se referem à média e as barras ao erro padrão da média.

5.3 Teste de Discriminação Olfatória e Teste de Suspensão pela Cauda

Os resultados referentes ao teste de Discriminação Olfatória e Teste de Suspensão pela Cauda nos diferentes grupos estudados, estão apresentados na Tabela 6 e ilustrados nas Figuras 23, 24, 25 e 26.

Não houve diferença significativa entre os grupos em ambos os testes e em todas as variáveis analisadas segundo o teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 6 – Resultados referentes ao teste de Discriminação Olfatória e as variáveis analisadas no Teste de Suspensão pela Cauda: tempo de latência entre a tentativa de escape e a imobilidade, tempo de mobilidade e tempo de imobilidade, em cada um dos grupos experimentais.

DO - TSC				
Grupos	DO	Latência	Mobilidade	Imobilidade
SAL - SAL	258,71±53,22	69,92±15,46	252,07±14,23	107,93±14,23
SAL – Caf 10 mg	301,25±42,86	62,68±10,6	218,72±22,79	141,29±22,79
SAL – Caf 20 mg	143,38±50,05	77,62±11,91	278,53±24,65	81,47±24,65
MPTP - SAL	215,29±91,69	75,60±15,37	297,96±16,81	62,04±16,81
MPTP - Caf 10 mg	285,86±110,19	88,05±31,43	310,05±16,57	49,95±16,57
MPTP - Caf 20 mg	126,86±29,16	76,10±16,24	259,26±21,86	100,74±21,86
p	0,044	0,925	0,045	0,045

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão. Tempo das variáveis expresso em segundos. Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (pós-teste de Dunn, $p < 0,05$).

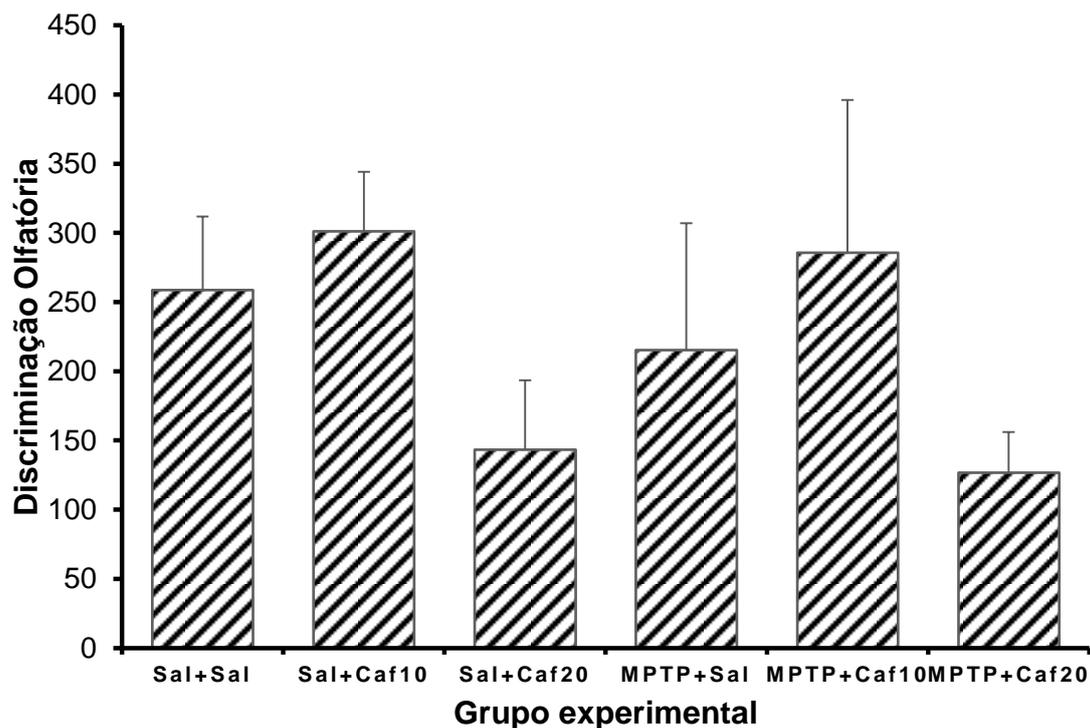


Figura 23 – Gráfico referente ao tempo de dispendido teste de DO, em cada grupo experimental. As colunas se referem à média e as barras ao erro padrão da média.

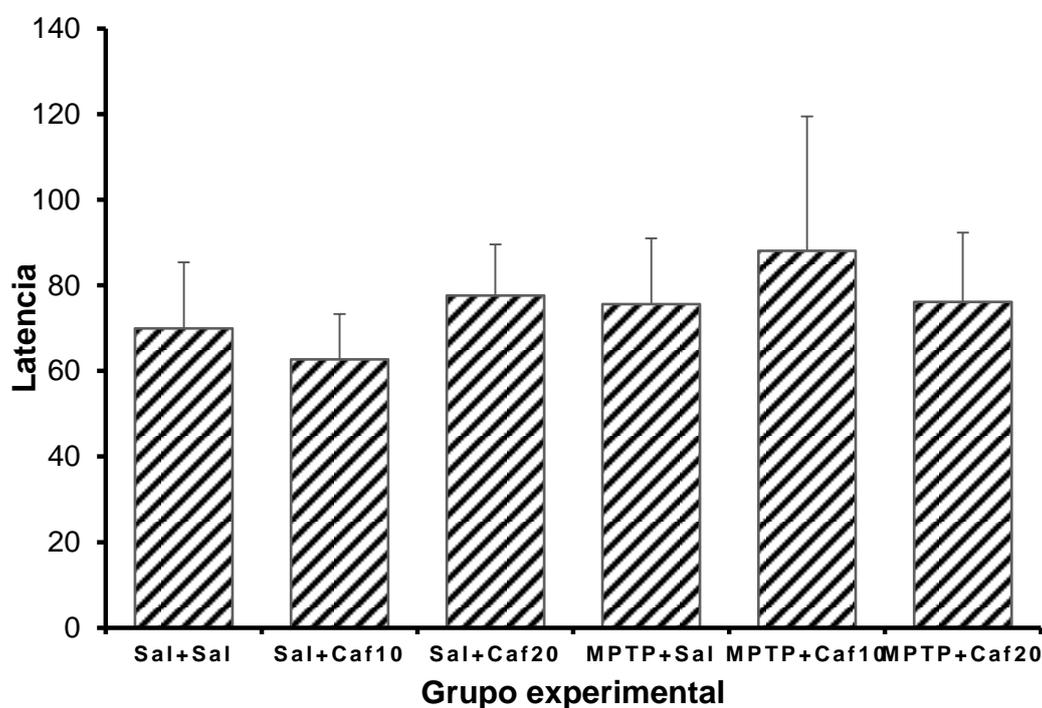


Figura 24 – Gráfico referente ao tempo de Latência, em cada grupo experimental, no TSC. As colunas se referem à média e as barras ao erro padrão da média.

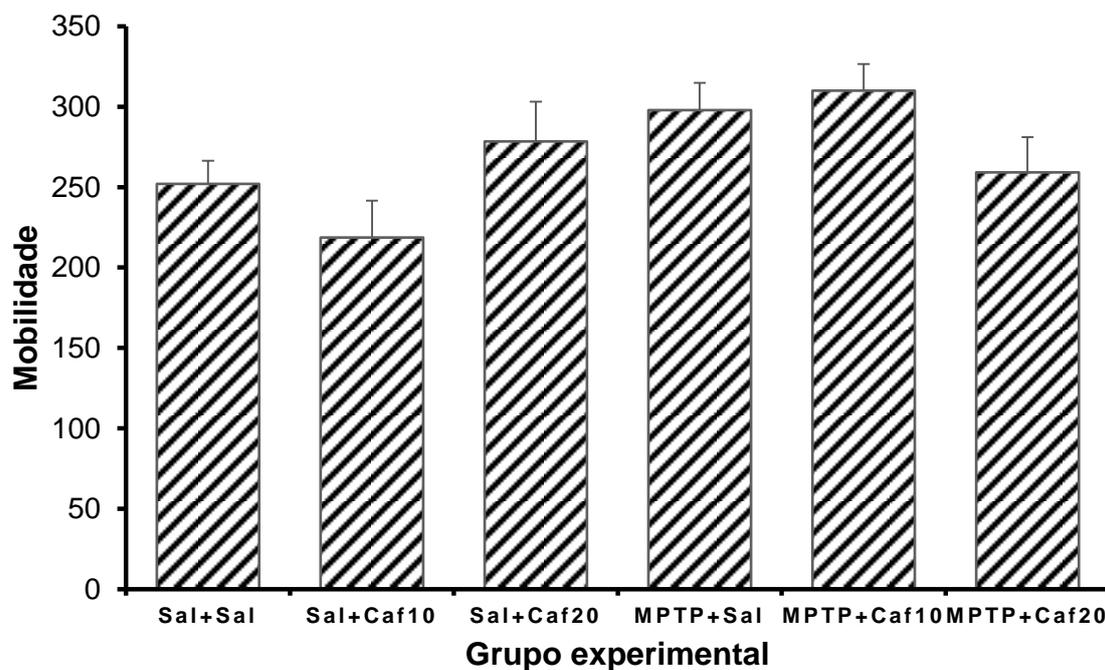


Figura 25 – Gráfico referente ao tempo de Mobilidade, em cada grupo experimental, no TSC. As colunas se referem à média e as barras ao erro padrão da média.

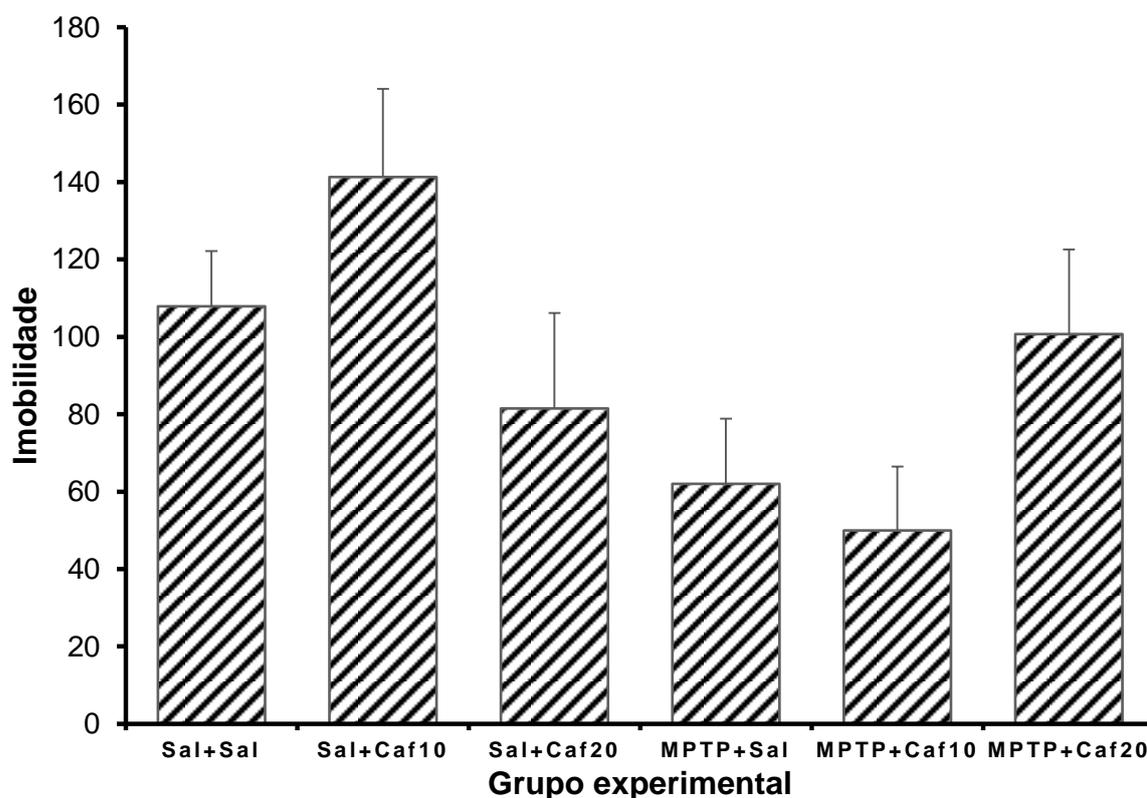


Figura 26 – Gráfico referente ao tempo de Imobilidade, em cada grupo experimental, no TSC. As colunas se referem à média e as barras ao erro padrão da média.

6. DISCUSSÃO

O MPTP é amplamente utilizado em camundongos pelo baixo custo e maior facilidade na manipulação do animal, assim como em primatas para se testar protocolos de tratamento de drogas antes do estudo em humanos, uma vez que mais se assemelham a DP humana e pesquisas já são realizadas com o uso do MPTP tanto para os sintomas motores como para os SNM (BLESA *et al.*, 2012; LE; SAYNA; JANKOVIC, 2014).

Por razões desconhecidas, os ratos são resistentes ao MPTP aplicada via sistêmica e as linhagens de camundongos variam amplamente na sua sensibilidade à toxina (BLESA *et al.*, 2012; BOVÉ *et al.*, 2005). Muitos fatores são conhecidos por influenciar a reprodutibilidade da lesão, incluindo linhagem dos camundongos (e até mesmo fornecedor), idade, sexo e peso (LE; SAYNA; JANKOVIC, 2014).

Em nossa pesquisa, foi utilizado um protocolo de administração considerado subagudo segundo estudo publicado por Duty e Jenner (2011) e todavia o índice de mortes pela exposição ao MPTP foi alto (53%) sem qualquer razão aparente.

Doses elevadas da toxina aplicadas de maneira aguda podem ser letais por resultar em neuro ou cardiotoxicidade periférica. O risco de mortalidade é dose-dependente e geralmente ocorre dentro de 24h após a aplicação da primeira dose de MPTP. As altas taxas de mortalidade (até 50%) vistas após administração de bólus agudo podem ser reduzidas para níveis aceitáveis (<20%) com reduções na dose administrada e pode ser quase completamente evitado com o uso de protocolos alternativos, nos quais a mesma dose ou ainda mais elevada é dada em doses fracionadas por maior período de tempo (DUTY; JENNER, 2011).

De acordo com nossos resultados sobre o teste do LCE, que se refere à ansiedade, nossos resultados não demonstraram diferença significativa entre o grupo controle e o grupo MPTP, apenas diferença intra grupo, como na variável tempo de permanência no centro do aparato, com diferença significativa ente o grupo MPTP+Caf 10mg/kg e o grupo MPTP+Caf 20mg/kg, e tempo de permanência nos braços fechados no qual o grupo Sal+Caf 20 mg/kg permaneceu tempo maior que o grupo Sal+Caf 10 mg/kg. Com base nestes

resultados não se pode afirmar que os animais tratados com MPTP apresentaram ansiedade e se houve melhora ou não com a administração de cafeína, pois a diferença se apresenta entre subgrupos grupos não equivalentes.

Vučković *et al.* (2008), utilizaram em seu estudo, camundongos C57BL/6, perfazendo 4 injeções via intraperitoneal de MPTP no mesmo dia, a cada duas horas, para avaliarem as alterações no comportamento e memória pelos danos causados nos núcleos da base. Foi observado que houve perda de 68% dos neurônios TH+ na SNc com o desenvolvimento de déficits na memória associativa e medo. No entanto, não houve sinais de ansiedade ou depressão.

Entretanto os estudos realizados por Wang *et al.* (2009), Sy *et al.* (2010) e Ho *et al.* (2011), nos quais utilizaram ratos da linhagem Wistar, com a infusão de MPTP (1µmol em 2 µmol de solução salina) na substância negra compacta, por estereotaxia, demonstraram ansiedade aumentada em ratos, avaliada como menor tempo de permanência nos braços abertos em comparação com os controles no teste do Labirinto em Cruz Elevada.

Em relação às variáveis analisadas no teste do CA, no que se refere à variável Bolos fecais, houve diferença entre os grupos Sal+Caf 10 mg e MPTP+Caf 20 mg e, na variável “Limpeza” houve diferença entre os grupos Sal+Sal, Sal+Caf 20 mg e MPTP+Sal, porém ambos os resultados não nos permitem afirmar que o grupo tratado ou o grupo controle apresentou maior nível de ansiedade que o outro.

Assim como nas variáveis que se relacionam à parte motora, apenas o item Erguimento (permanência nas patas traseiras) demonstrou diferença significativa entre o grupo controle e o grupo tratado com MPTP, o número de quadrantes percorridos, tanto centrais quanto periféricos, assim como o número total, apesar de apresentar diferença entre os grupos, não nos possibilita afirmar que os animais tratados com MPTP apresentaram prejuízo motor maior que o grupo controle.

Resultados similares foram encontrados no estudo de Ferro *et al.* (2005), no qual foram utilizados ratos Wistar, com infusão de MPTP intracerebral bilateral, em que os animais apresentaram poucas alterações motoras pelo

número reduzido de perda de células dopaminérgicas detectadas em seu ensaio, em relação aos ratos tratados com 6-OHDA.

Estes resultados diferem de dois estudos realizados pelo mesmo grupo de pesquisadores (PATIL *et al.* a e b, 2014). No primeiro, no qual foram utilizados camundongos albinos suíços adultos com peso entre 22-25g, que receberam injeções de MPTP na dose de 25 mg/kg + probenecida durante 5 dias consecutivos, uma vez ao dia, sendo observado um decréscimo significativo na atividade locomotora, no erguimento e na “limpeza”, aumento de tempo de imobilidade no campo aberto, além de se ter encontrado apenas 16% de células que contém tirosina hidroxilase (TH+) na substância negra compacta quando comparado ao grupo controle. No segundo estudo, seguindo o mesmo modelo animal houve resultados semelhantes quanto à parte motora com menor número de células TH+, apenas 7%.

No TSC, nas três variáveis analisadas (latência, tempo de mobilidade e imobilidade) não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, demonstrando que os animais não apresentaram comportamento depressivo com o modelo animal aqui utilizado.

Nossos achados estão de acordo com pesquisa realizada por Santiago *et al.* (2010) que analisaram o comportamento depressivo em diferentes modelos animais da DP e também não verificaram a presença do comportamento depressivo em ratos Wistar, nos quais foi infundido MPTP bilateral intracerebral.

Gorton *et al.* (2010), que mesmo utilizando metodologia diferente do nosso estudo, com uso de camundongos C57BL/6 com 4 injeções via intraperitoneal de MPTP no mesmo dia, a cada duas horas de intervalo, também não verificou qualquer comportamento depressivo com a utilização do TSC.

Em contrapartida os resultados de Mori *et al.* (2005) que se utilizaram do mesmo protocolo para realizar seu estudo sobre os mecanismos neurais subjacentes à disfunção motora detectados pelo TSC, demonstrou um tempo maior de imobilidade no teste que o grupo controle o que pode ser devido a um comportamento depressivo.

Os distúrbios olfatórios são um dos primeiros sintomas não motores observados na DP. A hiposmia pode ser multifacetada e não está restrita a

uma modalidade. Os pacientes com DP têm demonstrado deficiências na detecção, diferenciação e identificação de odor (TAYLOR; GREENE; MILLER, 2010).

A interação da dopamina (DA) nas camadas glomerular (receptor D2) e grânulo (receptor D1) do bulbo olfatório sugere um papel para a dopamina no processamento do odor. A depleção da dopamina no bulbo olfatório prejudica a discriminação olfatória em roedores e este efeito é replicado pelo tratamento com antagonista do receptor D2 (TILLERSON *et al.*, 2006)

Além disso, a alteração olfatória como biomarcador pré-motor da DP é de grande interesse, porque pode ser medida de forma rápida e objetiva. Em casos DP induzida por medicação, a piora da função olfativa tem sido associada com o surgimento e agravamento dos sintomas extrapiramidais (MORLEY *et al.*, 2014)

O teste de DO aqui utilizado foi baseado no teste utilizado por Cunha *et al.* (2012) e não foi encontrada aqui, diferença significativa entre os grupos analisados.

Os déficits olfatórios são ainda outros dos sintomas não motores difíceis de replicar com uso de MPTP em roedores (MCDOWELL; CHESSELET, 2010), e até mesmo em seres humanos.

Doty *et al.* (1992), em seu estudo no qual comparou indivíduos que desenvolveram a DP por exposição intravenosa ao MPTP com aqueles que apresentaram a doença naturalmente e também com indivíduos saudáveis, por meio de testes olfatórios, não encontrou diferenças significativas entre o grupo MPTP e o controle, sobre os distúrbios olfatórios.

O estudo realizado por Mitsumoto *et al.* (2005) que se utilizou de camundongos C57BL/6 para examinar os danos de células glomerulares dopaminérgicas do bulbo olfatório, com injeção de quatro doses de MPTP (20 mg/kg) com intervalo de 2h a cada aplicação, conclui que houve redução nos níveis de TH no bulbo olfatório, mas a proteína relacionada com o DAT foi indetectável. Este fato pode explicar a diferença de susceptibilidade ao MPTP do bulbo olfatório em relação ao estriado, já que a expressão da proteína DAT influencia indubitavelmente a ação tóxica do MPTP nos neurônios dopaminérgicos, uma vez que o metabólito tóxico MPP+ é absorvido por estas células via DAT.

Por outro lado Schintu *et al.* (2009) que induziram o a DP com uso MPTP crônico em conjunto com probenecida em camundongos observaram que os animais apresentaram características típicas da DP, incluindo o comprometimento das funções motoras e olfativas associadas à perda parcial dos neurônios TH+ na SNc.

Além da perda dopaminérgica, Dluzen (1992) propõe que o déficit olfativo na DP pode estar associado à redução da noraepinefrina no bulbo olfatório.

Em ensaios que se utilizaram da administração de MPTP via intranasal (PREDIGER *et al.*, 2006; PREDIGER *et al.*, 2010) houve o comprometimento da função olfatória com diminuição dos níveis da TH+ no bulbo olfatório, estriado e substância negra por meio de mecanismos apoptóticos, reduzindo a concentração de dopamina em diferentes estruturas cerebrais, tais como bulbo olfatório, estriado e córtex pré-frontal, mas não no hipocampo.

Assim, sugere-se que novos estudos, com a utilização desta espécie de roedor e com doses diferentes da mesma neurotoxina, sejam realizados para melhor compreensão deste modelo sobre os sintomas não motores da DP e o possível potencial terapêutico da cafeína sobre os mesmos.

7. CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos neste estudo conclui-se que:

- Os resultados foram inconclusivos sobre a capacidade do modelo animal aqui utilizado de reproduzir os sintomas não motores tais como ansiedade, depressão e distúrbio olfatório da DP.
- Não foi possível averiguar o potencial terapêutico da cafeína sobre os sintomas não motores da DP.

Sugere-se que estudos futuros sejam realizados para maiores elucidações sobre os SNM no modelo animal de MPTP da DP em camundongos e ação da cafeína sobre os mesmos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUÑA-LIZAMA M. M., BATA-GARCÍA J. L., ALVAREZ-CERVERA F. J., GÓNGORA-ALFARO J. L. Caffeine has greater potency and efficacy than theophylline to reverse the motor impairment caused by chronic but not acute interruption of striatal dopaminergic transmission in rats. **Neuropharmacology**. v. 70, p. 51-62. 2013.

ANTONINI A., BARONE P., MARCONI R., MORGANTE L., ZAPPULLA S., PONTIERI F. E., RAMAT S., CERAVOLO M. G., MECO G., CICARELLI G., PEDERZOLI M., MANFREDI M., CERAVOLO R., MUCCHIUT M., VOLPE G., ABBRUZZESE G., BOTTACCHI E., BARTOLOMEI L., CIACCI G., CANNAS A., RANDISI M. G., PETRONE A., BARATTI M., TONI V., COSSU G., DEL DOTTO P., BENTIVOGLIO A. R., ABRIGNANI M., SCALA R., PENNISI F., QUATRALE R., GAGLIO R. M., NICOLETTI A., PERINI M., AVARELLO T., PISANI A., SCAGLIONI A., MARTINELLI P. E., IEMOLO F., FERIGO L., SIMONE P., SOLIVERI P., TROIANIELLO B., CONSOLI D., MAURO A., LOPIANO L., NASTASI G., COLOSIMO C. The progression of non-motor symptoms in Parkinson's disease and their contribution to motor disability and quality of life. **J Neurol**. v. 259, n. 12, p. 2621-31. 2012.

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. **Pharmacol Ther**. v. 132, n. 3, p. 280-99. 2011.

BAGGA P., CHUGANI A. N., PATEL A. B. Neuroprotective effects of caffeine in MPTP model of Parkinson's disease: A (13)C NMR study. **Neurochem Int**. v.92, p. 25-34. Jan. 2016.

BICHLER Z., LIM H. C., ZENG L., TAN E. K. Non-Motor and Motor Features in LRRK2 Transgenic Mice. **PIOS One**. v. 8, n. 7, p. 1-11. July. 2013.

BLESA J., PHANI S., JACKSON-LEWIS V., PRZEDBORSKI S. Classic and new animal models of Parkinson's disease. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. v. 2012, p. 1-10. 2012.

BLUM R., LESCH K. P. Parkinson's disease, anxious depression and serotonin-zooming in on hippocampal neurogenesis. **J Neurochem**. v.135, n.3, p.441-4 Nov. 2015.

BONITO-OLIVA A., MASINI D., FISONE G. A mouse model of non-motor symptoms in Parkinson's disease: focus on pharmacological interventions targeting affective dysfunctions. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**. v. 8, art 290, p. 1-12. 2014.

BONITO-OLIVA A., PIGNATELLI M., SPIGOLON G., YOSHITAKE T., SEILER S., LONGO F., PICCININ S., KEHR J., MERCURI N. B., NISTICÒ R., FISONE G. Cognitive impairment and dentate gyrus synaptic dysfunction in experimental parkinsonism. **Biol Psychiatry**. v. 75, n. 9, p. 701-10. 2014.

BOSTANTJOPOULOU S., KATSAROU Z., KARAKASIS C., PEITSIDOU E., MILIONI D., ROSSOPOULOS N. Evaluation of non-motor symptoms in Parkinson's disease: an underestimated necessity. **Hippokratia**. v. 17, n. 3, p. 214-19. 2013.

BOVÉ J., PROU D., PERIER C., PRZEDBORSKI S. Toxin-induced models of Parkinson's Disease. **NeuroRx**. v. 2, n. 3, p. 484-94. July. 2005.

CAN A., DÃO D. T., TERRILLION C. E., PIANTADOSI S. C., BHAT S., GOULD T. D. The tail suspension test. **Jove**. v. 59, e3769, p. 1-5. 2012.

CANALS, M.; MARCELLINO, D.; FANELLI, F.; CIRUELA, F.; BENEDETTI, P.; GOLDBERG, S. R.; NEVE, K.; FUXE, K.; AGNATI, L. F.; WOODS, A. S.; FERRE´, S.; LLUIS, C.; BOUVIER, M.; FRANCO, R. Adenosine A2A-Dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. **The journal of biological chemistry**., v. 278, n. 47, 21, p. 46741-9, Nov. 2003.

CHO Y. T., FUDGE J. L. Heterogeneous dopamine populations project to specific subregions of the primate amygdala. **Neuroscience**. v. 165, n. 4, p. 1-34. Feb. 2010.

CUNHA C., HORT Y., SHINE J., DOYLE. K. L. Morphological and behavioral changes occur following the X-ray irradiation of the adult mouse olfactory neuroepithelium. **BMC Neuroscience**. v.13, n.134, p. 1-14. 2012.

CRYAN J. F., O'LEARY O. F., JIN S. H., FRIEDLAND J. C., OUYANG M., HIRSCH B. R., PAGE M. E., DALVI A., THOMAS S. A., LUCKI I. Norepinephrine-deficient mice lack responses to antidepressant drugs, including selective serotonin reuptake inhibitors. **PNAS**. v. 101, n. 21, p. 8186-91. 2004.

DLUZEN, D. E. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) reduces norepinephrine concentrations in the olfactory bulbs of male mice. **Brain Research**, v. 586. P. 144-47. 1992.

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. 1283-93. 2011.

DOTY R. L., SINGH A., TETRUD J., LANGSTON J. W. Lack of major olfactory dysfunction in mptp-induced parkinsonism. **Ann Neurol**. v.32, n. 1, p. 97-100. Jul. 1992.

DUTY S., JENNER P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. **British Journal of Pharmacology**. v.164, n. 4, p. 1357-91. 2011.

EL YACOUBI, M., LEDENT C., MÉNARD JF., PARMENTIER M., COSTENTIN J., VAUGEOIS JM. 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.

FERRO M. M., BELLISSIMO M. I., ANSELMO-FRANCI J. A., ANGELLUCCI M. E., CANTERAS N. S., DA CUNHA C. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations. **J Neurosci Methods**. v.148, n.1, p.78-87. Oct. 2005.

GAENSLER A., SWID I., LIEPELT-SCARFONE I., GODAU J., BERG D. The patients' perception of prodromal symptoms before the initial diagnosis of Parkinson's disease. **Mov Disord**. v. 26, n. 4, p. 653-8. Mar. 2011.

GORTON L. M., VUCKOVIC M. G., VERTELKINA N., PETZINGER G. M., JAKOWEC M. W., WOOD R. I. Exercise Effects on Motor and Affective Behavior and Catecholamine Neurochemistry in the MPTP-Lesioned Mouse. **Behav Brain Res**. v. 213, n. 2, p. 253-262. Dec. 2010.

HANDLEY, S. L., MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoreceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'- motivated behavior. **Naunyn – Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. n. 327, p. 1-5. 1984.

HAYASHI A., MATSUNAGA N., OKAZAKI H., KAKIMOTO K., KIMURA Y., AZUMA H., IKEDA E., SHIBAT., YAMATO M., YAMADA K., KOYANAGI S., OHDO S. A disruption mechanism of the molecular clock in a MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Neuromol Med**. v. 15, p. 238-251. 2013.

HO Y. J., HO S. C., PAWLAK C. R., YEH K. Y. Effects of d-cycloserine on MPTP-induced behavioral and neurological changes: potential for treatment of Parkinson's disease dementia. **Behavioural Brain Research**. v. 219, n. 2, p. 280-90. Jun. 2011.

ISHIWARI K., MADSON L. J., FARRAR A. M., MINGOTE S. M., VALENTA J. P., DIGIANVITTORIO M. D., FRANK L. E., CORREA M., HOCKEMEYER J., MÜLLER C., SALAMONE J. D. Injections of the selective adenosine A2A antagonist MSX-3 into the nucleus accumbens core attenuate the locomotor suppression induced by haloperidol in rats. **Behav Brain Res**. v. 178, n. 2, p. 190-9. 2007.

JACOB E. L., GATTO, N. M., THOMPSON A., BORDELON Y., RITZ B. Occurrence of Depression and Anxiety prior to Parkinson's Disease. **Parkinsonism Relat Desord**. v.16, n. 9, p. 576-81. Nov. 2010.

JACOBSON K. A. Introduction to Adenosine Receptors as Therapeutic Targets. **Handb Exp Pharmacol**. v. 193, p. 1-24. 2009.

JENNER P. A2A antagonists as novel non-dopaminergic therapy for motor dysfunction in PD. **Neurology**. v. 61, n. 11, suppl. 6, p. 32-8. 2003.

KOMADA M., TAKAO K., MIYAKAWA T. Elevated plus maze for mice. **Jove**. n. 22, p. 1-3. 2008.

LAGEMAN S. K., CASH T.V., MICKENS M.N. Patient-reported needs, non-motor symptoms, and quality of life in essential tremor and Parkinson's Disease. **Tremor and Other Hyperkinetic Movements**. v. 4, n. 240, p. 1-11. 2014.

LE W., SAYANA P., JANKOVIC J. Animal models of Parkinson's Disease: a gateway to therapeutics? **Neurotherapeutics**. v.11, p. 92–110, 2014.

LEES A. J., HARDY J., REVESZ T. Parkinson's disease. **Lancet**. v. 373, n. 9680, p. 2055-66. 2009.

LI X., REDUS L., CHEN C., MARTINEZ P. A., STRONG R., LI S., O'CONNOR J. C. Cognitive dysfunction precedes the onset of motor symptoms in the MitoPark mouse model of Parkinson's disease. **PLoS One**. v. 8, n. 8, p. 1-11. 2013.

LINDGREN H. S., DUNNETT S. B. Cognitive dysfunction and depression in Parkinson's disease: what can be learned from rodent models? **European Journal of Neuroscience**. v. 35, p. 1894-1907. 2012.

MCDOWELL K., CHESSELET M. F. Animal models of the non-motor features of Parkinson's disease. **Neurobiol Dis**. v. 46, n. 3, p. 597-606. June. 2012.

MITSUMOTO Y., MORI A., OHASHI S., NAKAI M., MORIIZUMI T. Differential effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the olfactory bulb and the striatum in mice. **Neurosci Res**. v. 51, n. 1, p. 111-5. Jan. 2005.

MORAGA-AMARO A. R., GONZALEZB H., PACHECOB R., STEHBERG J. Dopamine receptor D3 deficiency results in chronic depression and anxiety. **Behavioural Brain Research**. v. 274, p. 186-193. 2014.

MORI A., OHASHI S., NAKAI M., MORIIZUMI T., MITSUMOTO Y. Neural mechanisms underlying motor dysfunction as detected by the tail suspension test in MPTP-treated C57BL/6 mice. **Neurosci Res**. v. 51, n. 3, p. 265-74. Mar. 2005.

MORLEY J. F., PAWLOWSKI S. M., KESARI A., MAINA I., PANTELYAT A., DUDA J. E. Motor and non-motor features of Parkinson's disease that predict persistent drug-induced Parkinsonism. **Parkinsonism and Related Disorders**. v. 20, n. 7, p. 738-42. 2014.

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

MÜLLER T. Drug therapy in patients with Parkinson's disease. **Translational Neurodegeneration**. v. 1, n. 10, p. 1-12. 2012.

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. Fev. 2015.

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

OERTEL W.; SCHULZ J.B. Current and experimental treatments of Parkinson disease: A guide for neuroscientists. **J Neurochem.** v. 139, suppl 1, s:325-37. Oct, 2016.

PATIL S. P., JAIN P. D., SANCCHETI J. S., GHUMATKAR P.J., TAMBE R., SATHAYE S. Neuroprotective and neurotrophic effects of Apigenin and Luteolin in MPTP induced parkinsonism in mice. **Neuropharmacology**. v.86, p. 192-202, Nov. 2014.

PATIL S. P., JAIN P. D., SANCCHETI J. S., GHUMATKAR P.J., TAMBE R., SATHAYE S. Neuroprotective effect of metformin in mptp-induced parkinson's disease in mice. **Neuroscience**. v. 277, p.747–54. 2014.

PETROSKE E., MEREDITH G. E., CALLEN S., TOTTERDELL S., LAUY -S. Mouse model of parkinsonism: a comparison between subacute MPTP and chronic MPTP/probenecida treatment. **Neuroscience**. v. 106, n. 3, p. 589-601. 2001.

PFEIFFER R. F. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**. v. 22, suppl 1, s:119-22. Jan. 2016.

PREDIGER R. D., BATISTA L. C., MEDEIROS R., PANDOLFO P., FLORIO J. C., TAKAHASHI R. N. The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. **Exp Neurol**. V.202, n. 2, p. 391-403. Dec. 2006.

PLANKEN A., KURVITS L., REIMANN E., KADASTIK-EERME L., KINGO K, KÕKS S., TABA P. Looking beyond the brain to improve the pathogenic understanding of Parkinson's disease: implications of whole transcriptome profiling of Patients' skin. **BMC Neurology**. v. 17, n. 6, p. 1-11. 2017.

PREDIGER R.D. Effects of caffeine in Parkinson's disease: from neuroprotection to the management of motor and non-motor symptoms. **J Alzheimers Dis**. v.20, suppl 1, s: 205-20, 2010.

RANDALL P.A., NUNES E. J., JANNIERE S. L., STOPPER C. M., FARRAR A. M., SAGER T. N., BAQI Y., HOCKEMEYER J., MÜLLER C. E., SALAMONE J.D. Stimulant effects of adenosine antagonists on operant behavior: differential actions of selective A2A and A1 antagonists. **Psychopharmacology**. v. 216, n. 2, p. 173-86. 2011.

RIVERA-OLIVER M., DÍAZ-RÍOS M. Using caffeine and other adenosine receptor antagonists and agonists as therapeutic tools against neurodegenerative diseases: a review. **Life Sci.** v. 101, n. 0, p. 1-9. 2014.

SANTIAGO R. M., BARBIEIRO J., LIMA M. M., DOMBROWSKI P. A., ANDREATINI R., VITAL M. A. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** v. 34, n. 6, p. 1104-14. Aug. 2010.

SANTOS-GARCÍA D., DE LA FUENTE-FERNÁNDEZ R. Impact of non-motor symptoms on health-related and perceived quality of life in Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences.** v. 332, n. 1-2, p. 136-40. 2013.

SAUERBIER A., JENNER P., TODOROVA A., CHAUDHURI K. R. Non motor subtypes and Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders.** v. 22, suppl 1, s. 41-6. Jan. 2016.

SCHIFFMANN S. N., FISONE G., MORESCO R., CUNHA R. A., FERRÉ S. Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. **Prog Neurobiol.** v.83, n. 5, p. 277-92. 2007.

SCHINTU N., FRAU L., IBBA M., CABONI P., GARAU A., CARBONI E., CARTA A. R. PPAR-gamma-mediated neuroprotection in a chronic mouse model of Parkinson's disease. **Eur J Neurosci.** v. 29, n. 5, p. 954-63. Mar. 2009.

SCHWARZSCHILD M. A., XU K., OZTAS E., PETZER J. P., CASTAGNOLI K., CASTAGNOLI N. Jr., CHEN J. F. Neuroprotection by caffeine and more specific A2A receptor antagonists in animal models of Parkinson's disease. **Neurology,** v. 61, n. 11, suppl. 6, p. 55-61. 2003.

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

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.

SMITH Y., WICHMANN T., FACTOR S. A., DELONG M. R. Parkinson's disease therapeutics: new developments and challenges since the introduction of levodopa. **Neuropsychopharmacology.** v. 37, n. 1, p. 213-46. 2012.

SPRENGER F, POEWE W. Management of motor and non-motor symptoms in Parkinson's disease. **CNS Drugs.** v. 27, n. 4, p. 259-72. 2013.

STERÚ L., CHERMAT R., THIERRY B., SIMON P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology (Berl).** v.85, n.3, p.367-70, 1985.

SY H. N., WU S. L., WANG W. F., CHEN C. H., HUANG Y. T., LIOU Y. M., CHIOU C. S., PAWLAK C. R., HO Y. J. MPTP-induced dopaminergic degeneration and deficits in object recognition in rats are accompanied by neuroinflammation in the hippocampus. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 95, n. 2, p. 158-65. Apr. 2010.

TAYLOR T. N., GREENE J. G., MILLER G. W. Behavioral phenotyping of mouse models of Parkinson's Disease. **Behav Brain Res.** v. 211, n. 1, p. 1-10. July, 2010.

TILLERSON J. L., CAUDLE W. M., PARENT J. M., GONG C., SCHALLERT T., MILLER G. W. Olfactory discrimination deficits in mice lacking the dopamine transporter or the D2 dopamine receptor. **Behavioural Brain Research.** v.172, p. 970-105. 2006.

UBEDA-BAÑÓN I., SAIZ-SANCHEZ D., ROSA-PRIETO C., MARTINEZ-MARCOS A. α -Synuclein in the olfactory system in Parkinson's disease: role of neural connections on spreading pathology. **Brain Struct Funct.** v. 219, p. 1513-26. 2014.

VUČKOVIĆ M. G., WOOD R. I., HOLSCHNEIDER D. P., ABERNATHY A., TOGASAKI D. M., SMITH A., PETZINGER G. M., JAKOWEC M. W. Memory, mood, dopamine, and serotonin in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse model of basal ganglia injury. **Neurobiol Dis.** v. 32, n. 2, p. 319-27. Nov. 2008.

WALF A. A., FRYE C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nat Protoc.** v. 2, n. 2, p. 322–328. 2007.

WALSH R., CUMMINS R. A. The open-field test: A critical review. **Psychol Bull.** 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. Dec. 2009.

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, June 1967.

XU K., XU Y. H., CHEN J. F., SCHWARZSCHILD M. A. Neuroprotection by caffeine: time course and role of its metabolites in the MPTP model of Parkinson's disease. **Neuroscience.** v. 167, n. 2, p. 475-81. 2010.

XU K., DI LUCA D. G., ORRÚ M., XU Y., CHEN J.-F., SCHWARZSCHILD M. A. Neuroprotection by caffeine in the MPTP model of Parkinson's disease and its dependence on adenosine A2A receptors. **Neuroscience.** v. 322, p. 129-37. May. 2016.

ZENGIN-TOKTAS Y., FERRIER J., DURIF F., LLORCA P. M., AUTHIER N. Bilateral lesions of the nigrostriatal pathways are associated with chronic mechanical pain hypersensitivity in rats. **Neuroscience Research**. v. 76, n. 4, p. 261-264. 2013.

ZHU X. R., MASKRI L., HEROLD C., BADER V., STICHEL C. C., GÜNTÜRKÜN O., LÜBBERT H. Non-motor behavioural impairments in parkin-deficient mice. **European Journal of Neuroscience**. v. 26, n. 7, p. 1902-1911. 2007.

ZURKOVSKY L., BYCHKOV E., TSAKEM E. L., SIEDLECKI C., BLAKELY R. D., GUREVICH E. V. Cognitive effects of dopamine depletion in the context of diminished acetylcholine signaling capacity in mice. **Disease Models & Mechanisms**. v. 6, p. 171-183. 2013.

ANEXO A – Protocolo de aprovação do CEUA



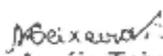
Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFMS



C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto intitulado "Efeito de dois antagonistas de receptores de adenosina, aplicados via intraperitoneal, nas alterações do comportamento não motor em camundongos com lesão bilateral de vias dopaminérgicas induzidas pela toxina 6-OHDA", Protocolo nº 670/2015 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, 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, em reunião ordinária do dia 26 de maio de 2015.

Vigência do Projeto	13/05/2015 a 30/12/2016
Espécie/Linhagem ou Raça	<i>Mus musculus</i> / Swiss
Números de Animais	96
Peso/Idade	20-30g/ Adulto
Sexo	Macho
Origem (fornecedor)	Biotério Central/CCBS/UFMS


Maria Araújo Teixeira

Coordenadora da CEUA/UFMS
Campo Grande, 27 de maio de 2015.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua.2000@gmail.com
fone (67) 3345-7186

