

VIVIANI APARECIDA PACHECO

EFEITOS DA INIBIÇÃO DA ÓXIDO NÍTRICO
SINTASE NO PARKINSONISMO INDUZIDO POR
MPTP EM RATOS

Dissertação apresentada como
requisito parcial para a obtenção do
grau de Mestre em Farmacologia,
Curso de Pós-Graduação em
Farmacologia, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria
Aparecida B. F. Vital

CURITIBA

2006

AGRADECIMENTOS

Ao Sérgio e ao Matheus, pelo apoio e pela paciência nos momentos de ausência.

À Professora Dra. Maria Aparecida B. F. Vital, pela sua orientação, compreensão e amizade.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, por terem compartilhado seus conhecimentos e contribuído para a minha formação em Farmacologia.

A todos os meus colegas do curso, pela amizade e companheirismo, em especial à Meigy T. Tadayeski, pela amizade e ajuda nos meus experimentos.

Aos servidores técnico-administrativos do Departamento, principalmente à Farmacêutica Silvia, pelo auxílio nas minhas atividades e pelo apoio incondicional.

Aos funcionários do Biotério Central da UFPR, em especial ao Luis que sempre esteve pronto para ajudar no que fosse preciso.

E, finalmente, a todos que, de uma maneira ou de outra, contribuíram e incentivaram a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 CARACTERÍSTICAS FISIOPATOLÓGICAS DA DOENÇA DE PARKINSON.....	1
1.2 ETIOLOGIA.....	2
1.2.1 ESTRESSE OXIDATIVO.....	3
1.2.2 FATORES GENÉTICOS X FATORES AMBIENTAIS.....	4
1.2.3 INFLUÊNCIA DO ÓXIDO NÍTRICO.....	5
1.3 MODELOS ANIMAIS.....	10
1.3.1 MODELO DO MPTP.....	10
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1 ANIMAIS.....	14
3.2 DROGAS.....	14
3.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.....	14
3.4 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL.....	16
3.4.1 CAMPO ABERTO.....	16
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	16
4 RESULTADOS.....	17
4.1 EXPERIMENTO 1: Efeitos do 7-NI em ratos lesados com MPTP.....	17

4.2 EXPERIMENTO 2: Efeitos do L-NAME em ratos lesados com MPTP.....	27
4.3 EXPERIMENTO 3: Efeitos do L-NAME intranigral em ratos lesados com MPTP.....	37
4.4 EXPERIMENTO 4: Efeitos da Aminoguanidina em ratos lesados com MPTP.....	48
5 DISCUSSÃO.....	58
6 CONCLUSÕES.....	66
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

7-NI – 7-nitroindazol
AG - Aminoguanidina
ATP – Adenosina trifosfato
cNOS – Óxido nítrico sintase constitutiva
COMT – Catecol-O-metiltransferase
CONT – Controle
COX-2 – Ciclooxigenase-2
DNA – Ácido desoxi-ribonucléico
DOPAC – Ácido 3,4-diidroxifenilacético
DP – Doença de Parkinson
eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
HVA – Ácido homovanílico
iNOS – Óxido nítrico sintase induzida
i.p. - Intraperitoneal
L-DOPA – Levodopa
L-NAME – N-nitro-L-arginina-metil-éster
L-NOARG – N-nitro-L-arginina
LPS – Lipopolissacarídeo
LTP – Potencial de longa duração
MAO-B – Monoamina-oxidase-B
MPDP⁺ - 1-metil-4-fenil-2,3-diidropiridina
MPP⁺ - N-metil-4-fenilpiperidínio
MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NF-κB – Fator de transcrição nuclear κB
NMDA – N-metil-D-aspartato
NO – Óxido nítrico
NOS – Óxido nítrico sintase
nNOS – Óxido nítrico sintase neuronal

ONOO⁻ - Peroxinitrito

O₂⁻ - Superóxido

OH[·] – Radical hidroxil

RNA – Ácido ribonucléico

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SNc – Substância negra parte compacta

SNC – Sistema nervoso central

SOD – Superóxido dismutase

UCHL1 – Ubiquitina carboxi-terminal hidrolase L1

VE - Veículo

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é um distúrbio neurodegenerativo progressivo que afeta cerca de 1% da população com idade maior que 65 anos. A doença se manifesta por sintomas motores característicos sendo que outros sintomas não motores podem aparecer. A inibição da óxido nítrico sintase (NOS) como possível ferramenta para interromper o processo degenerativo vem sendo bastante estudada. Assim, neste trabalho buscou-se investigar os efeitos da inibição da NOS sobre os sintomas motores produzidos pelo MPTP em ratos.

Foram utilizados ratos Wistar machos os quais foram divididos em 3 grupos: controle, SHAM e MPTP. Os animais do grupo MPTP receberam infusão bilateral de MPTP na substância negra parte compacta (SNc) e verificou-se que estes animais apresentaram uma diminuição na atividade geral no campo aberto. Os animais do grupo SHAM sofreram a cirurgia, mas não receberam o MPTP e os animais do grupo controle, não foram submetidos à cirurgia estereotáxica.

No primeiro experimento os animais receberam 7-nitroindazol (7-NI, inibidor da NOS neuronal) na dose de 25 mg/kg, ou veículo, i.p., 1 hora antes da lesão com MPTP. Os resultados mostram que o 7-NI foi capaz de prevenir as alterações motoras causadas pelo MPTP.

Em um segundo experimento, os animais receberam L-NAME (inibidor não seletivo da NOS) na dose de 25mg/kg, ou veículo, i.p., 1 hora antes da infusão do MPTP. O L-NAME não preveniu a toxicidade do MPTP.

No experimento 3, os animais receberam L-NAME diretamente na substância negra parte compacta nas doses de 3 e 30µg 15 minutos antes da lesão com MPTP. O L-NAME, na dose de 3µg foi capaz de prevenir da toxicidade do MPTP, o que não aconteceu com a dose de 30µg.

No quarto experimento, os animais receberam aminoguanidina (inibidor não seletivo da NOS) na dose de 25mg/kg 1 hora antes da infusão do MPTP. A aminoguanidina não foi capaz de atenuar a neurotoxicidade mediada pelo MPTP.

Portanto, nossos resultados sugerem que o MPTP pode ser usado como um bom modelo animal de parkinsonismo e que os inibidores da NOS devem ser considerados (principalmente os inibidores da NOS neuronal) em estudos futuros como uma ferramenta em potencial para interromper ou atenuar a progressão do processo neurodegenerativo subjacente à DP.

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Parkinson (DP) é um distúrbio progressivo do movimento que foi primeiramente descrita por James Parkinson, em 1817, como “paralisia agitante” (GERLACH e RIEDERER, 1996).

A doença se manifesta por uma tríade de sintomas que incluem bradicinesia, rigidez muscular e tremor em repouso, os quais não se apresentam sempre com a mesma intensidade. Em alguns casos, predomina o tremor, já em outros, a bradicinesia e a rigidez podem se mostrar de forma mais marcante. Além disso, podem aparecer outros sintomas como comprometimento do equilíbrio postural, depressão, lentidão de resposta a estímulos, demência, e ainda, distúrbios autonômicos como aumento da salivação e constipação (GERLACH e RIEDERER, 1996; PARK *et al.*, 2004). Os sintomas cardinais aparecem à medida que a doença progride, podendo iniciar unilateralmente, tornando-se bilaterais com o avanço da patologia (EBERHARDT e SCHULZ, 2003).

Entre as doenças neurodegenerativas, a DP perde, em prevalência, apenas para a Doença de Alzheimer; cerca de 1% da população com idade maior que 65 anos é afetada (EBERHARDT e SCHULZ, 2003).

1.1 CARACTERÍSTICAS FISIOPATOLÓGICAS DA DOENÇA DE PARKINSON

A maioria dos sintomas da DP está relacionada à perda de neurônios dopaminérgicos da substância negra parte compacta (SNc) (perda de mais ou menos 5% de células por ano com o avanço da doença) (BLUM *et al.*, 2001; SPECIALE, 2002) os quais se projetam para o estriado (núcleo caudado e putâmen) (SPECIALE, 2002). Em consequência disto há uma redução nos níveis de dopamina do estriado (PAUL *et al.*, 2004; SIDHU *et al.*, 2004) onde há um gradiente de decréscimo na concentração deste neurotransmissor do caudado para o putâmen (CALNE, 2001).

Os sintomas da doença só aparecem quando mais de 70% do conteúdo original de dopamina foi reduzido (ALMEIJEIRAS *et al.*, 2003). Isto acontece porque, em uma fase inicial do processo de degeneração neuronal, ocorre um fenômeno compensatório estriatal, em que há um aumento na atividade neuronal (os neurônios remanescentes passam a produzir e liberar mais dopamina) ou uma supersensibilidade dos receptores dopaminérgicos (BLUM *et al.*, 2001). Esta queda nos níveis de dopamina se relaciona com a degeneração tanto de neurônios dopaminérgicos da substância negra quanto de terminações nervosas do estriado (LANG e OBESO, 2004).

Outras lesões, como a degeneração da área tegmental ventral dopaminérgica, do *locus coeruleus* noradrenérgico e da via colinérgica ascendente do núcleo basal de Meynert também são afetadas, e podem estar relacionadas a alterações cognitivas e psicológicas, assim como a demência que acredita-se ocorrer em cerca de 30% dos casos de DP (BLUM *et al.*, 2001).

Uma outra característica da doença é o aparecimento dos corpos de Lewy nas regiões afetadas do cérebro (EBERHARDT e SCHULZ, 2003). Os corpos de Lewy são inclusões citoplasmáticas eosinofílicas que, ultraestruturalmente, são compostos de agregados fibrilares com α -sinucleína e ubiquitina como principais proteínas constituintes (SHIMOHAMA *et al.*, 2003; EBERHARDT e SCHULZ, 2003). A presença dos corpos de Lewy não está restrita ao sistema nervoso central, mas também são observados no sistema nervoso periférico de pacientes parkinsonianos (BLUM *et al.*, 2001).

1.2 ETIOLOGIA

O parkinsonismo idiopático, ou a DP propriamente dita, não tem uma etiologia definida, porém, alguns fatores, como o estresse oxidativo e fatores genéticos, podem contribuir para o desenvolvimento da doença.

1.2.1 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo desempenha um papel importante na morte celular da substância negra na DP (OBATA, 2002).

Os radicais livres são moléculas altamente reativas que podem atacar moléculas-chave, incluindo enzimas, lipídeos de membrana e DNA causando prejuízo morfofuncional à célula (GERLACH e RIEDERER, 1996).

Em determinadas circunstâncias, a fosforilação oxidativa mitocondrial pode gerar produtos colaterais como radicais livres de oxigênio, hidroxila e o peróxido de hidrogênio. Além disso, essas moléculas podem ser produzidas como subprodutos de outras vias bioquímicas. Todavia, o organismo possui mecanismos de defesa na forma de enzimas, como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase, bem como antioxidantes, como o ácido ascórbico, a glutatona e o α -tocoferol. Os efeitos do estresse oxidativo para a célula ocorrem quando há uma descompensação entre a formação de agentes oxidantes celulares e os processos antioxidantes (GERLACH e RIEDERER, 1996).

A vulnerabilidade dos neurônios dopaminérgicos pode ser devida ao fato do metabolismo normal da dopamina contribuir para a formação de radicais livres citotóxicos na presença de íons de metais de transição como o ferro, o cobre e o manganês, e isso ocorre no processo de desaminação da dopamina pela monoamina-oxidase-B (MAO-B) ou pela autoxidação da dopamina (GIASSON *et al.*, 2002). Sob condições fisiológicas, a dopamina é oxidada não-enzimaticamente pelo oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e quinonas. As quinonas sofrem uma ciclização intramolecular que é imediatamente seguida por uma cascata de reações oxidativas resultando na formação de um pigmento polimérico e negro conhecido como neuromelanina. Além disso, a dopamina é também desaminada enzimaticamente pela MAO-B para formar peróxido de hidrogênio e 3,4-desidroxifenilacetaldeído. Este último composto é, então, oxidado pela aldeído desidrogenase para formar o ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC), o qual, subseqüentemente, é metilado pela catecol-O-metiltransferase (COMT) para formar o ácido homovanílico (HVA). Desta forma, tanto a autoxidação da

dopamina quanto seu metabolismo mediado pela MAO-B envolvem a formação de H_2O_2 , um composto que pode ser facilmente reduzido na presença do íon Fe^{2+} para formar o radical hidroxil, que é uma espécie reativa prejudicial para as células vivas (ALMEIJEIRAS *et al.*, 2003). Lesões neuronais podem levar à liberação de ferro que, na presença de neuromelanina nos neurônios dopaminérgicos e sua habilidade relatada em acumular ferro, serão responsáveis pelo aumento da formação de radicais livres (ALMEIJEIRAS *et al.*, 2003; GIASSON *et al.*, 2002).

Considerando que a perda dos neurônios dopaminérgicos leva ao aumento na biossíntese e recaptção de dopamina pelos neurônios remanescentes, parece que a autoxidação e o metabolismo da dopamina excessivos subsequentes nestas células aumenta o estresse oxidativo, o que contribui para a perda progressiva dos neurônios dopaminérgicos que é observada com o envelhecimento normal e na DP (ALMEIJEIRAS *et al.*, 2003). O estresse oxidativo pode ser evidenciado pela presença aumentada de alguns indicativos, como, por exemplo, os produtos da peroxidação lipídica e oxidação do DNA mitocondrial e RNA citoplasmático, nos neurônios dopaminérgicos no cérebro de pacientes com DP (GIASSON *et al.*, 2002).

1.2.2 FATORES GENÉTICOS X FATORES AMBIENTAIS

A contribuição de fatores genéticos para o desenvolvimento da doença está intimamente ligada a fatores ambientais. Cerca de 15% dos pacientes com DP apresentam um histórico familiar (CALNE, 2001) e têm sido identificadas mutações de genes que codificam para as seguintes proteínas: α -sinucleína, ubiquitina carboxi-terminal hidrolase L1 (UCHL1), parkina (SHASTRY, 2001), DJ-1 e NR4A2, e os loci cromossômicos 1p32, 1p35, 1p36, 2p13, 4p14-16.3 e 12p11.2-q13.1 têm sido identificados (LE e APPEL, 2004; SHASTRY, 2001). A partir da triagem completa do genoma de um grande número de pacientes com DP familiar, no mínimo 17 regiões cromossômicas distintas (1p, 5q, 6q, 8p, 9q, 10q e várias regiões não específicas nos cromossomos 2, 4, 5, 6, 7, 9, 13, 14, 20, 21 e

X) ligadas à DP têm sido relatadas. Acredita-se que com o avanço das investigações genéticas aparecerão mais genes associados à DP (LE e APPEL, 2004).

É provável que nem todos os casos “familiares” sejam totalmente genéticos, mas podem estar relacionados à exposição aos mesmos fatores de risco ambientais (CALNE, 2001) como, por exemplo, exposição a pesticidas. Esta sugestão foi reproduzida em ratos pela administração intravenosa de rotenona (amplamente utilizado como inseticida). Estes animais mostraram o aparecimento de estruturas contendo α -sinucleína semelhantes aos corpos de Lewy encontrados em humanos e deterioração dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais (SHASTRY, 2001). Assim, pode-se considerar que os fatores genéticos podem representar a susceptibilidade de um indivíduo em desenvolver a doença, e que os fatores ambientais poderiam desencadear o processo neurodegenerativo. Contudo, acredita-se que para uma pessoa apresentar a doença é necessário que haja uma contribuição de fatores genéticos associados a fatores de risco ambientais (CALNE, 2001).

1.2.3 INFLUÊNCIA DO ÓXIDO NÍTRICO

A influência do óxido nítrico (NO) bem como da óxido nítrico sintase (NOS) na DP tem sido amplamente investigada. O NO vem sendo associado a uma variedade de processos fisiológicos no corpo humano desde que foi identificado como uma molécula sinalizadora (ZHANG *et al*, 2006). O NO é uma molécula lipossolúvel (GOMES e BEL, 2003), gasosa e com um tempo de meia-vida de poucos segundos (SAGIN *et al.*, 2004) que é produzida a partir do aminoácido L-arginina através da NOS (ZHANG *et al*, 2006). Esta molécula foi identificada nos anos 80 como um fator de relaxamento derivado do endotélio no sistema cardiovascular (ZHANG *et al*, 2006). Existem duas formas constitutivas da enzima e uma outra forma induzida. A atividade da NOS constitutiva (cNOS) é expressa em níveis basais, e esta apresenta-se em duas

isoformas distintas considerando sua localização e efeito: a neuronal (nNOS) e a endotelial (eNOS). A nNOS está presente no citosol de neurônios e, de forma semelhante à eNOS, é dependente de cálcio, ou seja, requer a interação com o complexo cálcio-calmodulina para produzir NO. A produção do NO ocorre, basicamente, da seguinte forma: quando o potencial de ação chega ao botão sináptico, a onda de despolarização promove a abertura de canais de cálcio voltagem-dependente na membrana permitindo o influxo de cálcio, assim o complexo cálcio-calmodulina, agora formado, interage com a NOS facilitando a produção de NO sob ação da enzima (DUNCAN e HEALES, 2005).

O NO produzido pela eNOS atua no cérebro como um vasodilatador para o controle da circulação sanguínea e acredita-se que é capaz de preservar o fluxo sanguíneo em casos de isquemia cerebral. O NO sintetizado através da eNOS que atua na guanilato-ciclase solúvel no músculo liso representa um dos vários fatores endógenos responsáveis pela regulação do fluxo sanguíneo cerebral (DUNCAN e HEALES, 2005).

A NOS induzida (iNOS) foi primeiro identificada em macrófagos e seus efeitos se apresentam em locais com inflamação crônica (SAGIN *et al.*, 2004). O controle da expressão da iNOS ocorre principalmente em nível de transcrição, freqüentemente devido à ação sinérgica de dois mediadores. Embora o mecanismo de indução ainda não esteja completamente esclarecido, o fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) está relacionado com a indução da NOS por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). O cérebro expressa as três isoformas da enzima NOS, e embora cada isoforma possa desempenhar um discreto papel fisiológico, o NO gerado pode atuar tanto em processos fisiológicos como patológicos (DUNCAN e HEALES, 2005).

O NO é uma importante molécula reguladora que, em condições fisiológicas normais, é produzido endogenamente por várias células (WEI *et al.*, 2003) (assim como neurônios, células endoteliais e macrófagos) (PRAST e PHILIPPU, 2001) e atua em diversos processos, como neurotransmissão, plasticidade sináptica e memória (WEI *et al.*, 2003). Embora o NO não preencha todos os critérios da

definição clássica de neurotransmissor, esta molécula possui muitas propriedades de um neurotransmissor.

Há muitas evidências da influência do NO no aprendizado e memória, comportamento e sua ação como um co-transmissor (DUNCAN e HEALES, 2005). O papel do NO como neurotransmissor no hipocampo parece ser importante para a formação da memória pela sua influência na manutenção do potencial de longa duração (LTP) (DUNCAN e HEALES, 2005).

O NO é um dos principais mensageiros inter/intracelular dentro e entre os neurônios do sistema nervoso periférico e o central. (DUNCAN e HEALES, 2005). No sistema nervoso, o NO influencia a liberação de neurotransmissores e processos sinápticos (CONTESTABILE, 2000), e parece estar envolvido, como um mediador intracelular, na morte celular induzida por neurotoxinas (DAWSON *et al*, 1991). Diversos modelos neurotóxicos mostram que o NO induz a morte de culturas de neurônios dopaminérgicos e que este processo de morte celular envolve o aumento do estresse oxidativo (DEHMER *et al*, 2000; MATTHEWS *et al*, 1997; VAN MUISWINKEL *et al*, 1998). Em modelos de excitotoxicidade, tem sido proposto que ativação excessiva dos receptores NMDA é um dos mecanismos da morte celular mediada pelo NO (CONTESTABILE, 2000).

O exato mecanismo pelo qual o NO contribui para determinadas doenças neurodegenerativas não está completamente entendido. Há evidências de que esta molécula, está associada com o processo de excitotoxicidade, danos ao DNA e modificações de proteínas, os quais podem promover mecanismos patogênicos envolvidos em processos neurodegenerativos (ZHANG *et al*, 2006).

Os danos aos ácidos nucléicos ocorrem pela exposição a espécies reativas de nitrogênio e espécies reativas de oxigênio. As espécies reativas do oxigênio (ROS) como o peroxinitrito (ONOO^-), superóxido (O_2^-) e OH^\cdot provocam a quebra de fitas simples e duplas do DNA (AMES, 1989).

Em condições fisiopatológicas, o aumento nas concentrações de NO pode causar lesão celular, já que pode promover a formação de radicais livres favorecendo os danos do estresse oxidativo (WEI *et al.*, 2003). Além disso, a produção excessiva de NO pode contribuir para um processo denominado

excitotoxicidade glutamatérgica que é descrita como uma condição resultante da liberação excessiva de glutamato e a conseqüente entrada de cálcio no terminal pós-sináptico e ativação da NOS cálcio-dependente. A excitotoxicidade parece ser responsável por grande parte do dano cerebral que ocorre em várias doenças neurodegenerativas (DUNCAN e HEALES, 2005).

O NO não é a única molécula de interesse quando considerado o estresse oxidativo. As espécies reativas de nitrogênio e em particular, a produção de ONOO⁻ representa um dos principais causadores do estresse oxidativo e também está implicada na patogênese de muitas doenças neurodegenerativas (LIPTON *et al*, 1993; DAWSON e DAWSON, 1996). A susceptibilidade particular do cérebro pode ser devida à alta demanda de oxigênio deste órgão (DRINGEN, 2000).

A nNOS é encontrada em várias regiões do cérebro, principalmente nos gânglios da base. Embora a função do NO nesta região permaneça desconhecida, mostrou-se que o NO aumenta a liberação de dopamina no estriado, o que sugere que o NO possa ter um papel no controle do comportamento motor (GOMES e BEL, 2003). Já é conhecida a presença de células positivas para a NOS no estriado (VINCENT e KIMURA, 1992) e o antagonismo da formação de NO provocou uma diminuição da síntese de dopamina nesta estrutura (SANDOR *et al*, 1995). Entretanto, dados contrários mostram que os inibidores da NOS podem aumentar o conteúdo de dopamina no estriado de ratos (DESVIGNES *et al*, 1999). Estes resultados, embora conflitantes, consideram evidente o papel do NO na modulação da transmissão dopaminérgica (ARAKI *et al*, 2001).

Durante a progressão da DP, ocorre um aumento na produção de NO como resultado do processo inflamatório. Verificou-se que este aumento nas concentrações de NO, sintetizado pela iNOS, pode desempenhar um importante papel na destruição dos neurônios dopaminérgicos, já que observou-se que camundongos mutantes que não apresentam a iNOS foram mais resistentes à lesão dopaminérgica induzida pelo 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (ANTUNES *et al.*, 2002).

De acordo com o que foi relatado, o NO pode desempenhar tanto um papel neurotóxico como neuroprotetor (GOMES e BEL, 2003).

A possível atuação de inibidores da NOS como neuroprotetores tem sido amplamente investigada. Vários estudos relatam a capacidade do 7-nitroindazol (7-NI) (ROYLAND *et al.*, 1999), um inibidor da NOS relativamente seletivo para a nNOS (GOMES e BEL, 2003), de impedir os danos nigroestriatais causados por MPTP. Além disso, Przedborski *et al.* (1996), demonstraram que camundongos deficientes na nNOS são resistentes à neurotoxicidade mediada por esta neurotoxina. Um tratamento prolongado consistindo de administrações repetidas de 7-NI antes, e 3-4 dias após a exposição ao MPTP protegeu contra a depleção de dopamina estriatal e a perda de células da substância negra, em camundongos. O 7-NI tem rápido acesso ao cérebro, onde seu mecanismo de ação tem sido relacionado à inibição da nNOS e da atividade da MAO-B, de forma reversível. A inibição da produção de NO poderia prevenir os danos mitocondriais causados pelo próprio NO e/ou seus derivados; e o bloqueio do metabolismo do MPTP dependente da MAO-B poderia impedir a produção de N-metil-4-fenilpiperidínio (MPP⁺) e, com isso, prevenir os danos à fosforilação oxidativa mitocondrial (ROYLAND *et al.*, 1999).

Além do 7-NI, outros inibidores da NOS têm sido investigados, como o N-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) e o N-nitro-L-arginina (L-NOARG). O L-NOARG e o L-NAME foram os primeiros inibidores da NOS; são derivados da L-arginina e inibem tanto a nNOS como a eNOS; esta última ação resulta em vasoconstrição e hipertensão, o que não ocorre com o 7-NI, pois este não inibe a eNOS (POKK e VÄLI, 2002).

Diferentes autores têm obtido resultados variáveis no que se refere às doses de inibidores da NOS necessárias para produzir um mesmo grau de inibição da enzima no cérebro. De acordo com a literatura, as doses de 7-NI e L-NAME necessárias para diminuir entre 80-90% a atividade da NOS, são de 20 a 100 mg/Kg e de 10 a 100 mg/Kg, respectivamente. Já com o L-NOARG, verificou-se que para a diminuição de 70-80% na atividade da NOS, são necessárias doses de 10 a 50 mg/Kg (POKK e VÄLI, 2002).

Apesar de todas as investigações realizadas, o papel do NO e da NOS na DP, bem como a ação neuroprotetora dos inibidores da NOS ainda não estão bem esclarecidos.

1.3 MODELOS ANIMAIS

Por causa da direta aplicabilidade em humanos, o modelo de DP ideal deveria apresentar as seguintes características: (1) déficits motores facilmente detectáveis; (2) perda de neurônios dopaminérgicos seletiva e gradual, desenvolvendo-se com a idade; e (3) produção de inclusões citoplasmáticas assim como os corpos de Lewy (SHIMOHAMA *et al.*, 2003). Entretanto, estas características não são freqüentemente encontradas nos modelos de DP que utilizam roedores. Mesmo assim, os modelos animais de DP são de grande auxílio na compreensão dos mecanismos patogénéticos e dos princípios terapêuticos para minimizar os sintomas da doença.

1.3.1 MODELO DO MPTP

Entre 1979 e 1982 observou-se que jovens dependentes de drogas, na Califórnia, que haviam utilizado uma nova “heroína sintética”, desenvolveram uma séria e irreversível síndrome parkinsoniana. Estes pacientes exibiram quase todos os sintomas típicos da DP e responderam bem ao tratamento com L-DOPA e agonistas dos receptores de dopamina. A análise da “heroína sintética” mostrou que ela continha não apenas o princípio ativo 1-metil-4-fenil-4-propionoxipiperidina, mas também, mais de 2,9% de MPTP (GERLACH e RIEDERER, 1996). O potencial desta substância em produzir a síndrome parkinsoniana foi subseqüentemente confirmado em várias espécies animais (GERLACH e RIEDERER, 1996).

O MPTP é altamente lipossolúvel e é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica. Ele é convertido, nas células gliais, pela MAO-B (já que os neurônios dopaminérgicos não apresentam esta enzima) (SPECIALE, 2002) a 1-metil-4-fenilpiridina (MPP^+) (SHIMOHAMA *et al.*, 2003). O grau do dano estriatal induzido pelo MPTP mostra-se proporcional às concentrações de MPP^+ estriatais. *In vitro*, a captação do MPP^+ via sistema de transporte dopaminérgico pelos sinaptossomas estriatais segue uma cinética muito semelhante à da própria dopamina. Assim, a MAO-B das células gliais forma MPDP⁺ (1-metil-4-fenil-2,3-diidropiridina), um intermediário de vida curta, que pode difundir-se nas formas de MPTP e MPP^+ ; este último, quando no espaço extracelular, entra nos neurônios dopaminérgicos por transportadores ativos de dopamina (SPECIALE, 2002). O MPP^+ absorvido concentra-se nas mitocôndrias onde inibe o complexo I da cadeia transportadora de elétrons reduzindo a formação de ATP e provocando um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, induzindo a apoptose nos neurônios dopaminérgicos (SHIMOHAMA *et al.*, 2003).

Em primatas, o MPTP causa sinais parkinsonianos irreversíveis e severos que são quase indistinguíveis do parkinsonismo idiopático. Entre as alterações causadas pelo MPTP incluem-se degeneração dos neurônios da substância negra e o aparecimento de micro-inclusões eosinofílicas e agregados de α -sinucleína, os quais diferem, porém, dos corpos de Lewy. Primatas tratados com MPTP apresentam uma boa resposta ao tratamento com L-DOPA e agonistas dos receptores de dopamina. Roedores são menos sensíveis à toxicidade causada pelo MPTP que os primatas. Nestes animais, a depleção de dopamina induzida pelo MPTP requer altas doses e os sinais motores permanentes do parkinsonismo raramente aparecem (SHIMOHAMA *et al.*, 2003).

Além das diferenças na sensibilidade ao MPTP entre espécies animais distintas, também ocorrem diferenças significantes na sensibilidade entre animais de mesma espécie (GERLACH e RIEDERER, 1996).

Apesar dos modelos animais estudados e de todas as investigações em torno da DP, sua etiologia permanece desconhecida e os tratamentos, até agora desenvolvidos, restringem-se a amenizar os sintomas motores, deixando de lado

as alterações cognitivas e de humor que aparecem com a doença. Além disso, estes tratamentos apresentam uma série de efeitos colaterais indesejáveis que comprometem o tratamento prolongado.

Deste modo, verifica-se a necessidade de estudar a participação do NO e da enzima NOS em modelos animais de parkinsonismo.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a participação do NO e da NOS no parkinsonismo induzido por MPTP em ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Avaliar o efeito da inibição da NOS no parkinsonismo induzido pelo MPTP em ratos. A avaliação do comportamento motor foi realizada através do teste do Campo Aberto.

2.2.2 Comparar os efeitos da inibição da NOS pelo 7-NI, pelo L-NAME e pela Aminoguanidina, inibidores da NOS seletivo para a nNOS, não seletivo e seletivo para a iNOS, respectivamente.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos, de 3 meses de idade, da mesma linhagem, obtidos através de cruzamentos sucessivos de matrizes provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Os animais foram mantidos em uma sala com umidade e temperatura controladas ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), em um ciclo de claro-escuro de 12 h (7:00 – 19:00 h). Água e comida foram fornecidas à vontade aos animais durante todo o experimentos. Todos os procedimentos experimentais estão de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (protocolo número 0144).

3.2 DROGAS

- MPTP (Sigma Chemical Co., USA) na dose de $1\mu\text{mol}$, dissolvido em $2,1\ \mu\text{l}$ de solução salina (NaCl 0,9%);
- 7-nitroindazol (7-NI - 25 mg/kg) (Sigma Chemical Co., USA);
- L-NAME (25 mg/kg) (Sigma Chemical Co., USA);
- Aminoguanidina (25 mg/kg) (Sigma Chemical Co., USA);
- Óleo de milho;
- Solução salina (NaCl 0,9%).

3.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Para cada experimento, 60 animais foram divididos em 6 grupos: controle+veículo, controle+inibidor da NOS, SHAM+veículo, SHAM+inibidor da NOS, MPTP+veículo e MPTP+inibidor da NOS.

Os animais submetidos à cirurgia estereotáxica foram inicialmente anestesiados com equitesin (0,3 ml/100 g – i.p.). Após a anestesia, foi feita a tricotomia e, então foi administrado o anestésico local (lidocaína 0,2 ml com 2% de vasoconstritor – s.c.) na derme que recobre o crânio dos ratos.

Os animais do grupo MPTP foram colocados em um estereotáxico (David Kopf, modelo 957L) e receberam a microinfusão bilateral de MPTP (1µmol em 2,1 µl de salina, 0,333 µl/min por 3 min) na substância negra parte compacta (SNc), utilizando as seguintes coordenadas estereotáxicas: ântero-posterior (AP): - 5,0 mm a partir do bregma; médio-lateral (ML): +/- 2,1 mm a partir da linha média; e dorso-ventral (DV): - 7,7 mm a partir da calota craniana, segundo PAXINOS e WATSON (1986).

A microinfusão de MPTP foi realizada com o auxílio de uma agulha (30 gauge) conectada a um tubo de polietileno adaptado a uma micro-seringa de 10 µl (Hamilton, EUA) que, por sua vez, está encaixada em uma bomba de infusão (Havard Apparatus, EUA). Após o término da microinfusão de MPTP a agulha foi mantida no local por mais 2 min para evitar o refluxo da neurotoxina. Em seguida, o escalpo foi suturado e os animais foram retirados do estereotáxico. Os ratos foram colocados em gaiolas com ambiente aquecido para recuperação da anestesia durante algumas horas e, posteriormente, encaminhados ao biotério.

O grupo SHAM foi submetido ao mesmo procedimento cirúrgico. Entretanto, os animais não receberam o MPTP, sendo somente introduzida a agulha nas mesmas coordenadas estereotáxicas. Os ratos do grupo controle não foram submetidos à cirurgia estereotáxica, mas foram retirados da gaiola de moradia para manuseio durante alguns minutos.

3.4 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

3.4.1 CAMPO ABERTO

Este aparelho consiste em uma arena de metal circular com 1 m de diâmetro e 32,5 cm de altura, pintada de branco, dividida com linhas pretas em 19 unidades. O campo aberto foi construído de acordo com a descrição de BROADHURST (1960).

Os animais foram colocados individualmente no centro do campo aberto e seu comportamento foi avaliado por 5 minutos. Durante a observação foram registrados a frequência de locomoção (penetrar em uma divisão com as quatro patas), de levantar (apoio somente nas patas traseiras, com o tronco perpendicular ao chão da arena), duração de imobilidade (sem nenhuma atividade motora, permanecendo estático no que diz respeito à cabeça, tronco e patas) e tempo de latência para início do movimento (tempo que o animal levou para iniciar o movimento após ser colocado no centro do aparelho). Foram utilizados cronômetros para o controle da duração de imobilidade e início do movimento. A arena foi limpa com solução de álcool 5% após a observação de cada animal.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey-Kramer. Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão.

4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 1: Efeitos do 7-NI em ratos lesados com MPTP

4.1.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Sessenta animais foram divididos em 6 grupos: controle+veículo (CONT+VE), controle+7-NI (CONT+7-NI), SHAM+veículo (SHAM+VE), SHAM+7-NI, MPTP+veículo (MPTP+VE) e MPTP+7-NI.

Os animais receberam 7-NI na dose de 25 mg/kg, ou veículo (olé de milho) – i.p., 1 hora antes da neurotoxina, e foram avaliados no teste do campo aberto, 24 horas e 7 dias após a cirurgia.

4.1.2 RESULTADOS

A análise do comportamento dos animais no teste do campo aberto realizado 24 horas após a cirurgia mostrou que os animais do grupo MPTP+VE apresentaram redução das freqüências de locomoção (Fig. 2) e levantar (Fig. 3) e aumento dos tempos de latência para início do movimento (Fig. 1) e de imobilidade (Fig. 4) quando comparados aos animais dos grupos CONT+VE e SHAM+VE. Os ratos do grupo MPTP+7NI não apresentaram diferença em comparação aos animais dos grupos CONT+7-NI e SHAM+7-NI em nenhum dos parâmetros avaliados; entretanto, quando comparados aos animais do grupo MPTP+VE, os animais do grupo MPTP+7-NI apresentaram diminuição nos tempos de latência para início do movimento (Fig. 1) e de imobilidade (Fig. 4), aumento das freqüências de locomoção (Fig. 2) e de levantar (Fig. 3). Os animais dos grupos CONT+VE, CONT+7-NI, SHAM+VE e SHAM+7-NI não diferiram entre si em nenhum dos parâmetros avaliados.

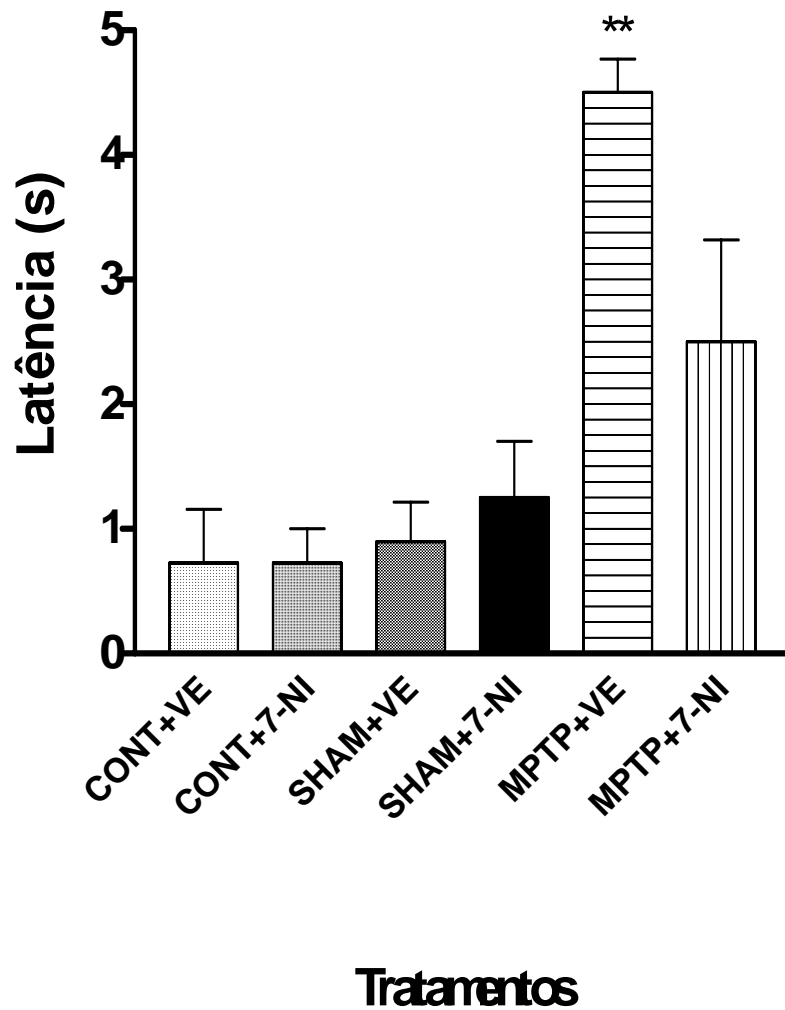


Fig. 1: Efeitos da infusão bilateral de MPTP intranigral e de 7-NI (25 mg/kg – i.p.) na latência para início do movimento de ratos avaliados no campo aberto 24 horas após a cirurgia. Anova seguida do teste de Tukey-Kramer. Os dados estão representados pela média \pm erro padrão. $n = 10$ /grupo; ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo CONT+VE.

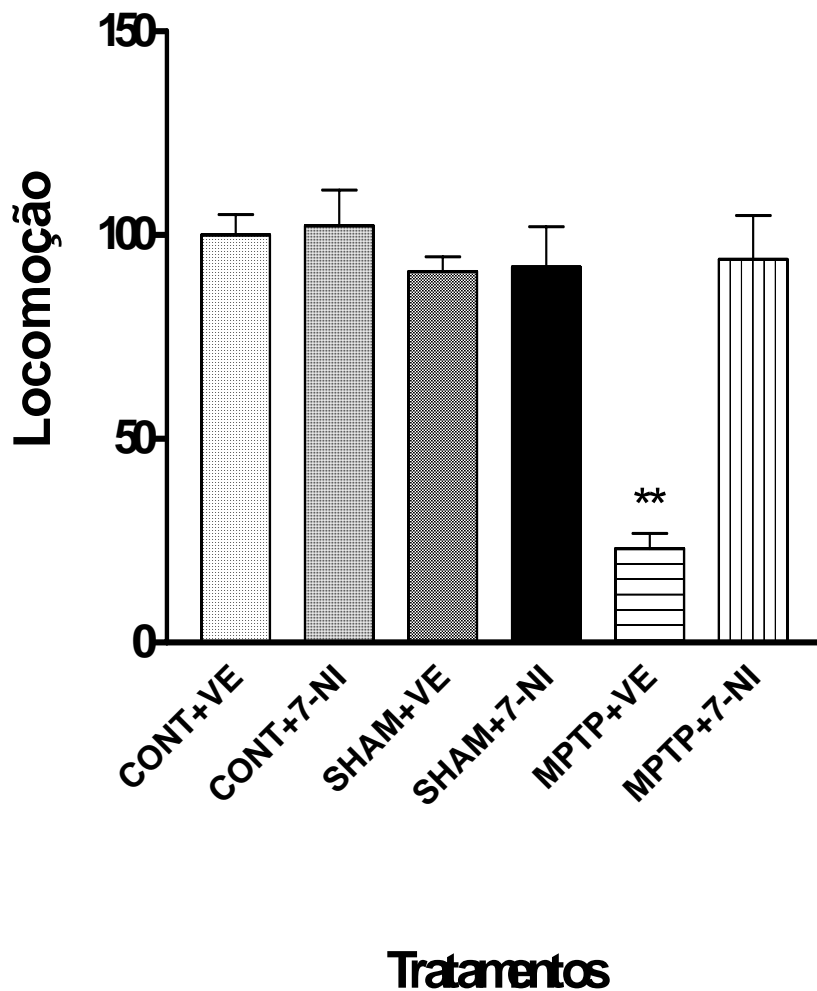


Fig. 2: Efeitos da infusão bilateral de MPTP intranigral e de 7-NI (25 mg/kg – i.p.) na locomoção de ratos avaliados no campo aberto 24 horas após a cirurgia. Anova seguida do teste de Tukey-Kramer. Os dados estão representados pela média \pm erro padrão. $n = 10/\text{grupo}$; ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo CONT+VE.

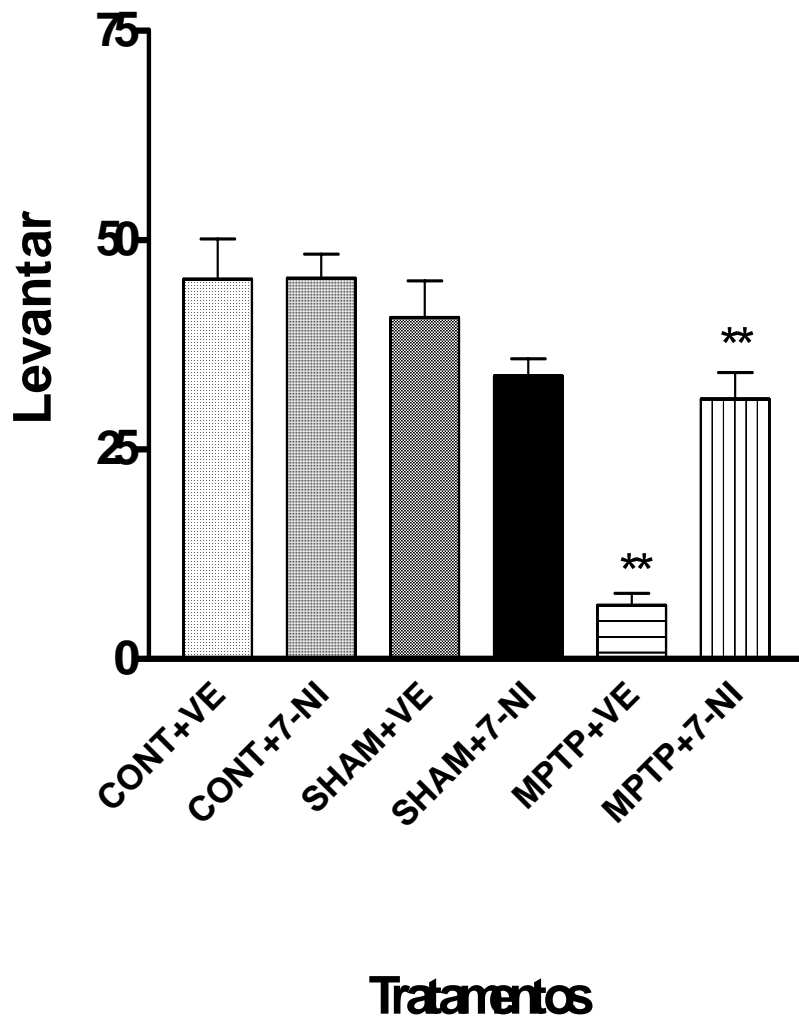


Fig. 3: Efeitos da infusão bilateral de MPTP intranigral e de 7-NI (25 mg/kg – i.p.) na frequência de levantar de ratos avaliados no campo aberto 24 horas após a cirurgia. Anova seguida do teste de Tukey-Kramer. Os dados estão representados pela média \pm erro padrão. $n = 10/\text{grupo}$; $**p < 0,01$ em comparação ao grupo CONT+VE.

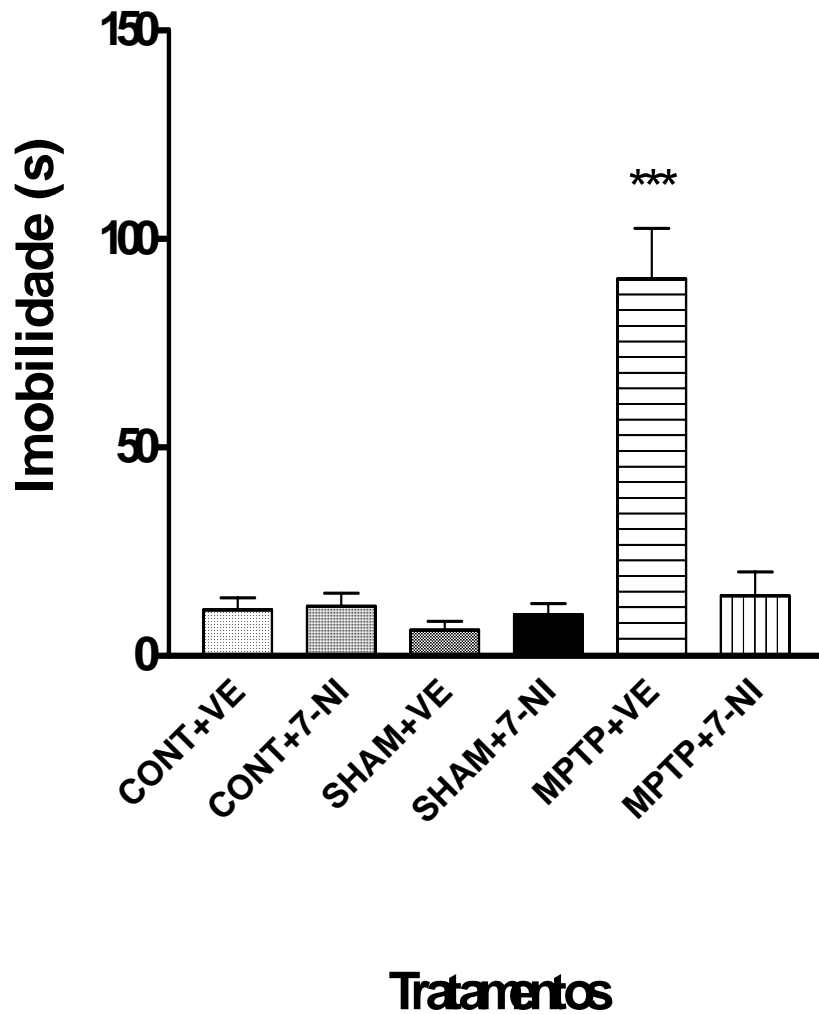


Fig. 4: Efeitos da infusão bilateral de MPTP intranigral e de 7-NI (25 mg/kg – i.p.) no tempo de imobilidade de ratos avaliados no campo aberto 24 horas após a cirurgia. Anova seguida do teste de Tukey-Kramer. Os dados estão representados pela média \pm erro padrão. $n = 10$ /grupo; *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo CONT+VE.

Na análise comportamental realizada 7 dias após a cirurgia os ratos do grupo MPTP+VE apresentaram aumento no tempo de imobilidade em comparação aos animais dos grupos CONT+VE e SHAM+VE (Fig. 8). Os animais do grupo MPTP+7-NI não diferiram dos animais dos grupos CONT+7-NI e SHAM+7-NI em nenhum dos parâmetros avaliados. Além disso, os ratos do grupo MPTP+7-NI comparados aos animais do grupo MPTP+VE mostraram diminuição significativa no tempo de imobilidade (Fig. 8). Os animais dos grupos CONT+VE, CONT+7-NI, SHAM+VE e SHAM+7-NI não diferiram entre si em nenhum dos parâmetros avaliados.

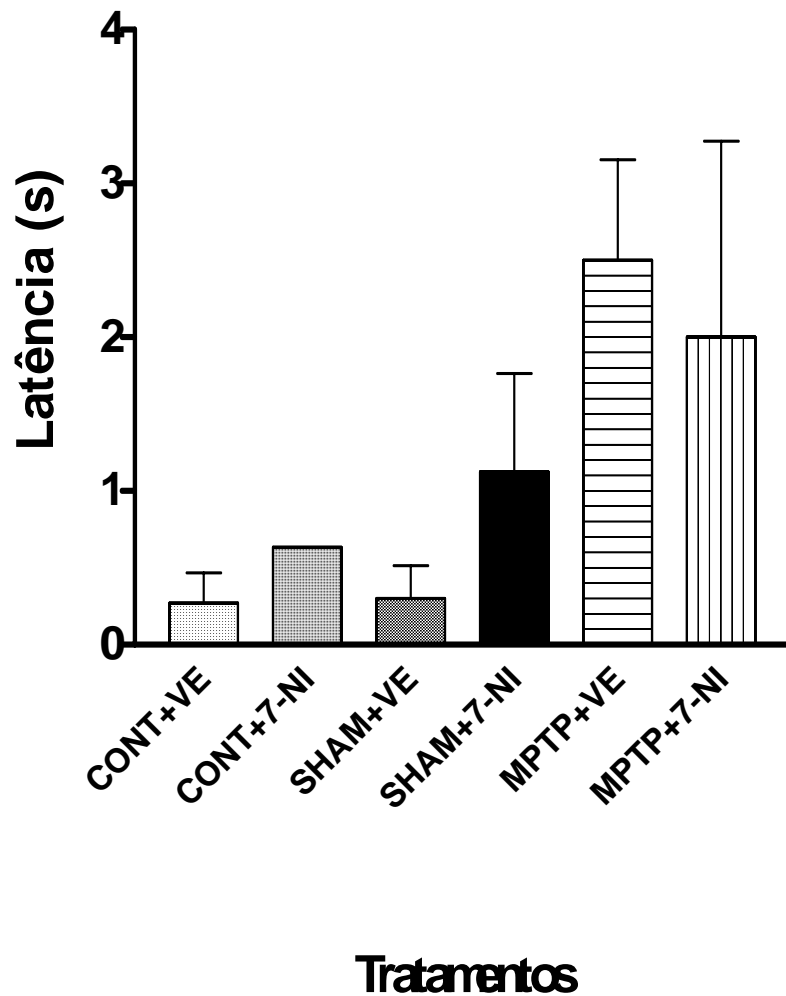


Fig. 5: Efeitos da infusão bilateral de MPTP intranigral e de 7-NI (25 mg/kg – i.p.) na latência para início do movimento de ratos avaliados no campo aberto 7 dias após a cirurgia. Anova seguida do teste de Tukey-Kramer. Os dados estão representados pela média \pm erro padrão. $n = 10$ /grupo.

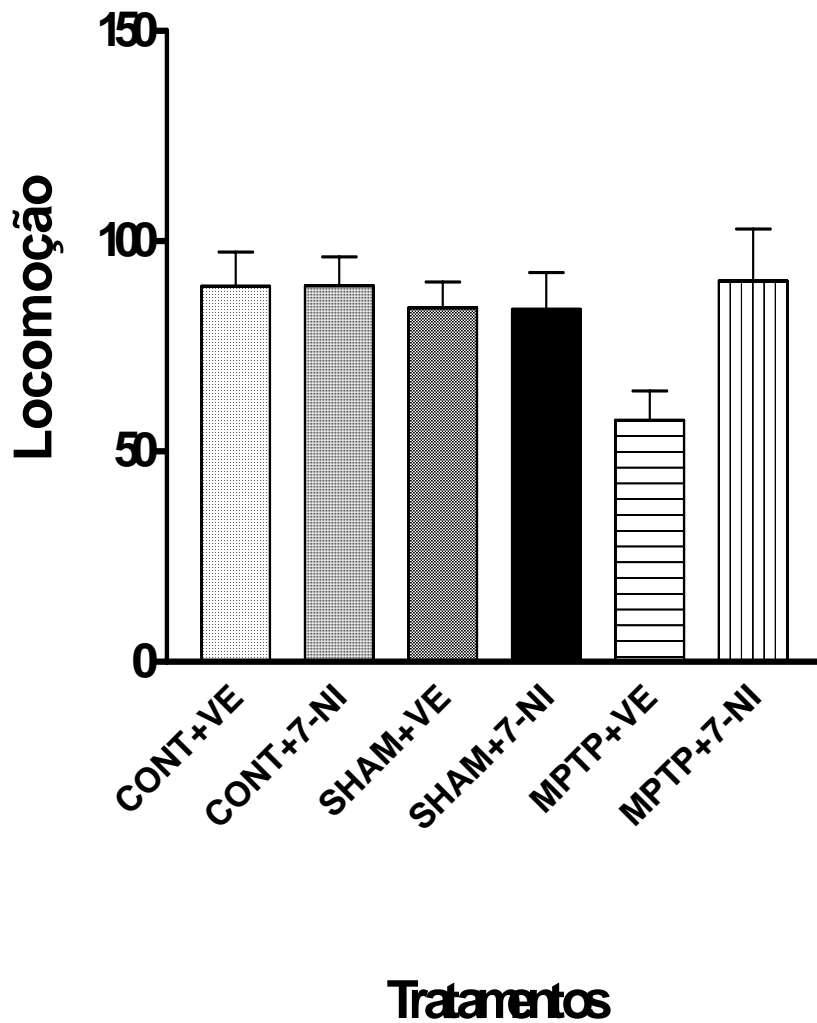


Fig. 6: Efeitos da infusão bilateral de MPTP intranigral e de 7-NI (25 mg/kg – i.p.) na locomoção de ratos avaliados no campo aberto 7 dias após a cirurgia. Anova seguida do teste de Tukey-Kramer. Os dados estão representados pela média \pm erro padrão. $n = 10/\text{grupo}$.

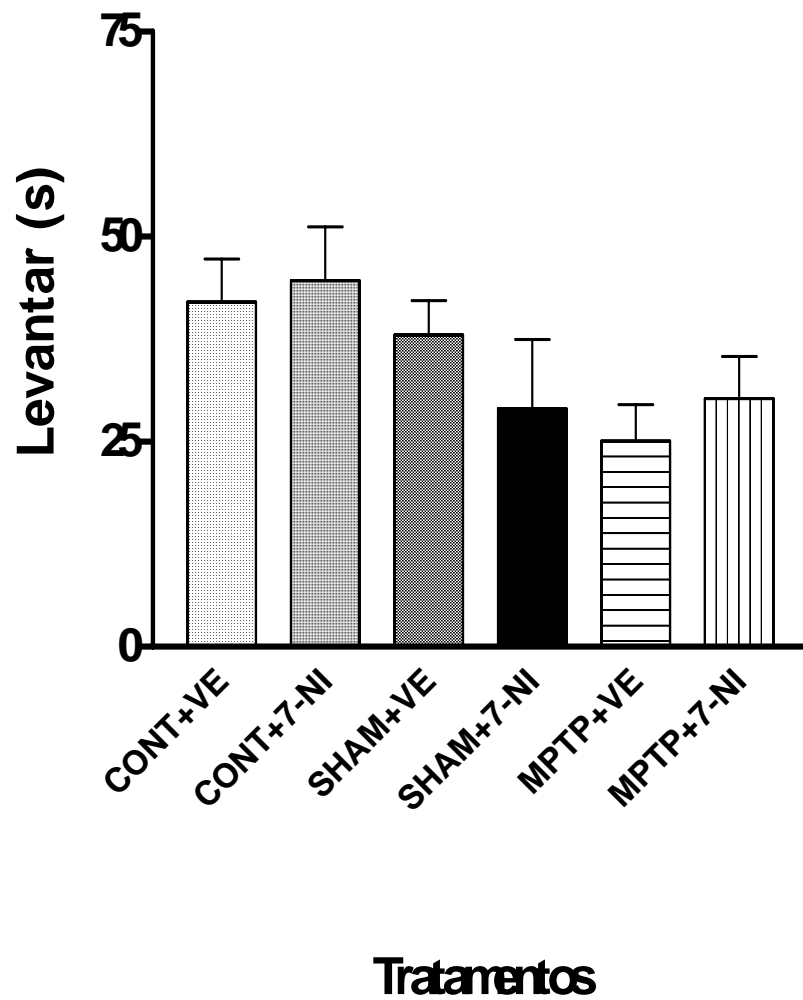


Fig. 7: Efeitos da infusão bilateral de MPTP intranigral e de 7-NI (25 mg/kg – i.p.) na frequência de levantar de ratos avaliados no campo aberto 7 dias após a cirurgia. Anova seguida do teste de Tukey-Kramer. Os dados estão representados pela média \pm erro padrão. $n = 10$ /grupo.

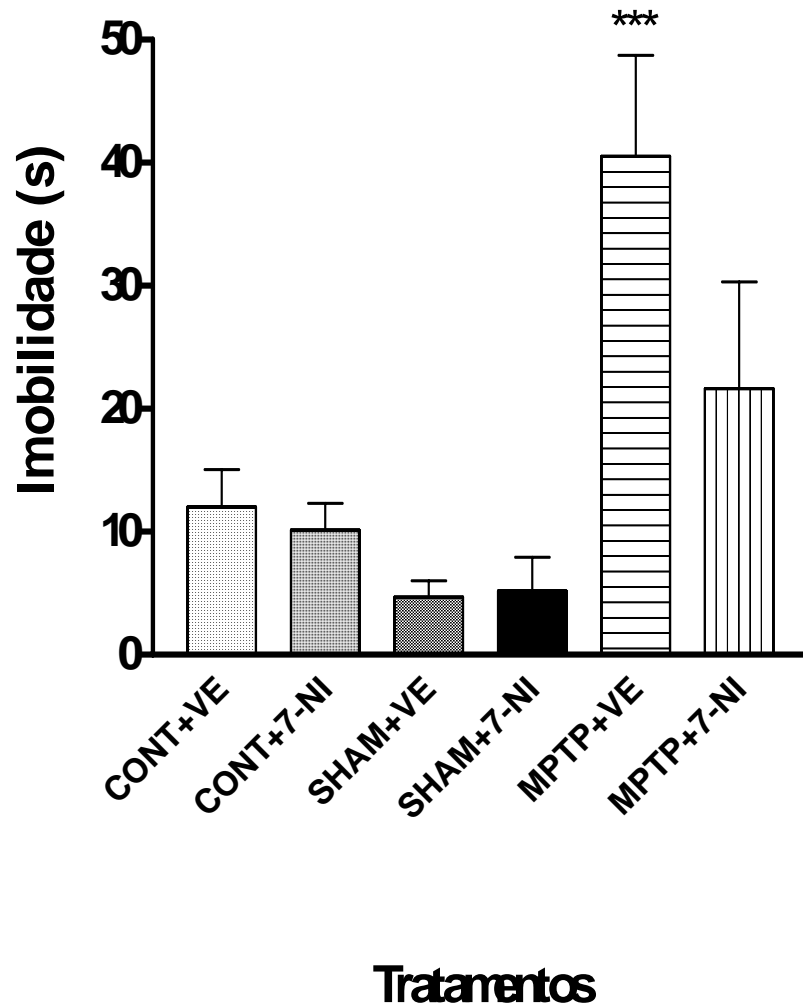


Fig. 8: Efeitos da infusão bilateral de MPTP intranigral e de 7-NI (25 mg/kg – i.p.) no tempo de imobilidade de ratos avaliados no campo aberto 7 dias após a cirurgia. Anova seguida do teste de Tukey-Kramer. Os dados estão representados pela média ± erro padrão. n = 10/grupo; ***p<0,001 em comparação ao grupo CONT+VE.

4.2 EXPERIMENTO 2: Efeitos do L-NAME em ratos lesados com MPTP

4.2.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Sessenta animais foram divididos em 6 grupos: controle+veículo (CONT+VE), controle+L-NAME (CONT+L-NAME), SHAM+veículo (SHAM+VE), SHAM+L-NAME, MPTP+veículo (MPTP+VE) e MPTP+L-NAME.

Os animais receberam L-NAME na dose de 25 mg/kg, ou veículo (salina) – i.p., 1 hora antes da neurotoxina, e foram avaliados no teste do campo aberto, 24 horas e 7 dias após a cirurgia.

4.2.2 RESULTADOS

A análise do comportamento dos animais no teste do campo aberto realizado 24 horas após a cirurgia mostrou que os ratos do grupo MPTP+VE e MPTP+L-NAME apresentaram redução das frequência de locomoção (Fig.10) e de levantar (Fig. 11), e aumento dos tempos de latência para iniciar o movimento (Fig. 9) e de imobilidade (Fig. 12) quando comparados aos animais dos grupos CONT+VE e SHAM+VE. Os animais do grupo MPTP+L-NAME não diferiram dos animais do grupo MPTP+VE em nenhum dos parâmetros estudados. Os animais dos grupos CONT+VE, CONT+L-NAME, SHAM+VE e SHAM+L-NAME não diferiram entre si em nenhum dos parâmetros avaliados.

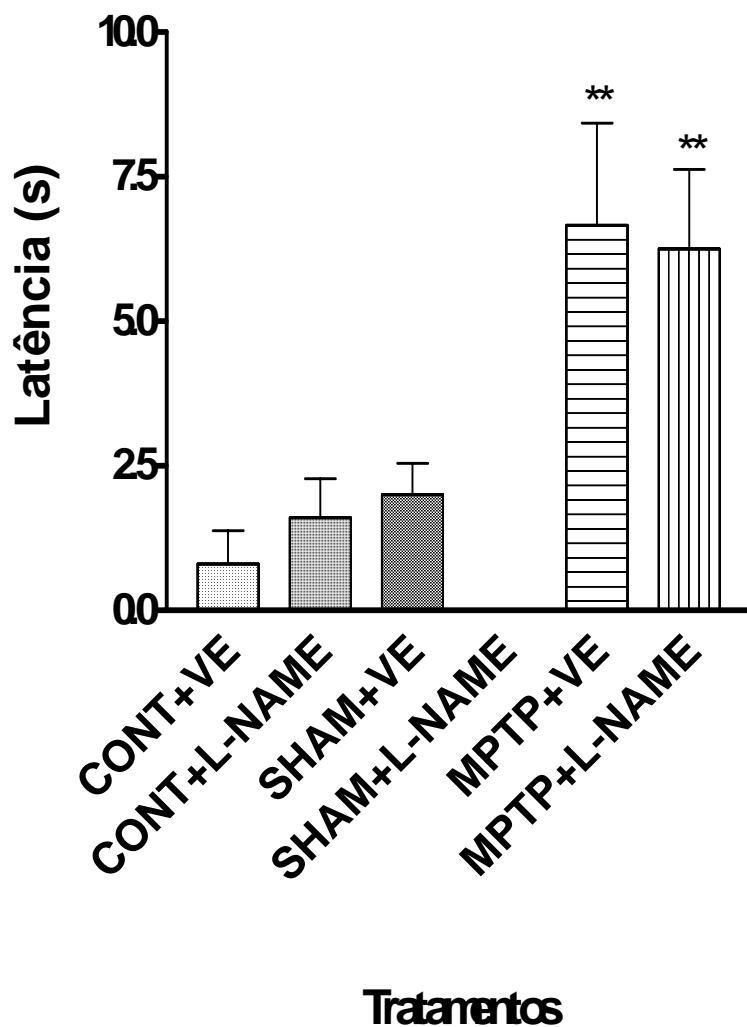


Fig. 9: Efeitos da infusão bilateral de MPTP intranigral e de L-NAME (25 mg/kg – i.p.) na latência para início do movimento de ratos avaliados no campo aberto 24 horas após a cirurgia. Anova seguida do teste de Tukey-Kramer. Os dados estão representados pela média \pm erro padrão. $n = 10$ /grupo; ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo CONT+VE.

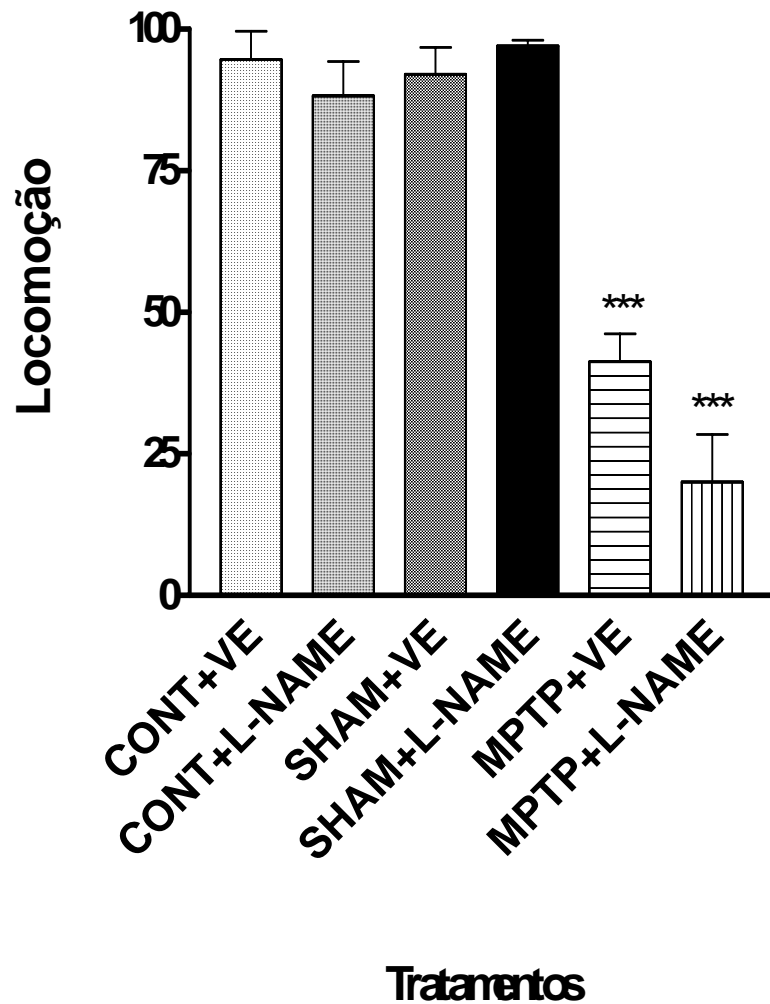


Fig. 10: Efeitos da infusão bilateral de MPTP intranigral e de L-NAME (25 mg/kg – i.p.) na locomoção de ratos avaliados no campo aberto 24 horas após a cirurgia. Anova seguida do teste de Tukey-Kramer. Os dados estão representados pela média \pm erro padrão. $n = 10/\text{grupo}$; *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo CONT+VE.

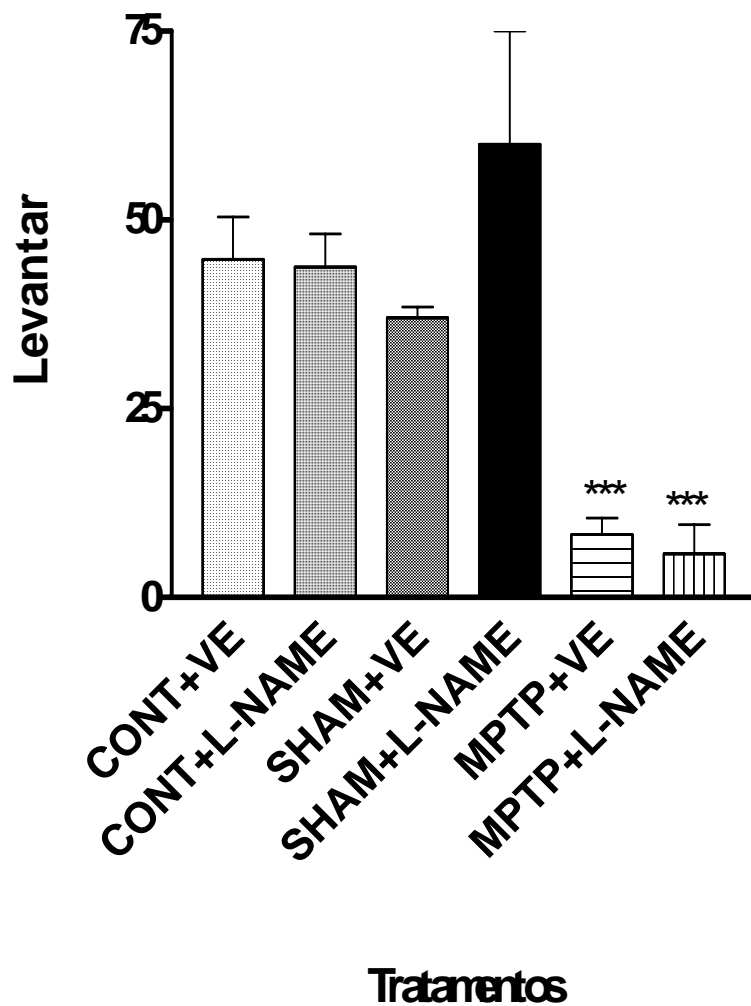


Fig. 11: Efeitos da infusão bilateral de MPTP intranigral e de L-NAME (25 mg/kg – i.p.) na frequência de levantar de ratos avaliados no campo aberto 24 horas após a cirurgia. Anova seguida do teste de Tukey-Kramer. Os dados estão representados pela média \pm erro padrão. $n = 10$ /grupo; *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo CONT+VE.

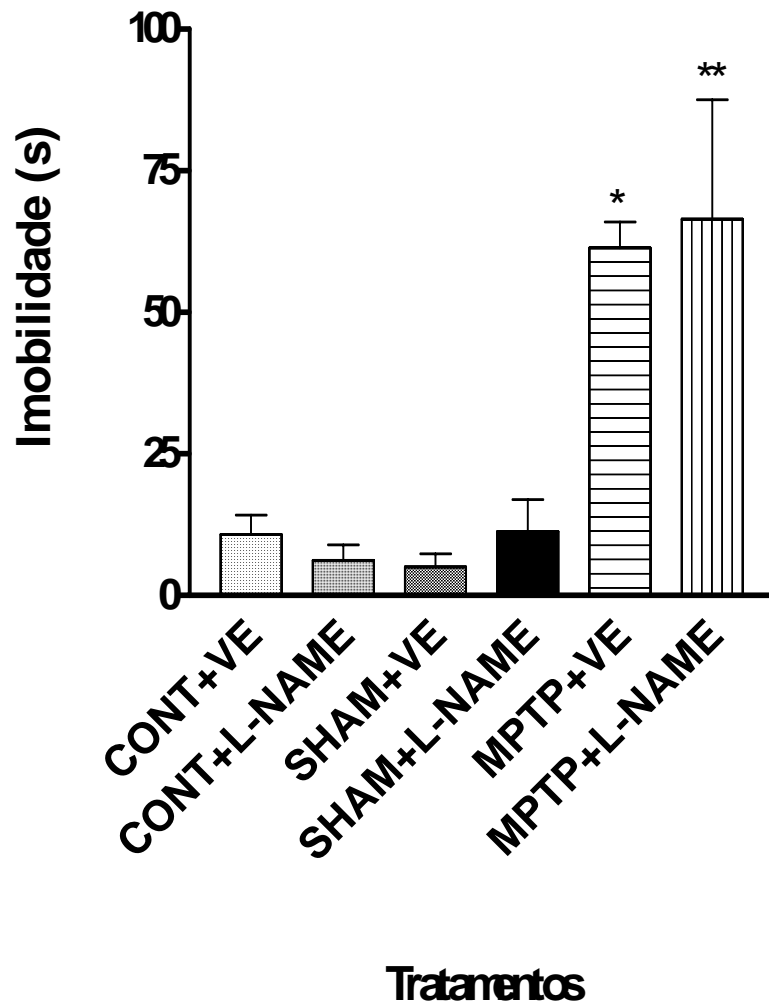


Fig. 12: Efeitos da infusão bilateral de MPTP intranigral e de L-NAME (25 mg/kg – i.p.) no tempo de imobilidade de ratos avaliados no campo aberto 24 horas após a cirurgia. Anova seguida do teste de Tukey-Kramer. Os dados estão representados pela média \pm erro padrão. $n = 10$ /grupo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo CONT+VE.

Na análise comportamental realizada 7 dias após a cirurgia, os animais do grupo MPTP+VE e MPTP+L-NAME não diferiram dos animais dos grupos CONT+VE e SHAM+VE em nenhum dos parâmetros avaliados: latência para início do movimento (Fig. 13), freqüências de locomoção (Fig. 14) e de levantar (Fig. 15) e tempo de imobilidade (Fig. 16). Os animais dos grupos CONT+VE, CONT+L-NAME, SHAM+VE e SHAM+L-NAME não diferiram entre si em nenhum dos parâmetros avaliados.

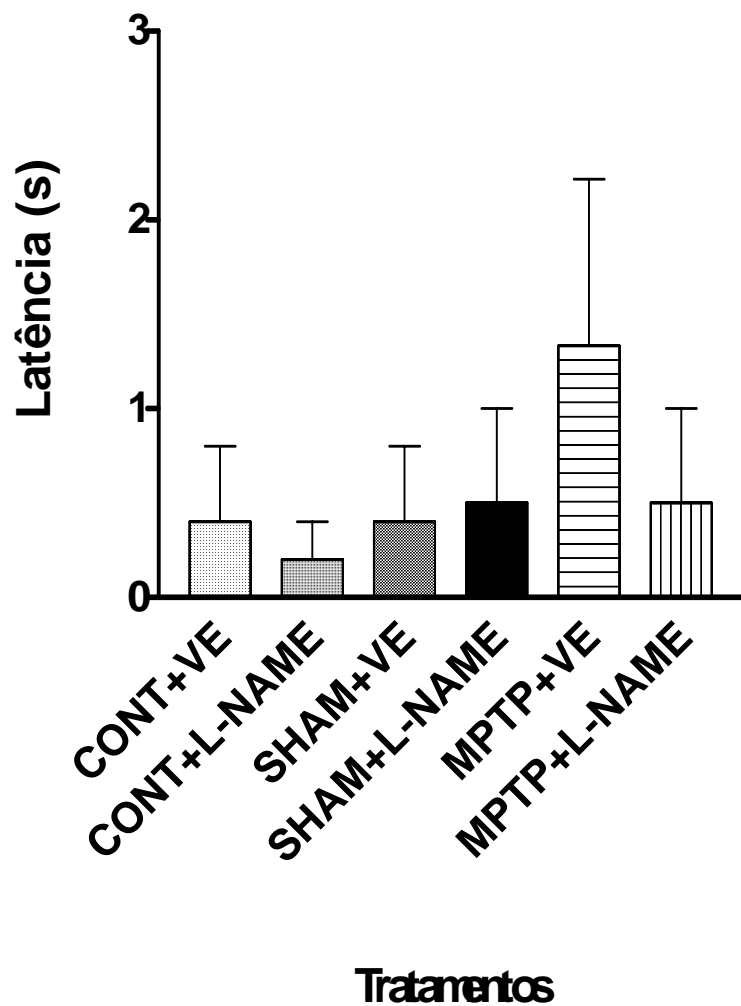


Fig. 13: Efeitos da infusão bilateral de MPTP intranigral e de L-NAME (25 mg/kg – i.p.) na latência para início do movimento de ratos avaliados no campo aberto 7 dias após a cirurgia. Anova seguida do teste de Tukey-Kramer. Os dados estão representados pela média \pm erro padrão. $n = 10$ /grupo.

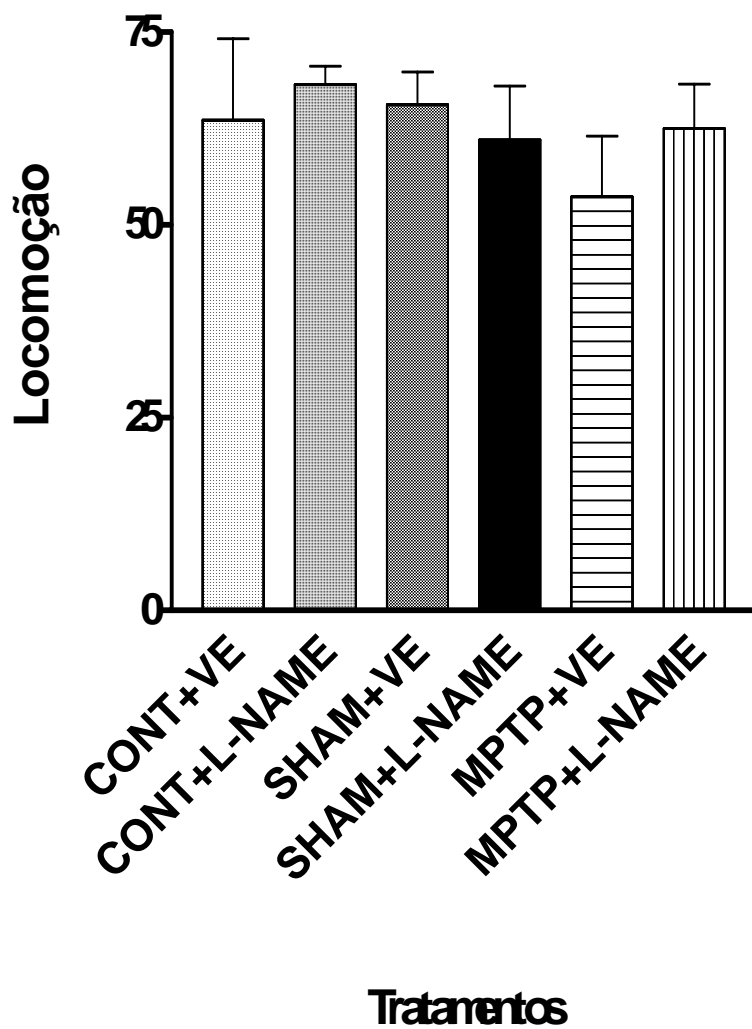


Fig. 14: Efeitos da infusão bilateral de MPTP intranigral e de L-NAME (25 mg/kg – i.p.) na locomoção de ratos avaliados no campo aberto 7 dias após a cirurgia. Anova seguida do teste de Tukey-Kramer. Os dados estão representados pela média \pm erro padrão. n = 10/grupo.

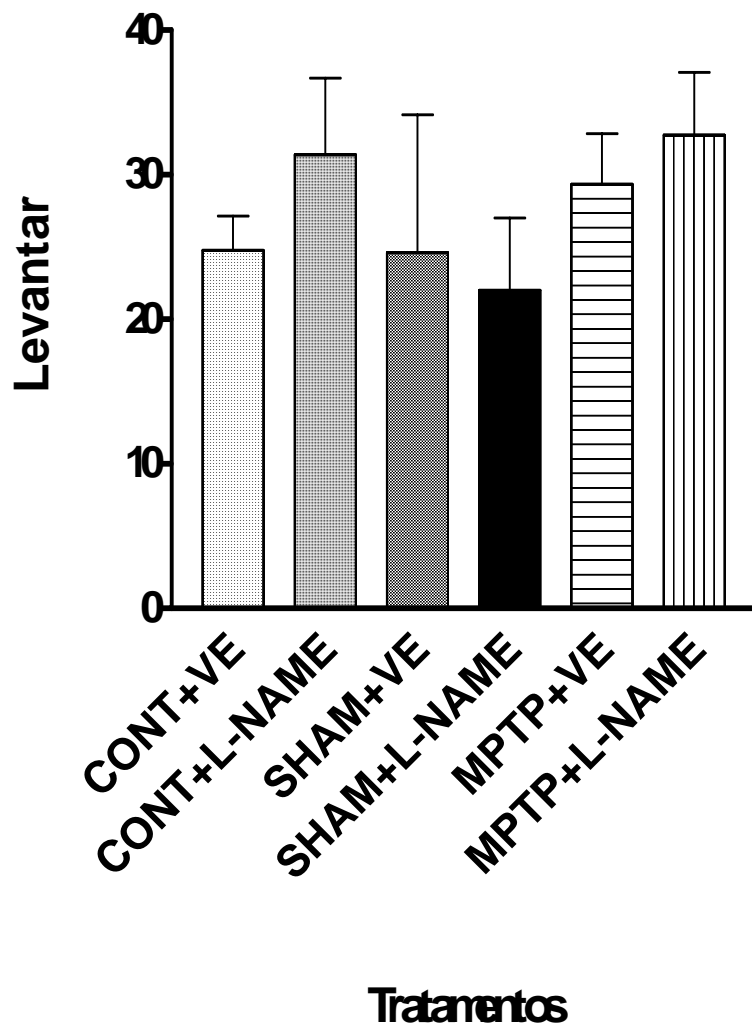


Fig. 15: Efeitos da infusão bilateral de MPTP intranigral e de L-NAME (25 mg/kg – i.p.) na frequência de levantar de ratos avaliados no campo aberto 7 dias após a cirurgia. Anova seguida do teste de Tukey-Kramer. Os dados estão representados pela média \pm erro padrão. $n = 10$ /grupo.

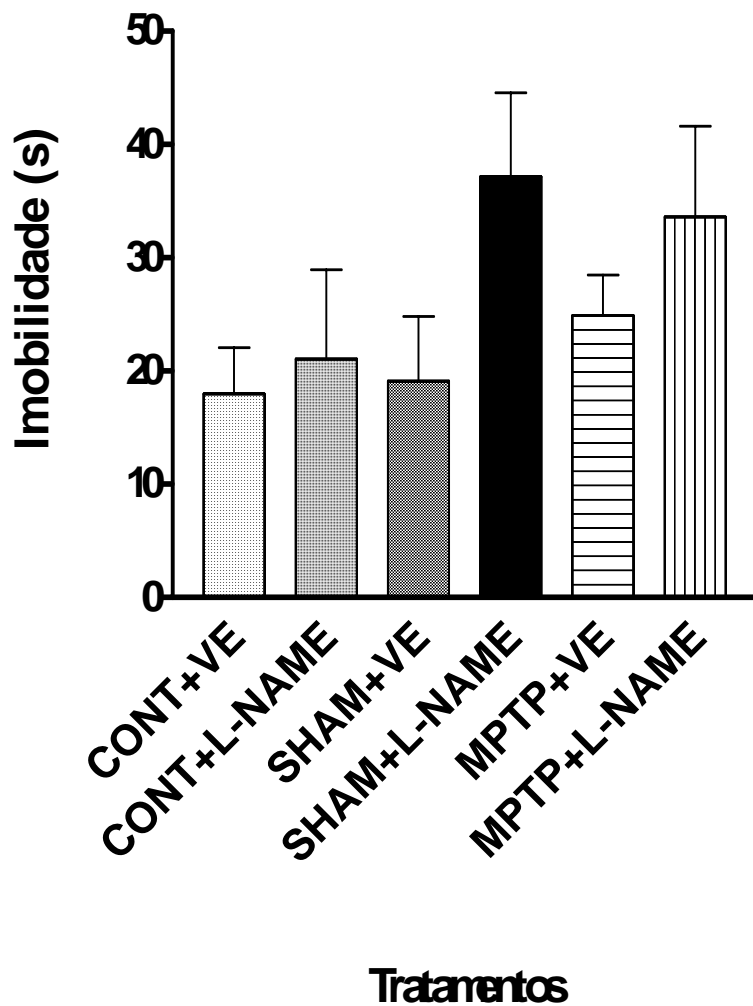


Fig. 16: Efeitos da infusão bilateral de MPTP intranigral e de L-NAME (25 mg/kg – i.p.) no tempo de imobilidade de ratos avaliados no campo aberto 7 dias após a cirurgia. Anova seguida do teste de Tukey-Kramer. Os dados estão representados pela média \pm erro padrão. n = 10/grupo.

4.3 EXPERIMENTO 3: Efeitos do L-NAME intranigral em ratos lesados com MPTP

4.3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Quarenta animais foram divididos em 4 grupos: SHAM+veículo (SHAM+VE), MPTP+veículo (MPTP+VE), MPTP+L-NAME 3 μ g e MPTP+L-NAME 30 μ g.

Os animais receberam a infusão de L-NAME na substância negra parte compacta nas doses de 3 μ g ou 30 μ g 15 minutos antes da injeção do MPTP intranigral. A avaliação comportamental dos animais no teste do campo aberto foi realizada 24 horas e 7 dias após a cirurgia.

4.3.2 RESULTADOS

Na avaliação dos animais no teste do campo aberto realizada 24 horas após a cirurgia, os animais do grupo MPTP+VE apresentaram diminuição nas frequências de locomoção (Fig. 18) e de levantar (Fig. 19) e aumento nos tempos de latência para início do movimento (Fig. 17) e de imobilidade (Fig. 20) quando comparados aos animais do grupo SHAM+VE. Os animais do grupo MPTP+L-NAME 3 μ g mostraram aumento nas frequências de locomoção (Fig. 18) e de levantar (Fig. 19) e redução nos tempos de latência para início do movimento (Fig. 17) e de imobilidade (Fig. 20) em comparação aos ratos do grupo MPTP+VE. A frequência de locomoção dos ratos do grupo MPTP+L-NAME 3 μ g mostrou-se reduzida em comparação aos animais do grupo SHAM+VE, sendo que nos parâmetros latência para início do movimento (Fig. 17), frequência de levantar (Fig. 19) e tempo de imobilidade (Fig. 20) não houve diferença. Quando se comparou os animais dos grupos MPTP+L-NAME 30 μ g e MPTP+VE, não houve diferença nos parâmetros investigados. Os ratos do grupo MPTP+L-NAME 30 μ g mostraram redução das frequências de locomoção (Fig. 18) e de levantar (Fig. 19)

e aumento nos tempos de latência para início do movimento (Fig. 17) e de imobilidade (Fig. 20) em comparação aos animais do grupo SHAM+VE.

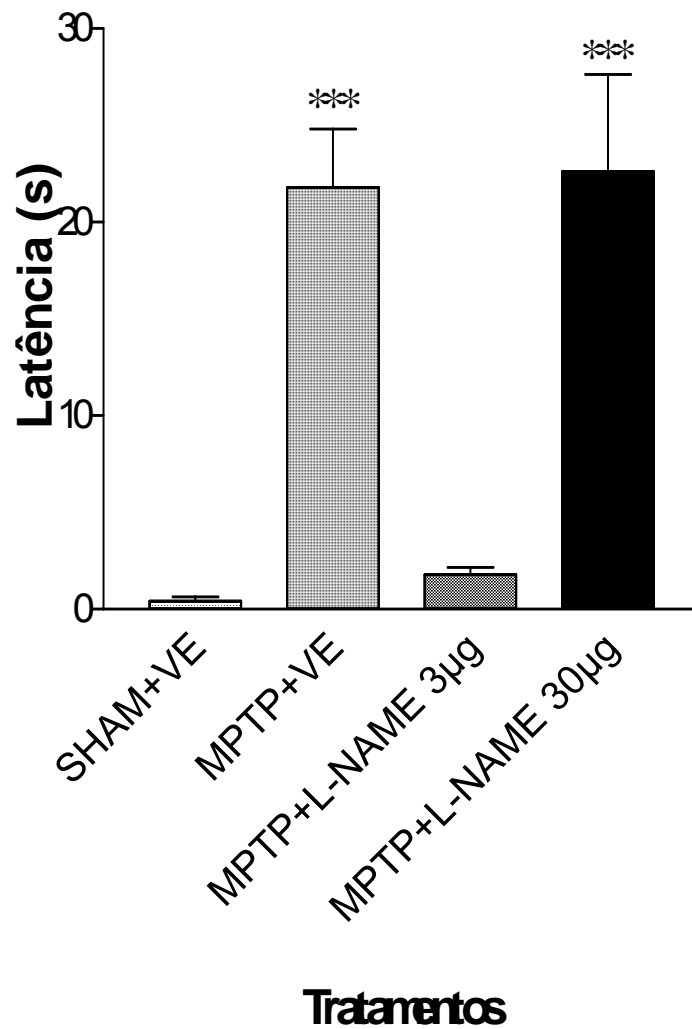


Fig. 17: Efeitos da infusão bilateral de MPTP e de L-NAME (3µg ou 30µg) intranigral na latência para início do movimento de ratos avaliados no campo aberto 24 horas após a cirurgia. Anova seguida do teste de Tukey-Kramer. Os dados estão representados pela média \pm erro padrão. $n = 10$ /grupo; *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo SHAM+VE.

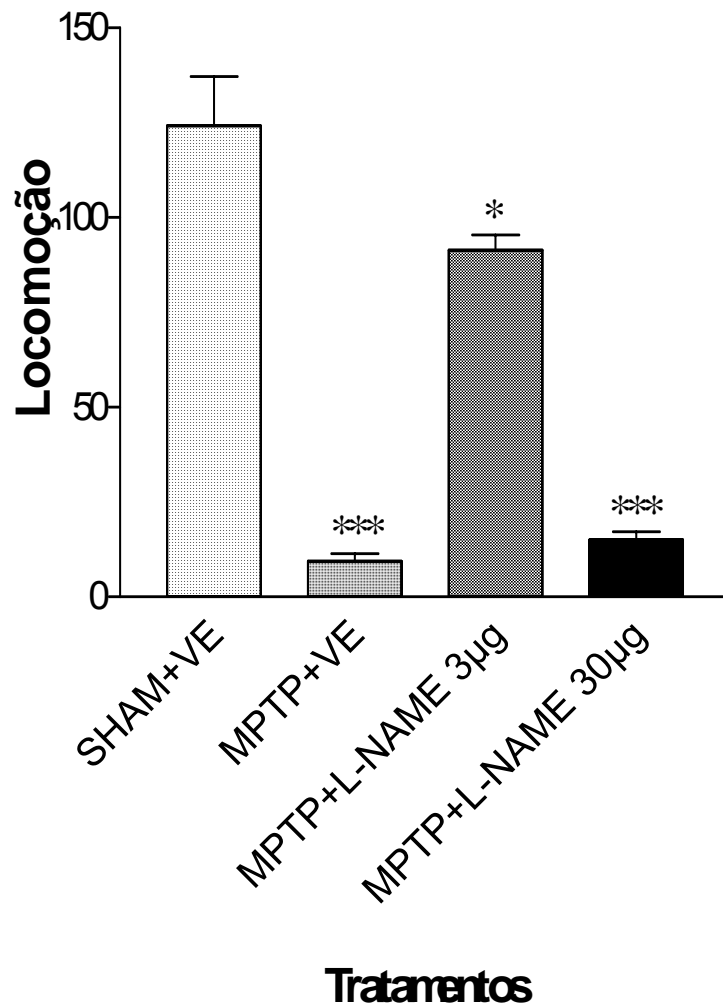


Fig. 18: Efeitos da infusão bilateral de MPTP e de L-NAME (3µg ou 30µg.) intranigral na locomoção de ratos avaliados no campo aberto 24 horas após a cirurgia. Anova seguida do teste de Tukey-Kramer. Os dados estão representados pela média ± erro padrão. n = 10/grupo; *p<0,05; ***p<0,001 em comparação ao grupo SHAM+VE.

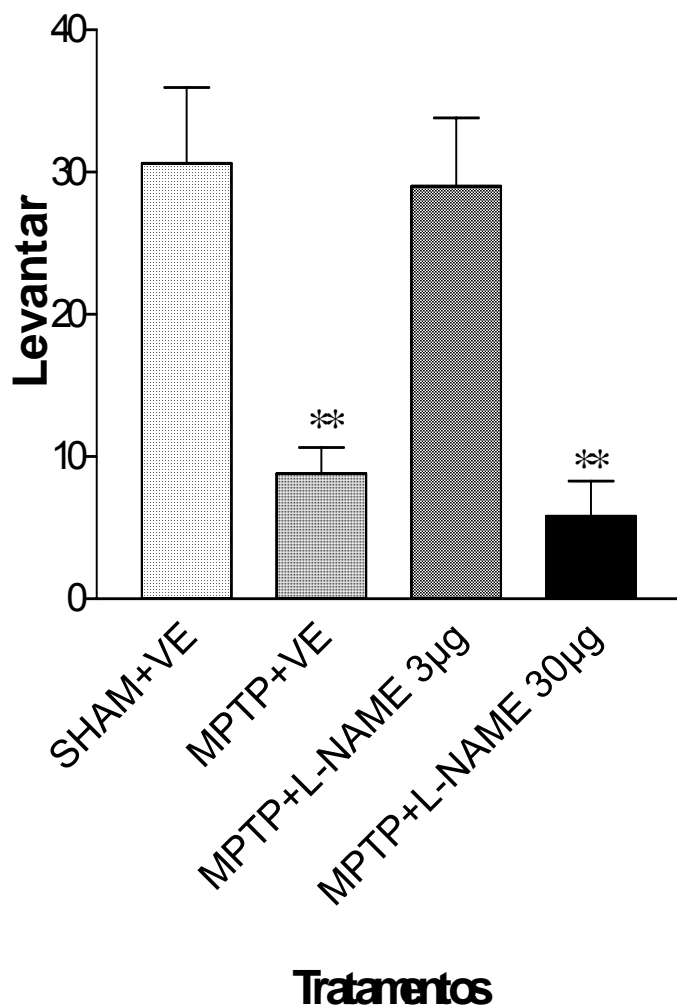


Fig. 19: Efeitos da infusão bilateral de MPTP e de L-NAME (3µg ou 30µg.) intranigral na freqüência de levantar de ratos avaliados no campo aberto 24 horas após a cirurgia. Anova seguida do teste de Tukey-Kramer. Os dados estão representados pela média ± erro padrão. n = 10/grupo; **p<0,01 em comparação ao grupo SHAM+VE.

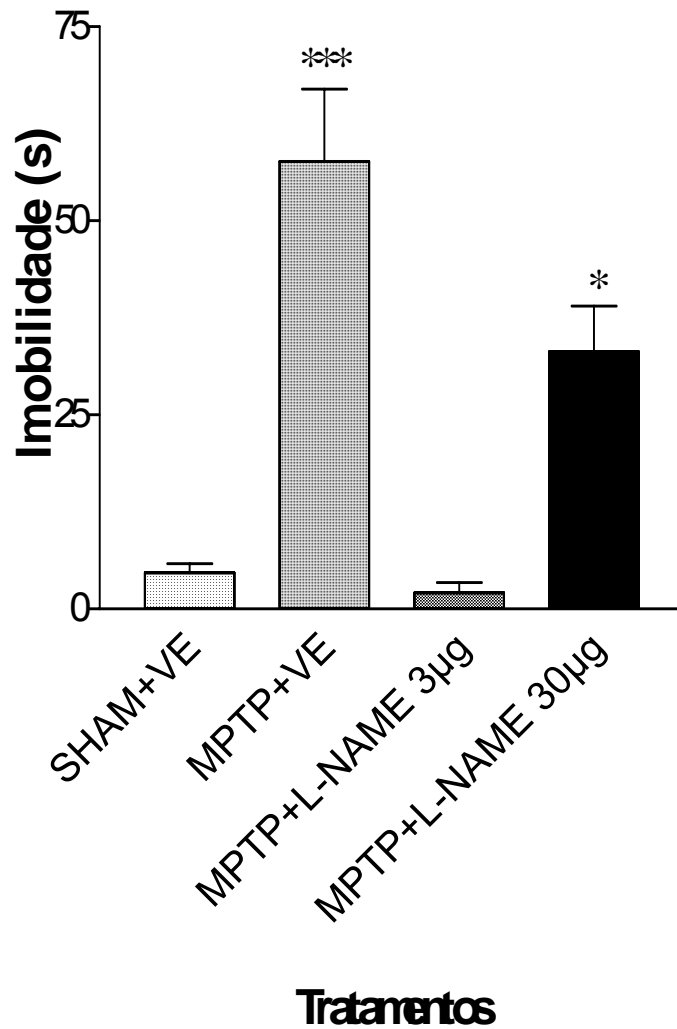


Fig. 20: Efeitos da infusão bilateral de MPTP e de L-NAME (3µg ou 30µg.) intranigral no tempo de imobilidade de ratos avaliados no campo aberto 24 horas após a cirurgia. Anova seguida do teste de Tukey-Kramer. Os dados estão representados pela média \pm erro padrão. $n = 10/\text{grupo}$; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo SHAM+VE.

Na observação realizada 7 dias após a cirurgia, os animais do grupo MPTP+VE apresentaram um aumento no tempo de latência para início do movimento (Fig. 21) quando comparados aos animais do grupo SHAM+VE; porém, nos parâmetros locomoção (Fig. 22), levantar (Fig. 23) e tempo de imobilidade (Fig. 24) não houve diferença entre estes dois grupos. Os animais do grupo MPTP+L-NAME 3 μ g mostraram redução do tempo de latência para início do movimento (Fig. 21) em comparação aos ratos do grupo MPTP+VE. Entretanto, os demais parâmetros não diferiram entre estes dois grupos. Não houve diferença entre os ratos do grupo SHAM+VE e MPTP+L-NAME 3 μ g nos parâmetros avaliados: latência para início do movimento (Fig. 21), locomoção (Fig. 22), frequência de levantar (Fig. 23) e tempo de imobilidade (Fig. 24). Os ratos do grupo MPTP+L-NAME 30 μ g não diferiram dos animais do grupo MPTP+VE em nenhum dos parâmetros; entretanto, quando comparados aos animais do grupo SHAM+VE, os ratos do grupo MPTP+L-NAME 30 μ g mostraram aumento no tempo de latência para início do movimento (Fig. 21). Nos parâmetros locomoção (Fig. 22), frequência de levantar (Fig. 23) e tempo de imobilidade (Fig. 24) não houve diferença entre os grupos MPTP+L-NAME 30 μ g e SHAM+VE.

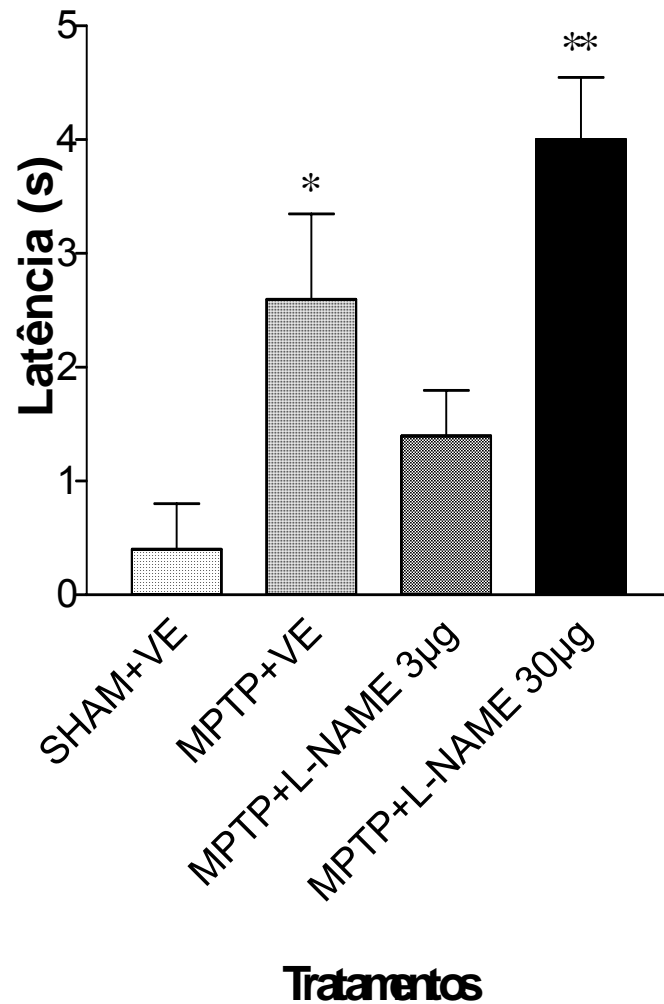


Fig. 21: Efeitos da infusão bilateral de MPTP e de L-NAME (3µg ou 30µg.) intranigral na latência para início do movimento de ratos avaliados no campo aberto 7 dias após a cirurgia. Anova seguida do teste de Tukey-Kramer. Os dados estão representados pela média ± erro padrão. n = 10/grupo; *p<0,05; **p<0,01 em comparação ao grupo SHAM+VE.

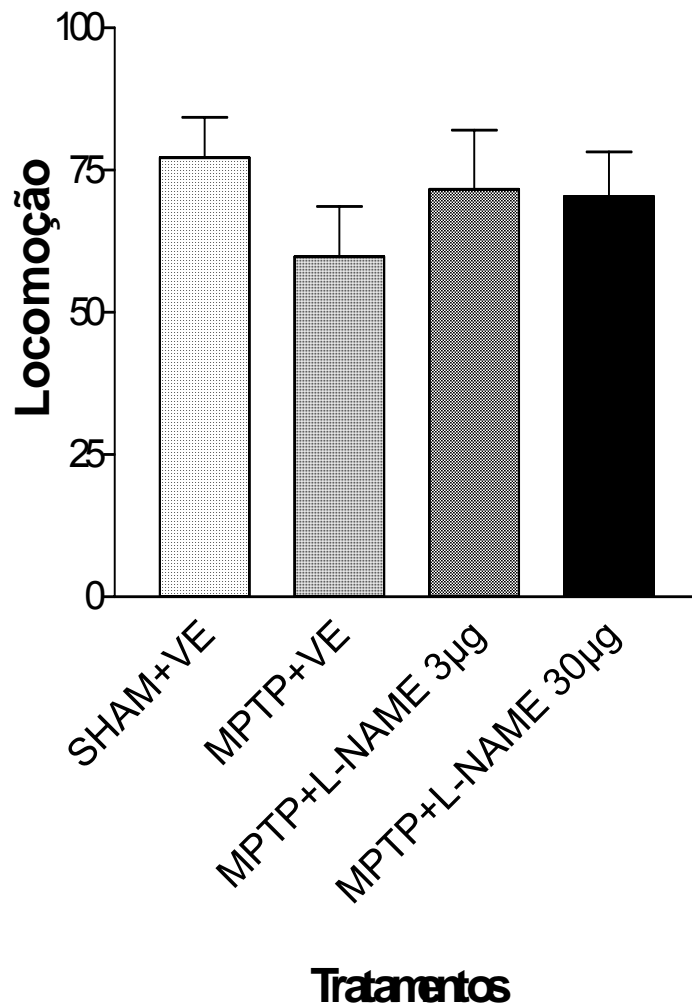


Fig. 22: Efeitos da infusão bilateral de MPTP e de L-NAME (3µg ou 30µg.) intranigral na locomoção de ratos avaliados no campo aberto 7 dias após a cirurgia. Anova seguida do teste de Tukey-Kramer. Os dados estão representados pela média \pm erro padrão. n = 10/grupo.

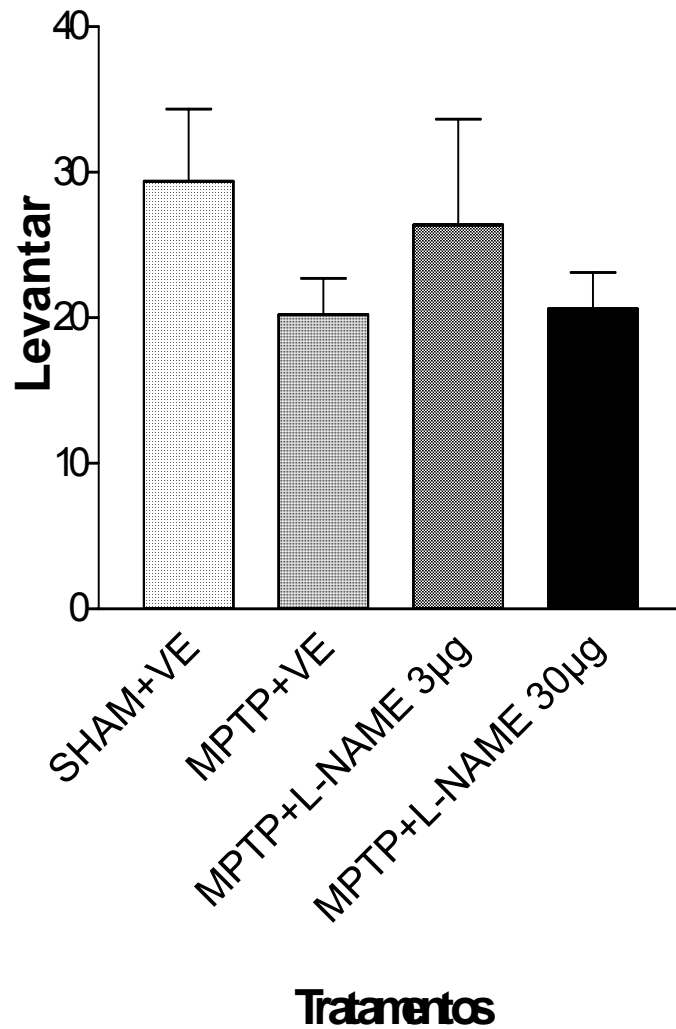


Fig. 23: Efeitos da infusão bilateral de MPTP e de L-NAME (3µg ou 30µg.) intranigral na frequência de levantar de ratos avaliados no campo aberto 7 dias após a cirurgia. Anova seguida do teste de Tukey-Kramer. Os dados estão representados pela média \pm erro padrão. n = 10/grupo.

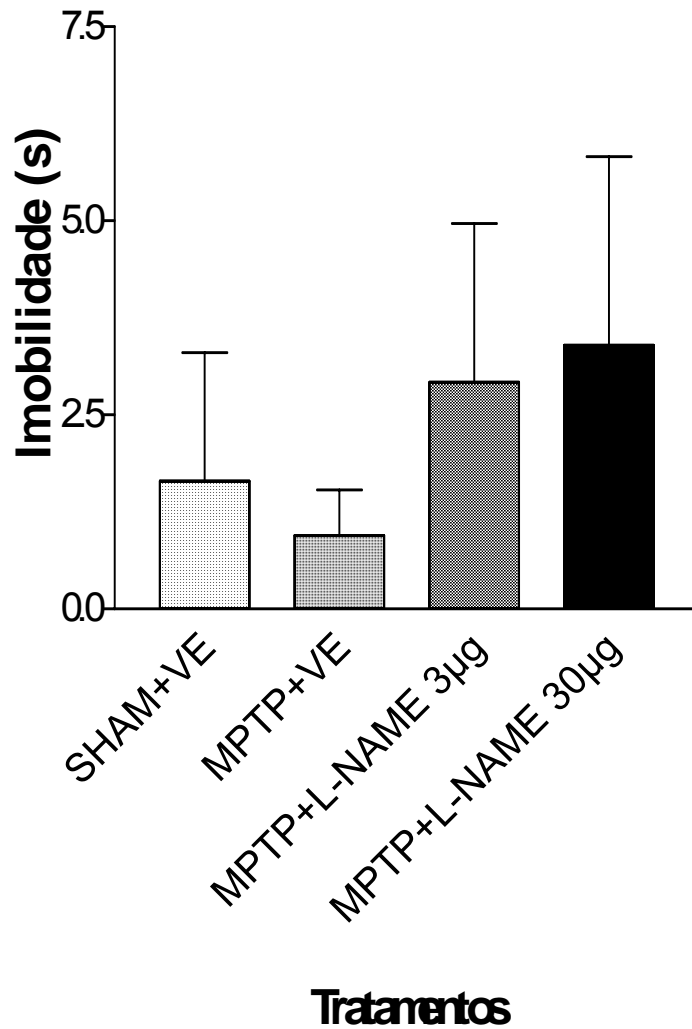


Fig. 24: Efeitos da infusão bilateral de MPTP e de L-NAME (3µg ou 30µg.) intranigral no tempo de imobilidade de ratos avaliados no campo aberto 7 dias após a cirurgia. Anova seguida do teste de Tukey-Kramer. Os dados estão representados pela média ± erro padrão. n = 10/grupo.

4.4 EXPERIMENTO 4: Efeitos da Aminoguanidina em ratos lesados com MPTP

4.4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Sessenta animais foram divididos em 6 grupos: controle+veículo (CONT+VE), controle+Aminoguanidina (CONT+AG), SHAM+veículo (SHAM+VE), SHAM+Aminoguanidina (SHAM+AG), MPTP+veículo (MPTP+VE) e MPTP+Aminoguanidina (MPTP+AG).

Os animais receberam aminoguanidina na dose de 25 mg/kg, ou veículo (salina) – i.p., 1 hora antes da neurotoxina, e foram avaliados no teste do campo aberto, 24 horas e 7 dias após a cirurgia.

4.4.2 RESULTADOS

No campo aberto realizado 24 horas após a cirurgia, os animais do grupo MPTP+VE apresentaram diminuição das freqüências de locomoção (Fig. 26) e de levantar (Fig. 27) e aumento nos tempos de latência para início do movimento (Fig. 25) e de imobilidade (Fig. 28) em comparação aos ratos dos grupos CONT+VE e SHAM+VE. Os animais do grupo MPTP+AG mostraram diminuição das freqüências de locomoção (Fig. 26) e de levantar (Fig. 27) e aumento nos tempos de latência para início do movimento (Fig. 25) e de imobilidade (Fig. 28) em comparação aos ratos dos grupos CONT+AG e SHAM+AG. Os ratos do grupo MPTP+AG não diferiram dos animais do grupo MPTP+VE nos parâmetros latência para início do movimento (Fig. 25), locomoção (Fig. 26), levantar (Fig. 27) e tempo de imobilidade (Fig. 28). Os animais dos grupos CONT+VE, CONT+AG, SHAM+VE e SHAM+AG não diferiram entre si em nenhum dos parâmetros avaliados.

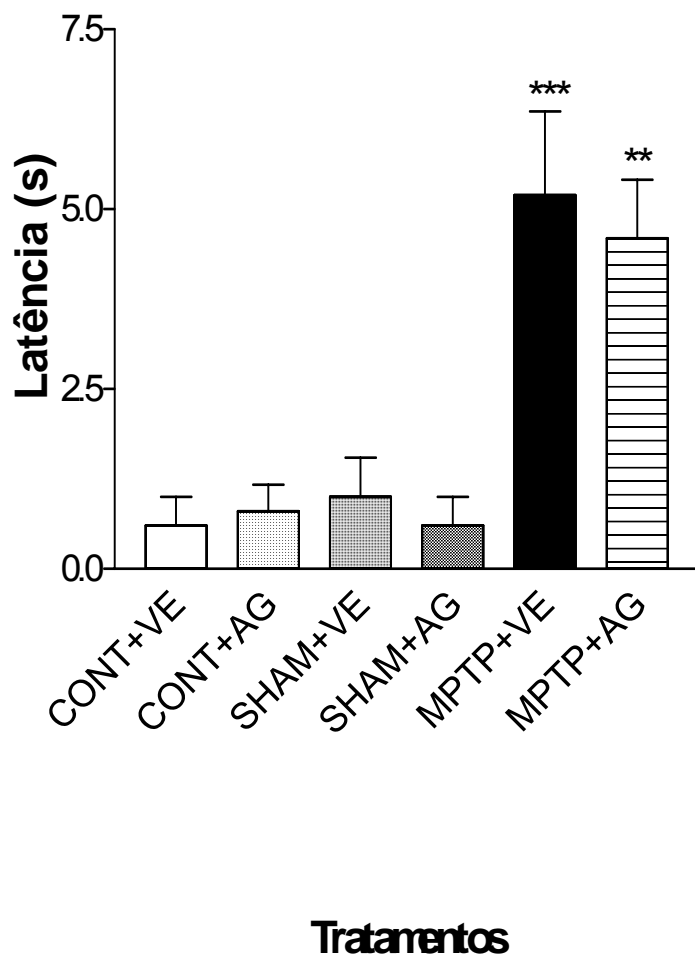


Fig. 25. Efeitos da infusão bilateral de MPTP intranigral e de Aminoguanidina (25 mg/kg – i.p.) na latência para início do movimento de ratos avaliados no campo aberto 24 horas após a cirurgia. Anova seguida do teste de Tukey-Kramer. Os dados estão representados pela média \pm erro padrão. $n = 10/\text{grupo}$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo CONT+VE.

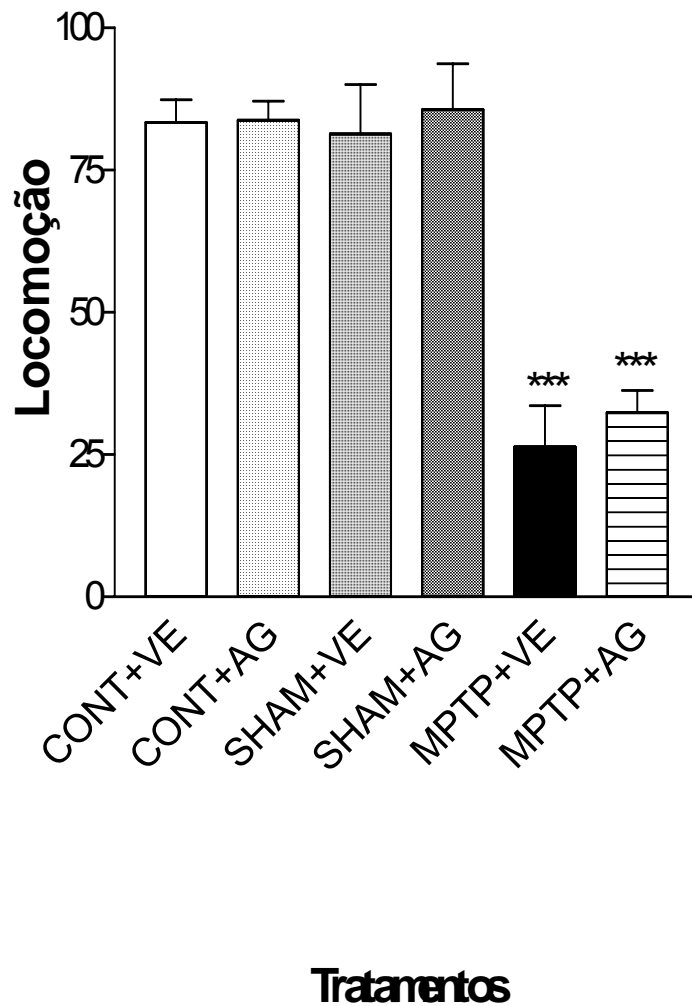


Fig. 26. Efeitos da infusão bilateral de MPTP intranigral e de Aminoguanidina (25 mg/kg – i.p.) na locomoção de ratos avaliados no campo aberto 24 horas após a cirurgia. Anova seguida do teste de Tukey-Kramer. Os dados estão representados pela média \pm erro padrão. $n = 10/\text{grupo}$; *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo CONT+VE.

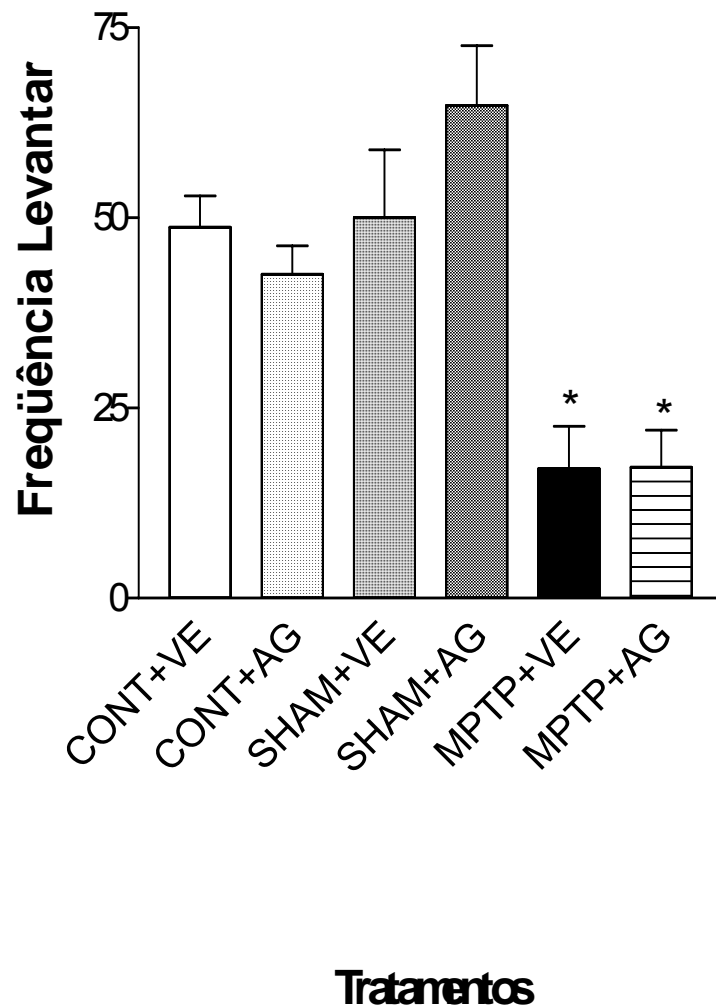


Fig. 27. Efeitos da infusão bilateral de MPTP intranigral e de Aminoguanidina (25 mg/kg – i.p.) na frequência de levantar de ratos avaliados no campo aberto 24 horas após a cirurgia. Anova seguida do teste de Tukey-Kramer. Os dados estão representados pela média \pm erro padrão. $n = 10$ /grupo; * $p < 0,05$ em comparação ao grupo CONT+VE.

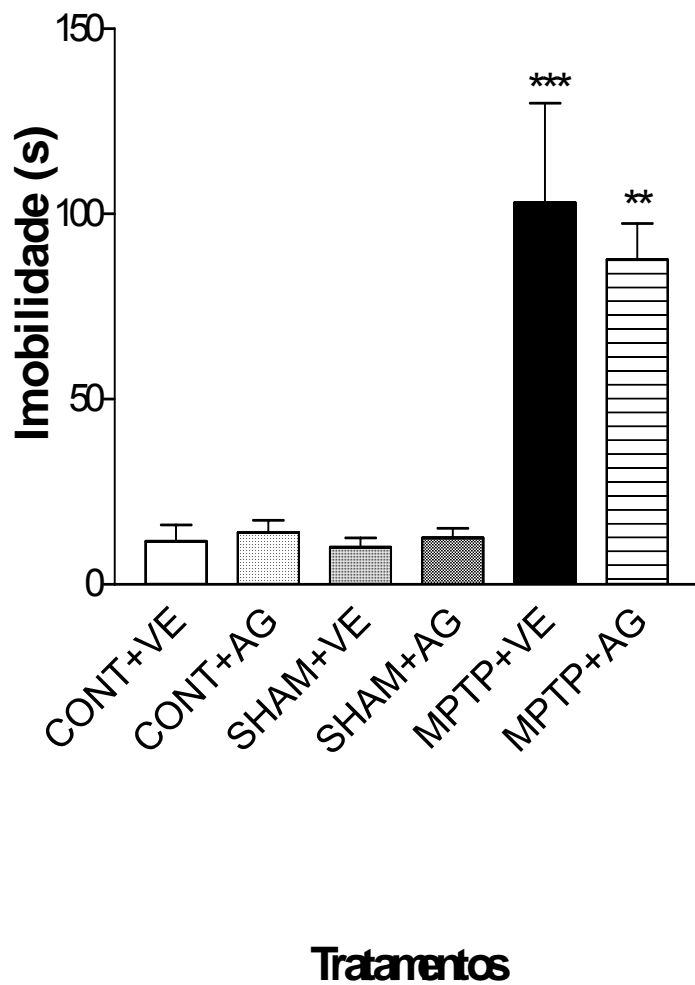
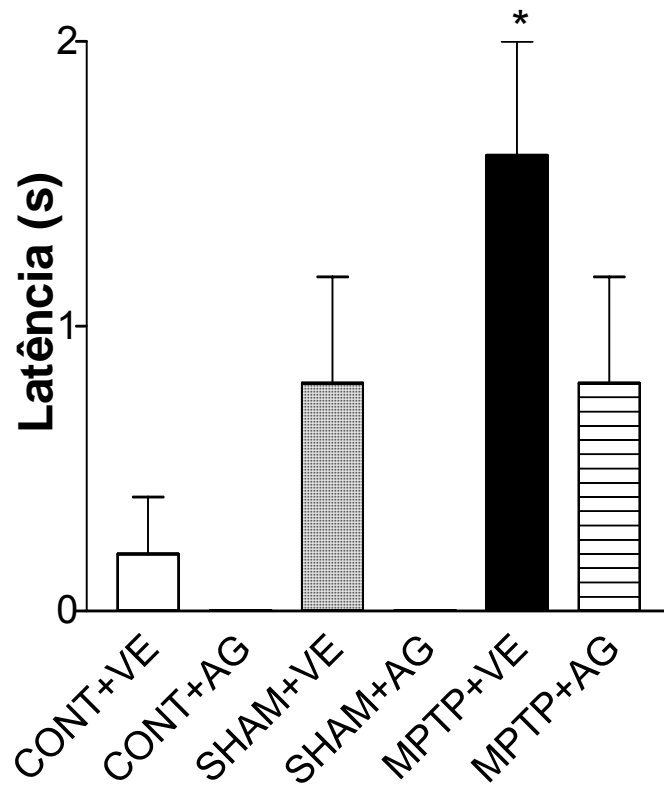


Fig. 28. Efeitos da infusão bilateral de MPTP intranigral e de Aminoguanidina (25 mg/kg – i.p.) no tempo de imobildade de ratos avaliados no campo aberto 24 horas após a cirurgia. Anova seguida do teste de Tukey-Kramer. Os dados estão representados pela média \pm erro padrão. $n = 10$ /grupo; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo CONT+VE.

Na avaliação comportamental realizada 7 dias após a lesão, os animais do grupo MPTP+VE mostraram um aumento no tempo de latência para início do movimento (Fig. 29) em comparação aos animais dos grupos CONT+VE e SHAM+VE. Nos parâmetros locomoção (Fig. 30), frequência de levantar (Fig. 31) e tempo de imobilidade (Fig. 32), não houve diferença entre os animais dos grupos MPTP+VE, CONT+VE e SHAM+VE. Os ratos do grupo MPTP+AG não apresentaram nenhuma diferença dos animais dos grupos CONT+VE e SHAM+VE em nenhum dos parâmetros avaliados. Os animais do grupo MPTP+AG, apresentaram redução no tempo de latência para início do movimento (Fig. 29) quando comparados aos ratos do grupo MPTP+VE; entretanto nos parâmetros locomoção (Fig. 30), levantar (Fig. 31) e tempo de imobilidade (Fig. 32) não houve diferença entre os grupos. Os animais dos grupos CONT+VE, CONT+AG, SHAM+VE e SHAM+AG não diferiram entre si em nenhum dos parâmetros estudados.



Tratamentos

Fig. 29. Efeitos da infusão bilateral de MPTP intranigral e de Aminoguanidina (25 mg/kg – i.p.) no tempo de latência para início do movimento de ratos avaliados no campo aberto 7 dias após a cirurgia. Anova seguida do teste de Tukey-Kramer. Os dados estão representados pela média \pm erro padrão. $n = 10$ /grupo; * $p < 0,05$ em comparação ao grupo CONT+VE.

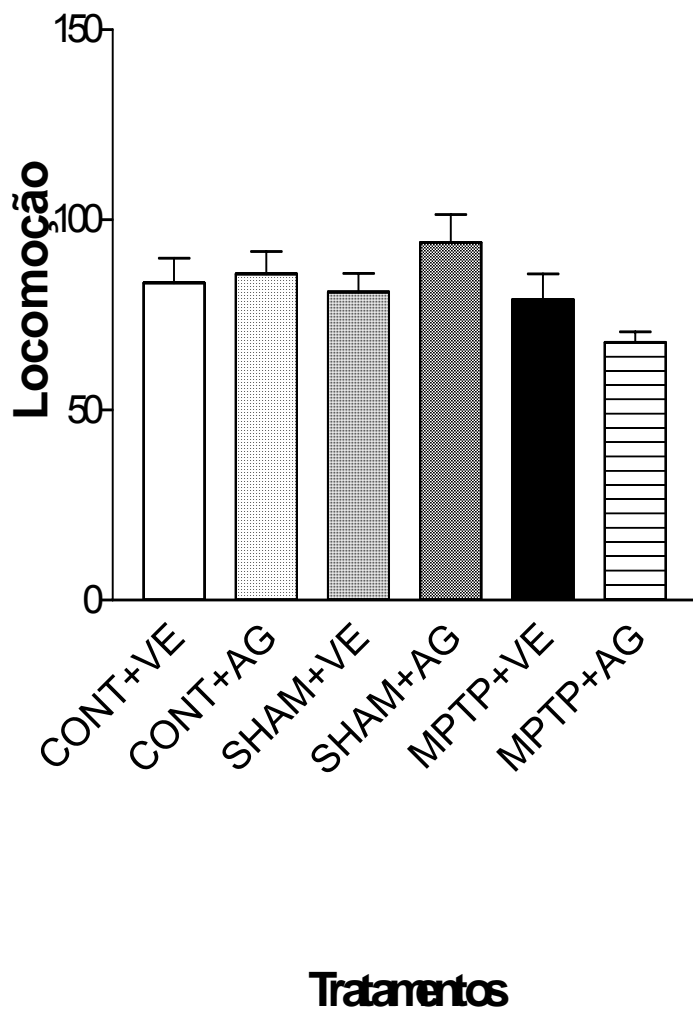


Fig. 30. Efeitos da infusão bilateral de MPTP intranigral e de Aminoguanidina (25 mg/kg – i.p.) na locomoção de ratos avaliados no campo aberto 7 dias após a cirurgia. Anova seguida do teste de Tukey-Kramer. Os dados estão representados pela média \pm erro padrão. $n = 10$ /grupo.

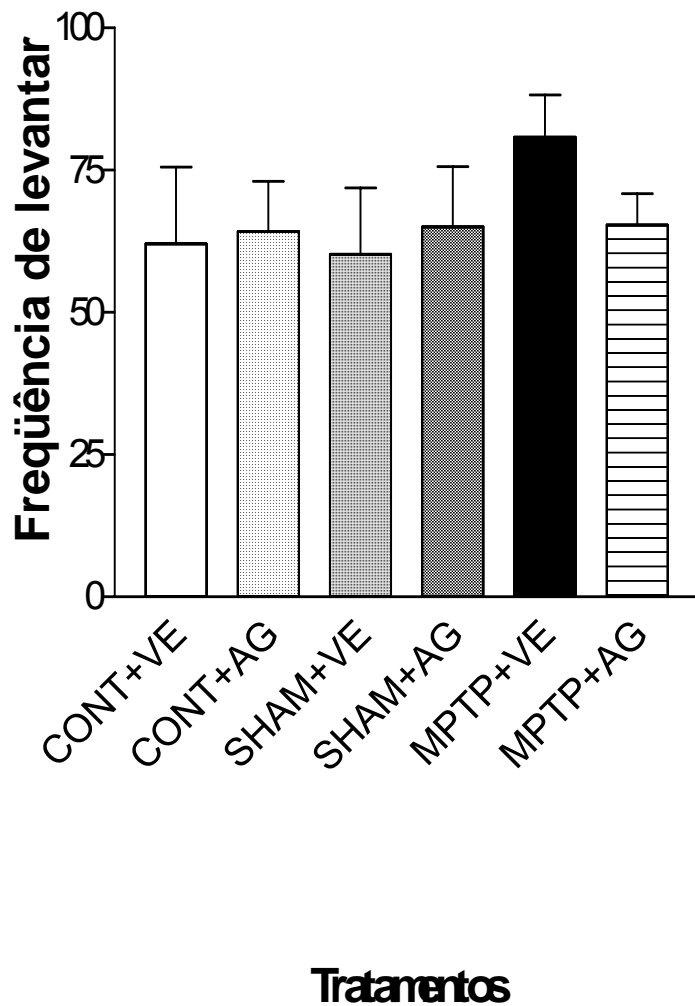
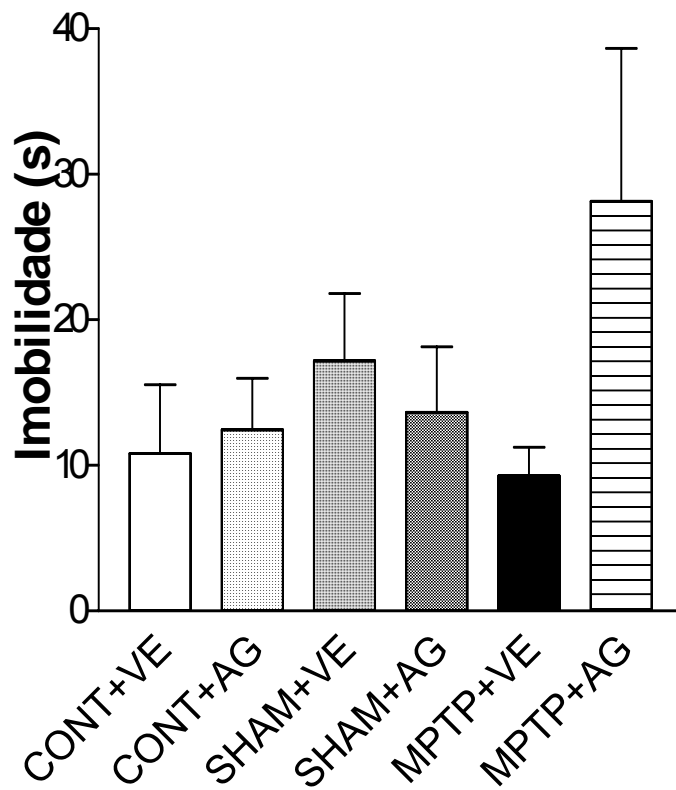


Fig. 31. Efeitos da infusão bilateral de MPTP intranigral e de Aminoguanidina (25 mg/kg – i.p.) na frequência de levantar de ratos avaliados no campo aberto 7 dias após a cirurgia. Anova seguida do teste de Tukey-Kramer. Os dados estão representados pela média \pm erro padrão. $n = 10$ /grupo.



Tratamentos

Fig. 32. Efeitos da infusão bilateral de MPTP intranigral e de Aminoguanidina (25 mg/kg – i.p.) no tempo de imobilidade de ratos avaliados no campo aberto 7 dias após a cirurgia. Anova seguida do teste de Tukey-Kramer. Os dados estão representados pela média \pm erro padrão. n = 10/grupo.

5 DISCUSSÃO

Nossos dados mostram que a infusão bilateral de MPTP na SNc causou prejuízo motor aos ratos, o que foi observado no teste do campo aberto, onde estes animais apresentaram aumento do tempo de latência para iniciar o movimento, diminuição das freqüências de locomoção e de levantar e aumento do tempo de imobilidade, o que reflete uma diminuição da atividade geral dos animais e confirma a reprodutibilidade do modelo do MPTP. Entretanto, 7 dias após a cirurgia, os animais mostraram uma recuperação do comportamento hipoativo indicando uma possível recuperação da via nigroestriatal neste período.

Nossos experimentos mostraram que o 7-NI foi capaz de prevenir a neurotoxicidade mediada pelo MPTP, o que não foi observado com o L-NAME administrado sistemicamente. Entretanto, quando o L-NAME foi administrado intranigral (3 µg) mostrou um efeito “neuroprotetor”, que não foi observado na maior dose (30 µg) desse inibidor da NOS. Com relação aos efeitos da aminoguanidina, verificamos que este inibidor da NOS, não mostrou-se capaz de impedir os efeitos comportamentais causados pelo MPTP.

De acordo com nossos experimentos o pré-tratamento com 7-NI (25 mg/kg – i.p.) foi capaz de atenuar as alterações motoras induzidas pelo MPTP e observadas no campo aberto 24 horas após a infusão da neurotoxina. Os animais do grupo MPTP+7-NI mostraram redução dos tempos de latência para iniciar o movimento e de imobilidade, e aumento das freqüências de locomoção e de levantar no campo aberto em comparação aos ratos lesados (grupo MPTP+VE). Este resultado sugere um efeito neuroprotetor do 7-NI. Todavia, a administração deste inibidor da NOS não alterou a função motora dos animais controle (não operado) e sham.

O papel do NO na fisiopatologia da lesão causada pelo MPTP já foi relatado em vários estudos (WATANABE *et al*, 2003; DUNCAN e HEALES, 2005; CASTAGNOLI *et al*, 1997; ROYLAND *et al*, 1999). Apesar do metabolismo do NO no cérebro ser de vital importância para a função cerebral normal, a sua produção excessiva é relacionada a várias patologias como doença de Alzheimer, DP e

esclerose múltipla (DUNCAN e HEALES, 2005). O NO não é a única molécula de interesse quando consideramos o estresse oxidativo. A neuroinflamação parece ser responsável por um ciclo repetitivo no qual a inflamação glial leva à produção de NO (DUNCAN e HEALES, 2005). Isto resultaria na liberação excessiva de NO em neurônios, causando liberação de glutamato com aumento do influxo de Ca^{2+} promovendo aumento da produção de NO (DUNCAN e HEALES, 2005).

Neste sentido, três isoenzimas distintas sintetizadoras de NO vêm sendo purificadas e clonadas: a nNOS, a iNOS e a eNOS. A nNOS é a principal isoforma presente no cérebro e sua atividade catalítica é identificada constitutivamente no sistema nervoso central. A iNOS é expressa em pequenas quantidades no cérebro. Entretanto, em condições patológicas, a expressão da iNOS pode aumentar nas células gliais em resposta a uma variedade de injúrias. A eNOS é principalmente localizada no endotélio de vasos sanguíneos e é discretamente expressa em algumas regiões do cérebro (LIBERATORE *et al*, 1999). Assim, a isoforma predominante da NOS no cérebro é a nNOS, a qual está implicada em funções importantes no sistema nervoso central bem como em alguns eventos fisiopatológicos. Por esta razão, o papel do NO e da nNOS nas funções do sistema nervoso central vêm sendo estudados através do uso de inibidores da NOS (SALTER *et al.*, 1995).

Em particular, a produção de $ONOO^-$ representa uma das principais origens do estresse oxidativo e esta molécula também está implicada na fisiopatologia de muitas doenças neurodegenerativas (DUNCAN e HEALES, 2005). De acordo com Obata e Yamanaka (2000), a inibição da NOS está associada com efeito neuroprotetor por impedir a formação de radicais livres induzida pelo MPP^+ , diminuindo, assim, o estresse oxidativo. Desta forma, acredita-se que o NO formado a partir da nNOS e o $ONOO^-$ aumentam o estresse oxidativo e desempenham um importante papel na neurotoxicidade causada pelo MPTP (MATTHEWS *et al*, 1997).

Diversos estudos evidenciaram a presença da isoforma neuronal da NOS no estriado (BOLAN *et al*, 2000; DE VENTE *et al*, 1998; IWASE *et al*, 1998). Camundongos “knockouts” para a nNOS são mais resistentes à toxicidade do

MPTP enquanto os “knockouts” para a eNOS não o são (GRIFFITHS, 1998). Neste sentido, Matthews *et al.* (1997), mostraram que o tamanho da lesão estriatal e a degeneração da substância negra causados pela injeção de MPP⁺ foram atenuados significativamente em camundongos “knockouts” para a nNOS, mas não nos camundongos mutantes para a eNOS.

O 7-NI é um inibidor relativamente específico para a isoforma neuronal da NOS (Schulz *et al.*, 1995). O 7-NI protegeu camundongos e babuínos da redução de dopamina e da perda de neurônios da substância negra induzida por MPTP (Schulz *et al.*, 1995; Przedborski *et al.*, 1996; Hantraye *et al.*, 1996).

Uma possível explicação para entender os presentes resultados pode advir dos estudos de SHIBATA *et al.* (1996) e SILVA *et al.* (1995), os quais mostraram que os inibidores da NOS podem aumentar a liberação de dopamina estriatal por mecanismos ainda não conhecidos. Entretanto, este dado não foi confirmado em nossos experimentos, pois o 7-NI *per se* não causou aumento da locomoção no teste do campo aberto.

Assim, nossos dados sugerem um efeito neuroprotetor do 7-NI nas nossas condições experimentais. Uma possível explicação para este efeito pode ser devido à própria inibição da nNOS, conforme discutido anteriormente. Como inicialmente proposto, o 7-NI poderia prevenir a formação excessiva do NO e o conseqüente estresse oxidativo (PRZEDBORSKI *et al.*, 1996; 1996; SCHULZ *et al.*, 1995). Todavia, alguns autores sugerem que a redução na neurotoxicidade mediada pelo MPTP não seja causada somente pela inibição desta enzima, mas também pode envolver a inibição da conversão do MPTP ao seu metabólito MPP⁺, uma transformação mediada pela MAO-B (DESVIGNES *et al.*, 1999), enzima que também participa no metabolismo oxidativo da dopamina. De acordo com ROYLAND *et al.* (1999) a conversão do MPTP a MPP⁺ ocorre duas horas após a injeção subcutânea de MPTP e o pré-tratamento com inibidores da MAO-B bloqueou a formação do MPP⁺ e atenuou a neurodegeneração (HEIKKILA *et al.*, 1984).

Nesta linha, CASTAGNOLI *et al.* (1997) já demonstraram que o 7-NI (50 µM) foi capaz de inibir a oxidação do MPTP catalisada pela MAO-B e reduziu a

formação de MPP⁺ estriatal em preparações mitocondriais de camundongos C57Bl/6. Entretanto, PRZEDBORSKI et al. (1996) verificaram que os níveis estriatais de MPP⁺ em camundongos tratados com MPTP foram inalterados pelo tratamento com doses neuroprotetoras (30 – 50 mg/kg) do 7-NI. Estas discrepâncias podem ser devidas a diferenças nas linhagens e nos substratos para a detecção enzimática empregados por estes autores.

Corroborando a hipótese da inibição da MAO-B, DESVIGNES et al. (1999) realizaram um estudo comparativo com o 7-NI (30 mg/kg, ip) e a pargilina (75 mg/kg, ip) e observaram que 7-NI causou aumento da liberação estriatal de dopamina (60%) e diminuição do DOPAC (50%), enquanto a pargilina produziu aumento do conteúdo de dopamina (em torno de 400%) e redução do DOPAC (níveis não detectáveis). Os efeitos do 7-NI sobre os níveis de dopamina e DOPAC foram menores que os da pargilina, isto poderia ser devido a duas ações opostas do 7-NI na transmissão dopaminérgica. O 7-NI poderia aumentar os níveis de dopamina pela inibição da MAO-B e reduzir a transmissão dopaminérgica estriatal devido à sua ação inibitória sobre a nNOS.

Confirmando os presentes dados, no modelo animal de parkinsonismo induzido pela administração sistêmica de reserpina verificamos que o 7-NI (25 mg/kg) foi capaz de reverter a hipolocomoção causada pela reserpina 24 e 48 hs após a sua administração tanto em camundongos swiss como em animais C57Bl/6 (Tadaiesky et al., 2006).

Pode-se ainda imaginar que um efeito conjunto, ou seja, inibição da NOS e da MAO-B tenham sido responsáveis pelo efeito neuroprotetor observado no presente estudo.

Com relação aos efeitos do L-NAME, inibidor da NOS que inibe as isoformas endotelial e neuronal da enzima (RÉUS *et al*, 1990), verificamos que o pré-tratamento com L-NAME i.p. (MPTP+L-NAME) não foi capaz de reverter os prejuízos motores causados pela infusão de MPTP. Uma possível explicação para esta ausência de efeito neuroprotetor poderia ser devida ao fato deste inibidor da NOS não ser capaz de cruzar a barreira hematoencefálica.

De acordo com REUS et al., (1990) o L-NAME atravessa a barreira hematoencefálica e inibe a nNOS, entretanto, deve-se considerar que a administração sistêmica do L-NAME inibe, preferencialmente a eNOS. Desta forma, parâmetros vasculares regulados pela eNOS, assim como o fluxo sanguíneo, estariam alterados e poderiam comprometer a interpretação dos efeitos deste inibidor no SNC. Por esta razão, pode-se aumentar a especificidade deste inibidor para a nNOS ao realizar a sua administração diretamente no SNC (BAGETTA *et al*, 1993).

Nossos dados mostram que o L-NAME administrado intranigral (3 μ g) mostrou efeito neuroprotetor pois foi capaz de prevenir os prejuízos motores causados pelo MPTP. Os animais do grupo MPTP+L-NAME (3 μ g) mostraram aumento das freqüências de locomoção e de levantar e redução dos tempos de latência para início do movimento e de imobilidade quando comparados aos animais do grupo MPTP+VE. Por outro lado, na dose de 30 μ g intranigral o L-NAME não alterou os efeitos do MPTP. Os animais do grupo MPTP+L-NAME (30 μ g) apresentaram aumento dos tempos de latência para início do movimento e de imobilidade e redução das freqüências de locomoção e de levantar de modo similar aos animais do grupo MPTP+VE.

Ou seja o presente estudo mostra que o L-NAME na menor dose (3 μ g) atenuou os efeitos comportamentais do MPTP (o que sugere um efeito neuroprotetor), entretanto, na maior dose empregada (30 μ g) o L-NAME não alterou os efeitos do MPTP. Salter *et al.*(1995) mostraram uma inibição da NOS estriatal dose-dependente após a administração do L-NAME no estriado; as doses de L-NAME utilizadas foram 3 μ g, 10 μ g, 30 μ g e 100 μ g, e o grau de inibição da NOS alcançado nos primeiros 90 minutos foram \pm 40%, \pm 60%, \pm 90% e \pm 100%, respectivamente. Deste modo, acreditamos que nas doses de L-NAME empregadas no presente estudo houve inibição da NOS, mas não sabemos como explicar esta discrepância. Uma possível hipótese pode surgir a partir do trabalho de Araki *et al.* (2001), que mostraram que altas concentrações de inibidores da NOS podem causar prejuízo motor em camundongos.

Estes últimos autores mostraram que tanto o 7-NI (40-160 mg/kg) quanto o L-NAME (40-160 mg/kg) causaram catalepsia de modo dose-dependente em camundongos. Mas somente o 7-NI produziu aumento do níveis estriatais de dopamina, enquanto o L-NAME não alterou nem os níveis de dopamina nem os de DOPAC e HVA (Araki *et al.* (2001). Este estudo sugere dois fatos muito relevantes: 1) o NO participa do controle motor; 2) o aumento dos níveis de dopamina, provavelmente é decorrente de um efeito inibidor da MAO-B só causado pelo 7-NI, como discutido anteriormente.

Num elegante estudo conduzido por ROYLAND *et al.* (1999), verificou-se a existência de uma relação temporal e causal entre o 7-NI e sua capacidade de bloquear a toxicidade mediada pelo MPTP. A relação temporal mostrou que a morte neuronal e a depleção estriatal de ATP foram completamente evitadas pelo tratamento com 7-NI imediatamente antes e 4 após a injeção de MPTP. Por outro lado, a administração do L-NAME não reverteu a redução do ATP. Esta diferença observada com os diferentes inibidores da NOS não pode ser atribuída a uma inibição reduzida da NOS, pois o L-NAME causa redução de aproximadamente 90% da atividade da NOS que é comparável ao efeito do 7-NI. Deste modo, a incapacidade do L-NAME de prevenir a redução de ATP indica que: a) a produção do NO não contribui para a falência energética induzida pelo MPTP; b) outros mecanismos além da inibição da nNOS podem estar relacionados à habilidade do 7-NI prevenir a depleção de ATP.

De fato, o efeito inibidor da MAO parece ser o principal mecanismo para explicar o efeito neuroprotetor do 7-NI. Não encontramos até o momento, nenhum trabalho que relacione o L-NAME à inibição da MAO.

O 7-NI (30 mg/kg ip e 1 mM intraestriatal) e a pargilina (75 mg/kg ip) causaram aumento da dopamina e redução do DOPAC estriatais, enquanto o L-NAME (200mg/kg ip) produziu aumento nos níveis de dopamina, sem alterar o conteúdo de DOPAC, sugerindo uma ausência de efeito inibidor da MAO para o L-NAME (DESVIGNES *et al.*, 1999).

O uso de inibidores da MAO no tratamento da DP é conhecido desde 1975, quando foi introduzida a selegelina (deprenil) na clínica neurológica (GREEN e

YOU DIM, 1975; BIRKMAYER et al., 1975). Mais recentemente surgiu a rasagilina como uma nova alternativa na inibição da MAO-B (YOU DIM e BAKHLE, 2006). Até hoje este grupo de drogas é considerado uma excelente estratégia terapêutica no tratamento da DP.

Todavia, ainda não conseguimos esclarecer porque somente a menor dose de L-NAME impediu os efeitos do MPTP. Considerando-se que a isoforma da NOS predominante em neurônios é a neuronal (DINERMAN *et al*, 1994), sugerimos que o efeito neuroprotetor verificado com a administração intranigral de L-NAME nesta dose, se deva, em sua maior parte, à inibição da nNOS. Isto porque o L-NAME é esterificado no cérebro a L-NOARG (N-nitro-L-arginina) que apresenta alta afinidade pela nNOS (SALTER et al., 1995).

Com relação aos efeitos da aminoguanidina (25 mg/kg – i.p.), um inibidor da NOS seletivo para a isoforma induzida da enzima (iNOS), nossos resultados mostram que os animais lesados com MPTP e que receberam este inibidor da NOS (ratos do grupo MPTP+AG) não diferiram dos animais do grupo MPTP+VE. Ou seja, a aminoguanidina não causou efeito neuroprotetor neste modelo animal de parkinsonismo.

De modo análogo, a aminoguanidina (50 mg/kg) não reverteu a hipoatividade de camundongos tratados com reserpina (1 mg/kg) (TADAIESKY, 2005). Deste modo, nesses dois modelos animais de parkinsonismo a inibição da iNOS não afetou o comportamento dos animais sugerindo que esta isoforma tenha pequena participação nos efeitos do MPTP e da reserpina. Por outro lado, MCNAUGHT e JENNER (1999) mostraram que a aminoguanidina atenuou a morte neuronal induzida pelo LPS em cultura de astrócitos.

Liberatore *et al.* (1999) sugerem que a nNOS não é a única isoforma da enzima com participação importante na neurodegeneração dopaminérgica que ocorre no modelo do MPTP e na DP. Estes autores sugerem que a *up-regulation* da iNOS poder levar à morte celular, principalmente pelo grande aumento da produção de NO.

O LPS aumenta a expressão da COX-2 4 a 16 horas após sua infusão intraestriatal, entretanto, não verificou-se alterações motoras nestes animais (LIMA

et al., 2006). Em outras palavras, acreditamos que a inflamação participa no processo neurodegenerativo que ocorre em modelos animais de parkinsonismo e na DP, mas que não é o principal mecanismo que inicia o processo de morte neuronal. Assim, embora nossos resultados com a aminoguanidina não tenham sido promissores, acreditamos que este e outros inibidores da iNOS devam ser melhor estudados.

Tomados em conjunto, nossos resultados sugerem que o NO participa no processo de morte neuronal induzido pela infusão intranigral de MPTP. Mais ainda, que os inibidores da nNOS como o 7-NI parecem ser candidatos promissores para impedir a toxicidade desta neurotoxina. Finalmente, acreditamos que são necessários estudos adicionais para verificar os efeitos comportamentais dos inibidores da NOS em modelos animais de memória e/ou depressão para que talvez um dia esta classe de medicamentos possa ser empregada no tratamento da DP.

6 CONCLUSÕES

- A infusão intranigral de MPTP em ratos provocou diminuição da atividade geral observada através do aumento dos tempos de latência para início do movimento e de imobilidade, e diminuição das freqüências de locomoção e de levantar dos animais quando observados no teste do campo aberto 24 horas após a infusão da neurotoxina.
- Não houve diferença entre os animais controle e sham em nenhum dos parâmetros avaliados no campo aberto.
- A administração de 7-NI na dose de 25mg/kg i.p. promoveu diminuição dos tempos de latência para início do movimento e de imobilidade, e aumento das freqüências de locomoção e de levantar dos animais do grupo MPTP+7-NI quando observados no teste do campo aberto em comparação aos animais do grupo MPTP + veículo .
- O L-NAME administrado intraperitonealmente na dose de 25mg/kg não foi capaz de prevenir os efeitos motores causados pelo MPTP observados no campo aberto.
- Quando administrado via intranigral o L-NAME, na dose de 3µg, protegeu contra o prejuízo motor induzido pelo MPTP, o que não foi observado na dose de 30µg.
- A Aminoguanidina (25mg/kg, i.p.) não foi capaz de prevenir a hipoatividade nos ratos que receberam MPTP em comparação aos grupos sham e controle.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeijeiras, Á.H-, Álvarez, E.M-, Iglesias, S.S-, Suárez C.S-, Otero, R.S-, 2003. Autoxidation and MAO-mediated metabolism of dopamine as a potential cause of oxidative stress: role of ferrous and ferric ions. *Neurochemistry International*.
- Ames, B.N., 1989. Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer. *Free Radical Res. Commun*, 7, 121-128.
- Antunes, F., Han, D., Rettori, D., Cadenas, E., 2002. Mitochondrial damage by Nitric oxide is potentiated by dopamine in PC12 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 1556, 2-3, 233-238.
- Araki, T., Mizutani, H., Mitsunobo, M., Imai, Y., Mizugaki, M., Itoyama, Y., 2001. Nitric oxide synthase inhibitors cause motor deficits in mice. *European Neuropsychopharmacology*, 11, 2, 125-133.
- Bloem, B.R., Irwin, I., Buruma, O.J.S., Haan, J., Roos, J., Tetrud, J.W., Langston, J.W., 1990. The MPTP model: versatile contributions to the treatment of idiopathic Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci*, 97, 273-293.
- Blum, D., Torch, S., Lambeng, N., Nissou, M.F., Sadoul, R., Verna, J.M., 2001. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*. 65, 2, 135-172.
- Bolan, E.A., Gracy, K.N., Chan, J., Trifiletti, R.R., Pickel, V.M., 2000. Ultrastructural localization of nitrotyrosine within the caudate-putamen nucleus and the globus pallidus of normal rat brain. *J. Neurosc.*, 20, 4798-4808.

Burns, R.S., Chiueh, C.C., Markey, S.P., Ebert, M.H., Jacobowitz, D.M., Kopin, I.J., 1983. A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 4546-4550.

Calne, D.B., 2001. Parkinson's disease is not one disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, 7, 3-7.

Castagnoli, K., Palmer, S., Anderson, A., Bueters, T., Castagnoli, N.Jr., 1997. The Neuronal Nitric Oxide Synthase Inhibitor 7-Nitroindazole Also Inhibits the Monoamine Oxidase-B-Catalyzed Oxidation of 1-Methyl-4-phenyl-1, 2,3,6-tetrahydropyridine. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 364-368.

Contestabile, A., 2000. Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. *Brain Res.*, 32, 476-509.

Dawson, V.L., Dawson, T.M., London, E.D., Bretz, D.S., Snyder, S.H., 1991. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 6368-6371.

Dawson, V.L., Dawson, T.M., 1996. Nitric oxide neurotoxicity. *J. Chem. Neuroanat*, 10, 179-190.

Dehmer, T., Lindenau, J., Haid, S., Dichgans, J., Schulz, J.B., 2000. Deficiency of inducible nitric oxide synthase protects against MPTP toxicity in vivo. *J. Neurochem.*, 74, 2213-2216.

De Vente, J., Hopkins, D.A., Markerink-Van Ittersum, M., Emson, P.C., Schmidt, H.H.H.W., Steinbusch, H.W.M., 1998. Distribution of nitric oxide-receptive, cyclic GMP-producing structures in the rat brain. *Neuroscience*, 87, 207-241.

Desvignes, C., Bert L., Vinet L., Denoroy L., Renaud B., Lambás-Señas L., 1999. Evidence that the neuronal nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole inhibits monoamine oxidase in the rat: in vivo effects on extracellular striatal dopamine and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid. *Neuroscience Letters*, 264, 5-8.

Dringen, R., 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog. Neurobiol.*, 62, 649-671.

Duncan, A.J., Heales, S.J.R., 2005. Nitric oxide and neurological disorders. *Molecular Aspects of Medicine*. 26, 67-96.

Eberhardt, O., Schulz, J.B., 2003. Apoptotic mechanisms and antiapoptotic therapy in the MPTP model of Parkinson's disease. *Toxicology Letters*. 139, 135-151.

Ferrante, R.J., Hantraye, P., Brouillet, E., Beal, M.F., 1999. Increased nitrotyrosine immunoreactivity in substantia nigra neurons in MPTP treated baboons is blocked by inhibition of neuronal nitric oxide synthase. *Brain Res.*, 823, 177-182.

Furfine, E.S., Harmon, M.F., Paith, J.E., Garvey, E.P., 1993. Selective inhibition of constitutive nitric oxide synthase by L-N^G-nitroarginine. *Biochemistry*, 32, 8512-8517.

Gerlach, M., Riederer, P., 1996. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *Journal of Neural Transmission*. 103, 987-1041.

Giasson, I.B., Ischiropoulos, H., Lee, V.M.Y., Trojanowski, J.Q., 2002. The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 32, 12, 1264-1275.

Gomes, M.Z., Bel, E.A. Del. 2003. Effects of eletrolytic and 6-hydroxydopamine lesions of rat nigrostriatal pathway on nitric oxide synthase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase. *Brain Research Bulletin*. 62, 107-115.

Hantraye, P., Brouillet, E., Ferrante, R., Palfi, S., Dolan, R., Matthews, R.T., Beal, M.F., 1996. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents MPTP-induced-parkinsonism in baboons. *Nat. Med.*, 2, 1017-1021.

Heiberg, I.L., Wegener, G., Rosenberg, R., 2002. Reduction of cGMP and nitric oxide has antidepressant-like effects in the forced swimming test rats. *Behavioural Brain Research*. 134, 1-2, 479-484.

Heukkila, K.E., Manzino, L., Cabbat, F.S., Duvoisin, R.C., 1984. Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors. *Nature*. 311, 467-469.

Iwase, K., Iyama, K., Akagi, K., Yano, S., Fukunaga, K., Mi, yamoto, E., Mori, M., Takiguchi, M., 1998. Precise distribution of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the rat brain revealed by non-radioisotopic in situ hybridization. *Mol. Brain Res.*, 53, 1-12.

Kharazia, V.N., Schmidt, H.H.H.W., Weinberg, R.J., 1994. Type I nitric oxide synthase fully accounts for NADPH-diaphorase in rat striatum but not cortex. *Neurosc.*, 4, 62, 983-987.

Lang, A.E., Obeso, J.A., 2004. Challenges in Parkinson's disease: restoration of the nigrostriatal dopamine system is not enough. *Neurology*. 3, 309-316.

Le, W., Appel, S.H., 2004. Mutant genes responsible for Parkinson's disease. *Current Opinion in Pharmacology*. 4, 1, 79-84.

Liberatore, G.T., Jackson-Lewis, V., Vukosavic, S., Mandir, A.S., Vila, M., McAulie, W.G., Dawson, V.L., Dawson, T.M., PRZEDBORSKI, S., 1999. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat. Med.* 5, 1403-1409.

Lipton, S.A., Choi, Y.B., Pan, Z.H., Chen, H.S.V., Sucher, N.J., Loscalzo, J., Singel, D.J., Stamler, J.S., 1993. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nat. Lond.*, 364, 626-632.

Matthews, R.T., Beal, M.F., Fallon, J., Fedorchak, K., Huang, P.L., Fishman, M.C., Hyman, B.T., 1997. MPP⁺ induced substantia nigra degeneration is attenuated in nNOS knockout in mice. *Neurobiol. Dis.*, 4, 114-121.

Montine, K.S., Quinn, J.F., Zhang, J., Fessel, J.P., Roberts, L.J., Morrow, J.D., Montine, T.J., 2004. Isoprostanes and related products of lipid peroxidation in neurodegenerative diseases. *Chemistry and Physics of Lipids*. 128, 1-2, 117-124.

Obata, T., 2002. Role of hydroxyl radical formation in neurotoxicity as revealed by in vivo free radical trapping. *Toxicology Letters*. 132, 2, 83-93.

Obata, T., Yamanaka, Y., 2000. Methamphetamine enhances 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced hydroxyl radical generation in the rat striatum. *Neurosc. Lett.* 292(1), 54-56.

Park, S-W *et al.*, 2004. Preventive effect of antioxidants in MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*. xx, 1-4.

Paul, G., Meissner, W., Rein, S., Harnack, D., Winter, C., Hosmann, K., Morgenstern, R., Kupsch, A., 2004. Ablation of the subthalamic nucleus protects survival in a rat model of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*. 185, 2, 272-280.

Pokk, P., Väli, M., 2002. Effects of Nitric Oxide Synthase Inhibitors 7-NI, L-NAME and L-NOARG in Staircase Test. *Archives of Medical Research*. 33, 3, 265-268.

Prast, H., Philippu, A., 2001. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Progress in Neurobiology*. 64, 1, 51-68.

Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., Yokoyama, R., Shibata, T., Dawson, V.L., Dawson, T.M., 1996. Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine MPTP -induced dopaminergic neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 4565-4571.

Royland, J.E., Delfani, K., Langston, J.W., Janson, A.M., Monte, D.A.D., 1999. 7-Nitroindazole prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced ATP loss in the mouse striatum. *Brain Research*. 839, 1, 41-48.

Sagin, F.G., Sozmen, E.Y., Ersoz, B., Montes, G., 2004. Link Between Monoamine Oxidase and Nitric Oxide. *NeuroToxicology*. 25, 1-2, 91-99.

Salter, M., Duffy, C., Garthwaite Jr., Strybos, P.J., 1995. Substantial Regional and Hemispheric differences in brain nitric oxide synthase (NOS) inhibition following intracerebroventricular administration of N omega-nitro-L-arginina (L-NA) and its methyl ester (L-NAME). *Neuropharmacology*. 34(6), 639-649.

Sandor, N.T., Brassai, A., Puskas, A., Lendvai, B., 1995. Role of nitric oxide in modulating neurotransmitter release from rat. *Brain Res. Bull*, 36, 483-486.

Schulz, J.B., Matthews, R.T., Muqit, M.M., Browne, S.E., Beal, M.F., 1995. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. *J. Neurochem.*, 64, 936-939.

Shastri, B.S., 2001. Parkinson's disease: etiology, pathogenesis and future of gene therapy. *Neuroscience Research*. 41, 1, 5-12.

Shibata, M., Araki, N., Ohta, K., Hamada, J., Shimazu, K., Fukuuchi, Y., 1996. Nitric oxide regulates NMDA-induced dopamine release in rat striatum. *NeuroReport*, 7, 605-608.

Shimohama, S., Sawada, H., Kitamura, Y., Taniguchi, T., 2003. Disease model: Parkinson's disease. *Trends in Molecular Medicine*. 9, 8, 360-365.

Sidhu, A. *et al.*, 2004. α -Synuclein regulation of the dopaminergic transporter: a possible role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *FEBS Letters*. 565, 1-5.

Silva, M.T., Rose, S., Hindmarsh, J.G., Aislaitner, G., Gorrod, J.W., Moore, P.K., Jenner, P., Marsden, C.D., 1995. Increased striatal dopamine efflux *in vivo* following inhibition of cerebral nitric oxide synthase by the novel monosodium salt of 7-nitroindazole. *Br. J. Pharmacol.*, 114, 257-258.

Southan, G.J., Szabo, C., 1996. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Bioch. Pharmacol.*, 51, 383-394.

Speciale, S.G., 2002. MPTP Insights into parkinsonian neurodegeneration. *Neurotoxicology and Teratology*. 24, 5, 607-620.

Strasser, A., McCarron, R.M., Ishii, H., Stanimirovic, D., Spatz, M., 1994. L-Arginine induces dopamine release from the striatum *in vivo*. *Neuroreport*, 5, 2298-2300.

Tadaiesky, M.T., Andreatini, R., Vital, M.A., 2006. Different effects of 7-nitroindazole in reserpine-induced hypolocomotion in two strains of mice. *Eur. J. Pharmacol.* 535, 199-207.

Tipson, K.F., Singer, T.P., 1993. Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds. *J. Neurochem.*, 61, 1191-1206.

Van Muiswinkel, F.L., Drukarch, B., Steinbusch, H.W., De Vente, J., 1998. Sustained pharmacological inhibition of nitric oxide synthase does not affect the survival of intrastriatal rat fetal mesencephalic transplants. *Brain Res.*, 792, 48-58.

Vincent, S.R., Kimura, H., 1992. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*, 46, 755-784.

Watanabe, H., Muramatsu, Y., Kurosaki, R., Michimata, M., Matsubara, M., Imai, Y., Araki, T., 2003. Protective effects of neuronal nitric oxide synthase inhibitor in mouse brain against MPTP neurotoxicity: an immunohistological study. *European Neuropsychopharmacology*.

Wei, T., Zhao, X., Hou, J., Ogata, K., Sakaue, T., Mori, A., Xin, W., 2003. The antioxidant ESeroS-GS inhibits NO production and prevents oxidative stress in astrocytes. *Biochemical Pharmacology*. 66, 1, 83-91.

West, A.R., Galloway, M.P., 1997. Endogenous Nitric Oxide Facilitates Striatal Dopamine and Glutamate Efflux *in vivo*: Role of Ionotropic Glutamate Receptor-Dependent Mechanism. *Neuroph.*, 36, 11/12, 1571-1581.

West, A.R., Galloway, M.P., 1996b. Intrastriatal infusion of (\pm)-S-nitroso-N-acetylpenicillamine releases vesicular dopamine via an ionotropic glutamate receptor-mediated mechanism: an *in vivo* microdialysis study in chloral hydrate-anesthetized rats. *J. of Neurochemistry*, 66, 1971-1980.

Zhang, L., Dawson, V.L., Dawson, T.M., 2006. Role of nitric oxide in Parkinson's disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 109, 33-41.