UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

LISSIANA MAGNA VASCONCELOS AGUIAR

# ANTAGONISMO DO RECEPTOR DA ADENOSINA $A_{2A}$: NOVA PERSPECTIVA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON

FORTALEZA
2009

# Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

LISSIANA MAGNA VASCONCELOS AGUIAR

# ANTAGONISMO DO RECEPTOR DA ADENOSINA $A_{2A}$: NOVA PERSPECTIVA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana.

FORTALEZA
2009

A23a Aguiar, Lissiana Magna Vasconcelos

Antagonismo do receptor da adenosina $A_{2A}$: nova perspectiva para o tratamento da doença de Parkinson./ Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar. – Fortaleza, 2009.

214f.: il.

Orientador: Profª. Drª. Glauce Socorro de Barros Viana.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza-Ce, 2009.

1. Doença de Parkinson. 2. Receptor $A_{2A}$ de adenosina. 3. Corpo estriado. I. Viana, Glauce Socorro de Barros (Orient.) II. Título.

CDD T616.833

LISSIANA MAGNA VASCONCELOS AGUIAR

# ANTAGONISMO DO RECEPTOR DA ADENOSINA $A_{2A}$: NOVA PERSPECTIVA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

_____
Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará-UFC

_____
Profa. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

_____
Profa. Dra. Caden Souccar
Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

_____
Profa. Dra. Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará-UFC

_____
Prof. Dra. Marta Maria Fonteles Marinho
Universidade Federal do Ceará-UFC

A Deus, a quem tudo devo.

Ao meu esposo Thales, minha filha Lícia, meus Pais, Irmãos e Sogros
por todo apoio, incentivo e paciência.

## AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, por ter me iluminado durante a execução desse trabalho assim com tem feito sempre em minha vida.

À Dra. Glauce Socorro de Barros Viana, minha orientadora, que sempre foi para mim um modelo de pesquisadora, pelo saber, confiança, incentivo e compreensão durante a execução deste trabalho.

À Dra. Marta Maria de França Fonteles, por ter me acolhido com tanto carinho e me permitido ingressar na pesquisa, me orientando e me ajudando em todos os sentidos e pela amizade sincera.

Às Professoras Thereza Christina Monteiro de Lima e Caden Souccar, por terem gentilmente aceito o convite para participar da banca examinadora.

A Profa. Geanne e ao Hélio por todas as contribuições durante a realização desse trabalho e principalmente pela ajuda na realização dos experimentos *in vitro*.

À Dra. Fca. Cléa Florenço de Sousa, minha, maravilhosa co-orientadora que está sempre me apoiando com seu sorriso franco e sua amizade acolhedora.

Às Profas. Silvânia e Danielle pela contribuição inestimável, pela paciência quase sem fim e pela nossa amizade, da qual eu me orgulho muito.

A minha família por ter suportado os momentos de ausência.

As minhas amigas Aline, Isabel, Verinha, Patrícia, Emmanuelle, pela amizade e apoio em todos os momentos.

A todo o pessoal do Laboratório de Neurofarmacologia, em especial aos bolsistas, principalmente pela amizade e ajuda em alguns experimentos e as técnicas do Laboratório, Vilani e Jaqueline.

Aos Professores, secretárias e funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, em especial à Aura.

Às bibliotecárias Norma e Rosane, da biblioteca de Ciências da Saúde da UFC, por me auxiliarem na revisão deste trabalho.

A todos que, de alguma forma, colaboraram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho. Muito obrigada.

"Quanto melhor é adquirir a sabedoria do que o ouro! E quanto mais excelente é escolher o entendimento do que a prata."

(prov. 16:16)

## RESUMO

**Antagonismo do receptor da adenosina $A_{2A}$: nova perspectiva para o tratamento da doença de Parkinson. LISSIANA MAGNA VASCONCELOS AGUIAR. Orientadora: Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2009.**

A doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa, caracterizada pela destruição dos neurônios nigroestriatais dopaminérgicos. O tratamento atual para esta doença está restrito ao alívio sintomático, porque até o presente momento não existem agentes capazes de inibir a degeneração neuronal. Existem evidências experimentais de que antagonistas de receptores $A_{2A}$ da adenosina poderiam ser úteis no tratamento de DP. Com a finalidade de investigar essa possibilidade, o presente trabalho demonstrou os efeitos da cafeína e do CSC (*8-(3-chlorostyryl caffeine*) no comportamento rotacional e nas alterações neuroquímicas em ratos lesionados com 6-OHDA, como modelo da doença de Parkinson. Os animais (ratos Wistar machos, 250-280g) foram tratados com cafeína (10 e 20 mg/kg, i.p.) diariamente durante 14 dias, iniciando 1h após a lesão ou 7 dias, iniciando seis dias após a lesão com 6-OHDA ou com CSC (1 e 5 mg/kg, i.p.) diariamente durante 7 dias, iniciando 6 dias após a lesão com 6-OHDA, sozinho ou associado com L-DOPA (CSC 1 mg/kg, i.p. + L-DOPA 50mg/kg + Benzerazida 12,5 mg/kg, i.p.). Os resultados mostraram que houve um aumento significativo do número de rotações induzidas por apomorfina nos animais lesionados com 6-OHDA (50 vezes) quando comparados aos animais falso operados. O tratamento com cafeína, principalmente durante 14 dias e o tratamento com CSC produziram uma recuperação motora parcial com redução do número de rotações. A 6-OHDA provocou morte neuronal evidenciada pela redução dos níveis de monoaminas (75-85%) quando comparadas ao lado contralateral. Nos grupos tratados com cafeína ou CSC sozinho ou associado com L-DOPA a redução dos níveis de DA, 5HT e seus metabólitos foi menor. As concentrações dos aminoácidos glutamato e GABA foram significativamente aumentadas (3,8 e 3 vezes, respectivamente) no estriado de ratos lesionados. O CSC reverteu essas alterações significativamente e foi observada uma potencialização desses efeitos na associação com L-DOPA. Os experimentos *in vitro* demonstraram que a cafeína e o CSC apresentaram um forte efeito neuroprotetor nas células mesencefálicas de rato expostas a 6-OHDA. O tratamento com CSC ou cafeína aumentou significativamente o número de células viáveis após a exposição das células a 6-OHDA, como foi demonstrado pelo teste do MTT. A exposição das células mesencefálicas a 6-OHDA aumentou os conteúdos de nitrito e a peroxidação lipídica, que retornaram a concentrações normais após tratamento com CSC ou cafeína. Além disso, a 6-OHDA reduziu o número de células normais e aumentou o número de células apoptóticas e o tratamento com CSC ou cafeína reverteu esses efeitos da 6-OHDA, promovendo aumento do número de células viáveis e redução do número de células apoptóticas. Houve uma redução do número de microglias ativadas após a exposição das células a cafeína e a 6-OHDA, o mesmo não ocorreu após a exposição das células ao CSC e a 6-OHDA. O tratamento com cafeína reduziu o aumento do número de astrócitos reativos induzidos pela 6-OHDA, enquanto o CSC não apresentou esse efeito. Esses resultados mostraram que ambos, a cafeína e o CSC apresentaram ações neuroprotetoras em células mesencefálicas de rato expostas a 6-OHDA. O presente trabalho mostrou que a cafeína e o CSC reverteram às alterações comportamentais e neuroquímicas da 6-OHDA, apresentando efeitos possivelmente benéficos no tratamento da DP.



Palavras-chave: Doença de Parkinson. Receptor da Adenosina $A_{2A}$. Corpo Estriado.

## ABSTRACT

**Adenosine $A_{2A}$ receptor antagonists: a new alternative for parkinson disease treatment. LISSIANA MAGNA VASCONCELOS AGUIAR. Supervisor: Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana. Doctorate's thesis. Post-graduation Program in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, UFC, 2009.**

Parkinson disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta. Antagonists of the $A_{2A}$ subtype of adenosine receptor have emerged as a target for nondopaminergic antiparkinsonian agents. The present work showed the effects of caffeine and 8-(-3-chlorostyryl)-caffeine (CSC), $A_{2A}$ receptors antagonists, on behavior and biochemical alterations in 6-OHDA-lesioned rats, as a model of PD. Animals (male Wistar rats, 260-280 g) were injected daily with caffeine (10 and 20 mg/kg,i.p., 1h after 6-OHDA lesion for 14 days or six days after 6-OHDA lesion for 7 days), or CSC (1 and 5 mg/kg, i.p., 1h after 6-OHDA lesion for 7 days) alone or associated with L-DOPA (CSC 1 mg/kg, i.p. + L-DOPA 50mg/kg + Benzerazida 12,5 mg/kg, i.p., six days after 6-OHDA lesion for 7 days). Fourteen days after 6-OHDA, the animals' behavior was assessed by monitoring body rotations induced by apomorphine (3 mg/kg, i.p.). The results showed that the drastic increase in body rotation, induced by the 6-OHDA lesion, after the apomorphine challenge, was significantly (50 times) and dose-dependently reversed by CSC or caffeine. The decreased striatal levels of DA and metabolites, in the 6-OHDA-lesioned rats (75-85%), were blocked after caffeine or CSC alone or in association with L-DOPA treatment as well as the concentrations of NE, 5-HT and 5-HIAA. These effects were potentiated in 6-OHDA-lesioned animals treated with the association of CSC and L-DOPA. Concentrations of the amino acids glutamate and GABA were significantly increased (3.8 and 3 times, respectively) in the 6-OHDA-lesioned rat striatum. Similarly, CSC also reversed these alterations significantly. We also demonstrated protective effects against 6-OHDA-induced cytotoxicity in rat mesencephalic cells. Caffeine or CSC significantly increased the number of viable cells after their exposure to 6-OHDA, as measured by the MTT assay. While nitrite levels and lipid peroxidation in the cells were drastically increased by 6-OHDA, its concentration was brought toward normality after caffeine or CSC. 6-OHDA decreased the number of normal cells while increasing the number of apoptotic cells. Caffeine or CSC, significantly recovered the number of viable cells, and decreased the number of apoptotic cells, as compared to the group treated with 6-OHDA alone. Interestingly, while a significant lower number of activated microglia was seen after cells exposure to caffeine plus 6-OHDA, this was not the case after cells exposure to CSC plus 6-OHDA. While caffeine lowered the percentage of reactive astrocytes increased by 6-OHDA, CSC showed not effect. These results showed a strong neuroptrotection afforded by caffeine or CSC on rat mesencephalic cells exposed to 6-OHDA. In conclusion, we showed that CSC or caffeine reversed behavior and biochemical alterations, observed in the 6-OHDA-lesioned rats, pointing out to the potential benefit of $A_{2A}$ receptors antagonists as non-dopaminergic therapeutic targets for the treatment of PD.



Key-words: Parkinson Disease. Receptor Adenosine $A_{2A.}$ Corpus Striatum.

## LISTA DE FIGURAS


| | | |
|---|---|---|
| **1** | Estruturas dos gânglios basais, relacionadas ao Mal de Parkinson..... | **20** |
| **2** | O balanço entre as ações estimulatórias e inibitórias mantendo o funcionamento normal do circuito neuronal e as possíveis alterações que ocorrem na doença de Parkinson..... | **25** |
| **3** | Principais vias dopaminérgicas no SNC..... | **27** |
| **4** | Distribuição dos receptores da adenosina de alta afinidade ($A_1$, $A_{2A}$ e $A_3$), nas diferentes regiões do SNC..... | **51** |
| **5** | Receptores da adenosina..... | **52** |
| **6** | Mecanismo proposto para a atividade anti-parkinsoniana dos antagonistas $A_{2A}$..... | **64** |
| **7** | Excitotoxicidade mediada pelo glutamato..... | **67** |
| **8** | Teste rotacional..... | **79** |
| **9** | Dissecação do corpo estriado (CE)..... | **80** |
| **10** | Estruturas químicas do MTT e do MTT formazan..... | **94** |
| **11** | Determinação do comportamento rotacional induzido por apomorfina (3 mg/kg, i.p.) por 60 min, em ratos com lesão estriatal por 6-OHDA, tratados com cafeína (nas doses de 10 e 20 mg/kg, i.p. diariamente durante 7 dias. O tratamento foi iniciado seis dias após a lesão com 6-OHDA)..... | **99** |
| **12** | Determinação do comportamento rotacional induzido por apomorfina (3 mg/kg, i.p.) por 60 min, em ratos com lesão estriatal por 6-OHDA, tratados com cafeína (10 e 20 mg/kg, i.p. diariamente durante 14 dias. O tratamento foi iniciado 1h após a lesão com 6-OHDA)..... | **100** |
| **13** | Determinação das concentrações de DA e seus metabólitos (DOPAC e HVA) em corpo estriado de ratos com lesão induzida por 6-OHDA, e tratados com cafeína (nas doses de 10 e 20 mg/kg, i.p. diariamente durante 14 dias. O tratamento foi iniciado 1h após a lesão com 6-OHDA)..... | **105** |

| | | |
|---|---|---|
| **14** | Determinação das concentrações de NE e 5-HT e seu metabólito (5-HIAA) em corpo estriado de ratos com lesão induzida por 6-OHDA, e tratados com cafeína (nas doses de 10 e 20 mg/kg, i.p. diariamente durante 14 dias. O tratamento foi iniciado 1h após a lesão com 6-OHDA)..... | **106** |
| **15** | Efeito do CSC *(8-(3-chlorostyryl caffeine)* nas concentrações de DA, DOPA e HVA em estriado de ratos lesionados com 6-OHDA (ng/mg de tecido)..... | **109** |
| **16** | Efeito do CSC *(8-(3-chlorostyryl caffeine)* nas concentrações de NE, 5-HT e 5-HIAA em estriado de ratos lesionados com 6-OHDA (ng/mg de tecido)..... | **110** |
| **17** | Efeito da cafeína na toxicidade induzida por 6-OHDA, em células mesencefálicas de ratos..... | **122** |
| **18** | Efeito do CSC *(8-(3-chlorostyryl caffeine)* na toxicidade induzida por 6-OHDA, em células mesencefálicas de ratos..... | **123** |
| **19** | Efeito da cafeína sobre as concentrações de nitrito/nitrato em células mesencefálicas de rato após a exposição a 6-OHDA..... | **125** |
| **20** | Efeito do CSC *(8-(3-chlorostyryl caffeine)* sobre as concentrações de nitrito em células mesencefálicas de rato após a exposição a 6-OHDA..... | **126** |
| **21** | Efeito do CSC *(8-(3-chlorostyryl caffeine)* na formação de nitrito em estriado ipsilateral de ratos lesionados com 6-OHDA | **128** |
| **22** | Efeito da cafeína sobre a peroxidação lipídica nas células após exposição a 6-OHDA..... | **130** |
| **23** | Efeito do CSC *(8-(3-chlorostyryl caffeine)* sobre a peroxidação lipídica nas células após exposição a 6-OHDA..... | **131** |
| **24** | Efeito do CSC *(8-(3-chlorostyryl caffeine)* sobre a peroxidação lipídica em estriado de ratos lesionados com 6-OHDA..... | **133** |
| **25** | Efeito da cafeína na morte celular por apoptose em cultura de células mesencefálicas expostas a 6-OHDA..... | **135** |
| **26** | Efeito do CSC *(8-(3-chlorostyryl caffeine)* na morte celular por apoptose em cultura de células mesencefálicas expostas a 6-OHDA..... | **136** |

**27** Efeito da cafeína sobre a percentagem de células OX-42 positivas em cultura de células mesencefálicas de ratos expostas a 6-OHDA..... **138**

**28** Efeitos da cafeína sobre a percentagem de células GFAP positivas em cultura de células mesencefálicas de ratos expostas a 6-OHDA..... **139**

**29** Efeitos do CSC *(8-(3-chlorostyryl caffeine)* sobre a percentagem de células OX-42 positivas em cultura de células mesencefálicas de ratos expostas a 6-OHDA..... **140**

**30** Efeitos do CSC *(8-(3-chlorostyryl caffeine)* sobre a percentagem de células GFAP positivas em cultura de células mesencefálicas de ratos expostas a 6-OHDA..... **141**

## LISTA DE TABELAS


| | | |
|---|---|---|
| **1** | Efeitos do CSC *(8-(3-chlorostyryl caffeine)*, sozinho ou associado com L-DOPA (L-DOPA 50 mg/kg + benzerazida 12,5 mg/kg), no comportamento rotacional induzido por apomorfina em ratos, após lesão estriatal induzida por 6-OHDA | **101** |
| **2** | Efeitos da cafeína administrada durante 7 ou 14 dias nas concentrações de dopamina e seus metabólitos (DOPAC e HVA) em corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA..... | **107** |
| **3** | Efeitos da cafeína administrada durante 7 ou 14 dias nas concentrações de noradrenalina, serotonina e do seu metabólito em corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA..... | **108** |
| **4** | Efeitos do CSC (*8-(3-chlorostyryl)caffeine*) sozinho ou associado com L-DOPA e da L-DOPA sozinha nas concentrações de dopamina e seus metabólitos (DOPAC e HVA) em corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA..... | **111** |
| **5** | Efeitos do CSC (*8-(3-chlorostyryl)caffeine*) sozinho ou associado com L-DOPA e da L-DOPA sozinha nas concentrações de NE, 5-HT e 5-HIAA em corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA..... | **112** |
| **6** | Efeitos da cafeína nas concentrações de Glutamato e GABA no corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA..... | **114** |
| **7** | Efeitos do CSC *(8-(3-chlorostyryl)caffeine)* sozinho ou associado com L-DOPA e da L-DOPA sozinha nas concentrações de Glutamato e GABA no corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA..... | **115** |
| **8** | Efeitos da cafeína ou do CSC *(8-(3-chlorostyryl caffeine)* no *binding* de receptores $D_1$ e $D_2$-símile (Bmax e Kd) em corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA..... | **118** |
| **9** | Efeitos da cafeína ou do CSC *(8-(3-chlorostyryl caffeine)* no *binding* de receptores GABAérgicos ($[^3H]$-GABA) e receptores glutamatérgicos ($[^3H]$-glutamato) no corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA..... | **120** |

## LISTA DE QUADROS


| | | |
|---|---|---|
| **1** | Propriedades e localizações dos subtipos de receptores dopaminérgicos..... | **28** |
| **2** | Propriedades biológicas dos receptores da adenosina em humanos..... | **54** |
| **3** | Principais materiais utilizados nos experimentos..... | **74** |
| **4** | Protocolo de Tratamento Experimental com cafeína..... | **76** |
| **5** | Protocolo de Tratamento Experimental com CSC..... | **77** |
| **6** | Resumo das alterações comportamentais e neuroquímicas da cafeína e do CSC *(8-(3-chlorostyryl caffeine)* em corpo estriado (CE) de ratos lesionados com 6-OHDA..... | **166** |
| **7** | Resumo das alterações neuroquímicas da cafeína e do CSC *(8-(3-chlorostyryl caffeine)* em cultura de células mesencefálicas de rato expostas a 6-OHDA..... | **167** |

## LISTA DE ESQUEMAS


| | | |
|---|---|---|
| **1** | Tratamento com cafeína durante 7 ou 14 dias após a lesão (protocolo 1)..... | **77** |
| **2** | Tratamento com CSC (1 e 5 mg/kg, i.p.), sozinho ou em asociação com L-DOPA (CSC 1mg/kg e L-DOPA 50 mg/kg associado a benserazida 12,5 mg/kg, i.p. – Prolopa ®) (protocolo 2)..... | **78** |

## LISTA DE ABREVIATURAS

**6-OHDA** - 6-hidroxidopamina
**ACPD** - Aminociclopentano-1,3-ácido descarboxílico
**AMPA** - Proprionato de α-amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxale
**AMPc** - 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico
**ANOVA** - Análise de variância
**ATP** - Adenosina tri-fosfato
**ATV** - Área tegmentar ventral
**BSA** - Albumina sérica bovina
**CA** - Cainato
**CE** - Corpo estriado
**CGS 21680** - 2-[p-(2-carboxyethyl)phenethylamino]-5'- N- ethylcarboxamidoadenosine
**CHPG** - Carboxi-3-hidroxifenilglicina
**c.p.m.** - Cintilações por minuto
**5HIAA** - Ácido 5 hidroxiindolacético
**5HT** - Serotonina
**COMT** - Catecol-o-metil transferase
**CSC** - *8-(3-chlorostyryl)caffeine*
**DA** - Dopamina
**DAG** - Diacilglicerol
**DOPAC** - Ácido dihidroxifenilacético
**DP** - Doença de Parkinson
**EPM** - Erro padrão da média
**ERO** - Espécies reativas do oxigênio
**GABA** - Ácido γ-amino butírico
**GABA-T** - GABA transaminase
**GAD** - Ácido glutâmico descarboxilase
**GFAP** - proteína glial fibrilar ácida
**GPe** - Parte externa do globo pálido
**GPi** - Parte interna do globo pálido
**GSH** - Glutationa reduzida
**GSH-Px** - Glutationa peroxidase

**HPLC** - Cromatografia líquida de alta performance

**HVA** - Ácido homovanílico

**i.p.** - intraperitoneal

**KW-6002** - istradefilina

**L-DOPA** - L-3,4-dihidroxifenilalanina

**LTP** - Potenciação a longo prazo

**MAO** - Monoamina oxidase

**MDA** - Malonildialdeído ou malondialdeído

**Min** - Minuto

**NA** - Noradrenalina

**NE** - Norepinefrina

**NMDA** - N-metil-D-aspartato

**MPP+** - 1-metil-4- fenilpiridina

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

**MTT** - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

**NO** - Óxido nítrico

**NOS** - Óxido nítrico sintase

**•OH** - Radical hidroxila

**ONOO-** - Peroxinitrito

**Ox-42** - anticorpo monoclonal anti CR3/CD11b

**PKC** - Proteína quinase C

**PKA** - Proteína quinase A

**SNC** - Sistema Nervoso Central

**SNc** - Substância negra parte compacta

**SNr** - Substância negra parte reticulada

**SNpr** - Substância negra pars reticulata

**SOD** - Superóxido dismutase

**STN** - Núcleo subtalâmico

**TBA** - Ácido tiobarbitúrico

**TH** - Tirosina hidroxilase

**TBARS** - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

**TNF** - Fator de necrose tumoral

**VTA** - Área tegumental ventral

**SUMÁRIO**


**I INTRODUÇÃO** ..... **20**

1 A doença de Parkinson ..... **20**

2 As bases neuronais da doença de Parkinson ..... **23**

3 Neurotransmissão monoaminérgica e doença de Parkinson ..... **27**

3.1 Envolvimento da neurotransmissão monoaminérgica na doença de Parkinson ..... **31**

4 Neurotransmissão colinérgica e doença de Parkinson ..... **33**

5 Aminoácidos transmissores e doença de Parkinson ..... **34**

6 Patogênese da Doença de Parkinson ..... **36**

6.1 Células da glia ..... **37**

6.2 Citocinas ..... **38**

6.3 Apoptose e caspases ..... **39**

6.4 Espécies reativas do oxigênio e estresse oxidativo ..... **41**

7 Adenosina ..... **49**

7.2 Receptores da adenosina ..... **50**

7.3 Adenosina como neuromodulador ..... **55**

7.4 Antagonistas de receptores da adenosina $A_{2A}$ e a doença de Parkinson ..... **58**

7.5 Antagonistas $A_{2A}$ e a interação com neurotransmissores ..... **60**

7.6 Antagonistas $A_{2A}$ como neuroprotetores na doença de Parkinson ..... **65**

**II RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA** ..... **70**

**III OBJETIVOS** ..... **72**

**IV MATERIAL E MÉTODOS** ..... **74**

1 Material utilizado nos experimentos ..... **74**

2 Animais ..... **75**

3 Drogas ..... **75**

4 Procedimento Experimental ..... **75**

4.1 Protocolos experimentais ..... **76**

4.2 Teste comportamental: teste rotacional ..... **78**

4.3 Dissecação da área cerebral (corpo estriado) ..... **79**

4.4 Determinação das concentrações de monoaminas e seus metabólitos com HPLC ..... **80**

4.4.1 Método ..... **80**

4.4.2 Procedimento Experimental ..... **81**

4.4.3 Soluções Reagentes..... **82**
4.5 Determinação das concentrações de aminoácidos com HPLC..... **82**
4.5.1 Método..... **82**
4.5.2 Procedimento Experimental..... **83**
4.5.3 Soluções Reagentes..... **83**
4.6 Determinação da concentração dos receptores dopaminérgicos..... **84**
4.6.1 Receptores $D_1$-símile..... **85**
4.6.2 Receptores $D_2$-símile..... **85**
4.6.3 Método..... **85**
4.6.4 Procedimento experimental..... **85**
4.6.5 Soluções reagentes..... **86**
4.7 Preparo das membranas para determinação dos receptores gabaérgicos e glutamatérgicos..... **87**
4.8 Determinação dos receptores gabaérgicos e glutamatérgicos..... **88**
4.8.1 Método..... **88**
4.8.2 Procedimento experimental..... **88**
4.9 Dosagem de proteína (método de Lowry)..... **90**
4.9.1 Método..... **90**
4.9.2 Soluções reagentes..... **91**
4.10 Determinação do índice de peroxidação lipídica e produção de nitriro..... **91**
4.10.1 Determinação da peroxidação lipídica (TBARS)..... **91**
4.10.2 Determinação do conteúdo de nitrito..... **92**
4.11 Cultura de células..... **93**
4.12 Estudos de viabilidade celular (MTT)..... **93**
4.13 Determinação do padrão de morte celular: coloração pela acridina/brometo de etídio..... **94**
4.14 Analise imunohistoquímica: GFAP e OX-42..... **95**
4.15 Análise Estatística..... **96**
**V RESULTADOS**..... **97**
1. Determinação do comportamento rotacional induzido por apomorfina em ratos com lesão estriatal por 6-OHDA, tratados com cafeína ou CSC, sozinho ou associado a L-DOPA..... **97**

2. Determinação das concentrações de dopamina (DA) e seus metabólitos (DOPAC e HVA), noradrenalina (NA), serotonina (5-HT) e seu metabólito (5-HIAA) no corpo estriado de ratos com lesão por 6-OHDA, tratados com cafeína ou CSC, sozinho ou associado a L-DOPA..... **102**
3. Determinação das concentrações de GABA e glutamato em corpo estriado de ratos com lesão por 6-OHDA, tratados com cafeína ou CSC, sozinho ou associado a L-DOPA..... **113**
4. Efeitos da cafeína ou do CSC nos receptores $D_1$ e $D_2$-símile ($B_{max}$ e Kd) em corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA..... **116**
5. Efeitos da cafeína ou do CSC no *binding* de receptores GABAérgicos ([$^3$H]-GABA) e receptores glutamatérgicos ([$^3$H]-glutamato) no corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA..... **119**
6. Determinação da viabilidade celular em cultura de células mesencefálicas de ratos expostas a 6-OHDA antes e após exposição à cafeína ou ao CSC..... **121**
7. Determinação da concentração de nitrito/nitrato em cultura de células mesencefálicas de ratos expostas a 6-OHDA na ausência ou na presença de cafeína ou CSC..... **124**
8. Determinação da concentração de nitrito em corpo estriado de ratos com lesão por 6-OHDA tratados com CSC (*ex vivo*)..... **127**
9. Determinação dos efeitos da cafeína ou do CSC na peroxidação lipídica em cultura de células mesencefálicas de ratos expostas a 6-OHDA..... **129**
10. Determinação da peroxidação lipídica em corpo estriado de ratos com lesão por 6-OHDA, tratados com CSC (*ex vivo*)..... **132**
11. Determinação dos efeitos da cafeína ou do CSC na morte celular por apoptose em cultura de células mesencefálicas de ratos expostas a 6-OHDA..... **134**
12. Determinação dos efeitos da cafeína ou do CSC sobre a percentagem de células OX-42 e GFAP positivas em cultura de células mesencefálicas de ratos expostas a 6-OHDA. **137**
**VI DISCUSSÃO**..... **142**
**VII CONSIDERAÇÕES FINAIS**..... **160**
**VIII CONCLUSÕES**..... **168**
**REFERÊNCIAS**..... **171**
**ANEXOS**..... **201**

# I INTRODUÇÃO

## 1 A doença de Parkinson

A doença de Parkinson foi descrita pela primeira vez em 1817 por James Parkinson, que relatou as características clínicas principais do Parkisonismo: tremor de repouso, rigidez, bradicinesia-hipocinesia, postura em flexão, perda dos reflexos posturais e o fenômeno do congelamento.

A doença de Parkinson é caracterizada por degeneração lenta e progressiva dos neurônios dopaminérgicos da substância negra. Essa destruição neuronal leva a perda dos terminais dopaminérgicos do estriado e também das regiões dos gânglios basais e cortical (**Figura 1**) (MOSLEY *et al.*, 2006).

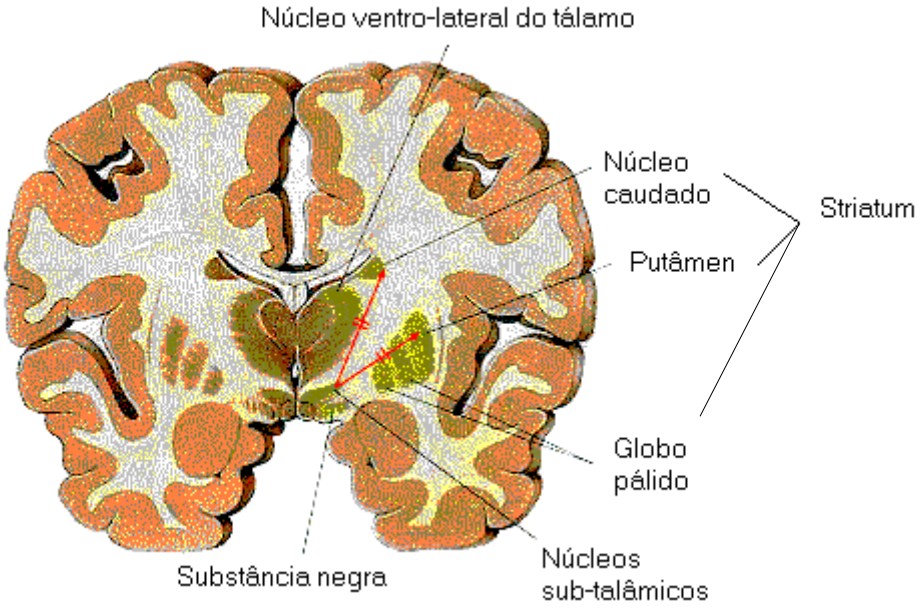



**Figura 1 - Estruturas dos gânglios basais, relacionadas ao Mal de Parkinson**
**Fonte:** Bear *et al*. (2002)

A origem dessa degeneração neuronal é desconhecida e provavelmente envolve muitos eventos celulares e moleculares, incluindo estresse oxidativo, acúmulo de proteínas

alteradas, excitotoxicidade, mecanismos pró-apoptóticos e disfunção mitocondrial (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Recentemente, tem sido sugerido que a reação das células da glia e o processo inflamatório também podem participar da cascata de eventos que levam a degeneração neuronal (MOSLEY *et al*., 2006).

A doença de Parkinson é a segunda doença degenerativa mais comum depois da demência de Alzheimer. É uma doença de distribuição universal e atinge todos os grupos étnicos e classes sócio-econômicas. Estima-se uma prevalência de 100 a 200 casos por 100.000 habitantes. Sua incidência e prevalência aumentam com a idade. No Brasil estima-se que existam cerca de 200 mil casos de mal de Parkinson. A maior parte está concentrada nas regiões Sudeste (principalmente no Rio de Janeiro e São Paulo) e Sul, responsável por um total estimado de 64 mil casos. De acordo com dados internacionais, a doença tem uma prevalência de dois casos para cada grupo de mil pessoas, considerada a população em geral, é de 1% na faixa etária acima de 50 anos de idade (BRASIL, 2006).

Trata-se de uma doença progressiva, que afeta principalmente pessoas a partir dos 50 anos e usualmente acarreta incapacidade severa após 10 a 15 anos, o impacto social e financeiro é elevado, particularmente na população mais idosa. É estimado que o custo anual mundial com medicamentos antiparkinsonianos esteja em torno de 11 bilhões de dólares, sendo cerca de 3 a 4 vezes mais caro para os pacientes na fase avançada da doença (BRASIL, 2006).

As manifestações motoras da doença de Parkinson ocorrem devido ao processo de degeneração de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais que leva a uma redução da modulação da dopamina estriatal e conseqüentemente, a alterações motoras, como a hipocinesia (CALABRESI *et al.,* 2007). A rigidez e o tremor envolvem distúrbios neuroquímicos mais complexos de outros neurotransmissores (particularmente acetilcolina, noradrenalina, serotonina e GABA), bem como dopamina (OLANOW *et al.,* 1996). Portanto, aumentando-se a estimulação dopaminérgica ou reduzindo-se a estimulação colinérgica ou glutamatérgica, os sintomas melhoram. Deste modo, existem atualmente vários modos de intervenção farmacológica sintomática:

- Drogas que aumentam a produção endógena de dopamina (como a levodopa, em geral utilizada juntamente com inibidores da dopa descarboxilase de ação periférica como a carbidopa);
- Agonistas dopaminérgicos (bromocriptina, pergolida);
- Drogas que previnem a degradação endógena da dopamina (Inibidoras da MAO-B como a selegilina);
- Inibidores da catecol-O-metiltransferase (COMT): tolcapone e entacapone;
- Antiglutamatérgicos (amantadina) e
- Antagonistas colinérgicos (benztropina).

O tratamento atual para esta doença está restrito ao alívio sintomático porque, até o presente momento, não existem agentes capazes de inibir a degeneração neuronal. Esses tratamentos levam a uma melhora inicial dramática enquanto a doença progride, e com o passar do tempo sua eficácia diminui bastante. Uma outra limitação desses medicamentos consiste nos seus efeitos colaterais, como o desenvolvimento das discinesias que acabam por impossibilitar a continuação do tratamento (XU *et al*., 2005).

O desenvolvimento de novos tratamentos que melhoram a sintomatologia da doença de Parkinson com menos efeitos colaterais são importantes em curto prazo, mas o tratamento ideal seria aquele o qual se pudesse aliar a essa terapêutica convencional drogas que impedissem a progressão da doença, como os neuroprotetores. Essas estratégias neuroprotetoras estão sendo propostas à medida que o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese da doença de Parkinson estão sendo elucidados.

As estratégias que podem ser consideradas para neuroproteção devem ter como alvo não apenas receptores de neurotransmissores (como receptores do glutamato ou da adenosina) mas também alvos farmacológicos menos convencionais como receptores de fatores neurotróficos, proteínas apoptóticas, fatores de transcição, radicais livres, toxinas mitocondriais e desregulação proteossomal (DAWSON; DAWSON, 2003; RAVINA *et al.,* 2003; XU *et al*., 2005).

Para entender melhor a fisiopatologia da doença de Parkinson, e para o desenvolvimento de novos tratamentos, é importante a utilização de modelos animais da doença de Parkinson, onde novas drogas e estratégias terapêuticas podem ser testadas.

A 6-hidroxidopamina (6-OHDA) é uma das neurotoxinas mais comuns utilizadas experimentalmente em modelos de degeneração da substância negra, tanto *in vitro* como *in vivo.* É incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica, sendo necessária a administração diretamente na estrutura cerebral que se deseja lesar. A injeção bilateral de 6-OHDA na SNc ou em outras regiões cerebrais provoca uma elevada mortalidade neuronal, principalmente dos neurônios catecolaminérgicos (BLANDINI *et al*., 2008). Esta droga apresenta similaridade estrutural com as catecolaminas e tem alta afinidade pelo sistema de transporte das mesmas, mostrando assim a sua seletividade por neurônios catecolaminérgicos. Produz lesões na SNc pela indução da produção de peróxido de hidrogênio e espécies reativas do oxigênio, como radical hidroxil, e também pela inibição do complexo I mitocondrial (BLUM *et al.,* 2001; MILLER *et al.,* 2009).

A injeção unilateral de 6-OHDA no estriado provoca a morte de todos os neurônios dopaminérgicos no mesencéfalo do lado aplicado e a diminuição de dopamina no lado correspondente do estriado, gerando um modelo válido de uma fase adiantada da DP com intensas alterações motoras. Esses animais apresentam comportamento rotatório contralateral em relação à lesão quando tratados com agonistas D1/D2 da dopamina, tais como a apomorfina. Esse comportamento pode ser explicado pela hiperexpressão dos receptores dopaminérgicos na porção lesada do estriado. Ou seja, as drogas agonistas terão seu efeito potencializado pela hipersensibilização dos receptores (KIN *et al.,* 1998).

## 2 As bases neuronais da doença de Parkinson

Meynert (1871), foi o primeiro a correlacionar a doença de Parkinson com uma disfunção dos núcleos da base ou gânglios da base. Os núcleos da base são massas de substância cinzenta situadas na base do encéfalo que se relacionam com o córtex motor e conseqüentemente, possuem ações importantes no controle motor do corpo. São constituídos

por estruturas (núcleos) situadas no interior do centro branco medular do cérebro que é a substância branca do telencéfalo, entre o córtex e o tálamo. As principais estruturas que constituem os núcleos da base são: corpo estriado (formado pelo núcleo caudado, o putamem e o globo pálido - que se situa medialmente ao corpo estriado e está dividido em uma porção interna (GPi) e externa (GPe) e outras duas estruturas terminais, a substância negra- situada no mesencéfalo e dividida em duas porções: a parte reticular (SNPr) e a parte compacta (SNPc)) e núcleo subtalâmico. Estas estruturas têm como principais funções: a diminuição do tônus muscular e inibição da atividade muscular indesejada e a organização e coordenação dos movimentos e da postura (BEAR *et al*., 2002).

Os núcleos da base têm a capacidade de receber e de enviar informações devido a um grande número de fibras que as ligam a outras regiões do cérebro. O movimento é controlado pela relação que existe entre o tálamo, os núcleos da base e o córtex. Quando ativado pelo córtex, o tálamo reforça positivamente o movimento voluntário. No entanto, quando esse movimento é desnecessário ou inconveniente, os núcleos da base inibem-no, ao inibirem o tálamo e os neurônios do tronco cerebral (OBESO *et al*., 2002).

Os neurônios aferentes do córtex projetam-se para os núcleos da base putamem e caudado e as principais estruturas eferentes são a parte interna do globo pálido e a parte reticular da substância negra. O fluxo dessas informações se dá por duas vias: a direta e a indireta. A via direta consiste de projeções do estriado para a parte externa do globo pálido e dali para o núcleo sub talâmico, e só depois para a parte interna do globo pálido ou a parte compacta da substancia negra. Desse modo os neurotransmissores, inibitórios ou excitatórios, são liberados em cada uma das sinapses da via para as células alvo. A ativação da via direta inibe o neurônio eferente e a ativação da via indireta excita o neurônio eferente, apresentando, portanto ações opostas (OBESO *et al.,* 2008).

A via dopaminérgica surge de células da parte compacta da substância negra, cujos axônios terminam no corpo estriado, onde ocorre a liberação de dopamina. A dopamina apresenta efeitos opostos nas células das vias direta e indireta, sendo excitatórios nas células da via direta e inibitórios nas células da via indireta (OBESO *et al.,* 2008). Nesse circuito, além da dopamina, outros neurotransmissores também possuem papel fundamental, como o ácido gama-aminobutírico (GABA), a acetilcolina, o glutamato, a substancia P, a encefalina,

entre outros. As concentrações de acetilcolina não se alteram na doença de Parkinson, mas com a depleção da dopamina ocorre redução do efeito inibitório nos neurônios do estriado ricos em acetilcolina, levando a uma hiperatividade relativa desses neurônios colinérgicos (XU *et al.,* 2005) (**Figura 2**).

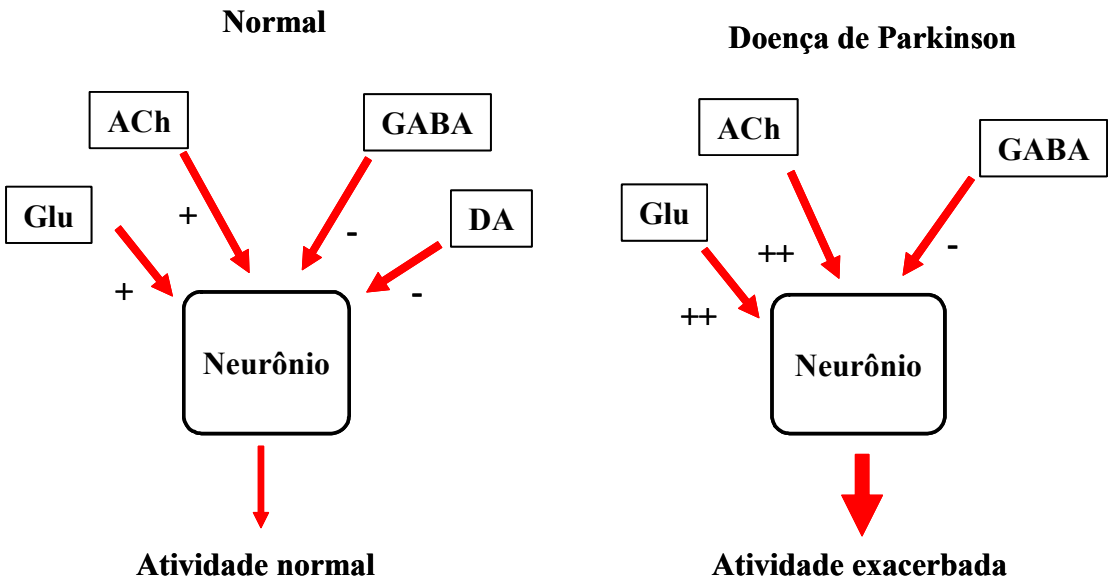



**Figura 2 - Balanço entre as ações estimulatórias (via glutamato-Glu e acetilcolina-ACh) e inibitórias (GABA e dopamina-DA) mantendo o funcionamento normal do circuito neuronal e as possíveis alterações que ocorrem na doença de Parkinson**
**Fonte:** modificado de Richardson *et al*. (1997)

Os neurônios estriatais que recebem impulsos excitatórios do córtex e do tálamo são controlados por *feedback* negativo. Esses neurônios são modulados também pela dopamina (liberada pelos neurônios nigroestriatais, que estão destruídos na doença de Parkinson) e pela acetilcolina (liberada a partir de um grupo de interneurônios estriatais). Mais recentemente, tem sido demonstrado que um neuromodulador ubíquo, a adenosina, também pode influenciar a função estriatal (OBESO *et al.,* 2008).

Os neurônios glutamatérgicos talamocorticais facilitam a estimulação dos movimentos via córtex, de forma que a ativação da via direta aumenta a atividade motora, enquanto a ativação da via indireta diminui a atividade motora. Os neurônios estriatais dessas vias constituem mais de 90% de todos os neurônios do estriado e são caracterizados por seu

tamanho médio (um diâmetro de aproximadamente 10μm). Essas são as principais terminações neuronais do estriado, e embora ambos os grupos de neurônios (os da via direta e da via indireta) liberem GABA, eles podem ser distinguidos pelos neuropeptídeos que expressam, ou seja, os da via direta contêm substância P e dinorfina, enquanto os da via indireta contêm encefalina (WICHMANN; DELONG, 2003).

Estudos sugerem que na doença de Parkinson ocorre um aumento do tônus inibitório nos sistemas motores talamocortical e do tronco cerebral. A depleção da concentração de dopamina leva a uma redução da estimulação dos neurônios estriatais gabaérgicos (putamem e caudado) que inibem a substância negra reticulada e a parte externa do globo pálido e a redução da inibição dopaminérgica de neurônios estriatais gabaérgicos que inibem a parte interna do globo pálido. Dessa forma, o córtex cerebral receberia menos estímulo para iniciar o movimento (OBESO *et al.*, 2002).

Estudos em ratos utilizando o modelo experimental de doença de Parkinson com lesão nigroestriatal por 6-OHDA e em macacos com o modelo de lesão com MPTP na parte compacta da substância negra demonstraram um aumento da expressão do RNAm para receptor $D_2$ nos neurônios estriatais da via indireta e redução na expressão do RNAm para receptores $D_1$, receptores da substância P e dinorfina nos neurônios estriatais da via direta. Além disso, foi também observada hiperatividade do núcleo subtalâmico e da parte interna do globo pálido em macacos tratados com MPTP utilizando várias técnicas (CROSSMAN, 2000; WICHMANN; DELONG, 2003).

Lesões no núcleo subtalâmico e na parte interna do globo pálido induzem a um intenso déficit motor em macacos tratados com MPTP, o que é seguido por uma redução da atividade neuronal dos neurônios da parte interna do globo pálido e da parte reticular da substância negra (OBESO *et al.*, 2002).

## 3 Neurotransmissão monoaminérgica e Doença de Parkinson

A dopamina (DA) representa cerca de 80 % do conteúdo de catecolaminas no cérebro. Projeções originárias de áreas cerebrais que sintetizam este neurotransmissor originam quatro vias axonais: (1) Nigro-estriatal; (2) mesolímbica; (3) mesocortical e (4) tuberoinfundibular (**Figura 3**).

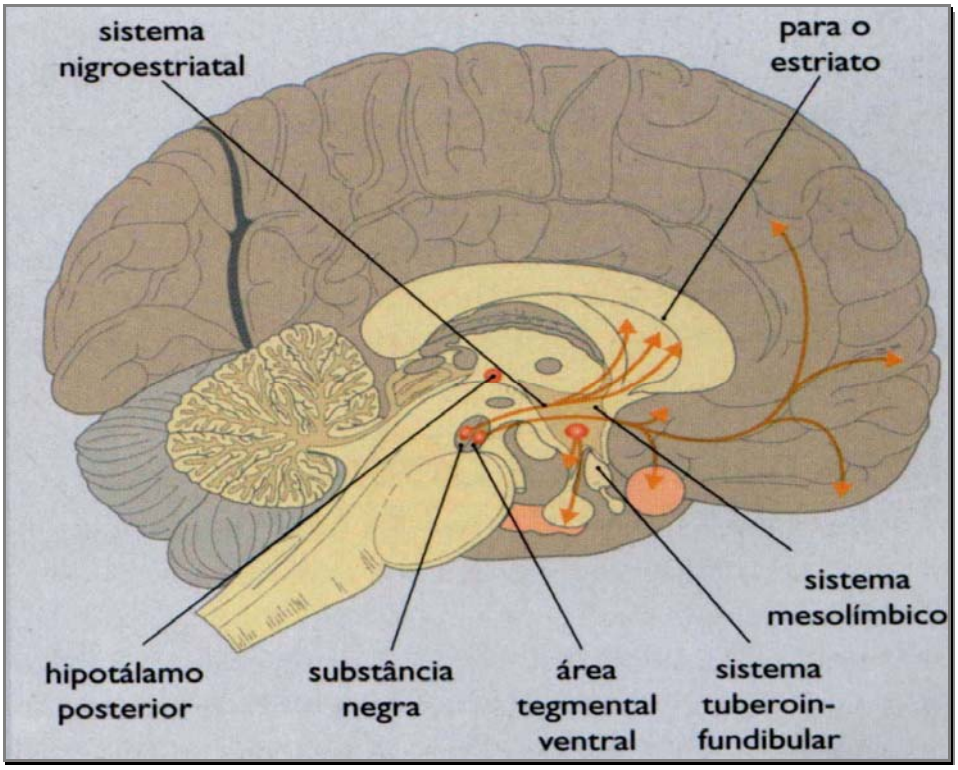



**Figura 3 - Principais vias dopaminérgicas no SNC**
**Fonte:** Kerwin *et al.*(1999)

As projeções que constituem a via nigroestriatal originam-se de neurônios sintetizadores de DA do mesencéfalo e substância negra pars compacta (SNpc) que inervam o estriado dorsal (caudado-putamen). A via nigroestriatal está envolvida no controle dos movimentos e sua degeneração leva a doenças como a doença de Parkinson (STOCCHI, 2009). A via mesocortical origina-se na área tegumentar ventral (ATV) e inerva diferentes regiões do córtex frontal. Esta via parece estar envolvida em alguns aspectos do aprendizado e memória (PRITCHARD *et al.,* 2009). A via mesolímbica origina-se na ATV e inerva o estriado ventral (núcleo accumbens), o tubérculo olfatório e partes do sistema límbico. Esta via foi implicada no comportamento motivacional (CHEN *et al.,* 2009). A via

tuberoinfundibular inicia a partir de células dos núcleos arqueado e periventricular do hipotálamo (FELDMAN *et al.,* 1997). As projeções desta via alcançam a eminência média do hipotálamo onde ocorre liberação de DA nos espaços perivasculares do plexo capilar do sistema hipotalâmico-hipofisário. Por esta via a DA é transportada para a hipófise anterior onde atua inibindo a liberação de prolactina.

A DA exerce suas ações ao se ligar a receptores de membrana específicos (PRITCHARD *et al.,* 2009). Estes receptores podem ser de 5 tipos subdivididos nas subfamílias $D_1$-símile ($D_1$ e $D_5$) e $D_2$-símile ($D_2$, $D_3$ e $D_4$), com base em suas propriedades bioquímicas e farmacológicas (**Quadro 1**), enquanto os efeitos da NA são mediados por receptores dos tipos $\alpha$ e $\beta$. Os camundongos que não apresentam estes receptores apresentam significantes déficits fisiológicos. Como, por exemplo, animais *knockout* para receptor $D_1$, apresentam hiperlocomoção e propriedades estriatais alteradas. Os animais *Knockout* para receptor $D_2$ apresentam os movimentos comprometidos e para o receptor $D_3$ hiperlocomoção. No caso dos receptores $\beta$ os animais *Knockout* para receptor $\beta_1$ morrem prematuramente após o nascimento e os sobreviventes apresentam respostas cardiovasculares alteradas. Os receptores pós-sinápticos dos neurônios recebem informações dos transmissores liberados de um outro neurônio (pré-sináptico).

**Quadro 1 - Propriedades e localizações dos subtipos de receptores dopaminérgicos**

| | $D_1$ | $D_5$ | $D_{2S}/D_{2L}$ | $D_3$ | $D_4$ |
|---|---|---|---|---|---|
| **Aminoácidos** | 446 | 477 | 415/444 | 400 | 387 |
| **Cromossomo** | 5 | 4 | 11 | 3 | 11 |
| **Vias Efetoras** | ↑ AMPc | ↑ AMPc | ↓AMPc<br>↑ canais $K^+$<br>↓canais $Ca^{2+}$ | ↓AMPc | ↓AMPc<br>↑ canais $K^+$ |
| **Distribuição do RNAm** | Caudado-putamen; Núcleo accumbens; Tubérculo olfatório | Hipocampo; Hipotálamo; | Caudado putamen; Núcleo accumbens; Tubérculo olfatório | Tubérculo olfatório; Hipotálamo; Núcleo accumbens | Córtex frontal; Medula; Mesencéfalo |

**Fonte:** Kuhar *et al*. (1999)

Freqüentemente, os receptores pós-sinápticos estão localizados nos dendritos ou corpos celulares dos neurônios, mas eles podem também ocorrer nos axônios ou terminações nervosas; no último caso, uma relação sináptica axo-axônica pode causar inibição ou excitação pré-sinática. Em contraste, os autoreceptores estão situados em um dado neurônio e respondem às moléculas transmissoras liberadas do mesmo neurônio. Autoreceptores podem ser amplamente distribuídos na superfície de um neurônio. Na terminação nervosa, eles respondem a moléculas transmissoras liberadas na fenda sináptica e no corpo celular, podem responder a moléculas transmissoras liberadas por dendritos. Funcionalmente, a maioria dos autoreceptores parece regular a liberação do transmissor de forma que o transmissor liberado ao atuar nos autoreceptores regula a sua liberação adicional. Autoreceptores já foram identificados para NA, DA, 5-HT e GABA, dentre outros (FEUERSTEIN, 2008).

Os receptores dopaminérgicos estão envolvidos em importantes ações, como comportamento estereotipado e hiperlocomoção. Também podemos citar seu envolvimento em doenças como a esquizofrenia, que é causada principalmente pela superestimulação de receptores $D_2$. O bloqueio destes receptores pode levar à doença de Parkinson ou discinesia tardia. Os ligantes destes receptores facilmente discriminam as subfamílias $D_1$- e $D_2$-símile, porém a maioria deles não diferencia claramente os diferentes membros de uma mesma subfamília (FEUERSTEIN, 2008).

Os receptores noradrenérgicos existentes no cérebro são receptores $\beta_1$ e $\beta_2$ os quais não podem ser diferenciados em termos de função fisiológica. A densidade do receptor $\beta_1$ varia em diferentes áreas cerebrais, diferentemente do que acontece com os receptores $\beta_2$ que estão restritos à glia e vasos sangüíneos.

A serotonina é sintetizada a partir do aminoácido L-triptofano após sua captação do sangue para o cérebro. A fonte primária do triptofano é a dieta. O triptofano é convertido a 5-hidroxitriptofano pela ação da triptofano hidroxilase, enzima sintetizada no corpo celular dos neurônios do núcleo da rafe. A enzima descarboxilase converte então o 5-hidroxitriptofano em serotonina (5-hidroxitriptamina – 5-HT). A serotonina é metabolizada pela MAO dando origem ao ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA).

Este neurotransmissor após sua síntese é armazenado em vesículas e liberado por exocitose para interagir com seus receptores. A serotonina pode se ligar a 14 receptores que são agrupados em famílias (FINK; GOTHERT, 2007):

- A família 5-$HT_1$ compreende os receptores 5-$HT_{1A}$, 5-$HT_{1B}$, 5-$HT_{1D}$, 5-$HT_{1E}$ e 5-$HT_{1F}$ que são acoplados à proteína G inibitória, produzindo inibição da atividade da adenililciclase e abertura dos canais de potássio, o que resulta em hiperpolarização.

- A família 5-$HT_2$ inclui os receptores 5-$HT_{2A}$, 5-$HT_{2B}$ e 5-$HT_{2C}$ (formalmente $5HT_{1C}$). Estes estimulam a fosfolipase C específica para os fosfoinositídios.

- O receptor 5-$HT_3$ pertence à superfamília dos receptores ligados a canais iônicos, causando uma rápida despolarização nos neurônios.

- As famílias 5-$HT_4$, 5-$HT_6$ e 5-$HT_7$ são incluídos na família acoplada positivamente à adenilciclase. Uma nova família de receptores serotonérgicos 5-$HT_{5A}$ e 5-$HT_{5B}$ ainda possui o mecanismo efetor desconhecido.

Os subtipos de receptores serotonérgicos possuem localizações diferentes no SNC onde os receptores 5-$HT_{1A}$ localizam-se principalmente no hipocampo, septo, amígdala, hipotálamo e neocórtex. Este receptor está localizado em alta densidade no corpo celular de neurônios serotonérgicos nos núcleos da rafe dorsal e medial onde fazem a função de autoreceptores modulando a atividade de neurônios serotonérgicos. Os subtipos 5-$HT_{1B}$ e 5-$HT_{1D}$ estão localizados nos gânglios da base particularmente no globo pálido e substância negra. Os receptores 5-$HT_{2A}$ estão localizados em áreas corticais, particularmente no córtex frontal, também estão localizados no claustrum, gânglios da base e núcleo olfatório. Os receptores 5-$HT_4$ estão localizados em grande concentração no corpo estriado, substância negra e tubérculo olfatório e hipocampo e indiretamente medeiam o aumento da liberação de DA estriatal. O receptor 5-$HT_7$ está localizado no córtex, septo, tálamo, hipotálamo, amígdala (FINK; GOTHERT, 2007).

A serotonina está envolvida em praticamente todo tipo de comportamento tais como, apetitivo, emocional, motor, cognitivo e autonômico. Por suas ações, os neurônios

serotonérgicos e receptores são alvos para uma ampla variedade de drogas, como antidepressivos, antipsicóticos, tratamento da enxaqueca e tratamento da náusea e vômitos, entre outros (MONTI; JANTOS, 2008).

### 3.1 Envolvimento da neurotransmissão monoaminérgica na Doença de Parkinson

A importância da dopamina como o neurotransmissor mais envolvido no controle motor está diretamente associada às conseqüências clínicas decorrentes da degeneração da via nigroestriatal, como aquelas observadas na doença de Parkinson: tremor, rigidez e acinesia.

A doença de Parkinson é caracterizada pela degeneração de estruturas subcorticais, constituídas pelos núcleos da base (também chamado de estriado, que compreende o núcleo caudado, o putâmen e o globo pálido), o subtálamo e a substância negra, que agem como um sistema acessório ao córtex cerebral e ao sistema cortiço-espinhal fornecendo informações de padrões complexos de movimento (STOCCHI, 2009).

O sistema dopaminérgico inerva todos os núcleos da base, através da via nigroestriatal e, provavelmente, exerce um importante controle modulatório dos circuitos neuronais (vias direta e indireta). Os núcleos da base fazem parte de um complexo circuito neuronal organizado em paralelo para integrar atividades de diferentes regiões corticais. Além disso, os núcleos da base são intimamente interconectados com o *locus ceruleus* (núcleo noradrenérgico), núcleo da rafe (neurônios serotonérgicos) e a formação reticular. O chamado "circuito motor" é, na verdade, o mais importante na fisiopatologia do movimento (OBESO *et al.*, 2002).

As áreas corticais enviam projeções glutamatérgicas ao estriado, que é a principal porta de entrada dos núcleos da base. O estriado envia projeções gabaérgicas a outros núcleos, como o globo pálido e a substância negra reticulada. Esses núcleos modulam o tálamo, que por sua vez envia projeções glutamatérgicas estimulatórias de volta ao córtex, facilitando com maior ou menor intensidade o início do movimento (OBESO *et al*., 2002).

A modulação mediada pelos núcleos da base ocorre pelo balanço entre dois circuitos que ligam o estriado ao globo pálido, a via direta e a via indireta. A dopamina estimula a via direta e inibe a via indireta. Desta forma ela funciona como um modulador dos núcleos da base, pois quando liberada no estriado facilita o movimento. Isso explica a lentidão de movimentos e a rigidez muscular na doença de Parkinson, visto que a degeneração dos neurônios nigroestriatais causa a redução da concentração de dopamina no estriado, e conseqüentemente distúrbios de movimento. Por outro lado, o excesso de dopamina ou a supersensibilização de receptores dopaminérgicos no estriado causa aumento dos movimentos e incoordenação, como no caso da discinesia, causada pelo tratamento com agonistas dopaminérgicos, ou com L-DOPA ou que ocorre na Coréia de Huntington (OBESO *et al.,* 2008).

Os efeitos da dopamina nos núcleos da base ocorrem através da interação com receptores $D_1$ e $D_2$. Os receptores $D_1$ modulam principalmente os neurônios da via direta, enquanto os $D_2$ são localizados em neurônios estriado-palidais da via indireta. Então, a ativação de $D_1$ ativa a via excitatória e a ativação de $D_2$ inibe a via inibitória (GERFEN, 2003; SIEGEL, 2006).

A destruição dopaminérgica nos núcleos da base relacionadas à doença de Parkinson leva a alterações na capacidade de elaboração dos movimentos automáticos, semi-automáticos, no tônus postural e na habilidade dos movimentos, evidenciando os sinais e sintomas motores característicos da doença como o tremor, a bradicinesia, a rigidez e a instabilidade postural (DOYON, 2008).

Além dos sintomas motores da doença de Parkinson, freqüentemente ocorrem sintomas não-motores como as alterações cognitivas e de comportamento, como a tendência ao isolamento, a ansiedade, distúrbios do sono, fadiga e depressão (LAUTERBACH, 2004; CHAUDHURI; NAIDU, 2008). Também são comuns as alterações sensoriais como dor, queimação e ardência na região de envolvimento motor e distúrbios autonômicos, como sialorréia, sudorese excessiva, pele oleosa e fria, constipação crônica, redução do esvaziamento da bexiga, distúrbios sexuais, hipotensão postural, distúrbios na fala, na escrita e na expressão facial (SABATÉ *et al*., 2008).

Todas essas alterações podem ter relação com as disfunções que ocorrem principalmente devido à redução das concentrações de dopamina e o conseqüente desequilíbrio dos outros sistemas (como o sistema colinérgico, serotonérgico, gabaaérgico e glutamatérgico) que estão integrados e onde a dopamina exerce um importante papel modulatório.

Vários estudos comprovam que em fases avançadas da doença de Parkinson ocorrem mudanças em outros neurotransmissores e em outros sistemas de neuromoduladores. A redução da noradrenalina está relacionada com a destruição de neurônios noradrenérgicos e é responsável por certos sintomas não motores da DP, como por exemplo, demência, depressão e estados vegetativos (FRANCIS; PERRY, 2007). Existe queda da concentração de serotonina (5-HT) demonstrada em todas as regiões cerebrais, embora não existam evidências de processos degenerativos envolvidos. Ocorre também uma diminuição na atividade da enzima glutamato descarboxilase, enzima responsável pela biossíntese do ácido gama-aminobutírico (GABA), que pode ser conseqüência da neurodegeneração dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal (FRANCIS; PERRY, 2007).

## 4 Neurotransmissão colinérgica e Doença de Parkinson

Um importante regulador do circuito motor é a acetilcolina. As concentrações de marcadores colinérgicos no estriado sugerem um papel importante da acetilcolina nessa área do sistema nervoso central. No estriado de ratos, o conteúdo de acetilcolina e acetilcolinesterase e a atividade da colina acetiltransferase são os mais altos no cérebro. O interesse nessa inervação é sempre crescente, desde que a acetilcolina têm demonstrado exercer um papel na fisiopatologia da doença de Parkinson devido ao desequilíbrio funcional decorrente da perda dos neurônios dopaminérgicos (CALABRESI *et al.,* 2000).

Os efeitos excitatórios mediados pela acetilcolina no estriado parecem ser gerados pela ativação dos receptores $M_1$ através do bloqueio da condutância do potássio. Estudos recentes indicam que a acetilcolina também pode aumentar a resposta aos receptores do glutamato (NMDA) e esta ação também parece envolver receptores $M_1$. Estudos *in vivo*

demonstraram que a acetilcolina pode apresentar efeitos tanto excitatórios como inibitórios. Os receptores $M_1$ são responsáveis inibição pré-sináptica da liberação do GABA, enquanto os receptores $M_3$ exercem um controle inibitório da liberação do glutamato no estriado (CALABRESI *et al*., 2000).

Evidências mostram que a acetilcolina pode expressar uma dupla ação funcional, a primeira ação inibitória, resultante dos efeitos pré e pós sinápticos: redução da liberação de neurotransmissores e supressão das correntes de cálcio. Esta ação ocorre em condições fisiológicas e na presença de baixas concentrações de acetilcolina na fenda sináptica. A segunda ação da acetilcolina no estriado pode ser considerada excitatória e envolve principalmente mecanismos pós sinápticos: a supressão das correntes de potássio e o aumento da resposta mediada por receptores NMDA. A expressão dessa ação excitatória, no entanto, requer condições fisiopatológicas particulares, como uma concentração anormal de acetilcolina no espaço sináptico e uma despolarização do potencial de membrana (para remover o bloqueio do receptor NMDA). Essas condições podem ser observadas, por exemplo, quando ocorre atividade prolongada e mantida da via estriatal ou durante uma falha no metabolismo energético. Esse fenômeno é encontrado em algumas doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson, em que a destruição das vias dopaminérgicas causa um aumento dos efeitos da acetilcolina (FRANCIS; PERRY, 2007).

Um dos primeiros tratamentos propostos para a doença de Parkinson foi o uso de antagonistas de receptores colinérgicos, porque se acreditava que o principal problema ocasionado pela doença era o desequilíbrio entre os sistemas dopaminérgico e colinérgico, onde uma diminuição na atividade DA resultaria em exacerbação dos efeitos colinérgicos. Isto é melhor compreendido agora, como um desequilíbrio na regulação dos neurônios estriatais, nos quais ambas, acetilcolina e dopamina agem (FRANCIS; PERRY, 2007).

## 5 Aminoácidos transmissores e Doença de Parkinson

Alguns pesquisadores têm observado que a dopamina causa depressão da resposta excitatória sináptica mediada por receptores AMPA no estriado, via ativação dos receptores

$D_2$ (FUXE *et al*., 2007; SIMOLA *et al*., 2008). Foi observado que em ratos com lesão estriatal unilateral mediada por 6-OHDA existe um aumento dos potenciais excitatórios espontâneos dos neurônios, que é inibido com o uso de agonistas $D_2$, sugerindo que a destruição dopaminérgica aumenta a excitabilidade neuronal no estriado e que a ativação dos receptores $D_2$ pré sinápticos pode reverter essa super excitabilidade através da inibição da liberação do glutamato no estriado (CALABRESI *et al*., 2000).

Então, a dopamina exerce controle em ambas as vias (direta e indireta), principalmente através dos receptores $D_1$ (dos neurônios do segmento interno) e $D_2$ (dos neurônios do segmento externo do globo pálido). Na ausência da dopamina, o controle da liberação da acetilcolina e do glutamato mediado pelo receptor $D_2$ nos terminais corticoestriatais é inibido, assim como o controle mediado pelo receptor $D_1$ na resposta pós-sináptica ao glutamato. Esses efeitos nos receptores $D_1$ e $D_2$ resultam em um aumento da estimulação da atividade do neurônio estriatal mediada pelo glutamato. Isto provavelmente contribui para o aumento da atividade dos neurônios da via indireta observada após desnervação dopaminérgica. Portanto, o efeito principal da destruição das terminações dopaminérgicas é causar um desequilíbrio na atividade das duas vias, contribuindo para a disfunção motora observada na doença de Parkinson.

A dopamina afeta a atividade dos neurônios GABAérgicos estriatais eferentes (*output*) diretamente e provavelmente indiretamente via interneurônios colinérgicos (FRANCIS; PERRY, 2007). Os efeitos da degeneração dos neurônios dopaminérgicos da substancia negra na doença de Parkinson e em modelos animais da doença de Parkinson estão associados com o desequilíbrio da atividade das vias direta e indireta, afetando, portanto outros sistemas de neurotransmissores. Galeffi *et al*. (2003) verificaram que as concentrações basais dos aminoácidos permaneceram praticamente inalteradas após a lesão com 6-OHDA; no entanto as concentrações de GABA nos dializados do globo pálido foram significativamente elevados nos ratos lesionados, indicando um desequilíbrio em favor da via indireta.

## 6 Patogênese da doença de Parkinson

A razão dos pacientes portadores da doença de Parkinson exibirem baixas concentrações de dopamina cerebral ocorre devido a degeneração da via dopaminérgica nigroestriatal, que é composta de neurônios dopaminérgicos cujos corpos celulares estão localizados na parte compacta da substância negra e cujos axônios e nervos terminais são encontrados no corpo estriado (PRZEDBORSKI, 2005). A neuropatologia da DP não está restrita apenas a via nigroestriatal, anormalidades histológicas podem ser encontradas em outros grupos de células dopaminérgicas e até não dopaminérgicas (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

A segunda característica patológica mais comum na DP é a presença de inclusões intraneurais, conhecidos como corpúsculos de Lewy. Os corpúsculos de Lewy são agregados citoplasmáticos eosinofílicos esféricos compostos de uma variedade de proteínas, como a α-sinucleína, parkina, ubiquitina e neurofilamentos, que podem ser encontrados em toda região cerebral afetada (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

Estudos sugerem que o mecanismo de morte neuronal na DP envolve a ativação de um fator etiológico como o acúmulo da proteína α-sinucleína mutante nos neurônios dopaminérgicos que desencadeia uma cascata de eventos, onde estão relacionados vários fatores como os radicais livres, disfunção mitocondrial, excitotoxicidade, inflamação e apoptose (PRZEDBORSKI, 2005).

Przedborski (2005), baseado em modelos neurotóxicos da DP, sugeriu que a degeneração dos neurônios dopaminérgicos na substancia negra não resulta da ativação de apenas um único fato deletério, mas da convergência de múltiplos fatores patogênicos.

## 6.1 Células da glia

Damier *et al.* (1993), verificaram que a ativação das células da glia e o processo inflamatório participam da cascata de eventos que levam a degeneração neuronal Muitos estudos têm constantemente relatado a presença de microglias e astrócitos ativados na DP, corroborando com esses resultados (HIRSCH *et al*., 2005; MCGEER; MCGEER, 2008). A função dessas células da glia não está completamente elucidada. Alguns astrócitos podem agir como neuroprotetores inativando radicais livres derivados do oxigênio e produzindo fatores neurotróficos que protegem os neurônios dopaminérgicos contra vários estímulos lesivos. Entretanto, microglias ativadas podem estar envolvidas nos mecanismos de lesão dos neurônios dopaminérgicos (SHAVALI *et al.,* 2006).

Microglias são macrófagos residentes no SNC que podem ser ativados em células apresentadoras de antígeno imunocompetentes durante o processo patológico. Essas células liberam citocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral alfa (TNFα) e interleucina-1β (SHAVALI *et al.,* 2006). Muitos pesquisadores encontraram concentração elevados de citocinas como o TNFα, interleucina-1β, fator de transformação e crescimento – alfa (TGF-α) e TGF-β no parênquima cerebral ou no fluido cérebro-espinhal de pacientes com DP (NAGATSU *et al*., 2000). Essas células ativadas também aumentam a liberação de enzimas como a oxido nítrico sintase indutiva (NOSi) e as cicloxigenases COX 1 e 2 (MOSLEY *et al*., 2006).

A ativação das microglias está diretamente associada com a morte dos neurônios dopaminérgicos na DP, podendo até mesmo ser usada como marcador biológico para a doença. Realmente as microglias ativadas servem como indicadores *in vivo* da resposta inflamatória e contribuem significativamente para o processo degenerativo. Baseados nessas observações, estudos epidemiológicos demonstraram que o uso de antiinflamatórios não esteroidais (AINES) reduzem o risco de desenvolvimento da DP (CHEN *et al.,* 2003).

Estudos bioquímicos e histológicos verificaram também a participação do estresse oxidativo na patogênese da DP com peroxidação lipídica, dano no DNA e redução da glutationa e da ferritina, além disso, as concentrações de NADPH oxidase, um produto

precursor das espécies reativas do oxigênio (ROS), está elevado na DP e a sua elevação coincide com a ativação das microglias. Na DP as microglias próximas aos neurônios dopaminérgicos parecem aumentar a sua capacidade de produção das ROS, devido ao seu estado ativado, levando a um ciclo contínuo de lesão neuronal e ativação do sistema imunológico no local (MOSLEY *et al*., 2006).

**6.2 Citocinas**

Os mecanismos através dos quais as células da glia e as citocinas pró-inflamatórias causam danos aos neurônios dopaminérgicos da DP ainda não são totalmente compreendidos. Estudos sugerem que as citocinas pró-inflamatórias produzidas pelas células da glia durante o processo inflamatório participam dos eventos envolvidos na degeneração neuronal na DP. Baseado nesse princípio, foi demonstrado *in vitro*, que o interferon γ, a interleucina -1β e o TNF-α podem induzir a expressão da óxido nítrico sintase indutiva (NOSi), e foi observado que os concentração desta enzima encontram-se aumentados na substância negra de pacientes com DP (HIRSCH *et al.,* 2005).

As citocinas pró-inflamatórias também podem agir diretamente nos neurônios dopaminérgicos através da interação com receptores específicos. Hirsch *et al.* (2005) analisaram os efeitos do TNF-α nos seus dois tipos de receptores TNFR-1 e TNFR-2 em camundongos tratados com MPTP e mostraram que os animais *Knockout* para um dos receptores do TNF-α ou para ambos foram protegidos contra a intoxicação por MPTP. Entretanto, Sriram *et al.* (2002) demonstraram que os terminais tirosina-hidroxilase positivos permaneceram inalterados em camundongos deficientes dos receptores do TNF tratados com MPTP.

Embora o TNF-α seja uma importante citocina envolvida no processo inflamatório durante a DP, muitas outras citocinas são produzidas e a inibição de apenas um dos eventos pode não ser suficiente para proteger os neurônios dopaminérgicos contra a degeneração. Assim, drogas que interferem na cascata de eventos que levam à degeneração ou que agem em várias vias podem representar alvos terapêuticos melhores para a neuroproteção.

### 6.3 Apoptose e capases

O termo apoptose é derivado do grego com o significado “ser descartado”, em analogia às pétalas de uma flor quando desprendidas. Este processo mostra-se eficaz e necessário para a manutenção das populações celulares. (LEIST, 2001).

As deficiências nos processos de apoptose são responsáveis pela proliferação de células tumorais, e a exarcebação destes mecanismos apoptóticos podem estar envolvidos em várias condições patológicas como as doenças autoimunes, as doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, Esclerose Amiotrófica Lateral (ALS), Esclerose Múltipla, dentre muitas outras. (DONG *et al*., 2009).

A apoptose tem sido implicada em várias doenças neurodegenerativas como um importante fator que contribui significativamente para a morte neuronal (DONG *et al*., 2009). A doença de Parkinson pode ser caracterizada como uma degeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos por apoptose do sistema nigroestriatal. A neurotoxina 6-OHDA que é uma das mais utilizadas como modelo da doença de Parkinson em animais, provoca danos mitocondriais e induz a ativação da caspase 3, causando morte neuronal por apoptose (COSTA *et al*., 2002).

Os mecanismos de morte celular induzida por 6-OHDA podem ser explicados de três maneiras: geração de espécies reativas do oxigênio (ROS) por auto-oxidação intra ou extracelular, formação de peróxido de hidrogênio induzido pela monoamino oxidase e inibição direta da cadeia respiratória mitocondrial (TANAKA *et al*., 2006). Muitos trabalhos na literatura têm sugerido que a excessiva geração de espécies reativas do oxigênio produzida por 6-OHDA provoca estresse oxidativo que lesiona as células e induz morte celular por apoptose (BLUM *et al*., 2001; TAKATA *et al*., 2005; HANROTT *et al.,* 2006).

O mecanismo celular de apoptose é marcado por alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial onde há formação de um canal de alta condutância com perda do potencial para fosforilação oxidativa; há extravasamento de citocromo c para o meio intracitoplasmático; ativação de uma série de substâncias serino-proteases como as caspases, transglutaminases, endonucleases e fosfatidilserina / trombospondina. O processo implica na

fragmentação da cromatina e das organelas, com posterior clivagem das mesmas. Os corpúsculos apoptóticos formados são fagocitados por macrófagos, que reconhecem suas sinalizações (DAMIANI, 2004).

As caspases são proteases, conhecidas por estarem envolvidas na apoptose. Foram descobertos mais de 14 tipos de caspases no tecido nervoso dos mamíferos, elas podem agir como iniciadoras da apoptose, executoras da apoptose ou como mediadores inflamatórios, dependendo do tipo de caspase. A ativação das caspases pode ser observada em várias doenças como no trauma (caspase-3), na DP (caspase-3), na ALS (caspase-3) e na doença de Alzheimer (caspase-3 e caspase 9). Alguns inibidores das caspases podem agir como neuroprotetores em alguns modelos celulares e animais de doenças neurodegenerativas (WALDMEIER; TATTON, 2004).

As caspases pró-apoptóticas são divididas em grupos iniciadores da apoptose incluindo caspases 2, 8, 9 e 10 e no grupo de executadores da apoptose, incluindo as caspases 3, 6 e 7. A apoptose pode ser induzida por vias extrínsecas de estímulos, como ligantes de superfície celular, ou por via intrínseca, com sinais originados no interior da célula.

Na via extrínseca da ativação da apoptose, a pró-caspase 8 é recrutada pela DED (domínios efetores de morte) e induzem o sinal de morte através do complexo DISC (Complexo de morte via estímulo extracelular), sendo que o ligante pode ser o fator de necrose tumoral (TNF). A via intrínseca de apoptose envolve a ativação da pró-caspase 9 a qual é ativada por eventos de alteração da permeabilidade mitocondrial, com liberação de citocromo c para o meio intracitoplasmático. (SALVESEN, 2002). Nesses casos de ativação da caspase 9, há interação com o fator de ativação das proteases pró-apoptóticas 1 (Apaf-1). Uma vez ativada, a caspase 9 ativa uma série de outras pró-caspases como por exemplo a caspase 3, 6 e 7 subseqüentemente, clivando estas pró-caspases em substratos menores, resultando numa amplificação do sinal de morte.

A mitocôndria atua como um regulador central da via intrínseca da apoptose, além disso, também pode amplificar e mediar a via extrínseca. A mitocôndria tem um papel "chave" na integração e propagação dos sinais de morte originados intrinsicamente por danos ao DNA, por estresse oxidativo, extravasamentos de proteínas e outros. A maior parte dos

sinais pró-apoptoticos são derivados da disrruptura mitocondrial originada pela perda do potencial para fosforilação oxidativa, aumentando subitamente a permeabilidade da membrana mitocondrial com formação de um edema com grande influxo de água para a matriz mitocondrial e eventual ruptura da membrana. Proteínas são liberadas para o meio intracitoplasmático (extra-mitocondrial) incluindo fator indutor da apoptose (AIF), endonucleases (endoG), Smac/Diablo, Htr/Omi e o citocromo c, que ativa o aptossomo e, conseqüentemente, a cascata de caspases (WALDMEIER; TATTON, 2004).

A interação entre a mitocôndria e as caspases ocorre através da família das proteínas Bcl-2. Genes pró-apoptóticos como Bax, Bid e Bak induzem a liberação de citocromo c além de outros fatores citossólicos. O citocromo c liga-se ao Apaf-1 o qual, através de alterações conformacionais, oligomeriza-se e forma o aptossomo, um complexo que ativará a pró-caspase 9. Esta pró-caspase 9 ativada, desencadeia o sinal para a ativação das caspases 3, 7 e 6 resultando num processo amplificado e catalítico resultando no processo apoptótico. (SLEE, 1999).

Vários estudos sugerem que o fator de necrose tumoral (TNF-$\alpha$) e a ativação dos receptores TNFR ativam a via extrínseca da indução da apoptose (em parte através do Bid e do Bax) e possuem um papel importante na patogênese de algumas doenças neurodegenerativas como a DP e a doença de Alzheimer (WALDMEIER; TATTON, 2004).

### 6.4 Espécies reativas do oxigênio e estresse oxidativo

Radicais livres são moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados. Em geral, são instáveis e têm vida muito curta devido à natureza livre de seus elétrons que os tornam hábeis a reagir com diversos compostos ou alvos celulares, de modo a obter uma maior estabilidade química conferida pelo emparelhamento de elétrons (HALLIWELL, 1994). Essas moléculas causam danos teciduais por interagirem com carboidratos, ácidos nucléicos (DNA), lipídios e proteínas.

Os radicais livres são moléculas altamente reativas formadas a partir de transferências de elétrons, podem reagir e formar uma outra série de espécies reativas, como as espécies reativas do oxigênio (ROS) e se não neutralizadas podem levar ao estresse oxidativo, exacerbar a inflamação e promover dano tecidual. Os radicais livres incluem as espécies reativas do oxigênio (ROS) como o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), radical peróxido ($ROO^{\cdot}$), o peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$), bem como as espécies reativas do nitrogênio (RNS), como o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) e espécies reativas do cloro (RCS) como o ácido hipocloroso (HOCl) (MOSLEY *et al*., 2006).

Essas espécies químicas são abundantes na natureza, produzidas normalmente no metabolismo celular e encontradas no meio ambiente, facilmente formadas com exposição excessiva a luz solar, poluição, álcool, inseticidas, radiação, exercício intenso, etc. Existem enzimas antioxidantes protetoras e mecanismos que neutralizam os radicais livres, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase, a glutationa, glutationa peroxidase e redutase, a vitamina E, a vitamina C, e outras substancias capazes de inativar ou reduzir a formação dos radicais livres (MOSLEY *et al.,* 2006).

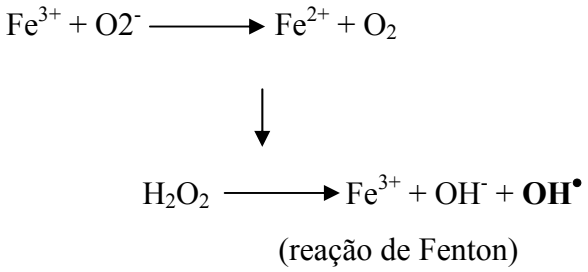
O dano oxidativo ocorre nos organismos celulares devido ao desequilíbrio entre a produção dos radicais livres e as defesas antioxidantes celulares. Através da respiração celular normal ou da respiração mitocondrial desregulada, grandes quantidades de ROS podem ser produzidos e desencadearem efeitos deletérios no delicado equilíbrio neuronal do SNC. O estresse oxidativo está realmente implicado como sendo a principal causa da injúria neuronal em várias doenças neurológicas, incluindo a doença de Parkinson, no entanto, ainda não está claro se o estresse oxidativo é causa ou conseqüência dessas doenças (ALFAVARO *et al*., 2004; MOSLEY *et al*., 2006).

Alguns dos mais destrutivos radicais livres gerados no organismo derivam do oxigênio ($O_2$). Então, a molécula mais importante para a manutenção da vida pode também provocar danos celulares, podendo levar a destruição de órgãos e do próprio organismo. O acúmulo dos danos ao longo da vida causados por moléculas vitais em órgãos está relacionado ao envelhecimento e ao desenvolvimento de doenças relacionadas com a idade (NICHOLLS, 2008).

O radical superóxido ($O^{2-}$) é o produto da adição de um elétron a molécula de oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). Muitas moléculas biológicas como, por exemplo, a hemoglobina (MISRA; FRIDOVICH, 1972a), miogobina (GOTOH; SHIKAMA, 1976), catecolaminas (MISRA; FRIDOVICH, 1972b) a alguns constituintes dos sistemas de transporte de elétrons mitocondriais (TURRENS *et al.,* 1985) e microssômicos (JAKOBY; ZIEGLER, 1990) reagem com o $O_2$ convertendo-o em $O^{2-}$. Adicionalmente, fagócitos ativados (neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos) geram o $O^{2-}$ em grande quantidade, com a finalidade de destruir microorganismos estranhos ao organismo. Esse mecanismo de proteção natural pode tornar-se nocivo nos processos de inflamação crônica (MOSLEY *et al*., 2006).

O radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) é a espécie de oxigênio mais reativa em sistemas biológicos; age rapidamente no local em que é produzido, sendo potencialmente capaz de causar alterações nas bases purínicas e pirimidínicas, levando a inativação ou a mutação do DNA, inibir diversas proteínas (constituintes das membranas celulares e enzimas) através da oxidação dos seus grupamentos sulfidrila (-SH) a pontes dissulfeto (-SS) e iniciar a peroxidação de lipídeos, especialmente ácidos graxos poliinsaturados de membranas e lipoproteínas (MOSLEY *et al.,* 2006).

O radical hidroxila é gerado nos sistemas biológicos principalmente por radiações ionizantes e através da reação que envolve um metal de transição, o radical superóxido e o peróxido de hidrogênio. Devido ao alto teor de água das células, sua exposição às radiações ionizantes (raios X e gama), pode resultar na formação do radical hidroxila, através do processo de radiólise da água (HALLIWELL, 1994). Os íons metálicos (de ferro ou cobre) possuem a habilidade de mover elétrons, o que constitui a base para a iniciação e propagação de muitas das reações de radicais livres mais nocivas. Assim, o $OH^{\bullet}$ é formado pela interação entre um íon metálico ($Fe^{3+}$), o $O^{2-}$ e o $H_2O_2$, de acordo com a seguinte equação:




(reação de Fenton)

O $H_2O_2$ não é especialmente tóxico, a menos que esteja em altas concentrações nas células, outra característica dessa molécula é que ela possui a capacidade de se difundir rapidamente através das membranas celulares podendo então se distribuir por sítios distantes dos quais ela foi gerada. Além disso, na presença de metais de transição, mais comumente o $Fe^{2+}$, mas também o $Cu^{1+}$, o $H_2O_2$ é reduzido à radical hidroxil ($OH^{\bullet}$) via reações de Haber-Weiss ou Fenton (NICHOLLS, 2008).

Essa via de produção do $OH^{\bullet}$ tem sido bastante estudada, embora o seu papel patológico não esteja bem definido, a existência de proteínas de transporte para o ferro e o cobre, utilizadas pelas células para minimizar a presença de íons metálicos livres indicam que tais reações podem ser prejudiciais para os sistemas biológicos (MOSLEY *et al.,* 2006).

O óxido nítrico (NO) funciona como um mensageiro intracelular de produção endógena que desempenha um importante papel em praticamente todos os sistemas do organismo (EISERICH et al., 1998), embora exerça diversas funções fisiológicas úteis, em excesso pode ser nocivo. Em determinadas condições o NO e o $O_2^-$ podem interagir, resultando em um produto muito tóxico, o peroxinitrito ($ONOO^-$):

$$O_2^- + NO\bullet \rightarrow ONOO^-$$

O $ONOO^-$ é capaz de reagir prontamente com diversas moléculas: proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucléicos, danificando-as. Além disso, seus prováveis produtos de decomposição, OH•, dióxido de nitrogênio e outros, possuem semelhante potencial deletério, consequentemente, a toxicidade do NO pode ser explicada, pelo menos em parte, por sua reação com o $O_2^-$ . O aumento da produção de $ONOO^-$ tem sido associado a diversos processos patológicos (WANG *et al.,* 2002).

Já foi estabelecido que o estresse oxidativo contribui para a cascata de eventos que leva a degeneração das células dopaminérgicas na doença de Parkinson. As regiões cerebrais que são ricas em catecolaminas, como a adrenalina, noradrenalina e dopamina são excepcionalmente vulneráveis a geração de radicais livres (HALD; LOTHARIUS, 2005). As catecolaminas, principalmente a dopamina, podem ser metabolizadas por enzimas endógenas

como a monoamino oxidase (MAO), como já foi descrito anteriormente, ou sofrerem destruição expontânea por autooxidação que leva a produção de $H_2O_2$ e quinonas derivadas da dopamina (SULZER; ZECCA, 2000). O metabolismo da dopamina pode exacerbar o processo inflamatório e o dano tecidual através da manutenção do $H_2O_2$ no ciclo de espécies reativas do oxigênio (ROS) e/ou através da modificação de grupos sulfidrilas de proteínas via adição nucleofílica mediada pelas quinonas derivadas da dopamina (MOSLEY *et al*., 2006).

Essa modificação na configuração das proteínas pode induzir a uma agregação proteíca e alterar processos celulares como a fosforilação oxidativa resultando em acúmulo de espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio, que são normalmente produzidas pelas microglias para destruir micoorganismos invasores. Espécies moleculares reativas incluindo o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e os radicais livres hidroxil, assim como os intermediários do nitrogênio, NO e ONOO•, podem causar danos nos nerônios se produzidos em excesso, o que geralmente ocorre durante respostas neuroninflamatórias prolongadas (MOSLEY *et al*., 2006).

As espécies reativas do nitrogênio têm sido associadas com a disfunção da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, peroxidação lipídica, danos ao DNA e a nitração de resíduos de tirosina em proteínas celulares. Isto sugere que o ânion superóxido derivado da microglia, através da formação de ONOO•, é um importante fator que contribui para a patogênese da doença de Parkinson (MOSLEY *et al*., 2006).

Um dos processos oxidativos mais amplamente estudados é aquele onde ocorre a quebra dos lipídios das membranas celulares e a formação do radical peroxil (LOO•). Este processo chamado de peroxidação lipídica é extremamente complexo e lesivo, porque uma vez iniciado, ele pode ser propagado, já que o radical peroxil formado pode reiniciar o processo, que pode ocorrer indefinidamente.

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ROS, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído),

culminando com a morte celular. A peroxidação lipídica também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson. Assim como na formação das ROS, nem sempre os processos de peroxidação lipídica são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido aracdônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória. Todavia, o excesso de tais produtos pode ser lesivo (NAKAMURA; LIPTON, 2009).

A lipoperoxidação é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. Estas etapas estão apresentadas nas reações seguintes, onde L representa o lipídio:

$$LH + OH^{\bullet} \text{ (ou } LO^{\bullet}) \longrightarrow L^{-} + H_2O \text{ (ou LOH) (Iniciação)}$$

$$L^{\bullet} + O_2 \longrightarrow LOO^{\bullet} \text{ (Propagação)}$$

$$LH + LOO^{\bullet\bullet} \longrightarrow L^{\bullet} + LOOH \text{ (Propagação)}$$

$$LOO^{\bullet} + L^{\bullet} \longrightarrow LOOL \text{ (Terminação)}$$

$$LOO^{\bullet} + LOO^{\bullet} \longrightarrow LOOL + O_2 \text{ (Terminação)}$$

A reação inicia-se com o seqüestro do hidrogênio do ácido graxo polinsaturado (LH) da membrana celular. Tal seqüestro pode ser realizado pelo $OH^{\bullet}$ ou pelo $LO^{\bullet}$ (radical alcoxila), com conseqüente formação do $L^{\bullet}$ (radical lipídico). Na primeira equação de propagação, o $L^{\bullet}$ reage rapidamente com o $O_2$, resultando em $LOO^{\bullet}$ (radical peroxila), que, por sua vez, seqüestra novo hidrogênio do ácido graxo polinsaturado, formando novamente o $L^{\bullet}$ na segunda equação de propagação. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais ($L^{\bullet}$ e $LOO^{\bullet}$) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até formarem complexos mais estáveis (NAKAMURA; LIPTON, 2009).

Vários estudos já comprovaram que as ROS podem ser causa ou conseqüência de doenças humanas associadas ao estresse oxidativo. Por isso, antioxidantes naturais e sintéticos têm sido recomendados para o alívio dos sinais e sintomas destas doenças e, mesmo, para bloquear sua evolução (NAKAMURA; LIPTON, 2009).

Os antioxidantes podem atuar em diferentes aspectos na proteção dos organismos contra os radicais livres. O primeiro mecanismo de defesa contra os radicais livres é impedir a sua geração, principalmente através da inibição das reações em cadeia com os íons metálicos (ferro e cobre). Os antioxidantes devem ser substancias capazes de inativar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o dano aos lipídeos, as proteínas, aos ácidos graxos e ao DNA, evitando assim as lesões aos constituintes celulares e a consequente morte celular. Um outro mecanismo de proteção é promover o reparo das lesões produzidas pelos radicais livres. Esse processo está relacionado com o reparo da molécula do DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas. Em algumas situações pode ocorrer uma adaptação do organismo em resposta a geração desses radicais livres com o aumento sa síntese das enzimas antioxidantes (FREINBICHLER *et al*., 2008).

Os compostos antioxidantes podem ter origem endógena, como as enzimas catalase, superóxido dismutase e a glutationa, ou serem exógenos, provenientes, por exemplo, da dieta alimentar. Muitos estudos destacam os tocoferóis (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C), o selênio, os carotenóides e principalmente os polifenóis, que têm sido amplamente estudados nos últimos anos, principalmente por inibirem a peroxidação lipídica e a lipoxigenase (EL-AGAMEY *et al.,* 2004; OMONI; ALUKO, 2005). De acordo com Xie *et al*. (2007), o café é um das principais fontes de compostos fenólicos na dieta humana.

Vários estudos já comprovaram que as metilxantinas, incluindo a cafeína e os seus metabólitos posssuem a capacidade de inibir o dano oxidativo induzidos por espécies reativas do oxigênio (LEE, 2000; JOGHATAIE *et al.*, 2004).

A cafeína parece exercer uma ação central que melhora a atividade do sistema dopaminérgico. Chen *et al.* (2007) demonstraram a ação neuroprotetora da cafeína utilizando um modelo experimental da doença de Parkinson em camundongos tratados com MPTP, onde foi observada uma redução da perda dos neurônios dopaminérgicos estriatais, esse efeito parece estar relacionado também ao bloqueio dos receptores $A_{2A}$.

Behan e Stone (2002) demonstraram que o CSC, um antagonista específico $A_{2A}$ derivado da xantina, assim como a cafeína, possui atividade protetora contra danos

excitototóxicos e danos causados por radicais livres, sugerindo que esses compostos podem agir prevenindo os danos neuronais resultantes de uma variedade de estímulos lesivos.

## 7 Adenosina

A adenosina é um nucleosídeo formado pela união de uma adenina e uma ribose, presente nos meios intra e extracelular que possui um papel neuromodulador e hemostático (CUNHA, 2001). Encontra-se em maior concentração no meio intracelular (10 a 50 nM), enquanto na fenda sináptica sua concentração fica em torno de 0,5 a 4μM (CUNHA, 2005). A produção intracelular resulta da clivagem da S-adenosilhomocisteína, do ATP (adenosina tri-fosfato) do ADP (adenosina difosfato) ou do AMP (adenosina monofosfato), dessa forma ela atua no metabolismo energético das células e participa das vias de sinalização intracelular. Enquanto o ATP funciona como um neurotransmissor em algumas áreas cerebrais, a adenosina não é armazenada ou liberada como um neurotransmissor clássico, embora ela seja liberada por qualquer célula, porém isso ocorre mediante um transportador de nucleosídeo, que pode também fazer a recaptação da adenosina mantendo um equilíbrio entre as concentrações intra- e extracelulares (FREDHOLM *et al.,* 2007).

Como a adenosina não é liberada por exocitose, ela funciona como uma molécula sinalizadora extracelular que influencia na transmissão sináptica modulando a atividade do sistema nervoso central no nível celular, pré-sináptico inibindo ou facilitando a liberação de transmissores ou pós-sináptico hiperpolarizando ou despolarizando neurônios e/ou exercendo efeitos não-sinápticos (RIBEIRO *et al.,* 2003).

Apesar dos seus efeitos neuromoduladores diretos, a adenosina exerce muitas ações indiretas no sistema nervoso que foram demonstradas por estudos relacionando interações dos receptores da adenosina com receptores de outros neurotransmissores e/ou neuromoduladores como fazendo parte de uma sofisticada rede de conexões. A adenosina, via ativação do receptor $A_1$ pode estimular as propriedades inibitórias do GABA, como a redução da excitabilidade mediada pelo glutamato, funcionando então como molécula-chave para o controle da transmissão sináptica glutamatérgica no sistema nervoso central (SEBASTIÃO; RIBEIRO, 2000).

## 7.2 Receptores da adenosina

A neuromodulação da adenosina é exercida através da ativação de quatro diferentes tipos de receptores, aqueles de alta afinidade $A_1$ e $A_{2A}$, baixa afinidade $A_{2B}$ e o $A_3$ que é um receptor de alta afinidade em humanos, mas ocorre em baixa densidade na maioria dos tecidos. Esses receptores pertencem à família de receptores acoplados a proteína G, possuem sete domínios transmembrana formados por aminoácidos hidrofóbicos e todos foram clonados e caracterizados em muitas espécies de mamíferos, incluindo a humana (FREDHOLM *et al.*, 2001).

O receptor $A_1$ está localizado principalmente no sistema nervoso central, com alta expressão no córtex cerebral, cerebelo, tálamo, hipocampo e medula espinhal. Adicionalmente esse receptor também é amplamente expresso em tecidos periféricos, tais como testículos, tecido adiposo, estômago, rins, hipófise, adrenais, coração, aorta, fígado, olhos e bexiga (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998). A localização desses receptores é pré-sináptica, pós-sináptica e axonal (REBOLA *et al*., 2003).

A ativação dos receptores $A_1$ promove efeitos inibitórios na neurotransmissão. Uma vez ativados, os receptores $A_1$ inibem a adenilato ciclase, através da ativação da proteína G inibitória (Gi/Go) que reduzem os concentração de AMPc, inibindo as vias dependentes dessa molécula sinalizadora. (CHEN *et al.,* 2007). Além disso, ativam canais de K+ pré-sinápticos, inibem o influxo de $Ca^{2+}$ e ativam fosfolipase C, resultando na inibição da liberação de vários neurotransmissores, em particular o glutamato, a dopamina, a serotonina e a acetilcolina. Em concordância com esses efeitos, estudos pré-clínicos têm mostrado que a ativação desse receptor possui efeitos anticonvulsivantes (BOISON, 2007) e neuroprotetores (CUNHA, 2005).

Os receptores $A_{2A}$ são considerados receptores de alta afinidade, com Kd de aproximadamente de 150 nM de adenosina (DUNWIDDIE; MASINO, 2001). Está localizado principalmente no sistema nervoso central, ocorrendo basicamente no estriado, nos neurônios gabaérgicos do caudado-putamen, no núcleo acumbens e no tubérculo olfatório e em menor quantidade em outras regiões do cérebro (**Figura 4**). Sua ocorrência nos tecidos periféricos

inclui células do sistema imune, olhos, músculo esquelético, coração, útero, bexiga, plaquetas e células endoteliais (DIXON *et al*., 1996). Esses receptores também são expressos em menor quantidade no intestino delgado, rins, baço, estômago, testículos, pele e fígado (LEE *et al.*, 2003; ISHIWATA *et al*., 2005).

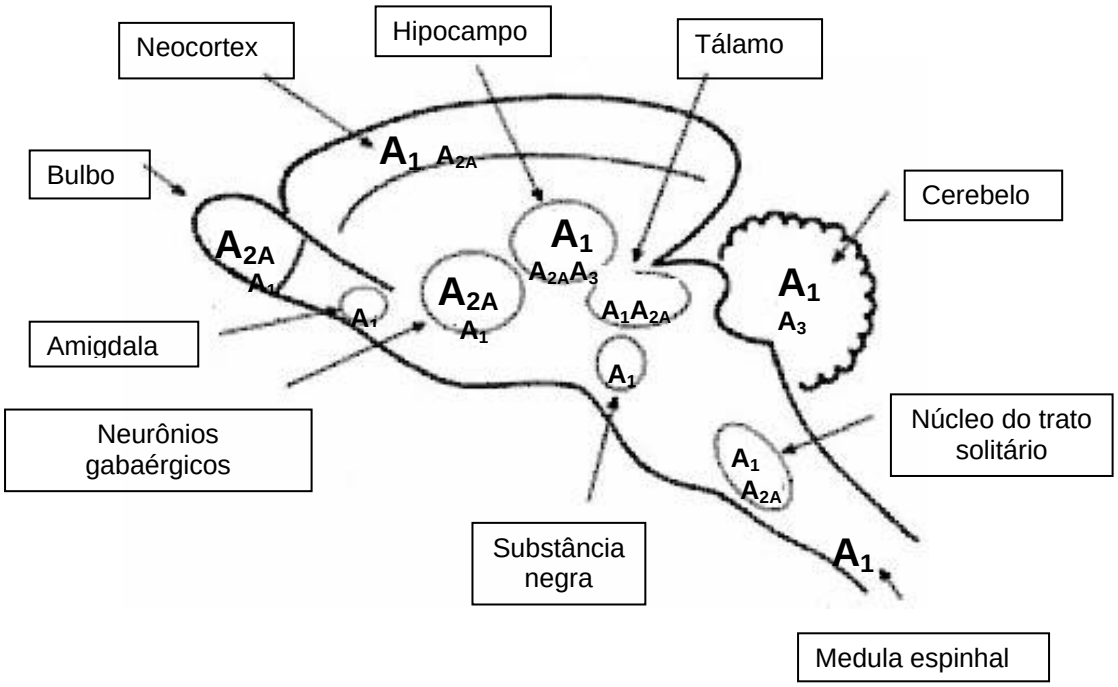



**Figura 4 - Distribuição dos receptores da adenosina de alta afinidade ($A_1$, $A_{2A}$ e $A_3$), nas diferentes regiões do SNC**
**Fonte**: Ribeiro *et al*. (2003)
Nota: Concentrações mais altas estão indicadas por letras maiores.

A ativação dos receptores $A_{2A}$, via proteína G estimulatória (Gs), ativa adenilato ciclase e aumenta as concentrações intracelulares de AMPc (XU *et al*., 2005). Ocorre também a facilitação da liberação de neurotransmissores, que provavelmente é decorrente da ativação de canais de cálcio e da proteína quinase A. Mecanismos de transdução de sinal independentes de AMPc, como a ativação da fosfolipase C, parecem estar envolvidos na sinalização de neurônios gabaérgicos e colinérgicos do estriado (FREDHOLM *et al.*, 2007).

O receptor $A_3$ se encontra em pequenas quantidades no cerebelo e hipocampo e em concentração ainda mais baixos em outras regiões do cérebro (RIBEIRO *et al.,* 2003). Os receptores da adenosina também estão presentes no sistema nervoso periférico, autonômico e somático, e os resultados obtidos em estudos com terminações do nervo motor demonstraram

ações inibitórias pré-sinápticas, mediadas pelo receptor $A_1$ (GINSBORG; HIRST, 1972), bem como excitatórias pré-sinápticas, mediadas pelo receptor $A_{2A}$ (CORREIA *et al.*, 1991). Eesses resultados inspiraram muitos estudos sobre as ações neuromoduladoras da adenosina no sistema nervoso central.

Os receptores $A_{2B}$ estão mais expressos no intestino grosso e bexiga e possuem baixa expressão no sistema nervoso central, pulmões, ductos deferentes e hipófise (GESSI *et al.*, 2005). São receptores acoplados a proteína G estimulatória, assim como os receptores $A_{2A}$, e promovem aumento dos concentração de AMPc (RIBEIRO, 2003) (Figura 2). Alguns estudos sugerem o envolvimento da fosfolipase C como mediadora de muitos efeitos da ativação dos receptores $A_{2B}$ (YAAR *et al.*, 2005). Fredholm e Altiok (1994) postularam que esses receptores podem apresentar efeitos neuroprotetores quando as concentrações extracelulares de adenosina aumentam, devido a baixa afinidade desses receptores pela adenosina e seu envolvimento com a reação inflamatória (**Figura 5**).

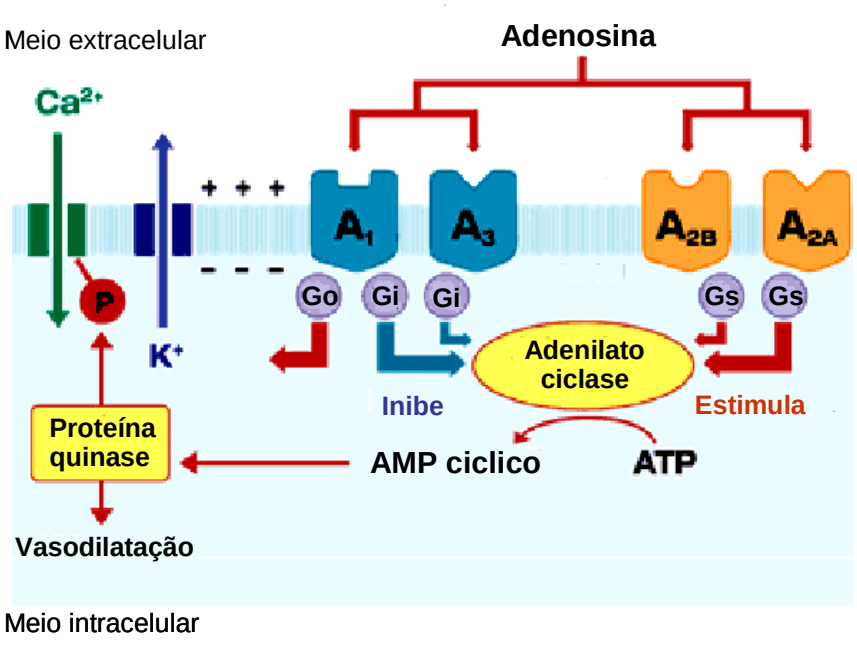



**Figura 5 - Receptores da adenosina**
**Fonte:** http://www.aderis.com/img/art_adenosine.gif

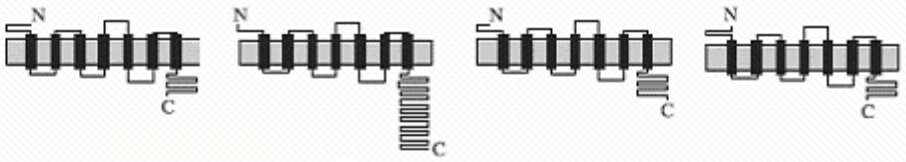
A neuromodulação inibitória da adenosina é mediada principalmente pela ativação dos receptores $A_1$ que estão acoplados a proteína G tipo Gi e Go, assim como os

receptores $A_3$, que foram os últimos receptores da adenosina descritos (FREDHOLM *et al.*, 2001; BOISON, 2008).

A ativação dos receptores $A_3$ inibe a produção de AMPc e, provavelmente, existe também o envolvimento da ativação da fosfolipase C, que foi descrita em cérebro de ratos (YAAR, 2005). Os efeitos biológicos desses receptores ainda estão sendo investigados, porém sabe-se que eles podem estar envolvidos no processo inflamatório e na apoptose (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998).

A adenosina modula vários receptores de neurotransmissores no cérebro, incluindo receptores dopaminérgicos, glutamatérgicos, colinérgicos e opióides (XU *et al.*, 2005). A descoberta dessas ações modulatórias e o desenvolvimento de vários agentes agonistas e antagonistas dos receptores da adenosina, principalmente aqueles de alta afinidade, $A_1$ e $A_{2A}$, favorecem a utilização desse sistema como ferramenta terapêutica em diversas patologias (**Quadro 2**) (CHEN *et al*., 2007).

**Quadro 2 - Propriedades biológicas dos receptores da adenosina em humanos**

| | $A_1$ | $A_{aA}$ | $A_{2B}$ | $A_3$ |
|---|---|---|---|---|
| Estrutura |  | | | |
| Localização no cromossomo humano | 1q32.1 | 22q11.23 | 17p12-p11.2 | 1p21-p13 |
| Aminoácidos | 326 | 410 | 328 | 318 |
| Proteína G | $G_{i1/2/3}$, $G_o$ | $G_s$, $G_{olf}$, $G_{15/16}$ | $G_s$, $G_{q/11}$ | $G_{i2,3}$, $G_{q/11}$ |
| Sinalização | ↓AMPc<br>↑IP3/DAG | ↑AMPc<br>↑IP3 | ↑AMPc<br>↑IP3/DAG | ↓AMPc<br>↑IP3/DAG |
| Distribuição no SNC | Difundido (↑ níveis no córtex, cerebelo, e hipocampo e ↓ em outras áreas) | Restrito (↑ níveis no estriado, núcleo acumbens, tubérculo olfatório) | Difundido (baixos níveis em todas as áreas) | Difundido (níveis intermediários no cerebelo e hipocampo e ↓ em todas as áreas) |
| Afinidade dos ligantes (Ki, em nM) | | | | |
| ***Agonistas $A_{2A}$:*** | | | | |
| - Adenosina | 70 | 150 | 5100 | 6500 |
| - NECA | 14 | 20 | 330 | 6.2 |
| - CGS21680 | 290 | 27 | 361,000 | 67 |
| ***Antagonistas $A_{2A}$:*** | | | | |
| - Cafeína | 12,000 | 2400 | 13,000 | 80,000 |
| - Teofilina | 6800 | 1700 | - | 86,000 |
| - CSC | 28,200 | 54 | - | - |
| - MSX-2 | 2500 | 5.0 | - | >10,000 |
| - SCH58261 | 290 | 0.6 | - | >10,000 |
| - KW6002 | 150 | 2.2 | 32 | - |

**Fonte**: modificado de Xu *et al*. (2005)

Os antagonistas dos receptores da adenosina originais são as xantinas como a cafeína e a teofilina, as quais possuem pouca ou nenhuma seletividade para o receptor $A_{2A}$. Modificações no núcleo das xantinas levaram à descoberta de antagonistas mais seletivos, como o KF17837. Mais recentemente, outros antagonistas derivados e não derivados das xantinas foram desenvolvidos, como o SCH 58261, que é um protótipo não derivado das xantinas que se tornou uma referência como antagonista do receptor $A_{2A}$ em estudos farmacológicos (ONGINI *et al*., 2001; BARALDI *et al*., 2003).

A cafeína, devido ao seu expressivo consumo mundial e às suas ações psicoestimulantes, possui uma especial importância em estudos clínicos, epidemiológicos e bioquímicos. A cafeína bloqueia de forma não específica os receptores $A_1$, $A_{2A}$ e $A_{2B}$, com

pouca afinidade para receptores $A_3$ (FREDHOLM *et al.,* 1999). O receptor com maior afinidade pela cafeína é o $A_{2A}$. O bloqueio desses receptores é alcançado com o consumo normal de cafeína em humanos, o equivalente a duas ou três xícaras de café. Vários estudos já foram realizados mostrando uma forte correlação entre o consumo de cafeína e uma redução no risco de desenvolvimento da doença de Parkinson (ROSS *et al*., 2000a, 2000b; ASCHERIO *et al*., 2001; XU *et al.,* 2003; ASCHERIO *et al*., 2004; KALDA *et al.,* 2006), bem como uma melhora da função cognitiva e da memória (CHEN *et al.,* 2007).

### 7.3 Adenosina como neuromodulador

Os diferentes tipos de receptores da adenosina podem co-existir em um mesmo terminal nervoso. Foi demonstrada a co-existência dos receptores $A_1$ e $A_{2A}$ funcionais em diferentes preparações de neurônios colinérgicos do estriado, colinérgicos, serotonérgicos, noradrenérgicos e glutamatérgicos do hipocampo, e colinérgicos do córtex cerebral (CUNHA, 2001; CUNHA, 2006). A afinidade semelhante desses receptores pela adenosina, o acoplamento a proteínas G antagônicas e sua co-existência tornam extremamente importante o papel da seletividade da adenosina segundo a sua concentração local (SEBASTIÃO; RIBEIRO, 2000). A concentração extracelular da adenosina parece determinar o tipo de receptor que irá ser ativado preferencialmente. A adenosina extracelular formada a partir dos nucleotídeos liberados na fenda sináptica agem preferencialmente em receptores $A_{2A}$, e a adenosina liberada através dos seus transportadores específicos ativa preferencialmente receptores $A_1$ (RIBEIRO *et al*., 2003).

Atualmente existem poucos estudos sobre o papel fisiológico da interação entre os diferentes subtipos de receptores da adenosina. Lopes *et al.* (1999) demonstraram que em neurônios hipocampais a ativação de receptores $A_{2A}$ reduz a inibição da transmissão sináptica exercida pela ativação dos receptores $A_1$, um processo que envolve a proteína quinase C, além disso, a presença de antagonistas $A_{2A}$ na junção neuromuscular aumenta a resposta inibitória à ativação do receptor $A_1$ (SEBASTIÃO; RIBEIRO, 2000).

Existe um consenso de que a neuromodulação exercida pela adenosina ocorre principalmente pela ativação dos receptores de alta afinidade, $A_1$ e $A_{2A}$, porém mais

recentemente, um papel neuromodulador também tem sido atribuído ao receptor $A_{2B}$ (RIBEIRO *et al*., 2003; ROSI *et al.,* 2003; BOISON, 2008). Essa ação neuromodulatória da adenosina ocorre através de interações receptor-receptor na ativação de receptores de neuropeptídeos, de receptores nicotínicos, de receptores NMDA (N-metil-D-Aspartato) e de receptores metabotrópicos do glutamato (RIBEIRO *et al.,* 2003). A interação com receptores ionotrópicos parece ocorrer através de modificações do grau de fosforilação desses receptores, enquanto a interação da adenosina com receptores metabotrópicos acoplados a proteína G deve ocorrer no nível da proteína G ou dos sistemas de transdução de sinais ativados por eles (RIBEIRO *et al*., 2003).

Vários trabalhos encontrados na literatura demonstram as interações entre os receptores da adenosina e receptores colinérgicos, dopaminérgicos, GABAérgicos e glutamatérgicos (CIRUELA *et al*., 2006; FUXE *et al*., 2007; DARE *et al.,* 2007; BOISON, 2008). Cartmell *et al.* (1994) demonstraram que a interação entre receptores da adenosina e os receptores glutamatérgicos resultam da potenciação do aumento das concentrações de AMPc induzidos por agonistas de receptores $A_{2A}$, após a ativação de receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGlu). Os efeitos da adenosina no sistema glutamatérgico são de grande relevância, visto que o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório, e está envolvido em vários processos de lesão neuronal (BOISON, 2008).

O efeito modulador da adenosina sobre o sistema colinérgico está bem estabelecido na junção neuromuscular e estudos indicam que esse efeito também ocorre no sistema nervoso central (CUNHA; RIBEIRO, 2000). A adenosina modula a liberação de acetilcolina em neurônios colinérgicos ascendentes, que se projetam até o córtex e o tálamo (XU *et al.,* 2005). Foram demonstradas ações da adenosina, tanto inibitória (via receptor $A_1$), como facilitatória (via receptor $A_{2A}$), sobre a liberação de acetilcolina, na junção neuromuscular, em neurônios estriatais, corticais e hipocampais (CUNHA; RIBEIRO, 2000).

Os receptores dopaminérgicos $D_1$ e $D_2$ são os principais reguladores da função estriatal e os receptores da adenosina $A_1$ e $A_{2A}$ são os principais moduladores dessa via de sinalização, a interação entre eles é a mais bem detalhada na literatura científica. Existem principalmente dois tipos de interações entre receptores da adenosina e os receptores dopaminérgicos no gânglio basal, a interação antagônica entre receptores $A_1/D_1$ nos neurônios gabaérgicos da via estriatonigral-estriatoendopeduncular (via direta) e receptores $A_{2A}/D_2$ nos neurônios gabaérgicos da via estriato-palidal (via indireta). A via direta promove ativação

motora, enquanto a via indireta promove inibição motora (FUXE et al., 2007). A co-localização destes receptores no corpo estriado e núcleo accumbens está bem estabelecida (FREDHOLM *et al*., 1999).

O primeiro indício de interações antagônicas entre receptores da adenosina e dopaminérgicos foi obtido em estudos comportamentais em modelos da doença de Parkinson utilizando antagonistas não seletivos da adenosina, como a cafeína e a teofilina associados a L-DOPA e agonistas dopaminérgicos, levando a uma potenciação do aumento da atividade motora produzida pelas drogas dopaminérgicas (FUXE; UNGERSTEDT, 1974).

A interação estabelecida entre receptores adenosinérgicos e dopaminérgicos tem sido descrita como intramembrana, com interação direta entre os receptores, ou envolvendo modulação de proteína G e a conseqüente ativação de segundos mensageiros como o AMPc (FUXE *et al.,* 1998; FERRE *et al*., 2001; FREDHOLM; SVENNINGSSON, 2003).

Estudos neuroquímicos mostram que na presença de um antagonista da adenosina $A_{2A}$ (CGS 21680) os agonistas de receptores $D_2$ de neurônios gabaérgicos da região estriato-palidal se mostram incapazes de exercerem atividade (FUXE *et al*., 1998). Além disso, Popoli *et al.* (1996) demonstraram uma potenciação do efeito motor induzido pelo agonista dopaminérgico $D_1$, SKF38393, quando associado a um antagonista $A_1$ (CPT), em camundongos que receberam reserpina e em ratos com lesão unilateral da via nigroestriatal.

Outros resultados de estudos comportamentais mostram que, em baixas doses, o agonista de receptor $A_{2A}$ CGS 21680 antagoniza as alterações comportamentais induzidas pelo agonista $D_2$-símile quinpirole em rato. Além disso, baixas doses do CGS 21680 podem antagonizar o aumento da atividade motora induzido por agonistas de receptores $D_2$, mas não por agonistas de receptores $D_1$, o que demonstra uma seletividade de interação entre esses receptores (FUXE *et al.,* 1998; FUXE *et al*., 2007). Em concordância com esses resultados, alguns trabalhos demonstraram que antagonistas de receptores $A_{2A}$ aumentam significativamente a ativação motora causada por agonistas de receptores $D_2$, mas não por agonistas de receptores $D_1$ (FERRE *et al*., 1997; FUXE *et al.,* 1998; FERRE *et al.,* 2001; FUXE *et al*., 2007).

O principal efeito da interação dos receptores adenosinérgicos e dopaminérgicos consiste em alterações no controle da atividade motora. A ativação motora induzida pela administração de antagonistas de receptores da adenosina pode ser revertida pela depleção de dopamina, pelo bloqueio dos receptores dopaminérgicos ou através da lesão de neurônios dopaminérgicos (FERRE *et al.,* 2001).

Esses resultados sugerem uma possível utilização de agonistas e antagonistas $A_1$ no tratamento de doenças com disfunção na sinalização dos receptores $D_1$, como o déficit de atenção no distúrbio de hiperatividade (antagonistas $A_1$), na doença de Parkinson (antagonistas $A_1$) e nas discinesias (agonistas $A_1$) (FUXE, *et al.,* 2007). Por exemplo, a ativação de receptores $A_{2A}$ reduz a sinalização dos receptores $D_2$, levando a redução da atividade glutamatérgica cortical pela via indireta, com redução da função motora. Na doença de Parkinson, onde a atividade do receptor $D_2$ está reduzida, antagonistas $A_{2A}$ poderiam ser úteis como agentes terapêuticos para aumentar a sinalização dos receptores $D_2$ através da interação $A_{2A}$-$D_2$ nos neurônios gabaérgicos da região estriato-palidal (FUXE *et al*., 2007).

### 7.4 Antagonistas de receptores $A_{2A}$ e a doença de Parkinson

Nos últimos dez anos muitos estudos pré-clínicos (em roedores e primatas), clínicos e epidemiológicos tem aumentado o interesse pelos receptores adenosinérgicos $A_{2A}$, como possível estratégia terapêutica não-dopaminérgica para a doença de Parkinson (CHEN *et al*., 2007). Muitos antagonistas $A_{2A}$ desenvolvidos ao longo da última década exibem propriedades anti-parkinsonianas, melhorando a atividade motora em modelos animais da doença de Parkinson e, mais recentemente, em pacientes portadores da doença (LEWITT *et al*., 2008). A distribuição dos receptores $A_{2A}$ no estriado, o antagonismo molecular e as interações comportamentais entre os receptores da adenosina e da dopamina proporcionam uma base anatômica e neuroquímica para a observação clínica de que os antagonistas $A_{2A}$ melhoram a atividade motora na doença de Parkinson. Estudos experimentais e epidemiológicos sugerem que a cafeína e outros antagonistas $A_{2A}$ podem proteger ou atenuar a degeneração dopaminérgica (CHEN *et al.,* 2007).

Vários estudos epidemiológicos demonstraram uma relação inversa entre o consumo de cafeína e o risco de desenvolvimento da doença de Parkinson (ROSS *et al*., 2000 a, 2000b; ASCHERIO *et al*., 2001; ASCHERIO *et al*., 2004; XU *et al.,* 2006). Baseado nesses resultados muitos pesquisadores tem investigado essa relação entre o consumo de cafeína e o desenvolvimento da doença de Parkinson em modelos animais da doença. Estes estudos farmacológicos e genéticos fornecem fortes evidências experimentais de que os receptores $A_{2A}$ podem contribuir para a degeneração dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais e por outro lado antagonistas desses receptores, como a cafeína, apresentam propriedades neuroprotetoras (XU *et al*., 2005).

Chen *et al.* (2001) demonstraram que a cafeína quando co-administrada com MPTP em camundongos em doses (5-30mg/kg) comparáveis com o típico consumo humano reduzem de maneira dose-dependente a perda neuronal dos neurônios dopaminérgicos estriatais expostos ao MPTP. Esse efeito protetor da cafeína também foi observado com diferentes protocolos de exposição ao MPTP (em dose única e em múltiplas doses). Análises histopatológicas mostraram que a destruição neuronal induzida pelo MPTP (via imunohistoquímica para tirosina hidroxilase) pode ser atenuada pela associação da cafeína com o MPTP, em camundongos (OZTAS *et al.,* 2002). De acordo com esses estudos a cafeína não só promove uma proteção funcional contra a neurotoxicidade do MPTP, como também reduz a degeneração do sistema dopaminérgico nesse modelo de doença de Parkinson.

Esses estudos com cafeína propiciaram outras pesquisas com antagonistas $A_{2A}$ com a finalidade de testar se o bloqueio $A_{2A}$ mediado por esses compostos mimetizaria o efeito neuroprotetor da cafeína atenuando a toxicidade do MPTP. Esses compostos testados, em sua maioria derivados das xantinas, como o CSC, o DMPX, o KW-6002, e outros não derivados das xantinas como o SCH58261, demonstraram possuir a capacidade de também atenuar a neurotoxicidade induzida pelo MPTP (CHEN *et al*., 2001).

A lesão nigroestriatal unilateral induzida por 6-OHDA (6-hidroxidopamina) tem sido largamente usada como um modelo animal da doença de Parkinson. Nesse modelo ocorre uma destruição imediata e quase completa dos neurônios dopaminérgicos da substância negra, resultando em uma depleção dos conteúdos de dopamina no estriado ipsilateral a injeção (DEUMENS *et al.,* 2002). As mudanças unilaterais na via nigroestriatal causadas pela injeção

de 6-OHDA levam a uma assimetria funcional a qual é quantificada utilizando-se um teste rotacional induzido por agonistas dopaminérgicos diretos (apomorfina) ou indiretos (anfetamina) (DEUMENS *et al*., 2002).

Efeitos neuroprotetores similares aos encontrados em modelos animais da doença de Parkinson com MPTP foram observados com o antagonista $A_{2A}$, KW-6002, em ratos utilizando o modelo de lesão com a neurotoxina 6-OHDA (IKEDA *et al*., 2002).

### 7.5 Antagonistas $A_{2A}$ e a interação com neurotransmissores

Os receptores $A_{2A}$ estão estreitamente relacionados com os receptores dopaminérgicos $D_2$, não só na sua localização, mais concentrada no estriado. A estimulação de receptores $A_{2A}$ diminui a afinidade de ligação dos receptores $D_2$ (FERRÉ *et al.,* 1991 a, 1991b, 1991c; FERRÉ *et al*., 2001) e promove efeitos opostos aos da ativação dos receptores $D_2$ no nível de segundos mensageiros e na expressão de genes (OLAH; STILES, 2000).

A co-localizaçãodos receptores $A_{2A}$ e $D_2$ nos neurônios estriatopalidais fornece as bases para interação funcional antagônica entre esses receptores. Resultados obtidos em diferentes estudos mostraram que os receptores da adenosina $A_{2A}$ exercem uma influência excitatória nos neurônios estriatopalidais, que em parte está relacionada ao seu efeito antagônico na ativação do receptor $D_2$. Essa interação funcional tem despontado como uma nova abordagem terapêutica para a doença de Parkinson, baseada no uso de antagonistas seletivos do receptor $A_{2A}$ (FUXE *et al.,* 2001; PINNA *et al*., 2005).

As primeiras evidências bioquímicas da interação entre os receptores $A_{2A}$ e $D_2$ foram observadas por Ferre *et al*. (1991a), que mostraram que a estimulação de receptores $A_{2A}$ reduz a afinidade dos receptores $D_2$ em preparações de membrana estriatal. Esses efeitos que parecem ocorrer devido a alterações no receptor $D_2$, que tem sido demonstradas em diferentes linhagens celulares (SALIM *et al.,* 2000). Estudos mais recentes utilizando novas técnicas provaram a existência de complexos heterométricos $A_{2A}$-$D_2$. Outros estudos sugerem

a existência de heterodímeros $A_{2A}$-mGluR5 e $A_1$-$D_1$ (GINES *et al.,* 2000; FERRE *et al*., 2002).

A interação $A_{2A}$-$D_2$ parece ser mais potente no estriado quando ocorre destruição dopaminérgica com aparecimento de receptores $D_2$ supersensíveis (FERRE; FUXE, 1992). Além da interação direta receptor-receptor intramembrana, tem sido demonstrada uma interação antagônica recíproca em nível de adenilato ciclase. A estimulação de receptores $D_2$ através de proteínas Gi/o inibe, enquanto a estimulação de receptores $A_{2A}$ acoplado a proteína Gs ativa a adenilato ciclase (KULL *et al*., 2000). Isso leva a uma regulação oposta na atividade da proteína quinase AMPc-dependente (PKA), que por sua vez, está envolvida no controle da fosforilação e da atividade de numerosas fosfoproteínas, incluindo a fosfoproteína reguladora de dopamina (DARPP-32) e fatores de transcrição, como o elemento de ligação a proteínas de resposta ao AMPc (CREB), que, por sua vez, controla a expressão de genes de resposta imediata (PINNA *et al.,* 2005).

Os antagonistas dopaminérgicos e os agonistas adenosinérgicos induzem a uma forte redução da atividade motora espontânea e induzida por agonistas dopaminérgicos. Esses efeitos dos agonistas adenosinérgicos estão correlacionados principalmente com os receptores $A_{2A}$ (PINNA *et al.,* 2005).

Agonistas de receptores $A_{2A}$ induzem sedação e catalepsia e inibem o efeito estimulador motor dos agonistas dopaminérgicos. Além disso, em ratos com lesão unilateral com 6-OHDA, a administração de agonistas de receptores $A_{2A}$ reduzem o comportamento rotacional induzido por agonistas dopaminérgicos. Em contraste, antagonistas de receptores da adenosina, incluindo a cafeína e metilxantinas, através da sua ação nos receptores $A_{2A}$ produzem estimulação motora através do aumento da atividade locomotora (FERRE *et al.* 2001; PINNA *et al.,* 2002).

A ativação dos receptores $A_{2A}$ estriatais antagoniza a redução da liberação de GABA induzida por agonista $D_2$ no globo pálido, enquanto o bloqueio dos receptores $A_{2A}$ estriatais potencia a redução da liberação do GABA mediada pelo receptor $D_2$. Receptores $A_{2A}$ pré-sinápticos localizados no estriado exercem um papel inibitório na neurotransmissão

gabaérgica, atenuando a inibição neuronal mediada pelo GABA (HATZIPETROS; YAMAMOTO, 2006).

Estudos mostraram que a atropina e a escopolamina reduzem os efeitos inibitórios do agonista $A_{2A}$, CGS 21680, no comportamento rotacional induzido por agonista dopaminérgico e a indução de *c-fos*, demonstrando que mecanismos diretos e indiretos envolvendo a transmissão colinérgica apresentam um importante papel no controle motor (MORELLI *et al.,* 1995). Estes resultados estão de acordo com o papel exercido pela dopamina nas respostas mediadas pela liberação de acetilcolina e com o aumento da liberação de acetilcolina no estriado e nos nervos terminais motores induzido pela ativação de receptores $A_{2A}$ (PINNA *et al.,* 2005).

A partir dessas evidências muitas pesquisas foram direcionadas na determinação do possível uso terapêutico de antagonistas $A_{2A}$ como uma alternativa para o tratamento da doença de Parkinson (HAUSER; SCHWARZSCHILD, 2005; SIMOLA *et al.*, 2008).

Estudos comportamentais em ratos com lesão unilateral no estriado por 6-hidroxidopamina (6-OHDA), revelaram que o bloqueio dos receptores $A_{2A}$ aumentou significativamente o número de rotações contralaterais induzidas por L-DOPA ou por estimulação de receptores dopaminérgicos; assim como a imunorreatividade *fos-like* no estriado e no globo pálido (MATSUYA *et al.,* 2007; KELSEY *et al*., 2009). Esses resultados forneceram as primeiras evidências de que o bloqueio dos receptores $A_{2A}$, através do seu efeito na potenciação da transmissão dopaminérgica, poderia contribuir para a melhora da disfunção motora observada nos modelos da doença de Parkinson.

A habilidade dos antagonistas $A_{2A}$ em reverter os déficits motores da doença de Parkinson em animais, tanto roedores como em primatas, encorajaram os primeiros ensaios clínicos em pacientes com doença de Parkinson que mostraram os resultados iniciais favoráveis (BARA-JIMENEZ *et al.,* 2003; XU *et al.,* 2005; HAUSER *et al.,* 2008). Esses estudos demonstraram uma melhora dos sintomas em pacientes com doença de Parkinson relativamente avançada, que já tinham desenvolvido complicações motoras como a discinesia.

Bara-Jimenez *et al.* (2003) demonstraram que o antagonista $A_{2A}$ derivado da xantina, KW-6002, associado a uma dose reduzida de L-DOPA produziu alívio dos sintomas comparados àqueles produzidos por doses ótimas de L-DOPA sozinha, mas com menos discinesia. No entanto, quando associado com uma dose total de L-DOPA, o KW-6002 melhorou os sintomas apenas sob algumas circunstâncias e, aparentemente, aumentou um pouco a discinesia.

O bloqueio $A_{2A}$ melhora não só a bradicinesia, mas também outros dois sintomas cardinais, como a rigidez muscular e o tremor de repouso. A rigidez muscular manifestada clinicamente como um aumento da resistência aos movimentos passivos é um sinal da doença de Parkinson que surge no início e tem caráter progressivo. Foi demonstrado que, em roedores a rigidez muscular induzida pela reserpina pode ser reduzida por um antagonista $A_{2A,}$ ou eliminada pela combinação sinérgica de L-DOPA e antagonista $A_{2A}$ (WARDAS, 2001).

Outros estudos sugerem que o tremor de repouso parkinsoniano, que costuma ser relativamente resistente a terapia de reposição dopaminégica, pode ser reduzido com uso de antagonistas $A_{2A}$. Em modelos de tremor de repouso parkinsoniano com roedores foi observado que antagonistas $A_{2A}$ reduziram os tremores e, resultados recentes obtidos em ensaios clínicos indicam que a combinação do antagonista $A_{2A}$, KW-6002, em associação com doses baixas de L-DOPA reduziu o tremor de repouso de maneira mais eficiente do que ocorreu com os outros sintomas cardinais da doença de Parkinson (BARA-JIMENEZ *et al.,* 2003).

O mecanismo através do qual os antagonistas $A_{2A}$ melhoram a disfunção motora da doença de Parkinson deve-se, provavelmente, a sua ação inibitória direta nos neurônios estriatopalidais que expressão ambos os receptores $A_{2A}$ e $D_2$ (SCHWARZSCHILD *et al*., 2006). O bloqueio dos receptores $A_{2A}$ nesses neurônios compensa a disfunção motora gerada pela perda da estimulação dopaminérgica nos receptores $D_2$ estriatais. Entretanto, essa ação dos antagonistas $A_{2A}$ mais direcionada a modulação dos receptores $D_2$ da via indireta, pode também explicar porque os efeitos dos antagonistas $A_{2A}$ parecem modestos quando comparados aos da L-DOPA (que promove a estimulação de todos os receptores dopaminérgicos). Existem evidências que comprovam a correlação entre os efeitos anti-parkinsonianos dos antagonistas $A_{2A}$ e a sua capacidade de modular a liberação do GABA e a

ativação de *c-fos* dopamina-dependente, na via estriatopalidal especificamente (OCHI *et al*., 2000) (**Figura 6**).

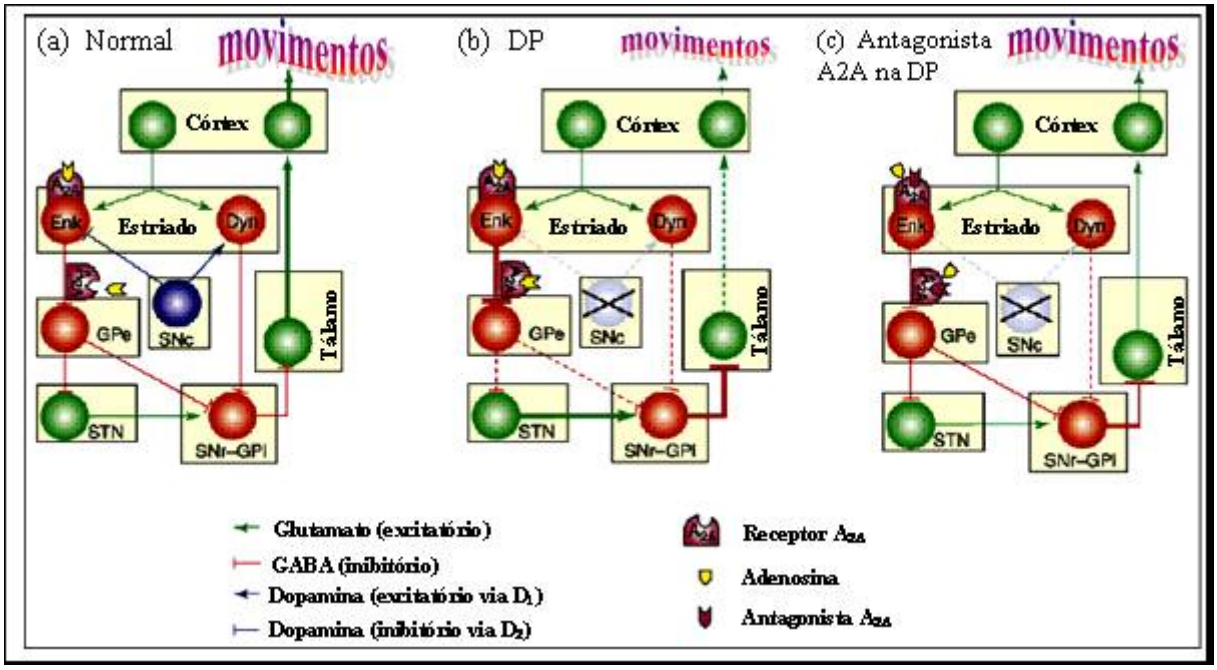



**Figura 6 - Mecanismo proposto para a atividade anti-parkinsoniana dos antagonistas $A_{2A}$**
**Fonte:** Schwarzschild *et al.* (2006)

Nota: O estriado está ligado a parte reticulada da substancia negra e a parte interna do globo pálido (SNr-GPi) participando da via direta (estriatonigral) e indireta (estriado-palidal-subtalâmica-nigral). No estado normal (a) a dopamina (em azul) dos neurônios da parte compacta da substancia negra (SNc) age em receptores $D_1$ estimulatórios na via direta estriatonigral e em receptores $D_2$ inibitórios na via indireta para facilitar a execução de movimentos intrincados e rápidos. A adenosina, via receptores $A_{2A}$ nos neurônios estriatopalidais do estriado e da parte externa do globo pálido (GPe), estimula neurônios da via indireta, fazendo então oposição a ativação dos receptores $D_2$. (b) A degeneração da substancia negra na doença de Parkinson (DP) remove o *input* da dopamina no estriado. Isto desinibe as projeções dos neurônios espinhosos estriatais da via indireta, eleva a ação inibitória mediada pelo GABA (em vermelho) no GPe, que em contrapartida leva a uma desinibição da transmissão excitatória mediada pelo glutamato (em verde) no núcleo subtalâmico (STN). A redução da dopamina também leva a uma redução na ativação dos neurônios espinhosos na via direta. O conseqüente desequilíbrio das vias direta e indireta leva a um significativo aumento do output inibitório do complexo (SNr-GPi). A conseqüente excessiva inibição dos neurônios talamocorticais produzem a característica redução dos movimentos na doença de Parkinson. (c) O bloqueio dos receptores $A_{2A}$ na doença de Parkinson reduziria a superatividade dos neurônios estriatopalidais e conseqüentemente dos neurônios do núcleo subtalâmico (STN), e talvez restauraria algum equilíbrio entre as vias direta e indireta.

## 7.6 Antagonistas $A_{2A}$ como neuroprotetores na doença de Parkinson

Nos últimos seis anos, evidências epidemiológicas e experimentais têm mostrado a possibilidade do antagonismo de receptores $A_{2A}$ proteger os neurônios dopaminérgicos da degeneração na doença de Parkinson (XU *et al.,* 2005; FREDHOLM *et al.,* 2005; BOVE *et al.,* 2005b; KALDA *et al*., 2006).

O potencial neuroprotetor da cafeína despertou interesse por causa das evidências genéticas e farmacológicas de que os receptores $A_{2A}$ podem contribuir para a degeneração dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais (ROSS *et al*., 2001; XU *et al.,* 2005; FREDHOLM *et al.,* 2005). A cafeína, que bloqueia receptores $A_1$ e $A_{2A}$ no cérebro, quando administrada a camundongos tratados com MPTP, em doses correspondentes ao típico consumo humano, reduz de forma dose-dependente a perda de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais (Xu *et al.,* 2005; CHEN et al., 2001). Esse efeito protetor da cafeína também foi observado com outros antagonistas mais seletivos para receptores $A_{2A}$, incluindo o CSC e o KW-6002 (KALDA *et al*., 2006; BOVE *et al.,* 2005b). Estudos genéticos mostram que a depleção de genes para receptores $A_{2A}$ pode atenuar a perda de neurônios dopaminérgicos estriatais em camundongos tratados com MPTP (CHEN *et al*., 2001).

A neuroproteção mediada pela cafeína, em contraste com o seu efeito estimulante motor, não exibiu tolerância após uso repetido (XU *et al.,* 2002). Todos esses estudos mostram evidências de que a cafeína e antagonistas $A_{2A}$ mais seletivos podem reduzir efeitos neurotóxicos aos neurônios dopaminérgicos em modelos animais da doença de Parkinson, embora ainda sejam necessárias muitas pesquisas para comprovar esses possíveis efeitos em seres humanos.

O papel fisiopatológico da adenosina endógena agindo através dos receptores $A_{2A}$ para interferir na neurodegeneração não está restrito apenas aos neurônios dopaminérgicos, a neuroproteção mediada pelos antagonistas $A_{2A}$ vai além dos modelos da doença de Pakinson de degeneração de neurônios nigroestriatais, de fato, essa neuroproteção foi relatada primeiramente em um modelo de isquemia global e depois disso em outros modelos de isquemia e excitotoxicidade em regiões corticais (PHILLIS, 1995; JONES *et al*., 1998;

MONOPOLI *et al.,* 1998; BOISON, 2008). Esses efeitos também contribuem para a relevância dos antagonistas $A_{2A}$ na doença de Parkinson, porque em estágios mais avançados a degeneração cortical e do gânglio basal contribuem para a progressão da doença.

Além disso, outros trabalhos observaram que antagonistas $A_{2A}$ podem limitar os danos estriatais induzidos por toxinas mitocondriais na saída (*output*) dos neurônios (BLUM *et al*., 2003; ALFINITO *et al.,* 2003) e podem reduzir a formação de agregados protéicos induzidos pela β-amilóide em cultura de células nos modelos de doença de Huntington e de Alzheimer. (DALL'IGNA *et al*., 2007).

Entretanto, foi observado que a inativação de receptores $A_{2A}$ apresentou efeitos opostos exacerbando ou atenuando a morte de neurônios estriatais sob diferentes condições. Isto ocorre provavelmente devido às diferentes ações dos receptores $A_{2A}$ estriatais pré-sinápticos e pós-sinápticos (BLUM *et al*., 2003).

O mecanismo através do qual os antagonistas $A_{2A}$ conferem proteção contra a morte dos neurônios dopaminérgicos ainda não foi elucidado até o presente momento. Entretanto, o fato desse efeito neuroprotetor se estender a outros tipos de neurônios no gânglio basal e no córtex cerebral favorece a teoria de que o sistema nervoso central funciona através de elementos celulares comuns - neuronais, gliais e/ou imunológicos (SCHWARZSCHILD *et al*., 2006).

A ativação de receptores $A_{2A}$ amplamente distribuídos nas terminações nervosas glutamatérgicas ou nos astrócitos pode aumentar a liberação do glutamato e, nesse caso, contribuir para a excitotoxicidade neuronal (LI *et al*., 2001; MARCHI *et al.,* 2002; PLATT, 2007). O glutamato é um aminoácido excitatório extremamente importante na ativação neuronal, e a superestimulação dos receptores NMDA pode levar a morte neuronal via mecanismos excitotóxicos (**Figura 7**).

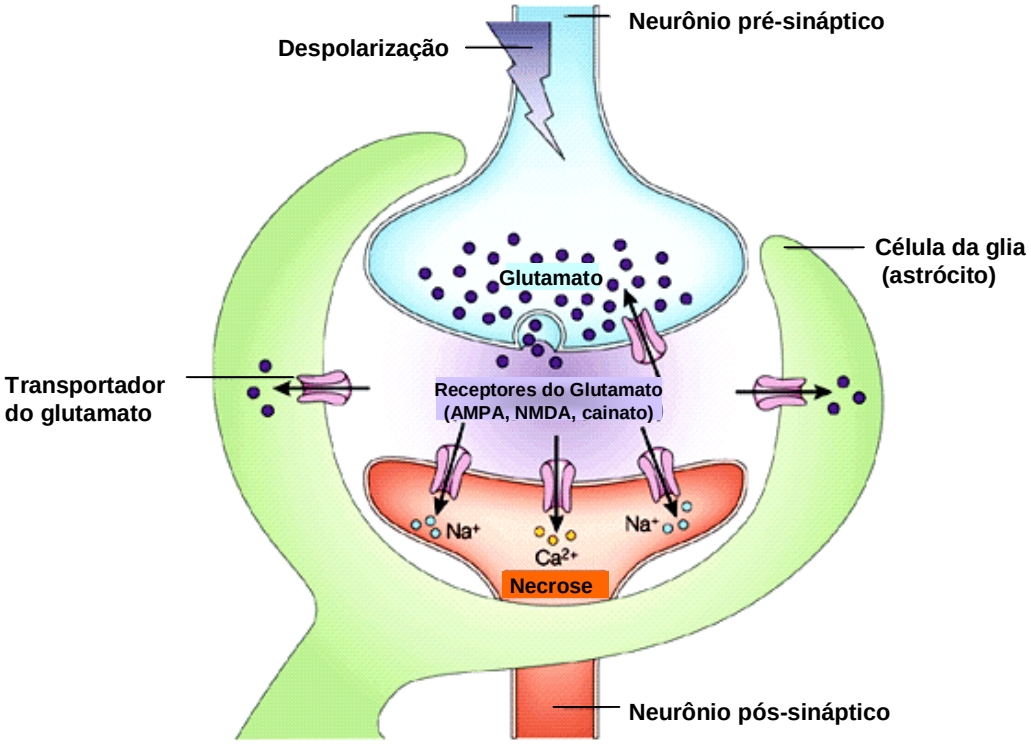



**Figura 7 - Excitotoxicidade mediada pelo glutamato**
**Fonte:** Syntichaki e Tavernarakis (2003)

Os mecanismos excitotóxicos mediados pelo glutamato envolvem principalmente a elevação da concentração de cálcio intracelular que por sua vez afeta muitos processos, dentre eles:

- o aumento da liberação do glutamato;

- a ativação de proteases (caspases) e lípases, causando lesão da membrana celular;

- a ativação da óxido nítrico sintetase (NOS) que, juntamente com as espécies reativas do oxigênio (ROS), gera peroxinitrito e radicais livres de hidroxila, os quais reagem com diversas moléculas celulares, incluindo lipídios de membrana, proteínas e DNA;

- o aumento da liberação de ácido araquidônico, que aumenta a produção de radicais livres e também inibe a captação do glutamato (RANG *et al.,* 2004; MATTSON, 2008).

Estudos mostram que o bloqueio de receptores $A_{2A}$ pré-sinápticos reduz a liberação do glutamato em muitas regiões do sistema nervoso central. Então a redução da liberação do glutamato na substância negra via bloqueio do receptor $A_{2A}$ pré-sináptico, nas projeções do núcleo subtalâmico pode ser descrito como um dos mecanismos de neuroproteção dos antagonistas $A_{2A}$ na doença de Parkinson (CHEN *et al.,* 2007).

Receptores $A_{2A}$ nas microglias e em outras células do sistema imunológico pode facilitar a o processo inflamatório no sistema nervoso central e desempenhar um papel importante na lesão neuronal. Pierri *et al.* (2005), demonstraram que a neuroproteção mediada pelo antagonista $A_{2A}$ KW-6002 contra a neurotoxicidade do MPTP está associada com a inibição da ativação das microglias na substancia negra.

Estudos comprovam que os antagonistas $A_{2A}$ podem promover proteção contra danos neuronais causados por toxinas e também proteger as células contra danos causados por espécies reativas do oxigênio em diferentes patologias associadas a geração de ROS, sugerindo a possibilidade do uso desses agentes como neuroprotetores (STONE *et al.,* 2001; MORELLI, 2003).

A estimulação dos receptores $A_{2A}$ promove aumento da liberação de neurotransmissores. A ativação desses receptores apresenta ação excitatória na liberação de neurotransmissores, incluindo o glutamato, um efeito provavelmente produzido pelo aumento do influxo de cálcio pré-sináptico. De acordo com esses relatos, alguns estudos foram desenvolvidos utilizando antagonistas $A_{2A}$ e mostraram que eles poderiam reduzir a liberação do glutamato (REBOLA *et al*., 2005).

Diferentes estudos enfatizam que os antagonistas $A_{2A}$ provavelmente apresentam ações protetoras e poderiam ser usados como agentes neuroprotetores contra lesões celulares em muitas situações onde os danos são produzidos pelo aumento da atividade do glutamato ou o aumento da geração de radicais livres, ou a combinação dos dois (KALDA *et al.,* 2006).

Uma melhor compreensão de como as muitas ações dos receptores $A_{2A}$ influenciam na sobrevivência dos neurônios dopaminérgicos poderia estabelecer o

antagonismo dos receptores $A_{2A}$ como uma estratégia neuroprotetora para o tratamento da doença de Parkinson.

## II RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A doença de Parkinson é uma doença degenerativa progressiva que atinge aproximadamente 1% da população mundial com idade acima de 55 anos. É descrita como um distúrbio motor em que os pacientes apresentam tremor, rigidez muscular, bradicinesia e distúrbios posturais. Além desses déficits motores pode ocorrer também disfunção cognitiva e, em alguns casos, demência, provavelmente pelo fato de o processo degenerativo não se limitar aos gânglios da base, afetando também outras áreas do cérebro (ZHOU *et al.,* 2008).

Ainda não existe tratamento adequado para a doença de Parkinson. A terapia atual está restrita ao alívio dos sintomas e nenhuma droga capaz de inibir a degeneração neuronal foi descoberta.

A literatura mostra que há o envolvimento de outros neurotransmissores além da dopamina, na doença de Parkinson. Com a diminuição da atividade dopaminérgica no estriado, outros sistemas que estão interligados são afetados. Ocorre um aumento da atividade colinérgica e glutamatérgica e uma diminuição da atividade GABAérgica, e isso contribui para hiperatividade neuronal que resulta em morte celular. Estudos sugerem que antagonistas de receptores $A_{2A}$ poderiam agir diminuindo a excitabilidade neuronal restaurando o equilíbrio entre a inibição e a excitação neuronal mediada pelos neurotransmissores (BOISON, 2008).

Existem evidências experimentais de que antagonistas de receptores $A_{2A}$ da adenosina poderiam ser úteis como uma alternativa terapêutica ou em combinação com os tratamentos atuais para tratar a doença de Parkinson (MORELLI; PINNA, 2001). Estudos recentes demonstraram que antagonistas de receptores $A_{2A}$ apresentam efeitos anti-parkinsonianos sem causar qualquer efeito colateral grave como observado na terapia dopaminérgica com L-dopa, como é o caso da discinesia (MATSUBARA *et al*., 2002; IKEDA *et al*., 2002). Assim, a associação da L-dopa com antagonistas de receptores $A_{2A}$ pode ser bastante útil, visto que com essa associação poder-se-á diminuir a dose da L-dopa, consequentemente seus efeitos colaterais e aumentar o tempo de uso e a eficácia dessa droga. A elucidação das ações dos receptores da adenosina na modulação dos sistemas envolvidos na

doença de Parkinson abre espaço para novas tentativas de retardar ou inibir a evolução da doença (JENNER, 2003; TAKAHASHI *et al*. 2008). Contudo, futuros estudos são necessários para revelar o papel dos antagonistas de receptores $A_{2A}$ da adenosina e elucidar seus efeitos na inibição da progressão da doença de Parkinson e no seu tratamento crônico, o que justifica a importância desse estudo.

# III OBJETIVOS

## 1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho de tese foi determinar os efeitos do bloqueio não seletivo (utilizando a cafeína) e seletivo (utilizando o CSC) do receptor da adenosina $A_{2A}$ em um modelo animal da doença de Parkinson produzido pela injeção estereotáxica da neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) no corpo estriado de rato e determinar os efeitos benéficos da terapia com L-dopa em associação com o antagonista seletivo do receptor $A_{2A}$, CSC.

## 2 Objetivos específicos

- Verificar as alterações no teste rotacional dos animais tratados com cafeína ou CSC sozinho ou associado a L-DOPA;

- Avaliar as alterações nos sistemas de neurotransmissores envolvidos no processo neurodegenerativo da DP, através da determinação das concentrações das monoaminas e seus metabólitos e das concentrações dos aminoácidos GABA e glutamato em corpo estriado de ratos tratados com cafeína ou CSC sozinho ou associado a L-DOPA;

- Avaliar as alterações na densidade dos receptores dopaminérgico ($D_1$ e $D_2$-símile), GABAérgico e glutamatérgico em corpo estriado de ratos tratados com cafeína ou CSC;

- Estudo da participação do estresse oxidativo determinando o índice de peroxidação lipídica (TBARS), a e a produção de nitrito em corpo estriado de ratos tratados com CSC (*ex vivo*);

- Determinar as alterações da viabilidade celular através do método do MTT, dosagem de TBARS e formação de nitrito em cultura de células mesencefálicas de rato expostas a 6-OHDA e tratadas com cafeína ou CSC.

- Determinar as alterações no padrão de morte celular induzida por 6-OHDA, e nas reações astrogliais e microgliais em cultura de células mesencefálicas de rato expostas a 6-OHDA e tratadas com cafeína ou CSC.

# IV MATERIAL E MÉTODOS

## 1 Material utilizado nos experimentos

**Quadro 3 - Principais materiais utilizados nos experimentos**

| Material | Marca / Modelo |
|---|---|
| -Agitador de tubos | Modelo 251, FANEN, SP, Brasil |
| -Balança analítica | Modelo H5, Mettler, Suíça |
| -Banho Maria | Modelo 102/1, FANEN, SP, Brasil |
| -Bomba para HPLC | LC-10AD Shimadzu Corp., Japan |
| -Centrífuga refrigerada | Modelo Marathon 26 KMR, Fisher Scientific |
| - Coluna para catecolaminas | Modelo C 18, 5 μm, 250 x 4,6 mm, Shimadzu, Japão |
| -Contador de cintilação líquida | Modelo LS 6500, Beckman, Fullerton, Ca, USA |
| -Cubetas de plástico para leitura em espectrofotômetro | Sarstedt, Alemanha Oriental |
| -Degaseificador | DGU-2A Shimadzu Corp., Japan |
| -Detector de Fluorescência | Modelo RF 535, Shimadzu Corp., Japan; |
| -Detector eletroquímico | L-ECD-6ª, Shimadzu Corp., Japan; |
| - Eletrodo de carbono | Shimadzu, Japão |
| -Equipamento de Millipore para filtração à vácuo | Millipore Apparatus, Bedford, MA, USA |
| -Espectrofotômetro | Modelo Beckman DU 640B, Fullerton, CA, USA |
| -Estufa para secagem | Modelo 315 SE FANEM, SP, Brasil |
| -Filtros de fibra de vidro | GF/B Whatman, Maidstone, England |
| -Frascos de vidro para contagem de cintilação | Vials Beckman, Fullerton, Ca, USA |
| -Freezer a – 70 ºC | Modelo ULT 2586-3D14, Revco Scientific, Inc. Asheville, N.C. ,USA |
| -Homogeneizadores manuais | Bellico, USA |
| -Integrador C-R6A Chromatopac | Shimadzu Corp., Japan |
| -Medidor de pH, modelo B374 | Micronal, SP, Brasil |
| -Micropipetas | H.E., Pedersen, Dinamarca |
| - Pré-coluna | CLC G-ODS, 4mmD X 1 cm, Shimadzu, Japão |
| -Sonicador | Modelo PT 10-35. Brinkmann Instruments Inc. NY, USA |

**2 Animais**

Foram utilizados ratos Wistar (250 - 280 g), machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, mantidos em ciclo de iluminação ambiental (claro/escuro) de 12 horas, com temperatura em torno de 25 ºC, recebendo ração padrão tipo Purina e água *ad libitum*.

Os experimentos foram realizados de acordo com o guia de cuidados e usos de animais de laboratório do Departamento de saúde e serviços humanos dos Estados Unidos da América (EUA) e aprovado pelo Comitê de Etica em Pesquisas Animais da Universidade Federal do Ceará (UFC).

**3 Drogas**

As seguintes drogas foram utilizadas: CSC *(8-(3-chlorostyryl caffeine)*, cafeína, 6-hidroxidopamina, ácido ascórbico, apomorfina, ácido octanosulfonico sódico, acetonitrila, tetrahidrofurano, padrões dos aminoácidos e das monoaminas (Sigma Co. St. Louis, USA); L-DOPA e benserazida (Prolopa 100/25 mg) (F. Hoffmann-La Roche AG. - Roche). Todas os reagentes foram de grau analítico.

**4 Procedimento experimental**

Os animais foram divididos em grupos de 6 a 8 animais, segundo o protocolo de tratamento. Os animais foram anestesiados com ketamina (100 mg/kg, i.p.) e com xilasina (5 mg/kg, i.p.) e receberam injeção estereotáxica unilateral de 6-OHDA (duas injeções de 1µl de uma solução de 6-OHDA dissolvido em salina 0,9% contendo 0,2% de ácido ascórbico em uma concentração final de 12 µg /µl) dentro do corpo estriado direito (AP 0,9/1,4; ML 3,0; DV 3,3 a partir do bregma), de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 1986), usando uma seringa Hamilton de 5 µl . A seringa permaneceu no local de aplicação por 2 min para assegurar que o seu conteúdo tenha sido injetado corretamente e depois foi retirada cuidadosamente (KIN *et al.,* 1998). Os animais falso operados receberam veículo e foram utilizados como controle negativos. Os protocolos e as doses utilizados neste

trabalho foram determinados a partir de pesquisas na literatura e da execução de testes piloto realizados anteriormente (AGUIAR *et al*., 2002; AGUIAR *et al.,* 2005).

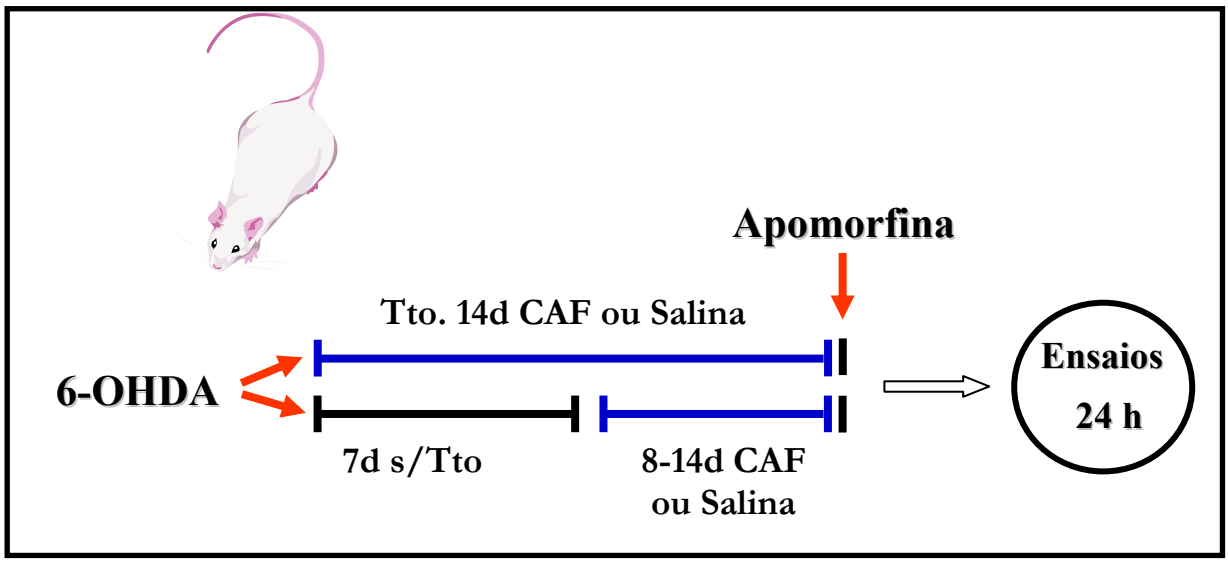
## 4.1 Protocolos experimentais

### - PROTOCOLO 1 – Tratamento com cafeína

**Quadro 4 – Protocolo de Tratamento Experimental com cafeína**

| GRUPOS | Tratamento | Doses (mg/kg) | Via de adm. | Duração do tto. (dias) |
|---|---|---|---|---|
| 1- Falso operado | Salina (controle -) | - | IP | 7 ou 14 |
| 2- Controle (6-OHDA) | Salina (controle +) | - | IP | 7 ou 14 |
| 3- CAF 10 7d | Cafeína | 10 | IP | 7 |
| 4- CAF 20 7d | Cafeína | 20 | IP | 7 |
| 5- CAF 10 14d | Cafeína | 10 | IP | 14 |
| 6- CAF 20 14d | Cafeína | 20 | IP | 14 |

Os animais foram submetidos à lesão nigroestriatal com injeção estereotáxica de 6-OHDA e tratados com cafeína nas doses de 10 e 20 mg/kg, i.p., por 7 ou 14 dias. Nos grupos de 14 dias o primeiro dia foi considerado como o dia da cirurgia e o tratamento iniciado 1 h após a lesão. Duas semanas depois os animais foram tratados com apomorfina para a realização do teste rotacional e 24 horas depois do teste foram sacrificados para a realização dos testes. Nos grupos de 7 dias o tratamento foi iniciado seis dias após a lesão com 6-OHDA, e continuado por sete dias. Vinte e quatro horas depois do tratamento (2 semanas após a lesão com 6-OHDA) os animais foram tratados com apomorfina (3mg/kg, i.p.) para a realização do teste rotacional e 24 horas depois do teste foram sacrificados para a realização dos testes bioquímicos.




**Esquema 1 - Tratamento com cafeína durante 7 ou 14 dias após a lesão (protocolo 1)**

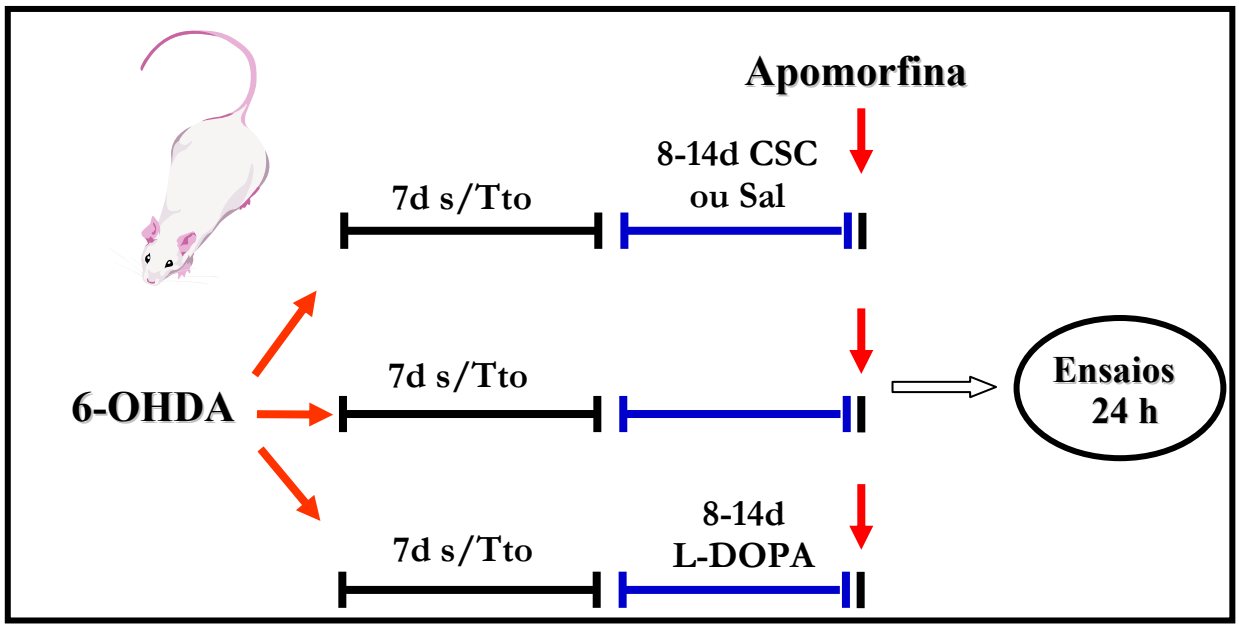
**- PROTOCOLO 2 – Tratamento com CSC**

**Quadro 5 – Protocolo de Tratamento Experimental com CSC**

| GRUPOS | Tratamento | Doses (mg/kg) | Via de adm. | Duração do tto. (dias) |
|---|---|---|---|---|
| 1- Falso operado | Salina (controle -) | - | IP | 7 |
| 2- Controle (6-OHDA) | Salina (controle +) | - | IP | 7 |
| 3- CSC1 | CSC | 1 | IP | 7 |
| 4- CSC5 | CSC | 5 | IP | 7 |
| 5- CSC1+L-DOPA | CSC | 1 | IP | 7 |
| | Prolopa: L-DOPA | 50 | IP | 7 |
| | + Benzerazida | 12,5 | | 7 |
| 6- L-DOPA | Prolopa | 50/12,5 | IP | 7 |

Os animais foram submetidos à lesão nigroestriatal com injeção estereotáxica de 6-OHDA e tratados com CSC (1 e 5 mg/kg, i.p.), sozinho ou em associação com L-DOPA (CSC 1mg/kg e L-DOPA 50 mg/kg associado a benserazida 12,5 mg/kg, i.p. – Prolopa ®) por

7 dias, sendo iniciado seis dias após a lesão com 6-OHDA, e continuado por sete dias. 24 horas depois do último dia de tratamento (2 semanas após a lesão com 6-OHDA) os animais foram tratados com apomorfina (3mg/kg, i.p.) para a realização do teste rotacional e 24 horas depois do teste foram sacrificados para a realização dos testes bioquímicos.




**Esquema 2 - Tratamento com CSC (1 e 5 mg/kg, i.p.), sozinho ou em asociação com L-DOPA (CSC 1mg/kg e L-DOPA 50 mg/kg associado a benserazida 12,5 mg/kg, i.p. – Prolopa ®) (protocolo 2)**

### 4.2 Teste comportamental: teste rotacional

Os animais foram submetidos ao teste rotacional duas semanas após a lesão com 6-OHDA. O comportamento rotacional foi determinado através do monitoramento das rotações induzidas pela apomorfina (3 mg/kg, i.p., que induz um comportamento rotacional na direção contrária à lesão (lado contralateral)) e o número de rotações completas em volta do próprio eixo foi observada durante 60 minutos (KIM *et al.*, 1998) **(Figura 8)**. Os animais controles que apresentaram um número de rotações a baixo de 150/hora foram excluídos do

estudo. No momento seguinte os animais foram sacrificados, o corpo estriado dissecado e armazenado a -70°C até o uso (no máximo dois meses).

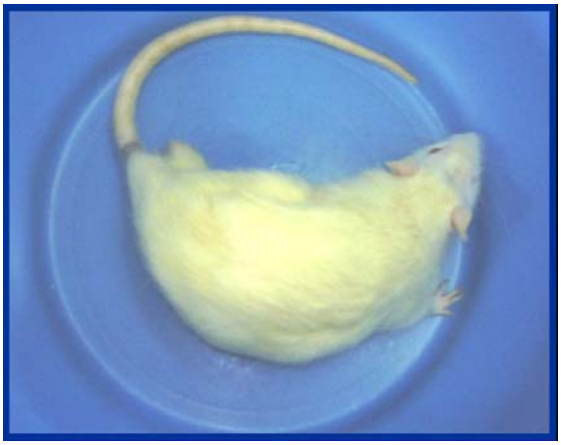


**Figura 8 - Teste rotacional induzido por apomorfina**

### 4.3 Dissecação da área cerebral (corpo estriado)

Os animais foram decapitados com uma guilhotina (Harvard, USA), os encéfalos retirados rapidamente e colocados sobre papel alumínio numa placa de Petri com gelo, 24 horas após o teste rotacional. Em seguida, acompanhando a fissura sagital mediana, a camada cortical cerebral foi liberada das leptomeninges com a ajuda de uma pinça reta de microdissecação que divulsionou o córtex delicadamente, em toda a sua extensão fronto-occipital. O córtex, depois de divulsionado, foi rebatido para os lados, expondo parte do corpo estriado **(Figura 9).**

O corpo estriado (caudado, putamen e globo pálido) foi então isolado das estruturas circunjacentes por divulsionamento com uma tesoura de microdissecação, sendo a sua retirada orientada pelo diâmetro da porção tuberosa visível desses núcleos, após o rebatimento lateral do córtex.

**Figura 9 - Dissecação cerebral mostrando a retirada do corpo estriado (CE) de rato**

Terminada a dissecação, cada área foi colocada em papel de alumínio, sob gelo, pesada e armazenada a -20 °C para uso posterior. Quando foi necessária a estocagem por um certo período de tempo (no máximo 2 meses), os tecidos foram considerados como tendo a mesma viabilidade para experimentação que as áreas 24h após a dissecação (BURKE, l987).

## 4.4 Determinação da concentração de monoaminas e seus metabólitos com HPLC

### 4.4.1 Método

Para a determinação da concentração de catecolaminas, foi utilizado o equipamento de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (MIYOSHI *et al*., 2002). Na cromatografia líquida clássica, um adsorvente (alumina ou sílica) é empacotado em uma coluna e é eluído por um líquido ideal (fase móvel). Uma mistura para ser separada é introduzida na coluna, e é carregada através da mesma por um líquido eluente. Se um composto da mistura (soluto) é adsorvido fracamente pela superfície da fase sólida estacionária, ele atravessará a coluna mais rapidamente que um outro soluto que seja mais rapidamente adsorvido. Então, a separação dos solutos é possível se existem diferenças na adsorção pelo sólido. Os detectores eletroquímicos medem a condutância do eluente, ou a

corrente associada com a oxidação ou redução dos solutos. Para ser capaz de detectar, no primeiro caso os solutos devem ser iônicos, e no segundo caso os solutos devem ter a característica de serem relativamente facéis de se oxidarem ou reduzirem.

Detectores eletroquímicos que medem corrente associada com a redução ou oxidação de solutos são chamados detectores amperométricos ou colorimétricos. Neste estudo, foi utilizado o tipo amperométrico que reage com uma quantidade muito menor de soluto, em torno de 1%. Todas as técnicas eletroquímicas envolvem a aplicação de um potencial para um eletrodo (geralmente de carbono vítreo), oxidação da substância que está sendo estudada próximo à superfície do eletrodo, seguindo a amplificação e medida da corrente produzida. As catecolaminas são oxidadas nos grupos de anel hidroxil para produzir um derivado ortoquinona com a liberação de dois elétrons.

### 4.4.2 Procedimento experimental

Os animais foram decapitados quatro semanas após a lesão com 6-OHDA, 24 h após o teste rotacional e, imediatamente, tiveram seus cérebros dissecados sob gelo. O CE foi utilizado para preparar homogenatos a 10 %. Os tecidos cerebrais foram sonicados em ácido perclórico ($HCLO_4$) por 30 s e centrifugados por 15 min em centrífuga refrigerada a 15.000 rpm. Uma alíquota de 20 μl do sobrenadante foi, então, injetada no equipamento de HPLC, para a análise química.

Para a análise das monoaminas, uma coluna CLC-ODS(M) com comprimento de 25 cm, calibre 4,6 mm e diâmetro da partícula de 3 μm, da Shimadzu-Japão, foi utilizada. A fase móvel utilizada foi composta por tampão ácido cítrico 0,163 M, pH 3,0, contendo ácido octanosulfônico sódico, 0,69 M (SOS), como reagente formador do par iônico, acetonitrila 4 % v/v e tetrahidrofurano 1,7 % v/v. Dopamina (DA), Ácido diidroxifenilacético (DOPAC), Ácido homovanílico (HVA), Serotonina (5-HT) e Ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) foram eletronicamente detectados usando um detector amperométrico (Modelo L-ECD-6A da Shimadzu, Japão) pela oxidação em um eletrodo de carbono vítreo fixado em 0,85 V relativo a um eletrodo de referência de Ag-AgCl.

4.4.3 Soluções reagentes:

**- Fase Móvel**

Foram pesados 15,75 g de ácido cítrico (grupo química, RJ, Brasil) e completado para um volume de 400 mL com água puríssima (Milli-Q). Esta solução foi ajustada para pH 3,0 com hidróxido de sódio 12,5 M (Reagen, RJ Brasil). A esta solução foi adicionado o SOS 75 mg (Sigma, MO, EUA) e completado o volume para 471,5 mL com água Milli-Q. Em seguida, foi procedida a filtração e degaseificação, e, posteriormente, adicionados 20 mL de acetonitrila (Carlo Erba Reagenti, MI, Itália) e 10 mL de tetrahidrofurano (Sigma, MO, EUA) para um volume final de 500 mL.

**- Ácido Perclórico 0,1 M**

Foram adicionados 1,8 ml de ácido perclórico (Sigma, MO, EUA) em um balão volumétrico e completado o volume para 300 mL.

**- Padrões**

Os padrões foram preparados em uma concentração final de 4 ng de DA, 5-HT, DOPAC, HVA e 5-HIAA (Sigma, MO, EUA). A partir da altura ou área dos picos desses padrões, as amostras foram calculadas no programa *Prisma*® em um computador PC e os resultados expressos em ng/mg de tecido.

## 4.5 Determinação das concentrações de aminoácidos com HPLC

4.5.1 Método

Para determinação das concentrações dos aminoácidos, foi utilizado o equipamento de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) com detector de fluorescência. A espectroscopia de fluorescência pode ser usada como método de detecção específica, e é um dos mais sensíveis para compostos que fluorescem. Fluorescência pode ser desenvolvida em compostos não fluorescentes por reações de derivatização realizadas pré ou pós-coluna.

4.5.2 Procedimento Experimental

Os animais foram decaptados 24 h após a realização do teste rotacional e, imediatamente, tiveram seus cérebros dissecados sobre o gelo. O corpo estriado foi utilizado para preparar homogenatos a 10 %. Os tecidos cerebrais foram sonicados em ácido perclórico ($HCLO_4$) por 30 segundos e centrifugados por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 15.000 rpm. O sobrenadante foi separado e filtrado através de uma membrana (Millipore- 0,2 μm) e posteriormente associado a uma solução de derivatização pré-coluna, para obtenção de fluorescência, em uma proporção de 1:1. Um minuto depois do início dessa associação uma alíquota de 20 μl foi retirada e injetada no equipamento de HPLC para análise química.

Para a determinação das concentrações dos aminoácidos, uma coluna de fase-reversa C18 (Shimadzu, Japão), foi utilizada. A fase móvel composta de duas fases: A (pH 6,95)- acetato de sódio (0,1 M), metanol (6 %, v/v) e tetrahidrofurano (1,5 %); B- Metanol puro (100 %), correu em um fluxo de 1,0 ml/min em um gradiente de 30 min de duração (MASSIEU; TAPIA, 1997). GABA e Glutamato (GLU) foram detectados usando um detector de fluorescência (Modelo RF-535 da Shimadzu, Japão) com comprimento de ondas excitação e emissão de 370 e 450 nm, respectivamente. Os cromatogramas foram registrados e quantificados por um computador usando um software da Shimadzu®. As concentrações dos aminoácidos foram determinadas por comparação com os padrões injetados no HPLC no dia do experimento e foram expressos em μmol/g de tecido.

4.5.3 Soluções Reagentes

**- Ácido Perclórico 0,1 M**

Foram adicionados 1,8 ml de ácido perclórico (Sigma, MO, EUA) em um balão volumétrico e completado o volume para 300 ml com água Milli-Q.

**- Padrões**

Os padrões foram preparados na concentração de 2,5 mM de GABA e GLUT, diluídos em ácido perclórico 0,1 M. Os *concentração* de aminoácidos foram determinados por comparação das áreas dos picos correspondentes com os padrões de acordo com o tempo de retenção de cada um, as amostras foram calculadas no programa Microsoft Excel em computador PC e os resultados expressos em μmol/g de tecido.

**- Solução de Derivatização**

A preparação da solução de derivatização foi dividida em duas fases:

1. Preparação do tampão Borato

Foram pesados 1,24 g de *BORAX-Sodium tetraborato* (Sigma-EUA) em um Becker e adicionados 45 ml de água puríssima (Milli-Q). Esta solução foi ajustada para pH 10,4 com hidróxido de sódio e completado para um volume final de 50 ml com água Milli-Q.

2. Preparação da reação de derivatização (OPA- 40 mmol/l)

Foram pesados 27 mg de *O-Phthaldialdehyde*-OPA (Sigma-EUA) em um Becker e adicionados 500 μl de etanol 99 % (Vetec-Brasil), 20 μl de 2-mercaptoetanol (Merck-EUA) e 4,5 ml do tampão Borato (preparado previamente). Esta solução de derivatização foi deixada por 24 h em repouso em uma temperatura em torno de 20°C. Após esse período, a solução foi utilizada por no máximo duas semanas, e após a primeira semana foi adicionado 5μl de 2-mercaptoetanol.

## 4.6 Determinação da concentração dos receptores dopaminérgicos

A determinação dos receptores dopaminérgicos foi feita através de ensaios de *binding* executados em homogenatos de corpo estriado de ratos, variando os seguintes parâmetros:

4.6.1 Receptores D1-símile

Foi utilizado o ligante específico [$^3$H]-SCH 23390 (87,0 Ci/mmol –Amersham Biosciences), de acordo com método previamente descrito (MELTZER *et al.,* 1989).

4.6.2 Receptores D2-símile

Foi utilizado o ligante específico [$^3$H]-espiroperidol (114,0 Ci/mmol – Amersham Biosciences), segundo uma adaptação do método previamente descrito por Kessler *et al.* (1991) e Meltzer *et al.* (1989).

4.6.3 Método

O [$^3$H]-SCH 23390 é um antagonista dopaminérgico que possui alta afinidade pelos receptores $D_1$-símile. O ligante [$^3$H]-espiroperidol é um antagonista dopaminérgico que possui alta afinidade pelos receptores $D_2$-símile, possuindo também afinidade pelos receptores serotonérgicos do tipo $5HT_2$ (TERAI *et al*., 1989; KESSLER *et al.,* 1991). Para bloquear os receptores serotonérgicos foi utilizado um antagonista específico, a mianserina.

A dopamina, um agonista dopaminérgico, foi adicionada, na forma não marcada, nos *brancos* dos ensaios para receptor $D_1$ para determinar a radioatividade de *background* ou ligações não-específicas, em uma concentração elevada para interagir com os mesmos sítios de ligação do receptor, impedindo assim, a ligação do [$^3$H]-SCH23390, que fica livre. O mesmo foi feito com relação ao receptor $D_2$, mas neste caso foi utilizado o butaclamol, um antagonista de receptores dopaminérgicos, também com o intuito de determinar as ligações não-específicas. Esses ligantes livres são retirados do filtro através de lavagens sucessivas, e a radioatividade é, então, contada por cintilação líquida.

4.6.4 Procedimento experimental

Logo após a dissecação das áreas cerebrais em gelo, como mencionado anteriormente, foram feitos homogenatos a 10 % em tampão tris-HCl 50 mM, pH 7,4.

Os homogenatos contendo 50-100 μg de proteína foram incubados em tampão tris-HCl modificado (50 mM, pH 7,4). No caso dos receptores $D_1$-símile o tampão continha

0,1515 a 7,58 nM de [$^3$H]-SCH 23390 para experimentos de saturação e 7,58 nM para experimentos de ponto único. No caso dos receptores $D_2$-símile o tampão continha 10 μM de mianserina (incubada por 30 minutos à temperatura ambiente) para bloquear os receptores serotonérgicos e 0,2358 a 4,72 nM de [$^3$H]-espiroperidol para experimentos de saturação e 3,77 para experimentos de ponto único. Em ambos os ensaios, os respectivos ligantes eram incubados na presença e na ausência de dopamina 100 μM (durante 10 min), no caso dos receptores $D_1$, ou butaclamol 10 μM, no caso dos receptores $D_2$ sendo o volume final do ensaio de 0,2 mL.

Após incubação a 37 °C durante 60 min, a reação foi terminada por filtração à vácuo através de filtros Whatman GF/B. Os discos de papel de filtro foram lavados três vezes com 4 mL de solução salina 0,9 % gelada, secos a 60 °C por no mínimo 2 h e colocados em frascos de vidro (*vials*) contendo 3 mL de um coquetel de cintilação líquida contendo tolueno.

A radioatividade foi medida em um contador de cintilação líquida Beckman LS-6500 com a eficiência de 61 %. O *binding* específico foi calculado como *binding* total menos o *binding* não-específico feito na presença de dopamina 100 μM ou butaclamol 10 μM, respectivamente para os receptores $D_1$ e $D_2$, e os resultados foram expressos como fentomoles por miligrama de proteína. A concentração de proteína foi determinada segundo o método de Lowry (1951), utilizando-se BSA como padrão.

### 4.6.5 Soluções reagentes

⇨ **[$^3$H]-espiroperidol** (114 Ci/mmol, Amersham Biosciences)

5 μL de [$^3$H]-espiroperidol foram diluídos em tampão tris-HCl , pH 7,4, de forma a obter uma concentração final de 43,28 nM.

⇨ **[$^3$H]- SCH 23390** (87 Ci/mmol, Amersham Life Science)

5 μl de [$^3$H]-SCH 23390 foram diluídos em tampão tris HCl, pH 7,4 de forma a obter uma concentração final de 11,5 nM

**⇨ Tampão Tris-HCl**

6 g de Tris-HCl (trizma base, Sigma, Brasil) foram diluídos em 1000 mL de água bidestilada, obtendo-se uma concentração de 50 mM. O pH foi ajustado com solução HCL 0,1 N (MERCK, Rio de Janeiro, Brasil) para pH 7,4.

**⇨ Tris HCl modificado**

NaCl 120 mM; KCl 1mM; $CaCl_2$ 2 mM; $MgCl_2$ 1 mM, NaEDTA 1 mM e ascorbato sódico 1 mM foram dissolvidos em tampão tris-HCl 50 mM pH 7,4

**⇨ Mianserina**

Mianserina (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi diluída em tampão tris-HCl obtendo-se uma concentração final de 10 μM.

**⇨ Dopamina (cloridrato de dopamina)**

10 mg de dopamina (Sigma, St. Louis, MO, USA) foram diluídas em 2 mL de tampão tris-HCl não modificado tendo uma concentração final de 5 mg/ml. A esta solução foi acrescentado ácido ascórbico 0,1 %.

**⇨ Butaclamol (Cloridrato de butaclamol (+)- )**

Butaclamol (RBI, MA, USA) foi dissolvido em ácido ascórbico a 0,1% de forma a se obter uma concentração final de 10 μM.

**⇨ Coquetel de cintilação**

0,5 g de p-bis-2-(5-feniloxazolil) benzeno, POPOP (Sigma, St. Louis, MO, USA) e 4,0 g de 2,5-difeniloxasol, PPO (Sigma, St. Louis, MO, USA) foram dissolvidos em 1000 mL de tolueno (Beckman, Fullerton, CA, USA).

## 4.7 Preparo das membranas para determinação dos receptores gabaérgicos e glutamatérgicos

Os homogenatos de corpo estriado de ratos (*pool* de 3 animais) foram preparados em 2 mL de solução de sacarose 0,32 M de acordo com o método descrito por Vogel e Vogel

(1997). Os homogenatos foram centrifugados a 20.000 Xg por 10 min a 4 $^{o}$C e os decantados suspensos em tampão Tris-HCl 50 mM, e centrifugados a 20.000 X *g* por 15 min a 4 $^{o}$C. Os decantados resultantes foram suspensos em tampão Tris-HCl 50 mM gelado e centrifugados a por mais 15 min a 4 $^{o}$C, ressuspensos em Triton X-100 0.05%, e incubados por 15 min a 37 °C. Após incubação, a amostra foi lavada por 2 vezes em tampão Tris–HCl 50 mM a 4 ºC e centrifugada a 20.000 X*g* por 15 min. O pellet final foi, então suspenso em 0,3 ml de tampão Tris-HCl 50 mM.

## 4.8 Determinação dos receptores gabaérgicos e glutamatérgicos

### 4.8.1 Método

Para a determinação dos receptores GABAérgicos e glutamatérgicos foram utilizados os ligantes inespecíficos [$^{3}$H]-GABA e [$^{3}$H]-ácido glutâmico, respectivamente, os quais são agonistas de todos os receptores GABAérgicos e glutamatérgicos. Para os brancos dos experimentos foram utilizados o antagonista muscimol (no caso do receptor GABAérgico) e o agonista glutamato (no caso do receptor glutamatérgico).

### 4.8.2 Procedimento experimental

**- Receptores GABAérgicos e Glutamatérgicos**

Para a determinação dos receptores GABAérgicos membranas (0,05 mL) contendo 0,3-0,5 mg de proteína foram incubados em tampão tris-HCl contendo 50 nM de [$^{3}$H]-GABA (4-amino-n-[2,3-$^{3}$H]butyric acid - 81 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech) para os ensaios de ponto único e 10-200 nM para os experimentos de saturação na presença e na ausência de muscimol (100 mM) em um volume final de 0,1 mL.

No caso dos receptores glutamatérgicos o ensaio de ligação foi feito ao se incubar 0,05 mL das preparações de membrana (0,3–0,5 mg de proteína) com [$^{3}$H]-ácido glutâmico (L-[G-$^{3}$H] glutamic acid - 49 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech) 50 nM para experimentos de ponto único e 50-200 nM para experimentos de saturação em um volume

final de 0,2 mL. O *binding* inespecífico foi determinado na presença de ácido glutâmico (1 mM) para o *binding* glutamatérgico. O tempo de incubação foi de 30 min a 37 °C.

Após os tempos de incubação, a reação foi terminada por filtração a vácuo através de filtros Whatman GF/B. Os filtros foram lavados três vezes com 4 mL de solução salina 0,9 % gelada, secos a 60 °C por no mínimo 2 h e colocados em frascos de vidro (*vials*) com 3 mL de um coquetel de cintilação líquida contendo tolueno.

A radioatividade foi medida em um contador de cintilação líquida Beckman LS-6500 com uma eficiência de 61 %. A ligação específica foi calculada como a ligação total menos a ligação não-específica feita na presença de muscimol 100 mM para os receptores GABAérgicos e ácido glutâmico (1 mM) para o binding glutamatérgico os resultados foram expressos como fentomoles por miligrama de proteína. A concentração de proteína foi determinada segundo o método de Lowry *et al.* (1951) utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

**- Soluções reagentes**

**⇨ [$^3$H]-GABA (4-amino-n-[2,3-$^3$H]ácido butírico)**

19 μL de [$^3$H]-GABA foram diluídos em 381 μL de tampão tris-HCl, pH 7,4, de forma a obter uma concentração final no ensaio de 50 nM.

**⇨ [$^3$H]-ácido glutâmico (L-[G-$^3$H] ácido glutâmico)**

11 μL de [$^3$H]-ácido glutâmico foram diluídos em 589 μL de tampão tris-HCl , pH 7,4, de forma a obter uma concentração final no ensaio de 50 nM.

**⇨ Muscimol 100 μM**

4,5 μl (88 mM) de muscimol foram diluídos em 400 μl de tampãp tris-HCl.

**⇨ Ácido glutâmico (1 mM)**

1,471 mg de L-glutamato foram diluídos em 1 mL de tampão (0,01 M). Desta solução foram retirados 100 μl e rediluídos para 900 μl de tampão (solução 1 mM)

**⇨ Sacarose 0,32 M**

109,5 g de sacarose foram pesados e diluídos para 1000 mL de água destilada. A solução foi armazenada a 4 ºC e usada nesta temperatura para o preparo dos homogenatos.

**⇨ Triton – X 100 0,05 %**

0,05 mL do Triton X 100 foram diluídos em 99,95 mL de água destilada.

**⇨ Tampão Tris-HCl**

6 g de Tris-HCl (trizma base, Sigma, Brasil) foram diluídos em 1000 mL de água bidestilada, obtendo-se uma concentração de 50 mM. O pH foi ajustado com solução HCl 0,1 N (MERCK, Rio de Janeiro, Brasil) para pH 7,4.

**⇨ Coquetel de cintilação**

0,5 g de p-bis-2-(5-feniloxazolil) benzeno, POPOP (Sigma, St. Louis, MO, USA) e 4,0 g de 2,5-difeniloxasol, PPO (Sigma, St. Louis, MO, USA) foram dissolvidos em 1000 mL de tolueno (Beckman, Fullerton, CA, USA).

## 4.9 Dosagem de proteína

### 4.9.1 Método

A quantidade de proteína em homogenatos de cérebro foi determinada a 25 °C, utilizando albumina sérica bovina como padrão, de acordo com o método previamente descrito (LOWRY *et al.,* 1951), que emprega duas reações de formação de cor para analisar a concentração protéica fotometricamente. Inicialmente, é feita uma reação biureto de baixa eficiência, na qual os íons de cobre alcalino produzem uma cor azulada na presença de ligações peptídicas. Essa cor biureto é característica de todas as proteínas, e fornece uma cor básica de fundo para a próxima etapa de ensaio. Depois, o método emprega uma mistura complexa de sais inorgânicos, o reagente Folin-Ciocalteau, que produz uma cor verde azulada intensa na presença de tirosina ou triptofano livres ou ligados a proteínas. Como as quantidades desses dois amonoácidos são geralmente constantes nas proteínas solúveis, com poucas exceções, a cor das reações (verde-azulada) é indicativa da presença de proteína e a

intensidade da cor proporcional à concentração. Esta coloração foi medida em comprimento de onda de 750 nm, através de um espectrofotômetro Beckam DU 640B.

4.9.2 Soluções Reagentes

**- Reagente A:** $Na_2CO3$ (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 2 % em NaOH (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) 0,1 N;

**- Reagente B:** $CuSO_4.5H_2O$ a 0,5 % em $NaKC_4H_4O_6.4H_2O$ (Grupo Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 1 %;

**- Reagente C:** Solução de cobre alcalino (24 ml do reagente A com 1 ml do reagente B, misturados no momento de usar);

**- Reagente de Folin:** Ciocalteau - Fenol (Labordin, Piraquara, PR, Brasil), 1:1 em água bidestilada;

**- Solução de albumina sérica bovina** (Sigma, St Louis, MO, EUA) 1 mg/ml em água bidestilada.

## 4.10 Determinação do índice de peroxidação lipídica e produção de nitrito

4.10.1 Determinação da peroxidação lipídica (TBARS)

O grau de lipoperoxidação em corpo estriado de ratos foi medido através da determinação das concentrações de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme o método de Draper e Hadley (1990), seguindo o protocolo a seguir.

Foram preparados homogenatos da área cerebral a 10% em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15 %. Um volume de 0,25 mL do homogeneizado foi misturado a 1 mL de solução de ácido tricloroacético a 10% e acrescido de 1 mL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,6%. Após a agitação, essa mistura foi mantida em um banho de água fervente (95-100°C) por 15 min., adicionado o n-butanol (2:1 v/v), a seguir resfriada em banho de gelo por alguns minutos e posteriormente centrifugada (800xg, 5 min). O conteúdo de TBARS foi determinado em espectrofotômetro a 535 nm. Os resultados foram expressos em micromol de malonildialdeído (MDA) por mg de proteína.

4.10.2 Determinação do conteúdo de nitrito

**- Preparação da Curva Padrão:**

Foram pesados 7mg de $NaNO_2$ e dissolvidos em 10 mL de água destilada (estoque-10mM) foram feitas as diluições em série (10 e 20x), ficando 1mM, 100µM, 10µM, 5µM, 2,5µM, 1,25µM, 0,625µM, 0,312µM. Foi feita uma equação da reta para o cálculo das concentrações do teste (GREEN *et al*., 1981).

**- Método:**

Foram preparados homogenatos da área cerebral a 10% (w/v) em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15 %. Após a centrifugação (800xg, 10 min) os sobrenadantes foram coletados e a produção de NO determinada através da reação de Griess. Uma alíquota de 100 µl do sobrenadante foi incubada com 100 µl do reagente de Griess [sulfanilamida 1 % em $H_3PO_4$ 1 %/*N-(-1-naphthyl)-ethylenediamine* 0,1 %/ $H_3PO_4$ 1 % / diluído em água (1:1:1:1)] a temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 550nm. A concentração de nitrito (µM) foi determinada a partir de uma curva padrão de $NaNO_2$.

## 4.11 Cultura de células

Células mesencefálicas foram isoladas de cérebro de embrião obtidos de ratas Wistar entre os dias 16-18 de gestação (AHMADI *et al.,* 2003). Após o tratamento com tripsina as células foram suspendidas em Neurobasal Medium sem L-glutamina, suplementado com B-27 (Gibco, USA) contendo estreptomicina, penicilina e actinomicina. A suspensão de células foi colocada em 96 poços com poli-L-lisina, com densidade de $5x10^4$ células/poço. As culturas foram mantidas à 37°C a 5% de $CO_2$ atmosférico.

## 4.12 Estudos de viabilidade celular (MTT)

Um dos métodos mais utilizados na avaliação da citotoxicidade de diferentes compostos é o teste da redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), devido à sua rapidez, versatilidade e alta reprodutibilidade (SUPINO, 1995). Este teste colorimétrico baseia-se na capacidade das células viáveis converterem um sal de tetrazólio solúvel (MTT) num precipitado de formazan insolúvel (**Figura 10**). Os sais de tetrazólio atravessam a membrana celular e no citoplasma aceitam elétrons a partir de substratos oxidados, ou de determinadas enzimas, sendo particularmente reduzidos como resultado da atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase (SUPINO, 1995). Esta reação converte os sais de MTT de cor amarela em cristais de formazan de cor violeta que se acumulam em endossomas e são posteriormente transportados para a superfície celular através de um processo de exocitose (SUPINO, 1995; LIU, 1999). Os referidos cristais de formazan podem ser posteriormente dissolvidos num solvente orgânico, que permita a sua quantificação por espectrofotometria (SUPINO, 1995; FRESHNEY, 1994).

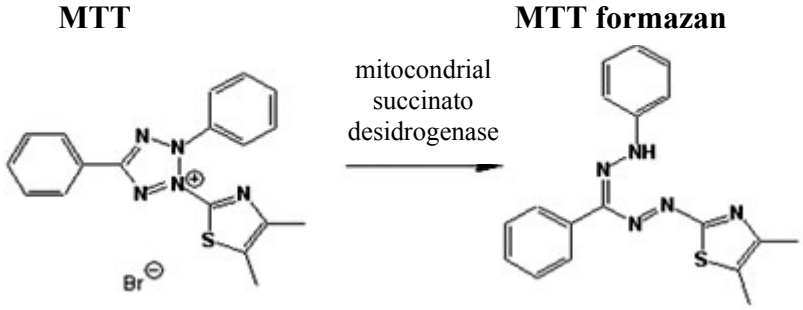



**Figura 10 – Estruturas químicas do MTT e do MTT formazan**
**Fonte:** modificado de Liu (1999)

Após 4 dias em cultura, a cafeína (CAF, 5 e 10 µg/ml) ou o CSC (CSC 0,1, 1 e 5 µg/ml) foi adicionado às células, 3 h antes da 6-OHDA (40µl). A neurotoxicidade foi avaliada usando o teste do MTT. Cerca de 24 h após a incubação com 6-OHDA o medium foi removido e o MTT foi adicionado à cultura de células em uma concentração final de 200 µM, e incubado novamente por 3h. Após a lavagem com PBS foram adicionados 150 µl de DMSO e, após 5 min foi lida a absorbância (595nm). A inibição da redução do MTT indica a diminuição da toxicidade induzida pela 6-OHDA. Os experimentos foram realizados em triplicatas em três dias diferentes.

## 4.13 Determinação do padrão de morte celular: coloração pela laranja de acridina / brometo de etídio

Visando a determinação do padrão de morte celular (apoptose/necrose), as lâminas foram lavadas com a solução de laranja de acridina e brometo de etídio (AO/BE) durante 01 min, sendo em seguida visualizadas em microscópio de fluorescência. O método de coloração pela laranja de acridina / brometo de etídio (BRANTON; CLARKE, 1999) se baseia em revelar as células (controle e tratadas) com a concentração de Laranja de Acridina (AO) e Brometo de Etídio (BE), sendo a leitura realizada em microscópio de fluorescência. A AO intercala-se no DNA, conferindo aparência verde ao mesmo, e atravessa somente

membranas intactas. O BE somente é incorporado por células não viáveis (com instabilidade de membrana), intercalando-se ao DNA corando-o de laranja; liga-se fracamente ao RNA, que aparecerá em vermelho.

As células viáveis (membrana intacta) apresentaram núcleo uniformemente corado de verde pela AO; o BE não marca, pois não atravessa a membrana. As células em apoptose inicial (membrana ainda intacta) apresentaram manchas verdes brilhantes no núcleo (condensação da cromatina) e não são marcadas por BE; morfologicamente observam-se alterações da membrana em decorrência da formação de corpúsculos apoptóticos. As células em apoptose tardia (instabilidade da membrana) apresentarão manchas laranjas (condensação da cromatina) e morfologicamente observam-se alterações da membrana (corpos apoptóticos), citoplasma vermelho (RNA). As células em necrose (lesão de membrana) apresentam cor uniformemente laranja-avermelhada e não há formação de corpos apoptóticos. Acredita-se que as membranas plasmáticas permanecem intactas durante a apoptose até os últimos estágios quando se tornam permeáveis aos solutos normalmente retidos.

**4.14 Análise imunohistoquímica: GFAP e OX-42**

A imunohistoquímica para GFAP (proteína glial fibrilar ácida (GFAP), componente dos filamentos de tamanho intermediário do citoesqueleto celular, presente nos astrócitos e em algumas outras células) e OX-42 (anticorpo monoclonal anti CR3/CD11b) revela a presença de astrócitos e microglias imunorreativas, respectivamente. A cultura de células foi aspirada e as células fixadas com paraformaldeído 4 % em tampãp fosfato 0,1 M, pH 7,4. Após a lavagem com PBS 3 vezes, foi adicionado em seguida peróxido de hidrogênio a 3% (em PBS). Logo após, as células foram incubadas por 1,5 h a 37 ºC com o anticorpo primário de coelho, GFAP (Dako, 1:750) ou OX-42 (Serotec, 1:500). No dia seguinte, as células foram lavadas com PBS 2 vezes, sendo logo em seguida adicionado o anticorpo secundário (reagente amarelo ou LINK – DAKO Cytomation) durante 1 h em câmara fria. Após esse período as células foram lavadas com PBS, e adicionada Streptavidina peroxidase (reagente vermelho – DAKO Cytomation) por 40 min. As células foram novamente lavadas e, em seguida, aplicada solução de DAB preparada de acordo com o fabricante (DAKO Cytomation) durante 30 seg. A imunorreatividade para GFAP e OX-42 foi visualizada através de kits de detecção colorimétricos, de acordo com os protocolos do fabricante. As células

coradas foram visualizadas através de microscópio óptico (Nikon). Os astrócitos (GFAP+) ou microglias ativadas (OX-42) e as células não-marcadas foram contadas por toda a lâmina. A contagem total de células representou 100 % das células de cada lâmina.

**4.15 Análise estatística**

Os resultados foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) com teste de Student Newman Keuls ou teste de Tukey (*post hoc*) pelo programa GraphPad Prism® versão 3.00, San Diego California USA. Copyright (c) 1994-1999 por GraphPad Software. O mesmo programa (GraphPad Prism©) foi utilizado para confecção dos gráficos apresentados neste trabalho. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas a partir de $p< 0,05$.

# V RESULTADOS

## 1 Determinação do comportamento rotacional induzido por apomorfina em ratos com lesão estriatal por 6-OHDA, tratados com cafeína ou CSC sozinho ou associado com L-DOPA

Duas semanas após a injeção intraestriatal de 6-OHDA foi administrada apomofina (3 mg/kg, i.p.) e os animais exibiram comportamento rotacional na direção oposta ao lado da lesão (rotação contralatertal). Um aumento significativo no número de rotações induzidas por apomorfina foi observado nos animais controles lesionados com 6-OHDA (controles positivos), quando comparado ao grupo falso operado (controle negativo) (178.7±7.8 vs. 7.0±0.5 rotações/h; $F(3, 34)=172.8$; $p<0.001$).

Uma recuperação motora parcial foi observada nos animais lesionados com 6-OHDA e tratados com cafeína na dose maior, que reduziu significativamente o número de rotações induzidas por apomorfina em torno de 40 % (20 mg/kg, i.p., durante 7 dias), quando comparados com o grupo controle lesionado com 6-OHDA. Não houve diferença significativa no número de rotações do grupo tratado com cafeína na dose menor (10 mg/kg, i.p., durante 7 dias) (**Figura 11**).

O tratamento com cafeína nas duas doses durante 14 dias, reduziu profundamente o número de rotações induzidas por apomorfina em torno de 47 e 69 % (cafeína 10 e 20 mg/kg, i.p., durante 14 dias, respectivamente), quando comparados com o grupo controle lesionado com 6-OHDA (**Figura 12**).

O número de rotações por hora diminuiu cerca de 18 % e 42 % nos grupos lesionados com 6-OHDA, após tratamento com CSC 1 (173,1 ± 16,7 rotações/h) e CSC 5 mg/kg (122,5 ± 14,1 rotações/h). Os resultados demonstraram que o CSC reduziu significativamente, e de maneira dose-dependente as rotações induzidas por apomorfina resultantes da lesão estriatal com 6-OHDA, revertendo parcialmente os efeitos dessa neurotoxina. No entanto, o efeito do CSC no comportamento rotacional dos grupos lesionados

com 6-OHDA não foi potencializado pela sua associação com L-DOPA. De fato nenhuma diferença significativa foi observada entre L-DOPA (L-DOPA 50 mg/kg + benzerazida 12,5 mg/kg) e CSC 1 + L-DOPA (CSC 1 mg/kg + L-DOPA 50 mg/kg + benzerazida 12,5 mg/kg) (**Tabela 1**).

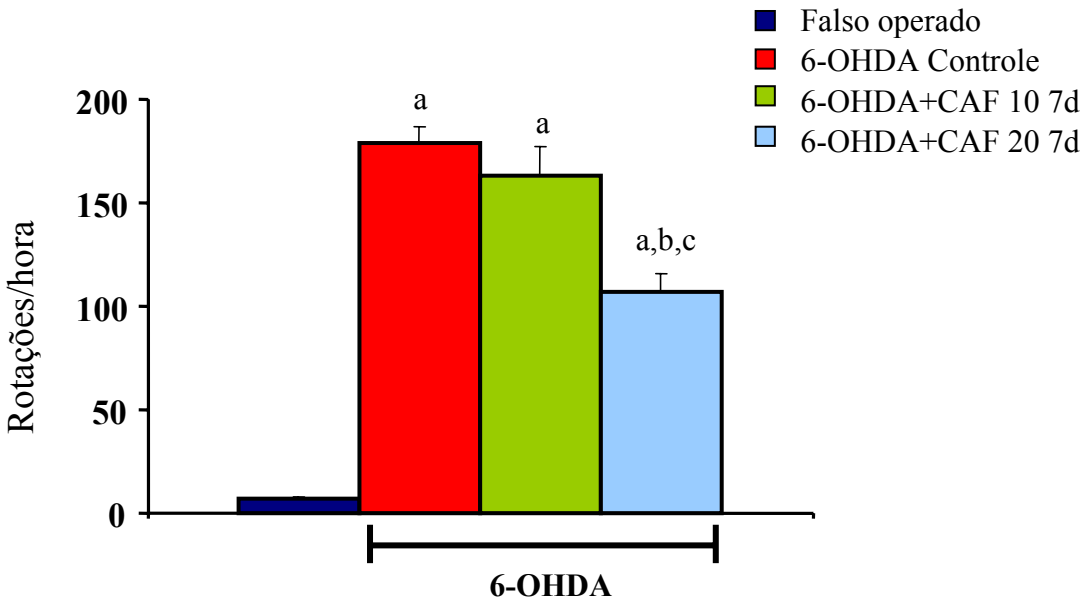



**Figura 11 - Determinação do comportamento rotacional induzido por apomorfina (3 mg/kg, i.p.) por 60 min, em ratos com lesão estriatal por 6-OHDA, tratados com cafeína (nas doses de 10 e 20 mg/kg, i.p. diariamente durante 7 dias. O tratamento foi iniciado seis dias após a lesão com 6-OHDA)**

Nota: Os resultados são expressos como média ± EPM do número de experimentos (6-8). Foram usados o teste ANOVA e Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. a vs falso operado, b vs controle (6-OHDA) e c vs CAF 10 7d, respectivamente, com $p<0,05$.

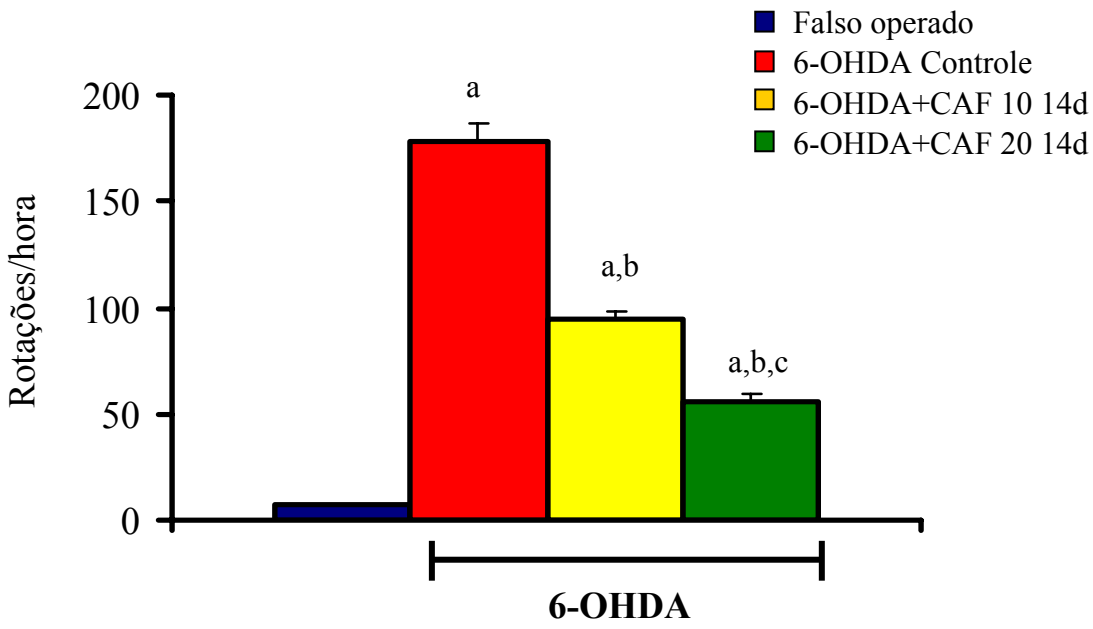



**Figura 12 - Determinação do comportamento rotacional induzido por apomorfina (3 mg/kg, i.p.) por 60 min, em ratos com lesão estriatal por 6-OHDA, tratados com cafeína (10 e 20 mg/kg, i.p. diariamente durante 14 dias. O tratamento foi iniciado 1h após a lesão com 6-OHDA)**

Nota: Os resultados são expressos como média ± EPM do número de experimentos (6-8). Foram usados os testes ANOVA e Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. a vs falso operado, b vs controle (6-OHDA) e c vs CAF 10 14d, respectivamente, com $p<0,05$.

**Tabela 1 – Efeitos do CSC *(8-(3-chlorostyryl caffeine)*, sozinho ou associado com L-DOPA (L-DOPA 50 mg/kg + benzerazida 12,5 mg/kg), no comportamento rotacional induzido por apomorfina em ratos, após lesão estriatal induzida por 6-OHDA**

| Grupos | Rotações/h |
|---|---|
| Falso operado | 4,2±0,4 |
| Controle (6-OHDA) | 210±11,4 [a] |
| CSC 1 | 173,1±16,7 [a] |
| CSC 5 | 122,5±14,1 [a,b,c] |
| CSC 1 + L-DOPA 50 | 274,4±15,0 [a,b,c,d] |
| L-DOPA 50 | 238,3±14,2 [a,c] |

Nota: O número de rotações contralaterais completas foi determinado durante 60 minutos. Os resultados são expressos como média ± EPM do número de experimentos (7-8). a vs Falso operado, b vs Controle (6-OHDA), c vs CSC 1, d vs CSC 5, respectivamente, com $p<0,05$ (ANOVA e teste de Tukey como teste post hoc).

**2 Determinação das concentrações de dopamina (DA) e seus metabólitos (DOPAC E HVA), Noradrenalina (NA), Serotonina (5-HT) e seu metabólito (5-HIAA) no corpo estriado de ratos com lesão por 6-OHDA, tratados com cafeína ou CSC, sozinho ou associado com L-DOPA**

A injeção de 6-OHDA produz dano oxidativo que resulta em destruição neuronal, como indicado pela redução das concentrações das monoaminas e dos seus metabólitos no lado ipsilateral (75-85 %), quando comparado com o lado contralateral dos animais controles. Nenhuma diferença foi observada nos lados contralaterais entre grupos falso operado, controle lesionado com 6-OHDA e dos animais lesionados com 6-OHDA e tratados com cafeína ou com CSC, sozinho ou em associação com L-DOPA.

Foi observada uma redução significativa da concentração de dopamina (DA) no lado ipsilateral dos controles (78 %). No entanto, nos animais tratados com cafeína nas doses de 10 e 20 mg/kg, essa redução foi de 72 e 64 %, respectivamente, no tratamento de 7 dias [$F(5,32)=44,17$; $p<0,001$] (**Tabela 2**) e somente 55 e 22 %, respectivamente, no tratamento de 14 dias, indicando uma recuperação significativa, que foi praticamente completa com a dose maior de cafeína no tratamento de 14 dias [$F(5,34)=36,61$; $p<0,001$]. O mesmo ocorreu com o seu metabólito, DOPAC, que teve uma redução de 76 % no grupo controle, e em torno de 68 e 50 % nos grupos tratados com cafeína durante 7 dias, nas doses de 10 e 20 mg/kg, respectivamente [$F(5,34)=83,87$; $p<0,0001$], e de 40 e 34 % nos grupos tratados com cafeína durante 14 dias, nas doses de 10 e 20 mg/kg, respectivamente [$F(5,34)=19,66$; $p<0,001$]. Além disso, a concentração de HVA também diminuiu em torno de 58 % nos controles, e cerca de 26 e 21 %, respectivamente, nos grupos lesionados e tratados com cafeína nas mesmas doses (10 e 20 mg/kg; $F(5, 34)=16,32$); $p<0,001$) (**Figura 13** e **Tabela 2**).

Uma redução significativa da concentração de noradrenalina (NA) foi também observada no lado ipsilateral dos animais controles (57 %) e, nos grupos tratados com cafeína, nas doses de 10 e 20 mg/kg, uma redução de aproximadamente 36 %, com o tratamento durante 7 dias $F[5, 34)=31,45$; $p<0,001$] e aproximadamente 40 %, com o tratamento durante 14 dias; $F[5, 34)=22,69$; $p<0,001$], como mostrado na **Figura 14** e na **Tabela 3**.

A concentração de serotonina (5-HT) reduziu em cerca de 61 % nos grupos controles (lesionados com 6-OHDA) no lado ipsilateral quando comparado ao lado contralateral. Por outro lado, no grupo tratado com cafeína, nas doses de 10 e 20 mg/kg, essa redução foi de 48 e 20 %, respectivamente com o tratamento durante 7 dias [$F(5, 34)=40,35$; $p<0,001$] e de 58 e 40 %, respectivamente com o tratamento durante 14 dias [$F(5, 34)=29,03$; $p<0,001$]. Nenhuma diferença significativa foi observada na concentração de 5-IHAA entre os grupos (**Figura 15** e **Tabela 4**) [$F(5, 34)=3,66$; $p<0,001$]. Além disso, nenhuma diferença significativa foi observada entre o grupo falso operado (nos lados ipsilateral e contralateral) e o lado contralateral dos ratos lesionados com 6-OHDA (controle).

No tratamento com doses repetidas em ratos lesionados com 6-OHDA, utilizando o CSC (1 e 5 mg/kg, i.p.) também foi observada redução da concentração de DA (61 % e 49 %) e dos seus metabólitos DOPAC (57 % e 33 %) e HVA (39 % e 26 %), respectivamente, embora essa redução tenha ocorrido em menor extensão quando comparada aos valores observados no grupo controle (lesionado com 6-OHDA). O efeito do CSC foi dose-dependente tanto com relação à redução da depleção da concentração de DA (grupo controle (lesionado com 6-OHDA): 565,9±32,5 ng/mg de tecido; CSC 1: 1031,0±41,2 ng/mg de tecido; CSC 5: 1477,0±118,5 ng/mg de tecido) como de DOPAC (grupo controle (lesionado com 6-OHDA): 373,2±41,1 ng/mg de tecido; CSC 1: 610,6±42,8 ng/mg de tecido; CSC 5: 940,0±43,2 ng/mg de tecido) ou HVA (grupo controle (lesionado com 6-OHDA): 167,9±18,1 ng/mg de tecido; CSC 1: 261,5±20,4 ng/mg de tecido; CSC 5: 316,0±35,0 ng/mg de tecido).

Com o objetivo de demonstrar a potenciação dos efeitos da L-DOPA causada pelo CSC nos níveis da dopamina estriatal e dos seus metabólitos após lesão com 6-OHDA, essas duas drogas foram utilizadas em associação. Os resultados mostraram que após a lesão com 6-OHDA, os conteúdos de DA, DOPAC e HVA reduziram cerca de 79 %, 73 % e 61 %, respectivamente, quando comparados ao grupo falso operado. Por outro lado, no grupo tratado com CSC (1 mg/kg), foi observada uma diminuição dessa redução das concentrações de DA, DOPAC e HVA (61 %, 57 % e 39 %, respectivamente). Os valores obtidos da dopamina e dos seus metabólitos no grupo com associação do CSC e L-DOPA (CSC 1 mg/kg + L-DOPA 50 mg/kg + benzerazida 12,5 mg/kg) foram bem próximos daqueles observados

no grupo falso operado, indicando uma reversão quase total do efeito da neurotoxicidade da 6-OHDA (**Tabela 4**).

Também foram observadas reduções nos conteúdos estriatais da NA, 5-HT e 5-HIAA após lesão com 6-OHDA, na ordem de 50 %, 46 % e 26 %, respectivamente (NE: 210,3±15,7 ng/mg de tecido; 5-HT: 378,4±34,5 ng/mg de tecido; 5-HIAA: 394,3±33,4 ng/mg de tecido), quando comparados ao grupo falso operado (NE: 420,6±44,7 ng/mg de tecido; 5-HT: 704,6±29,3 ng/mg de tecido; 5-HIAA: 532,0±45,4 ng/mg de tecido). Essas reduções foram menores nos grupos lesionados com 6-OHDA, após tratamento com as duas doses de CSC, e os efeitos foram dose-dependente. Então, o CSC (1 mg/kg) promoveu uma redução de 39 %, 30% e 25 % da concentração de NA (257,8±25,8 ng/mg de tecido), 5-HT (494,6±38,0 ng/mg de tecido) e 5-HIAA (397,1±32,0 ng/mg de tecido), respectivamente, indicando uma recuperação parcial dos efeitos da 6-OHDA (**Figura 16**).

Os resultados apresentados na **Tabela 5** mostram que CSC na dose mais alta (5 mg/kg) promoveu uma recuperação dos conteúdos de NA, 5-HT e 5-IHAA a valores próximos aos normais (CSC 5, NA: 311,9±23,3 ng/mg de tecido; 5-HT: 587,8±32,7 ng/mg de tecido; 5-HIAA: 487,5±36,3 ng/mg de tecido). Enquanto a L-DOPA 50 mg/kg (L-DOPA 50 + Benz 12,5) não reverteu os efeitos da 6-OHDA nas concentrações da NA, 5-HT e 5-HIAA no estriado de ratos lesionados com 6-OHDA, porém a sua associação com CSC 1 mg/kg elevou os valores a níveis próximos àqueles encontrados no grupo falso operado.

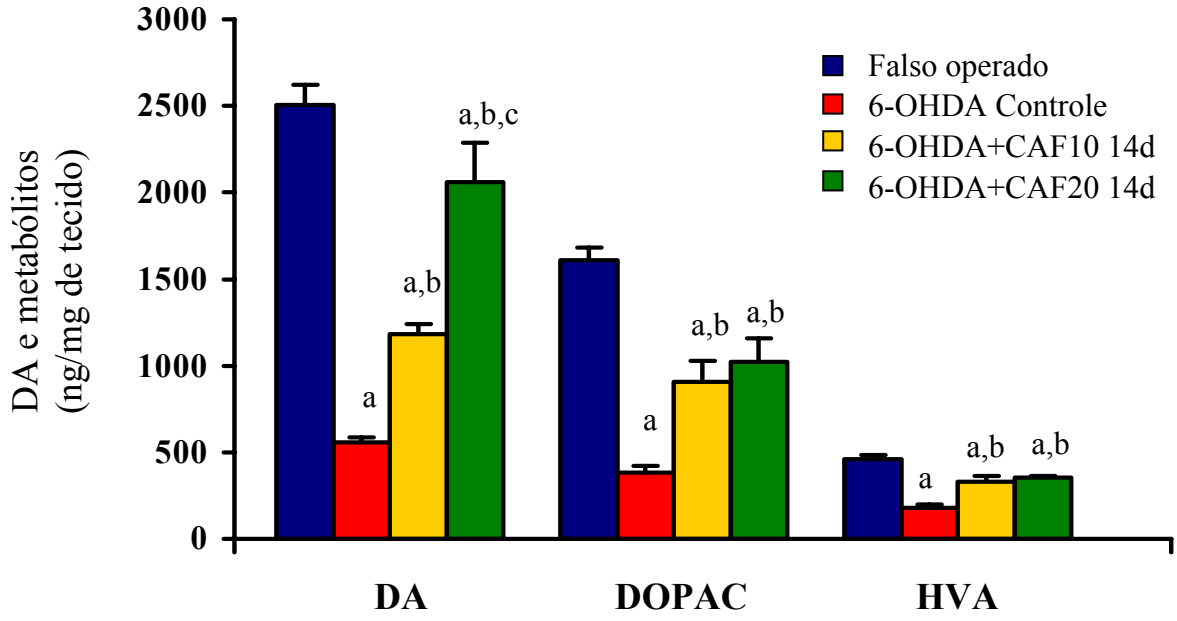



**Figura 13 - Determinação das concentrações de DA e seus metabólitos (DOPAC e HVA) em corpo estriado de ratos com lesão induzida por 6-OHDA, e tratados com cafeína (nas doses de 10 e 20 mg/kg, i.p. diariamente durante 14 dias. O tratamento foi iniciado 1h após a lesão com 6-OHDA)**

Nota: Os resultados são expressos como média ± EPM do número de experimentos (6-8). a vs Falso operado, b vs Controle (6-OHDA) e c vs Cafeína 10, respectivamente, com $p<0,05$ (ANOVA e Student-Newman-Keuls).

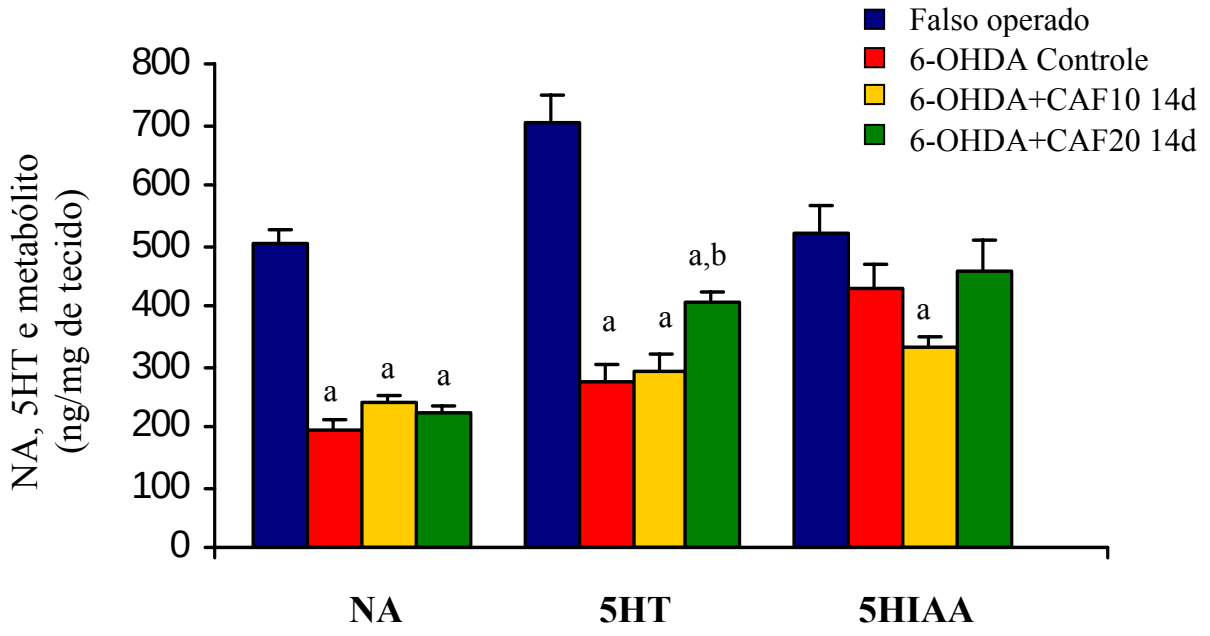



**Figura 14 - Determinação das concentrações de NA e 5-HT e seu metabólito (5-HIAA) em corpo estriado de ratos com lesão induzida por 6-OHDA, e tratados com cafeína (nas doses de 10 e 20 mg/kg, i.p. diariamente durante 14 dias. O tratamento foi iniciado 1h após a lesão com 6-OHDA)**

Nota: Os resultados são expressos como média ± EPM do número de experimentos (6-8). a vs Falso operado, b vs Controle (6-OHDA) e c vs Cafeína 10, respectivamente, com $p<0,05$ (ANOVA e Student-Newman-Keuls).

**Tabela 2 - Efeitos da cafeína administrada durante 7 ou 14 dias nas concentrações de dopamina e seus metabólitos (DOPAC e HVA) em corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA**

| Grupos | DA | DOPAC | HVA |
|---|---|---|---|
| Falso operado | 2631,0 ± 171,9 | 1561,0 ± 69,6 | 429,0 ± 34,5 |
| Controle (6-OHDA) | 565,9 ± 32,5 [a] | 373,2 ± 41,1 [a] | 180,3 ± 7,2 [a] |
| CAF 10 7d | 718,7 ± 47,8 [a] | 504,1 ± 42,7 [a] | 283,6 ± 13,7 [a,b] |
| CAF 20 7d | 933,7 ± 59,4 [a] | 775,3 ± 52,7 [a,b,c] | 303,7 ± 32,5 [a,b] |
| CAF 10 14 d | 1176,0 ± 107,0 [a,b] | 929,9 ± 26,3 [a,b,c] | 317,0 ± 14,6 [a,b] |
| CAF 20 14 d | 2056,0 ± 232,5 [a,b,c,d,e] | 1025,0 ± 40,1 [a,b,c,d] | 337,8 ± 19,2 [a,b] |

Nota: A cafeína (10 e 20 mg/kg, i.p.) foi administrada 1h após a lesão com 6-OHDA e depois diariamente durante **14 dias** ou diariamente durante **7 dias**. Neste protocolo o tratamento foi iniciado 6 dias após a lesão com 6-OHDA **(Protocolo 1)**. Os controles foram tratados com salina 0,9%. Duas semanas após a lesão com 6-OHDA, os animais foram sacrificados e o corpo estriado utilizado para determinação de monoaminas (ng/mg de tecido) em HPLC-EC. Os resultados são expressos como média ± EPM do número de experimentos (6-8). a vs Falso operado, b vs Controle (6-OHDA), c vs Cafeína 10 7 dias, d vs Cafeína 20 7 dias e e vs Cafeína 10 14 dias, respectivamente, com $p<0,05$ (ANOVA e Student-Newman-Keuls).

**Tabela 3 - Efeitos da cafeína administrada durante 7 ou 14 dias nas concentrações de noradrenalina, serotonina e do seu metabólito em corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA**

| Grupos | NA | 5HT | 5-HIAA |
|---|---|---|---|
| Falso operado | 466,6 ± 23,1 | 704,6 ± 63,5 | 532,0 ± 45,4 |
| Controle (6-OHDA) | 200,3 ± 10,4 [a] | 275,2 ± 30,9 [a] | 394,3 ± 33,4 |
| CAF 10 7d | 298,4 ± 33,9 [a,b] | 367,5 ± 40,3 [a] | 351,3 ± 39,7 [a] |
| CAF 20 7d | 296,7 ± 28,5 [a,b] | 563,5 ± 50,6 [a,b,c] | 457,7 ± 58,6 |
| CAF 10 14 d | 277,3 ± 20,7 [a] | 295,1 ± 31,5 [a,d] | 340,4 ± 27,4 [a] |
| CAF 20 14 d | 278,5 ± 23,8 [a] | 421,5 ± 17,0 [a,b,d,e] | 460,3 ± 53,5 |

Nota: A cafeína (10 e 20 mg/kg, i.p.) foi administrada 1h após a lesão com 6-OHDA e depois diariamente durante **14 dias** ou diariamente durante **7 dias**. Neste protocolo o tratamento foi iniciado 6 dias após a lesão com 6-OHDA **(Protocolo 1)**. Os controles foram tratados com salina 0,9%. Duas semanas após a lesão com 6-OHDA, os animais foram sacrificados e o corpo estriado utilizado para determinação de monoaminas (ng/mg de tecido) em HPLC-EC. Os resultados são expressos como média ± EPM do número de experimentos (6-8). a vs Falso operado, b vs Controle (6-OHDA), c vs Cafeína 10 7 dias, d vs Cafeína 20 7 dias e e vs Cafeína 10 14 dias, respectivamente, com $p<0,05$ (ANOVA e Student-Newman-Keuls).

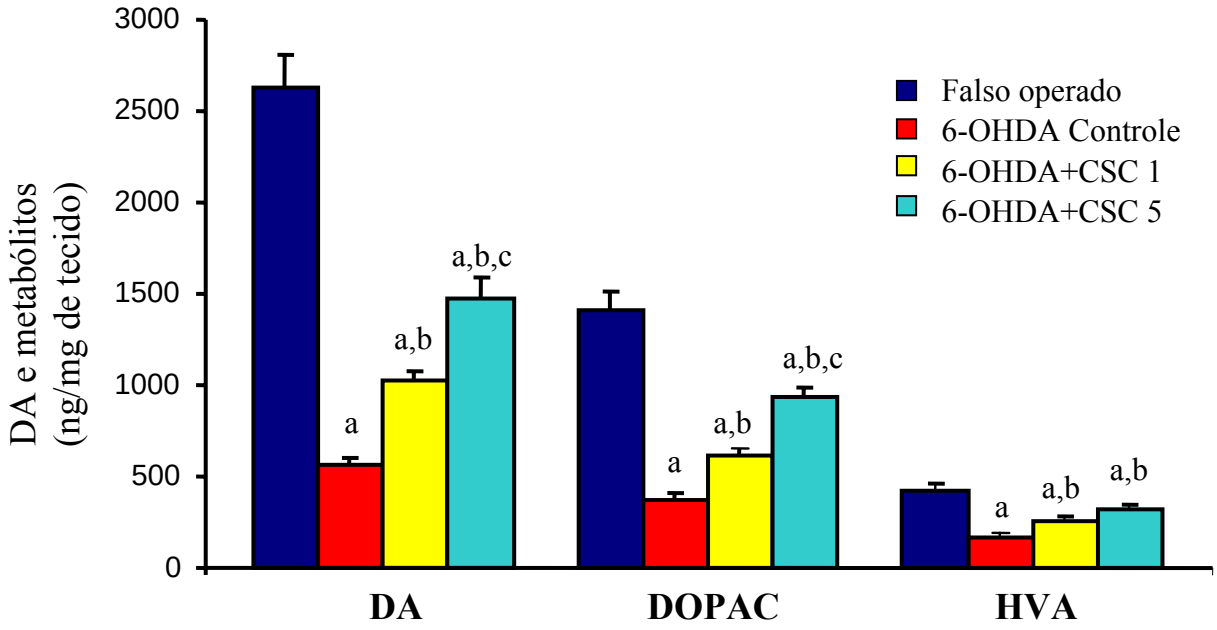



**Figura 15 - Efeito do CSC *(8-(3-chlorostyryl caffeine)* nas concentrações de DA, DOPA e HVA em estriado de ratos lesionados com 6-OHDA (ng/mg de tecido)**

Nota: Os resultados são expressos como média ± EPM do número de experimentos (8-10). a vs Falso operado, b vs Controle (6-OHDA), c vs CSC 1, respectivamente, com $p<0,05$ (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*).

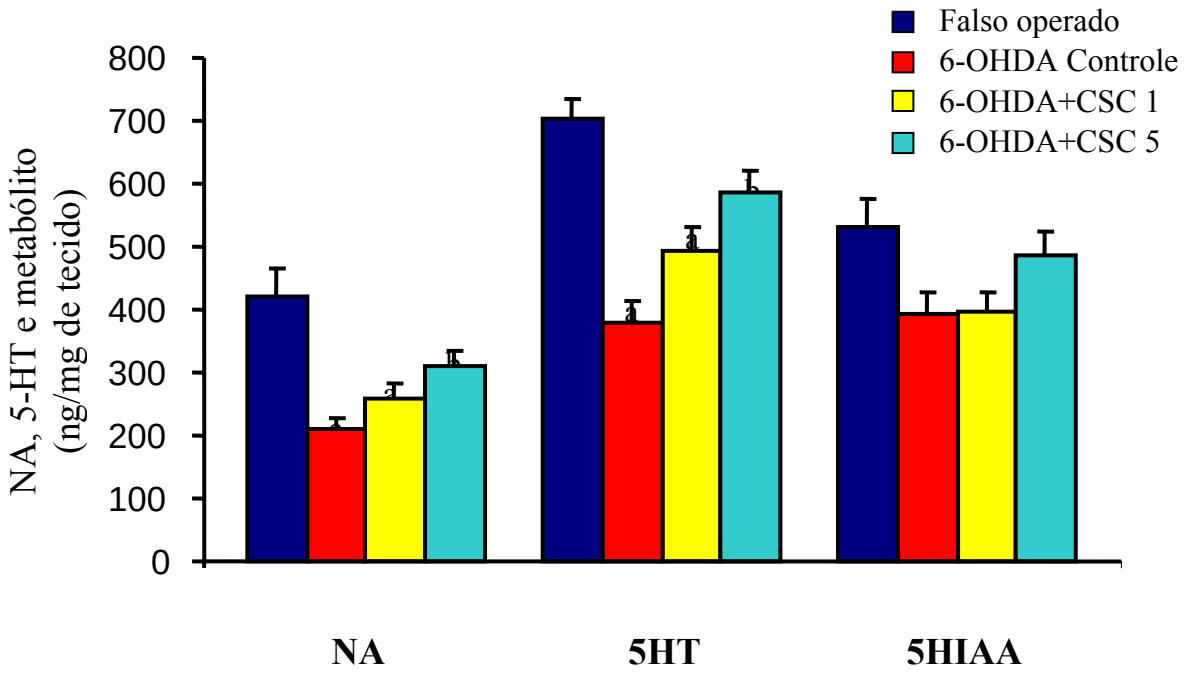



**Figura 16 - Efeito do CSC *(8-(3-chlorostyryl caffeine)* nas concentrações de NA, 5-HT e 5-HIAA em estriado de ratos lesionados com 6-OHDA (ng/mg de tecido)**

Nota: Os resultados são expressos como média ± EPM do número de experimentos (8-10). a vs Falso operado, b vs Controle (6-OHDA), c vs CSC 1, respectivamente, com $p<0,05$ (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*).

**Tabela 4 - Efeitos do CSC (*8-(3-chlorostyryl)caffeine*) sozinho ou associado com L-DOPA e da L-DOPA sozinha nas concentrações de dopamina e seus metabólitos (DOPAC e HVA) em corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA**

| Grupos | DA | DOPAC | HVA |
|---|---|---|---|
| Falso operado | 2631,0±171,9 | 1405,0±108,8 | 429,0±34,5 |
| Controle (6-OHDA) | 565,9±32,5 [a] | 373,2±41,1 [a] | 167,9±18,1 [a] |
| CSC 1mg | 1031,0±41,2 [a,b] | 610,6±42,8 [a] | 261,5±20,4 [a] |
| CSC 1mg + L-DOPA 50mg | 2129,0±102,0 [ab,c,d] | 1320,0±136,2 [b,c,d] | 430,7±35,9 [b,c] |
| L-DOPA 50mg | 1243,0±112,0 [a,b,e] | 664,7±66,1 [a,b,e] | 245,0±29,1 [a,e] |

Nota: O CSC (1e 5 mg/kg, i.p.) sozinho ou associado com L-DOPA (CSC 1 mg/kg, i.p. + L-DOPA 50mg/kg + Benzerazida 12,5mg/kg, i.p.), e a L-DOPA (L-DOPA 50mg/kg + Benzerazida 12,5mg/kg, i.p.) foram administrados diariamente durante 7 dias (iniciando seis dias após a lesão com 6-OHDA e continuando diariamente durante 7 dias (Protocolo 2)). Os controles foram tratados com salina 0,9%. Duas semanas após a lesão com 6-OHDA, os animais foram sacrificados e o corpo estriado utilizado para determinação das monoaminas (ng/mg de tecido) em HPLC-EC. Os resultados são expressos como média ± EPM do número de experimentos (6-8). a vs Falso operado, b vs Controle (6-OHDA), c vs CSC 1, d vs CSC 5 e e vs CSC 1 + L-DOPA, respectivamente, com $p<0,05$ (ANOVA e teste de Tukey como teste *post hoc*).

**Tabela 5 - Efeitos do CSC (*8-(3-chlorostyryl)caffeine*) sozinho ou associado com L-DOPA e da L-DOPA sozinha nas concentrações de NA, 5-HT e 5-HIAA em corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA**

| Grupos | NA | 5HT | 5-HIAA |
|---|---|---|---|
| Falso operado | 420,6±44,7(6) | 704,6±29,3(6) | 532,0±45,4(6) |
| Controle (6-OHDA) | 210,3±15,7(10) [a] | 378,4±34,5(10) [a] | 394,3±33,4(10) |
| CSC 1mg | 257,8±25,8 (8) [a] | 494,6±38(7) [a] | 397,1±32(7) |
| CSC 1mg + L-DOPA 50mg | 390,8±18,6(7) [b,c] | 586,8±32,9 (7) [b] | 448,68±51,5(6) |
| L-DOPA 50mg | 222,3±16,7 (7) [a,e] | 420,6±24,1 (7) [a,d,e] | 398,4±37,5 (6) |

Nota: O CSC (1e 5 mg/kg, i.p.) sozinho ou associado com L-DOPA (CSC 1 mg/kg, i.p. + L-DOPA 50mg/kg + Benzerazida 12,5mg/kg, i.p.), e a L-DOPA (L-DOPA 50mg/kg + Benzerazida 12,5mg/kg, i.p.) foram administrados diariamente durante 7 dias (iniciando seis dias após a lesão com 6-OHDA e continuando diariamente durante 7 dias (Protocolo 2)). Os controles foram tratados com salina 0,9%. Duas semanas após a lesão com 6-OHDA, os animais foram sacrificados e o corpo estriado utilizado para determinação das monoaminas (ng/mg de tecido) em HPLC-EC. Os resultados são expressos como média ± EPM do número de experimentos (6-8). a vs Falso operado, b vs Controle (6-OHDA), c vs CSC 1, d vs CSC 5 e e vs CSC 1 + L-DOPA, respectivamente, com $p<0,05$ (ANOVA e teste de Tukey como teste *post hoc*).

**3 Determinação das concentrações de GABA e Glutamato em corpo estriado de ratos com lesão por 6-OHDA, tratados com cafeína ou CSC, sozinho ou associado a L-DOPA**

A **Tabela 6** mostra que a lesão estriatal por 6-OHDA aumentou as concentrações de GABA (57,8 ± 6,9 μmol/g de tecido) e glutamato (96,4 ± 4,7 μmol/g de tecido) cerca de 3 e 3,8 vezes, respectivamente, quando comparado com o grupo falso operado (GABA: 19,3 ± 1,9; GLU: 25,4 ± 2,6 μmol/g de tecido).

O tratamento de 7 dias com cafeína não alterou o aumento dos conteúdos de GABA e glutamato induzido por 6-OHDA, exceto na dose de 20 mg/kg, onde foi observada uma redução da concentração de glutamato em cerca de 23% (CAF 10- GABA: 64,0 ± 6,8; GLU: 92,3 ± 10,0; CAF 20- GABA: 55,5 ± 6,2; GLU: 74,0 ± 7,8 μmol/g de tecido), quando comparado ao grupo controle (lesionado com 6-OHDA e tratado com salina 0,9 %).

A **Tabela 7** mostra que o tratamento com CSC (1 e 5 mg/kg) reduziu as alterações nos conteúdos de GABA e glutamato provocadas pela 6-OHDA (CSC1- GABA: 44,3±16,0; GLU: 72,4±6,0; CSC 5- GABA: 25,5±3,9; GLU: 57,1±4,9 μmol/g de tecido), quando comparado ao grupo controle (lesionado com 6-OHDA e tratado com salina 0,9 %).

Esses resultados indicam uma recuperação parcial, mas significativa, dos efeitos da neurotoxina após tratamento com CSC. Os efeitos da lesão com 6-OHDA nos conteúdos de GABA e glutamato não foram revertidos com o tratamento com L-DOPA 50 mg/kg (L-DOPA 50 + Benz 12,5). Entretanto, foi observada uma potencialização dos efeitos do CSC nos animais lesionados com 6-OHDA quando administrada em associação com a L-DOPA (CSC 1 mg/kg, i.p. + L-DOPA 50mg/kg + Benzerazida 12,5mg/kg, i.p.).

**Tabela 6 - Efeitos da cafeína nas concentrações de Glutamato e GABA no corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA**

| Grupos | Glutamato | GABA |
|---|---|---|
| Falso operado | 25,4±2,6 | 19,3±1,9 |
| Controle (6-OHDA) | 96,4±4,7 [a] | 57,8±6,9 [a] |
| CAF 10 7d | 92,3±10,0 [a] | 64,0±6,8 [a] |
| CAF 20 7d | 74,0±7,8 [a,b] | 55,5±6,2 [a] |

Nota: A cafeína (10 e 20 mg/kg, i.p.) foi administrada 1h após a lesão com 6-OHDA e depois diariamente durante 7 dias. O tratamento foi iniciado 6 dias após a lesão com 6-OHDA**.** Os controles foram tratados com salina 0,9%. Duas semanas após a lesão com 6-OHDA, os animais foram sacrificados e o corpo estriado utilizado para determinação dos aminoácidos GABA e glutamato (µmol/g de tecido) em HPLC. Os resultados são expressos como média ± EPM do número de experimentos (7-8). a vs Falso operado, b vs Controle (6-OHDA), respectivamente, com $p<0,05$ (ANOVA e teste de Tukey como teste *post hoc*).

**Tabela 7 - Efeitos do CSC *(8-(3-chlorostyryl)caffeine)* sozinho ou associado com L-DOPA e da L-DOPA sozinha nas concentrações de Glutamato e GABA no corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA**

| Grupos | Glutamato | GABA |
|---|---|---|
| Falso operado | 25,4±2,6 | 19,3±1,9 |
| Controle (6-OHDA) | 96,4±4,7 [a] | 57,8±6,9 [a] |
| CSC 1mg | 72,4±6,0 [a,b] | 44,3±6,0 [a,b] |
| CSC 5 mg | 57,1±4,9 [a,b,c] | 25,5±3,9 [b,c] |
| CSC 1mg + L-DOPA 50mg | 56,0±3,5 [a,b,c] | 37,1±3,1 [a,b,d] |
| L-DOPA 50mg | 85,3±6,7 [a,d,e] | 51,0±2,7 [a,d,e] |

Nota: Efeito do CSC (nas doses de 1 e 5 mg/kg, i.p. diariamente durante 7 dias. O tratamento foi iniciado 6 dias após a lesão com 6-OHDA) sozinho ou associado com L-DOPA (CSC 1 mg/kg, i.p. + L-DOPA 50mg/kg + Benzerazida 12,5 mg/kg, i.p.) e da L-DOPA (L-DOPA 50mg/kg + Benzerazida 12,5 mg/kg, i.p.) nos níveis de GABA e glutamato. Os controles foram tratados com salina 0,9%. Duas semanas após a lesão com 6-OHDA, os animais foram sacrificados e o corpo estriado utilizado para determinação dos aminoácidos (μmol/g de tecido) em HPLC. Os resultados são expressos como média ± EPM do número de experimentos (7-8). a vs Falso operado, b vs Controle (6-OHDA), c vs CSC 1, d vs CSC 5, e vs CSC 1 + L-DOPA, e vs L-DOPA 50, respectivamente, com $p<0,05$ (ANOVA e teste de Tukey como teste *post hoc*).

**4 Efeitos da cafeína ou do CSC nos receptores $D_1$ e $D_2$-símile ($B_{MAX}$ e Kd) em corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA**

A **Tabela 8** mostra uma redução significativa de cerca de 46 % na ligação do [$^3$H]-SCH 23390 no lado ipsilateral do grupo controle quando comparado ao grupo falso operado (Falso operado: 324,5 ± 24,3; Controle (6-OHDA): 175,2 ± 8,4 fmol/mg de proteína), enquanto a constante de dissociação (Kd) aumentou cerca de 3 vezes no grupo Controle quando comparado ao grupo falso operado (FO: 1,0 ± 0,19; Controle (6-OHDA): 2,7 ± 0,24 nM), mostrando que a neurotoxina 6-OHDA promoveu uma redução significativa da afinidade dos receptores $D_1$-símile. Os resultados da **Tabela 8** mostram ainda que a lesão intraestriatal com 6-OHDA promoveu uma *up-regulation* dos receptores $D_2$-símile, com um aumento na ligação do ligante [$^3$H]-espiroperidol aos receptores $D_2$ em torno de 60% duas semanas após a lesão (FO:230,0 ± 24,8; Controle (6-OHDA): 369,8 ± 24,3 fmol/mg de proteína), enquanto o Kd aumentou cerca de duas vezes quando comparado ao grupo falso operado (FO:1,3 ± 0,22; Controle (6-OHDA): 2,6 ± 0,27 nM).

No grupo lesionado e tratado com cafeína (10 mg/kg, 7dias) ocorreu uma redução apenas de 32 % no Bmax dos receptores $D_1$-símile (FO: 324,5 ± 24,3; CAF10: 221,6 ± 14,7 fmol/mg de proteína), enquanto o Kd aumentou cerca de 60 % quando comparado ao grupo falso operado (FO:1,0 ± 0,19; CAF10: 1,5 ± 0,23 nM). Com relação aos receptores $D_2$-símile, no grupo tratado com cafeína ocorreu um aumento em torno de 38 % na densidade desses receptores quando comparados ao grupo falso operado (FO: 230,0 ± 24,8; CAF10: 317,7 ± 32,0 fmol/mg de proteína), enquanto o Kd aumentou cerca de 60 % quando comparado ao grupo falso operado (FO: 1,3 ± 0,22; CAF10: 1,6 ± 0,25 nM).

No grupo lesionado e tratado com CSC (1 mg/kg) não foram observadas alterações significativas no Bmax (FO: 324,5 ± 24,3; CSC1: 207,4 ± 20 fmol/mg de proteína) e no Kd (Falso operado:1,0 ± 0,19; CSC1: 2,9 ± 0,38 nM) dos receptores $D_1$-símile, quando comparado ao grupo falso operado. Com relação aos receptores $D_2$-símile, no grupo tratado com CSC não foi observada nenhuma alteração na densidade desses receptores quando comparados ao grupo falso operado (FO: 230,0 ± 24,8; CSC1: 285,3 ± 29,0 fmol/mg de

proteína), enquanto o Kd diminuiu cerca de 46 % quando comparado ao grupo controle (Controle (6-OHDA): 2,6 ± 0,27; CSC1: 1,4 ± 0,17 nM).

**Tabela 8 - Efeitos da cafeína ou do CSC *(8-(3-chlorostyryl caffeine)* no *binding* de receptores $D_1$ e $D_2$-símile (Bmax e Kd) em corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA**

| Grupos | $D_1$ | | $D_2$ | |
|---|---|---|---|---|
| | **Bmax** (fmol/mg de proteína) | **Kd** (nM) | **Bmax** (fmol/mg de proteína) | **Kd** (nM) |
| Falso operado | 324,5±24,3 | 1,0±0,19 | 230,0±24,8 | 1,3±0,22 |
| Controle (6-OHDA) | 175,2±8,4[a] | 2,7±0,24 [a] | 369,8±24,3 [a] | 2,6±0,27 [a] |
| CAF 10 | 221,6±14,7 [a] | 1,6±0,23 [b] | 317,7±32,0 | 1,6±0,25 [b] |
| CSC 1 | 207,4±20,0 [a] | 2,9±0,38 [a] | 285,3±29,0 | 1,4±0,17 [b] |

Nota: Efeito da cafeína ou do CSC (10 mg/kg, i.p. e 1 mg/kg, i.p., respectivamente, administrados diariamente durante 7 dias. O tratamento foi iniciado 6 dias após a lesão com 6-OHDA) nos receptores $D_1$ e $D_2$-símile (Bmax e Kd). Os controles foram tratados com salina 0,9%. Duas semanas após a lesão com 6-OHDA, os animais foram sacrificados e o corpo estriado utilizado para determinação da densidade dos receptores dopaminérgicos $D_1$ e $D_2$-símile. Os valores de Bmax e Kd são expressos em fentomoles/mg de proteína enquanto aqueles de Kd em nM e apresentados como média ± EPM do número de experimentos (6-8). a vs falso operado, b vs Controle (6-OHDA), respectivamente, com $p<0,05$ (ANOVA e teste de Tukey como teste *post hoc*).

**5 Efeitos da cafeína ou do CSC no *binding* de receptores Gabaérgicos ([$^3$H]-GABA) e receptores Glutamatérgicos ([$^3$H]-Glutamato) no corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA.**

A **Tabela 9** mostra uma redução significativa em torno de 46 % e 40 % na ligação do [$^3$H]-GABA e do [$^3$H]-glutamato, respectivamente no lado ipsilateral dos animais lesionados com 6-OHDA quando comparados ao grupo falso operado ([$^3$H]-GABA: FO: 316,5 ± 29,3; Controle (6-OHDA): 172,1 ± 18,4 e [$^3$H]-glutamato: FO: 2093,0 ± 296,5; Controle (6-OHDA): 1244,0 ± 89,7 fmol/mg de proteína).

O tratamento com cafeína na dose de 10 mg/kg (7 dias) não promoveu nenhuma alteração significativa sobre a ligação dos receptores GABAérgicos e glutamatérgicos aos seus respectivos ligantes radioativos, cujos valores permaceceram próximos àqueles observados no grupo controle ([$^3$H]-GABA: CAF10: 174,2 ± 14,5; Controle (6-OHDA): 172,1 ± 18,4 e [$^3$H]-glutamato: CAF10: 1558,0 ± 182,1; Controle (6-OHDA): 1244,0 ± 89,7 fmol/mg de proteína).

O tratamento com CSC na dose de 1 mg/kg reduziu em apenas 18 % e 13 % a ligação dos receptores GABAérgicos e glutamatérgicos aos seus respectivos ligantes radioativos, no lado ipsilateral dos animais lesionados com 6-OHDA, quando comparados ao grupo falso operado ([$^3$H]-GABA: FO: 316,5 ± 29,3; [$^3$H]-GABA: CSC1: 259,2±18,0 e [$^3$H]-glutamato: FO: 2093,0 ± 296,5; CSC1: 1809,0±173,4 fmol/mg de proteína).

**Tabela 9 - Efeitos da cafeína ou do CSC *(8-(3-chlorostyryl caffeine)* no *binding* de receptores GABAérgicos ([$^3$H]-GABA) e receptores glutamatérgicos ([$^3$H]-glutamato) no corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA**

| **Grupos** | **[$^3$H]- GABA** (fmol/mg de proteína) | **[$^3$H]- glutamato** (fmol/mg de proteína) |
|---|---|---|
| Falso operado | 316,5±29,3 (7) | 2093,0±296,5(6) |
| Controle (6-OHDA) | 172,1±18,4 (6)[a] | 1244,0±89,7 (7) [a] |
| CAF 10 | 174,2±14,5 (6) | 1558,0±182,1 (8) |
| CSC 1 | 259,2±18,0 (7) [b] | 1809,0±173,4 (8) |

Nota: Os animais foram tratados com cafeína ou CSC (10 mg/kg, i.p. e 1 mg/kg, i.p., respectivamente, diariamente durante 7 dias. O tratamento foi iniciado 6 dias após a lesão com 6-OHDA). Duas semanas após a lesão com 6-OHDA, os animais foram sacrificados e o corpo estriado utilizado para determinação da densidade dos receptores GABA e glutamato. Para a determinação dos receptores GABA e glutamato foram utilizados os antagonistas tritiados [$^3$H]-GABA e [$^3$H]-glutamato, respectivamente. Os resultados são expressos em fentomoles/mg de proteína e apresentados como média ± EPM do número de animais mostrados am parênteses. a vs falso operado, b vs Controle (6-OHDA), respectivamente, com $p<0,05$ (ANOVA e teste de Tukey como teste *post hoc*).

**6 Determinação da viabilidade celular em cultura de células mesencefálicas de ratos expostas a 6-OHDA antes e após exposição à cafeína ou ao CSC**

Para avaliação da viabilidade celular em cultura de células mesencefálicas de ratos foi utilizado o teste do MTT ([3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium) para determinar a neurotoxiciade induzida pela 6-OHDA e as alterações causadas pela cafeína ou o CSC.

Os resultados do teste do MTT mostraram que a exposição das células mesencefálicas a 10 μg/ml de 6-OHDA causou uma redução de 34 % na viabilidade celular, quando comparado aos controles (MTT em absorbância 595 nm, controles: 0,4223 ± 0,0476; 6-OHDA: 0,2808 ± 0,0360). A cafeína sozinha, utilizada nas concentrações 5 e 10 μg/ml, não alterou a viabilidade celular, nas células expostas a 6-OHDA houve bloqueio da citotoxicidade induzida pela 6-OHDA, e os valores da redução do MTT foram próximos aos do controle (na ausência de 6-OHDA) (**Figura 17**).

O CSC sozinho, utilizado nas concentrações 0,1; 1 e 5 μg/ml, não apresentou nenhum efeito tóxico *per se*, mas reverteu significativamente a drástica redução da viabilidade celular após a exposição a 6-OHDA (Controle: 0,407 ± 0,019; 6-OHDA: 0,220 ± 0,017; CSC 0,1 + 6-OHDA: 0,323 ± 0,014; CSC 1 + 6-OHDA: 0,352 ± 0,031 μM; CSC 5 + 6-OHDA: 0,362 ± 0,038 μM (**Figura 18**).

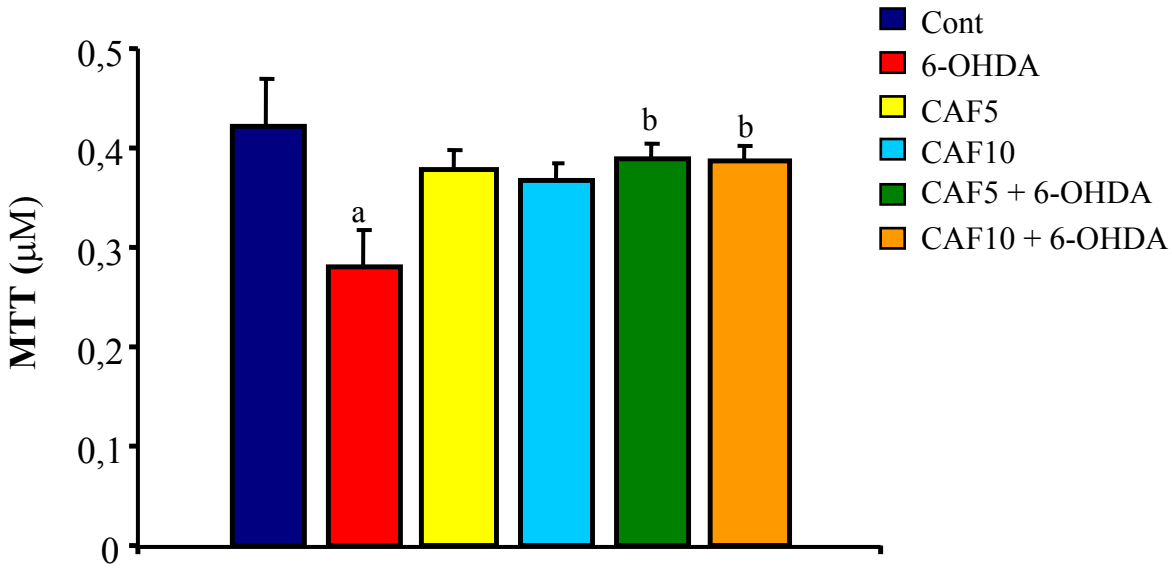



**Figura 17 - Efeito da cafeína na toxicidade induzida por 6-OHDA, em células mesencefálicas de ratos**

Nota: Após quatro dias de cultura, CAF (5 e 10 µg/ml) foi adicionada as células, 3 h antes da 6-OHDA (10 µg/ml). A neurotoxicidade foi determinada através do método do MTT, a e b vs controle e 6-OHDA, respectivamente, com $p<0,05$ (ANOVA e teste de Tukey ).

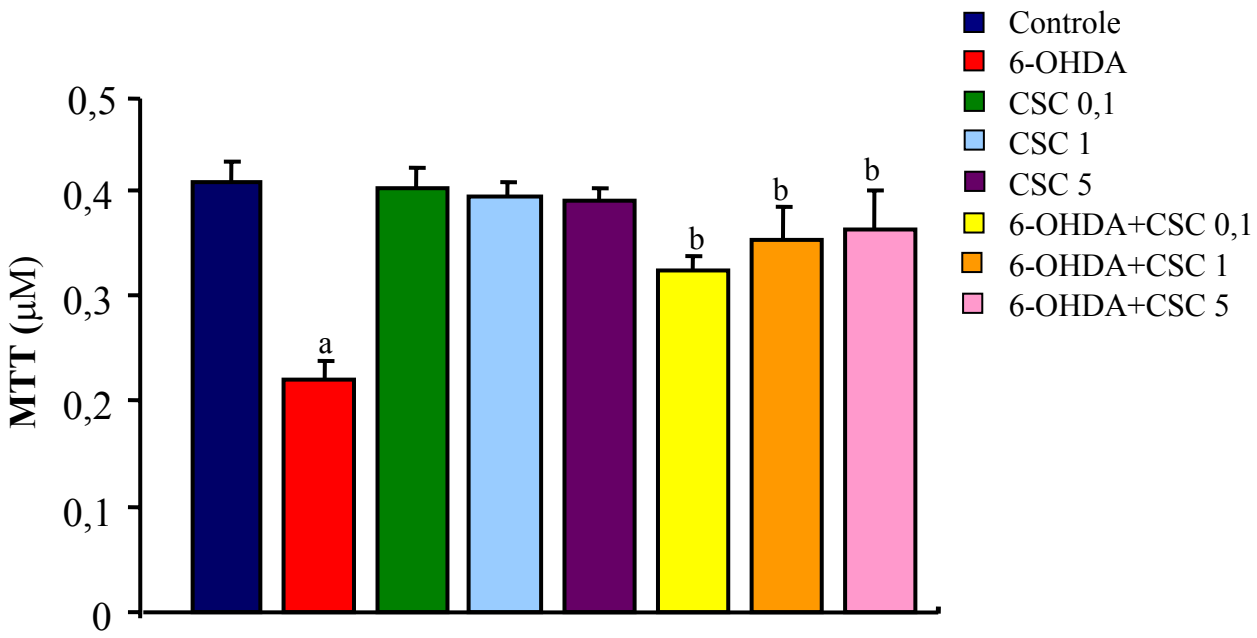



**Figura 18 - Efeito do CSC *(8-(3-chlorostyryl caffeine)* na toxicidade induzida por 6-OHDA, em células mesencefálicas de ratos**

Nota: Após 4 dias de cultura, o CSC (0,1 a 5 µg/ml) foi adicionado às células mesencefálicas de rato, 3 h antes da 6-OHDA (10 µg/ml). A viabilidade celular foi avaliada através do teste do MTT, adicionado a cultura 24 h após a incubação com 6-OHDA sozinha ou na presença do CSC. Os experimentos foram realizados em triplicatas em três dias diferentes. a vs Controle, b vs 6-OHDA; com $p<0,05$ (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*).

## 7 Determinação da concentração de nitrito/nitrato em cultura de células mesencefálicas de ratos expostas a 6-OHDA na ausência ou na presença de cafeína ou CSC

Para avaliação da concentração de nitrito/nitrato em cultura de células mesencefálicas foi utilizado o método de Green *et al.* (1981) com a finalidade de determinar a neurotoxiciade induzida pela 6-OHDA (10 μg/ml) com relação ao estresse oxidativo e a geração de espécies reativas do nitrogênio e as alterações causadas pela cafeína ou o CSC.

Em células normais, a concentração de nitrito/nitrato é geralmente muito baixa. No entanto, na presença de estresse oxidativo como ocorre com a exposição das células mesencefálicas a 6-OHDA, a concentração de nitrito/nitrato aumenta. Nossos resultados mostraram que a exposição das células a 6-OHDA (10 μg/ml) causou um aumento na formação de nitrito/nitrato de duas vezes, quando comparado ao controle (Controle: 0,99 ± 0,04; 6-OHDA: 2,01 ± 0,1 μM).

Enquanto a cafeína (nas doses 0,1; 1 e 5 μg/ml) *per se* não apresentou efeito na formação de nitrito/nitrato, nas células expostas a 6-OHDA houve bloqueio do aumento dos concentração de nitrito/nitrato induzida pela 6-OHDA, e os valores da redução na formação de nitrito/nitrato foram próximos aos do controle (na ausência de 6-OHDA) (CAF 0,1 + 6-OHDA: 1,08 ± 0,05 μM; CAF 1 + 6-OHDA: 0,73 ± 0,05 μM; CAF 5 + 6-OHDA: 0,79 ± 0,15 μM) (**Figura 19**).

O CSC (nas doses 0,1; 1 e 5 μg/ml) *per se* não apresentou efeito na formação de nitrito/nitrato, porém, nas células expostas a 6-OHDA houve bloqueio do aumento dos níveis de nitrito/nitrato induzida pela 6-OHDA, e os valores da redução na formação de nitrito/nitrato foram próximos aos do controle (na ausência de 6-OHDA) (CSC 0,1 + 6-OHDA: 0,54 ± 0,05 μM; CSC 1 + 6-OHDA: 0,50 ± 0,03 μM; CSC 5 + 6-OHDA: 0,53 ± 0,09 μM) (**Figura 20**).

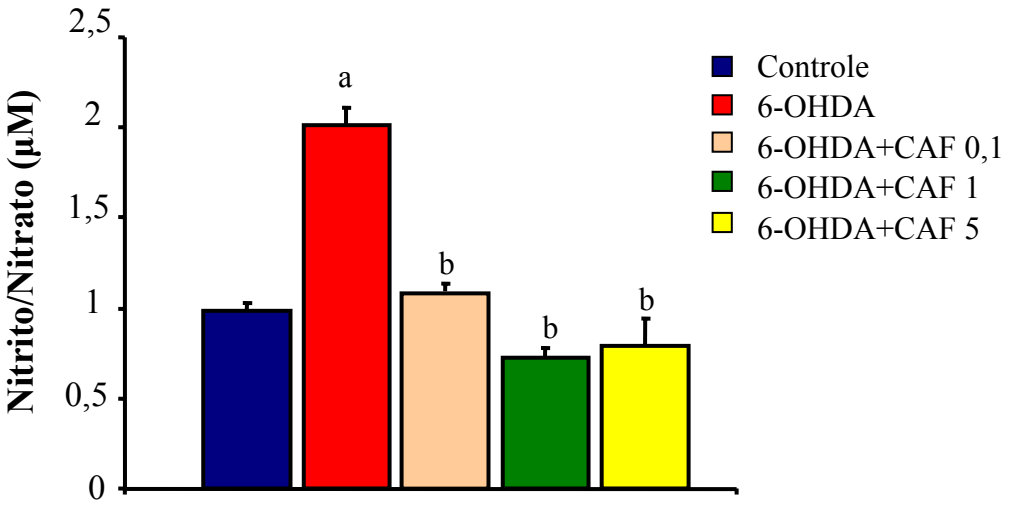



**Figura 19 - Efeito da cafeína sobre as concentrações de nitrito/nitrato em células mesencefálicas de rato após a exposição a 6-OHDA**

Nota: Após 4 dias de cultura, a cafeína (0,1; 1,0 e 5,0 µg/ml) foi adicionada às células mesencefálicas de rato, 3 h antes da 6-OHDA (10 µg/ml). A concentração de nitrito, utilizada como indicador da formação de radicais livres, foi medida utilizando o reagente de Griess na cultura de células 24 h após a incubação com 6-OHDA sozinho ou na presença da cafeína. Os experimentos foram realizados em triplicatas em três dias diferentes. a vs Controle, b vs 6-OHDA; com $p<0,05$ (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*).

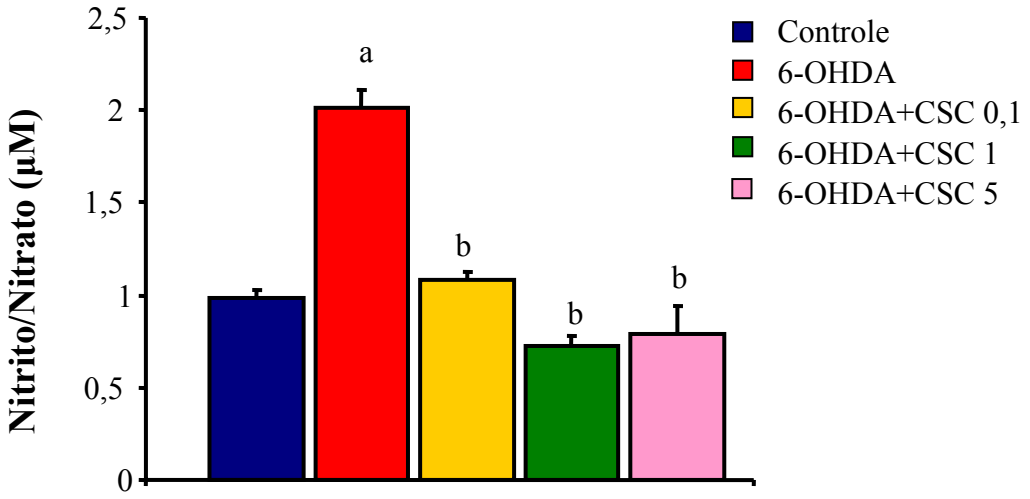



**Figura 20 - Efeito do CSC *(8-(3-chlorostyryl caffeine)* sobre as concentrações de nitrito em células mesencefálicas de rato após a exposição a 6-OHDA**

Nota: Após 4 dias de cultura, o CSC (0,1; 1,0 e 5,0 µg/ml) foi adicionado às células mesencefálicas de rato, 3 h antes da 6-OHDA (10 µg/ml). A concentração de nitrito, utilizada como indicador da formação de radicais livres, foi medida utilizando o reagente de Griess na cultura de células 24 h após a incubação com 6-OHDA sozinho ou na presença do CSC. Os experimentos foram realizados em triplicatas em três dias diferentes. a vs Controle, b vs 6-OHDA; com $p<0,05$ (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*).

**8 Determinação da concentração de nitrito em corpo estriado de ratos com lesão por 6-OHDA tratados com CSC (*ex vivo*)**

Os conteúdos de nitrito, que são usados como marcadores da formação de radicais livres, foram significativamente aumentados (cerca de 2,7 vezes) no estriado ipsilateral dos animais controles (lesionados com 6-OHDA e tratados com salina 0,9 %), quando comparados ao grupo falso operado (Controle (n-8): 6,9±0,35; FO (n-8): 2,55±0,28 μM).

O tratamento com CSC nas doses de 1 e 5 mg/kg, promoveu uma reversão quase total desses efeitos, onde a concentração de nitrito retornou a valores próximos àqueles observados no grupo falso operado (sem nenhuma diferença significativa entre os grupos tratados com CSC e o grupo falso operado) (FO (n-8): 2,55±0,28; CSC1: 3,15±0,3 e CSC5: 2,1±0,26 μM) (**Figura 21**).

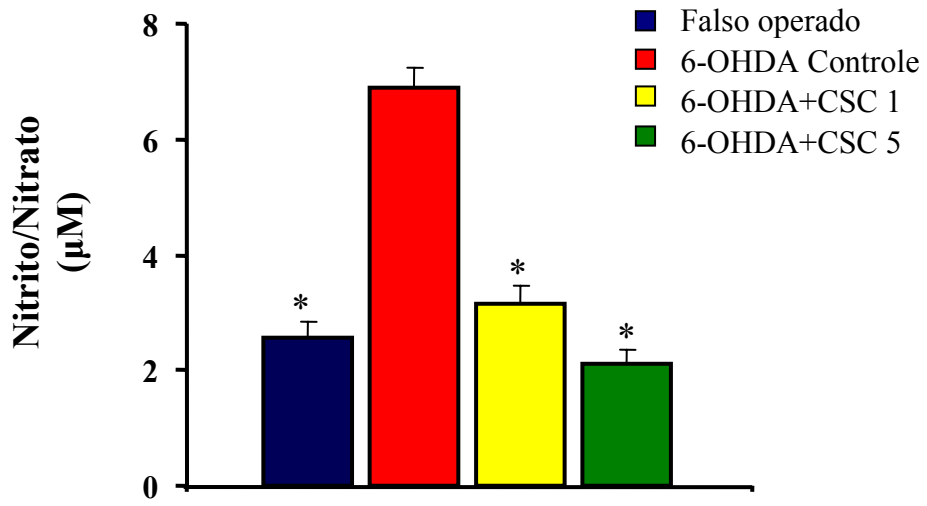



**Figura 21 - Efeito do CSC *(8-(3-chlorostyryl caffeine)* na formação de nitrito em estriado ipsilateral de ratos lesionados com 6-OHDA** (12 µg/µl)
Nota: Os animais receberam CSC (1 e 5 mg/kg, i.p., iniciando seis dias após a lesão com 6-OHDA e continuando diariamente durante 7 dias (Protocolo 2)) Os controles foram tratados com salina 0,9%. Os resultados são expressos como média ± EPM do número de experimentos (8). * vs Controle (6-OHDA), com $p<0,05$ (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*).

**9 Determinação dos efeitos da cafeína ou do CSC na peroxidação lipídica em cultura de células mesencefálicas de ratos expostas a 6-OHDA.**

A peroxidação lipídica em cultura de células mesencefálicas foi avaliada através da determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) com a finalidade de determinar a neurotoxiciade induzida pela 6-OHDA com relação ao estresse oxidativo e a geração de radicais livres e as alterações causadas após exposição das células a associação cafeína + 6-OHDA ou CSC + 6-OHDA.

Os resultados do teste do TBARS mostraram que a exposição das células dopaminérgicas a 6-OHDA (10 μg/ml) causou um aumento de 2,1 vezes na peroxidação lipídica, quando comparado aos controles (TBARS a 532 nm, Controles: 1,12 ± 0,05; 6-OHDA: 2,38 ± 0,11). Enquanto nas células expostas a cafeína sozinha utilizada na dose de 5 μg/ml a peroxidação lipídica foi tão reduzida quanto nos controles, nas células expostas a 6-OHDA e tratadas com cafeína houve bloqueio da citotoxicidade induzida pela 6-OHDA, e os valores da redução da peroxidação lipídica foram próximos aos do controle (na ausência de 6-OHDA) (TBARS a 532 nm, CAF 5: 0,64 ± 0,10; CAF 5 + 6-OHDA: 0,91 ± 0,15) (**Figura 22**).

Nas células expostas ao CSC sozinho utilizado na dose de 5 μg/ml a peroxidação lipídica foi reduzida quanto comparada ao controle, nas células expostas a 6-OHDA e tratadas com CSC houve bloqueio da citotoxicidade induzida pela 6-OHDA, e os valores da redução da peroxidação lipídica foram próximos aos dos controles (na ausência de 6-OHDA) (TBARS a 532 nm, CSC 5: 0,58 ± 0,11; CSC 5 + 6-OHDA: 1,9 ± 0,12) (**Figura 23**).

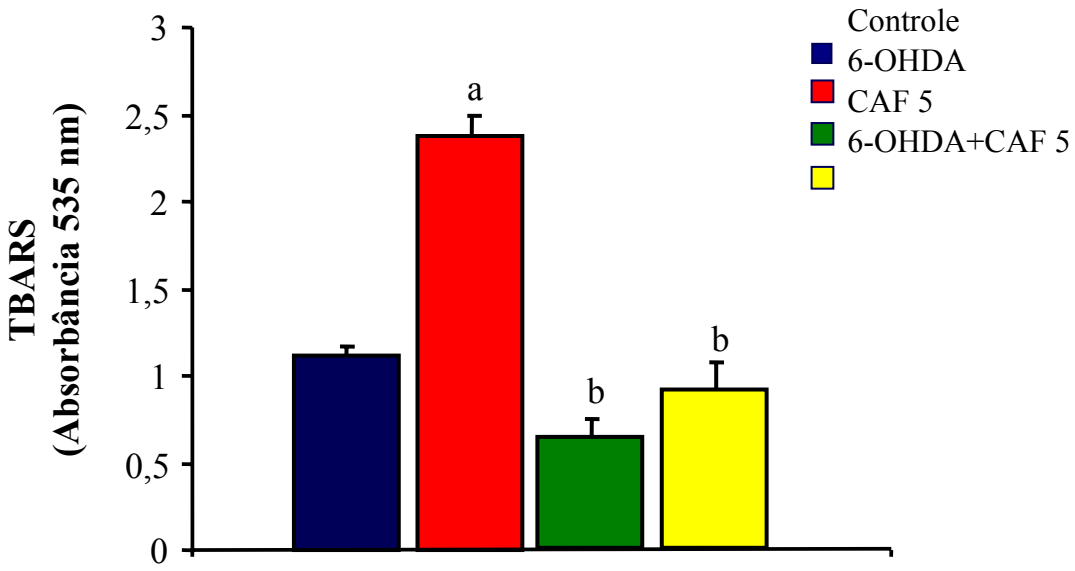



**Figura 22 - Efeito da cafeína sobre a peroxidação lipídica nas células após exposição a 6-OHDA**

Nota: As concentrações de TBARS foram determinadas na cultura de células 24 h após a incubação com 6-OHDA (10 µg/ml) sozinho ou na presença da cafeína (5 µg/ml). Os experimentos foram realizados em triplicatas em três dias diferentes. a vs Controle, b vs 6-OHDA; com $p<0,05$ (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*).

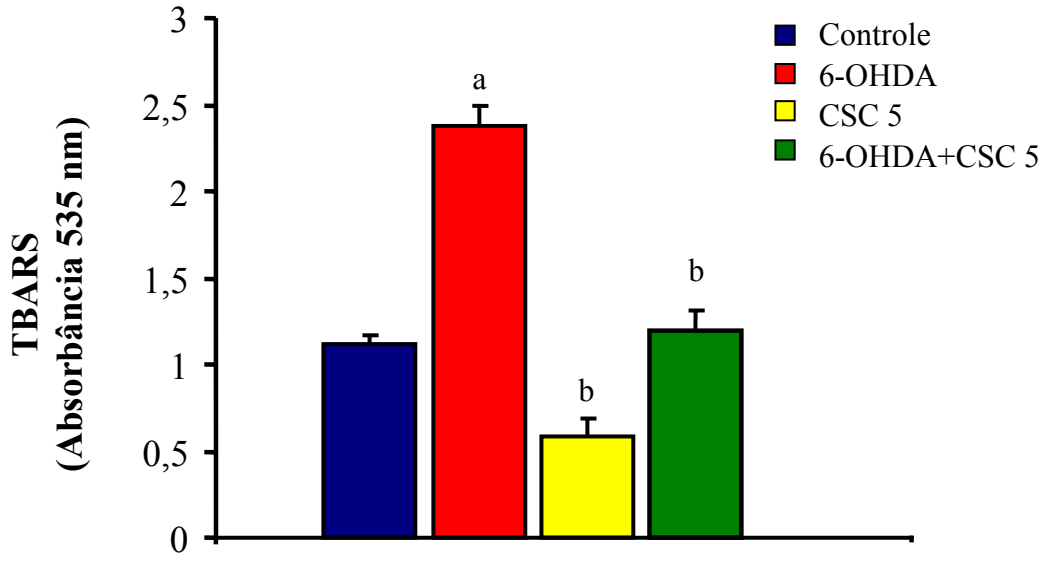



**Figura 23 - Efeito do CSC *(8-(3-chlorostyryl caffeine)* sobre a peroxidação lipídica nas células após exposição a 6-OHDA**

Nota: As concentrações de TBARS foram determinadas na cultura de células 24 h após a incubação com 6-OHDA (10 µg/ml) sozinho ou na presença do CSC (5 µg/ml). Os experimentos foram realizados em triplicatas em três dias diferentes. a vs Controle, b vs 6-OHDA; com $p<0,05$ (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*).

**10 Determinação da peroxidação lipídica em corpo estriado de ratos com lesão por 6-OHDA, tratados com CSC (*ex vivo*).**

Os resultados apresentados na **Figura 24** mostram um aumento de 2,8 vezes do conteúdo de TBARS no estriado ipsilateral dos ratos lesionados com 6-OHDA (12 μg/μl) e tratados com salina 0,9 % (Controles), determinado a partir do aumento dos valores das absorbâncias quando comparadas aquelas obtidas do estriado ipsilateral do grupo Falso operado [Falso operado (n-8): 0,7838±0,069; Controle (n-8): 2,136±0,121 nM].

Esses efeitos foram parcialmente, mas significativamente recuperados nos grupos lesionados com 6-OHDA e tratados com CSC nas doses de 1 e 5 mg/kg, quando comparados ao grupo falso operado. [Falso operado (n-8): 0,7838±0,069; CSC1: 1,141±0,072 e CSC5: 1,303±0,13 nM] (**Figura 24**).

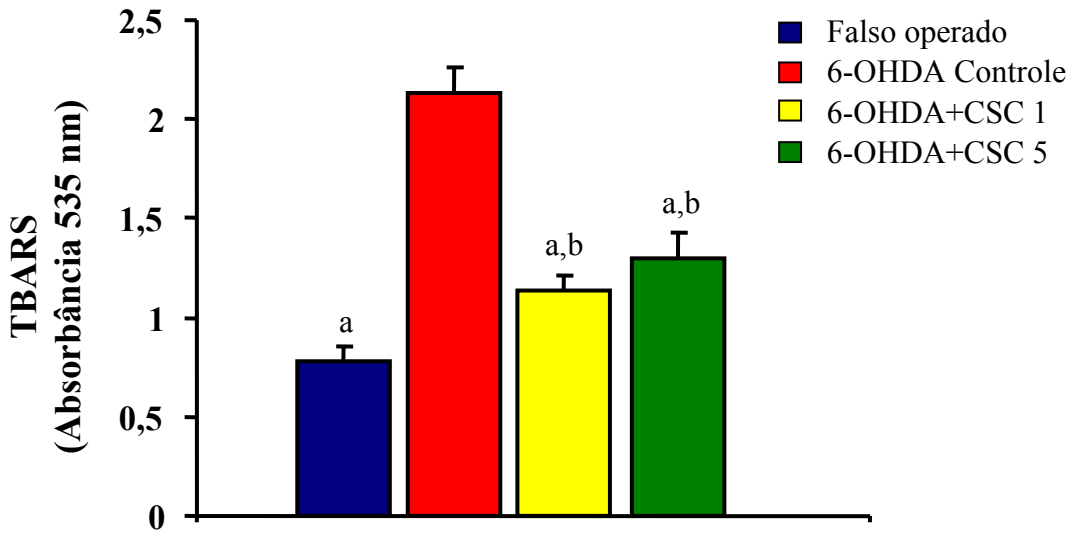



**Figura 24 - Efeito do CSC *(8-(3-chlorostyryl caffeine)* sobre a peroxidação lipídica em estriado de ratos lesionados com 6-OHDA** (12 µg/µl)
Nota: Os animais receberam CSC (1 e 5 mg/kg, i.p., iniciando seis dias após a lesão com 6-OHDA e continuando diariamente durante 7 dias (Protocolo 2)) Os controles foram tratados com salina 0,9%. Os resultados são expressos como média ± EPM do número de experimentos (8). a vs Controle (6-OHDA); b vs Falso operado, com $p<0,05$ (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*).

**11 Determinação dos efeitos da cafeína ou do CSC na morte celular por apoptose em cultura de células mesencefálicas de ratos expostas a 6-OHDA**

A exposição a 6-OHDA (10 μg/ml) reduziu em 30 % o número de células normais, enquanto o número de células apoptóticas aumentou em 61 %, quando comparadas aos controles. A cafeína (10 μg/ml) sozinha não alterou o número de células normais, apoptóticas ou necróticas, e reverteu parcialmente a citotoxicidade induzida por 6-OHDA.

Os resultados mostram que na associação da cafeína com 6-OHDA, a cafeína recuperou significativamente o número de células viáveis e apoptóticas, quando comparado as células expostas a 6-OHDA sozinha (Controle – células normais: 90,3%, apoptóticas: 6%, necróticas: 3,7%; 6-OHDA – células normais: 29,4%, apoptóticas: 60,9%, necróticas: 9.7%; CAF 10 + 6-OHDA – células normais: 69,1%, apoptóticas: 18,7%, necróticas: 12,2%) (**Figura 25**).

Na associação do CSC com 6-OHDA, o CSC (5 μg/ml) recuperou significativamente o número de células viáveis e reduziu o número de células apoptóticas, quando comparado as células expostas a 6-OHDA sozinha (Controle – células normais: 90,3%, apoptóticas: 6%, necróticas: 3,7%; 6-OHDA – células normais: 29,4%, apoptóticas: 60,9%, necróticas: 9.7%; CSC5 + 6-OHDA – células normais: 79,5%, apoptóticas: 16,1%, necróticas: 4,4%) (**Figura 26**).

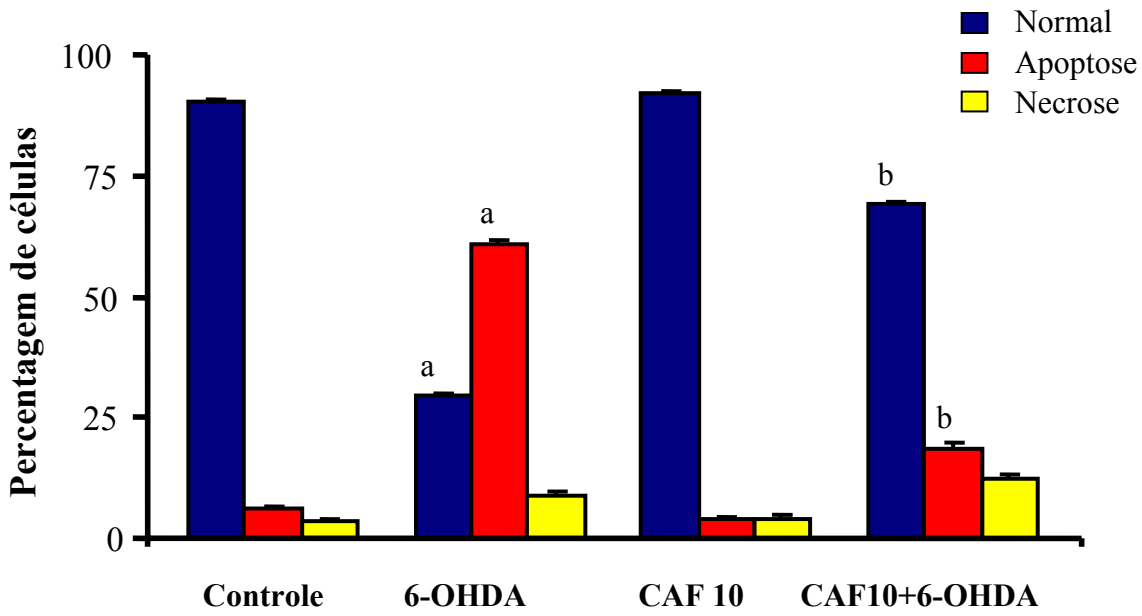



**Figura 25 - Efeito da cafeína na morte celular por apoptose em cultura de células mesencefálicas expostas a 6-OHDA**

Nota: A apoptose ou a necrose foram determinadas através da coloração pela laranja de acridina / brometo de etídio em cultura de células 24 h após a incubação com 6-OHDA (10 µg/ml) sozinha ou na presença da cafeína (10 µg/ml). Os experimentos foram realizados em triplicatas em três dias diferentes. a vs Controle, b vs 6-OHDA; com $p<0,05$ (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*).

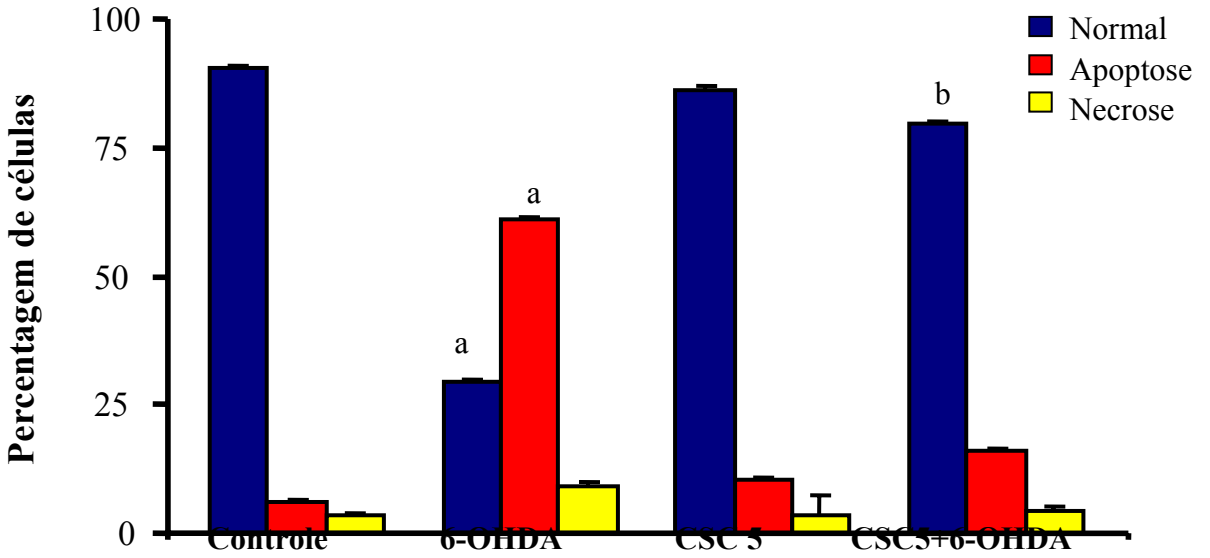



**Figura 26 - Efeito do CSC *(8-(3-chlorostyryl caffeine)* na morte celular por apoptose em cultura de células mesencefálicas expostas a 6-OHDA**

Nota: A apoptose ou a necrose foram determinadas em cultura de células 24 h após a incubação com 6-OHDA (10 µg/ml) sozinha ou na presença do CSC (5 µg/ml). Os experimentos foram realizados em triplicatas em três dias diferentes. a vs Controle, b vs 6-OHDA; com $p<0,05$ (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*).

**12 Determinação dos efeitos da cafeína ou do CSC sobre a percentagem de células OX-42 e GFAP positivas em cultura de células mesencefálicas de ratos expostas a 6-OHDA**

Nos controles, menos de 40 % das células em cultura foram coradas pelo OX-42, indicando a presença de microglias ativadas. Foi observado um pequeno aumento na percentagem de microglias ativadas após a exposição das células a 6-OHDA (10 μg/ml). No entanto, um número significativamente menor de microglias ativadas foi observado após a exposição à cafeína + 6-OHDA (**Figura 27**). Nenhuma alteração significativa foi observada nas células expostas ao CSC + 6-OHDA (**Figura 29**).

Um pequeno número de células coradas com GFAP foi observado nos controles, e esse número foi significativamente aumentado após a exposição das células a 6-OHDA (10 μg/ml), onde uma parte da população celular foi imunoreativa aos astrócitos. A cafeína (10 μg/ml) reduziu a percentagem de astrócitos reativos aumentados pela 6-OHDA, e os valores obtidos foram similares aqueles dos controles (**Figura 28**). O CSC (5 μg/ml) não alterou a percentagem de astrócitos reativos aumentados pela 6-OHDA, na cultura de células (**Figura 30**).

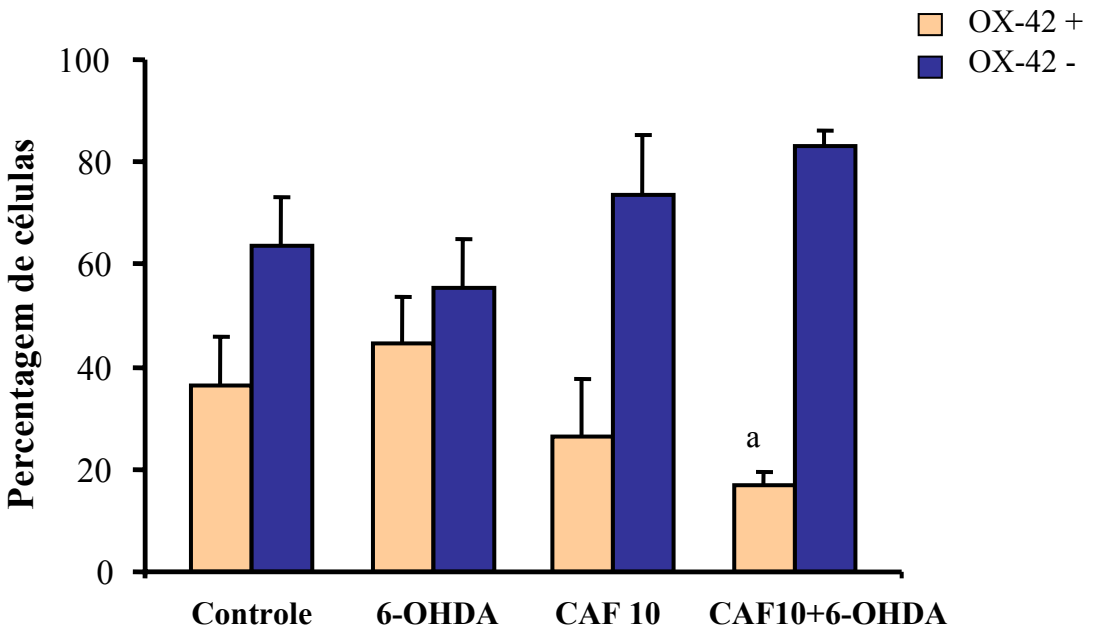



**Figura 27 - Efeito da cafeína sobre a percentagem de células OX-42 positivas em cultura de células mesencefálicas de ratos expostas a 6-OHDA**

Nota: As células imunoreativas foram determinadas na cultura de células 24 h após a incubação com 6-OHDA (10 µg/ml) sozinho ou na presença da cafeína (10 µg/ml). Os experimentos foram realizados em triplicatas em três dias diferentes. a vs Controle, com $p<0,05$ (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*).

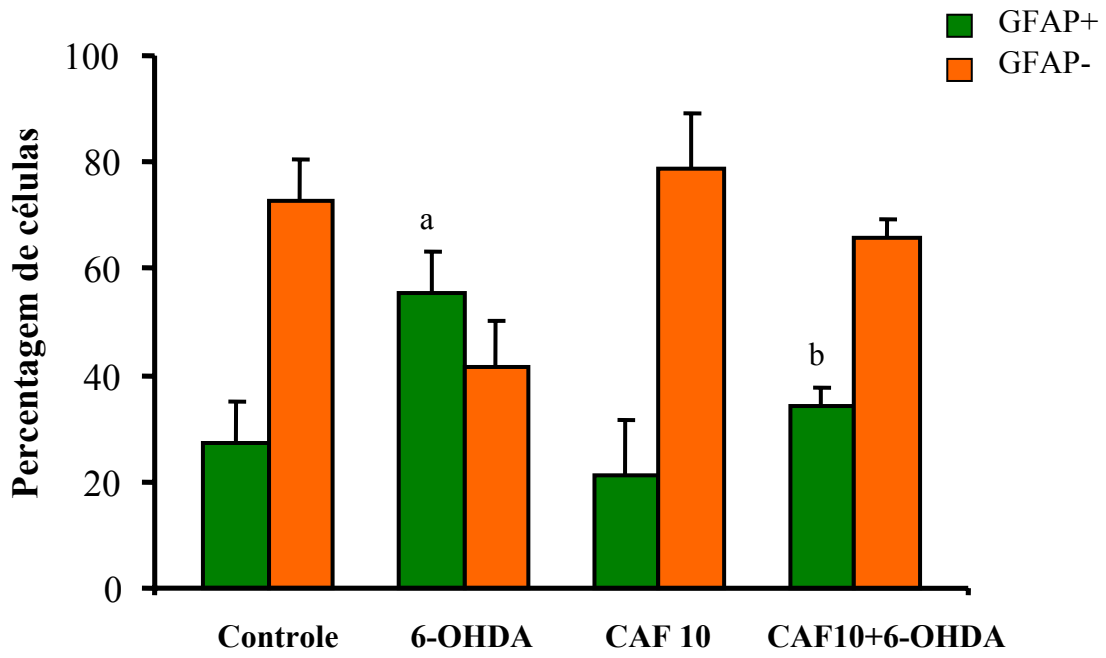



**Figura 28 - Efeitos da cafeína sobre a percentagem de células GFAP positivas em cultura de células mesencefálicas de ratos expostas a 6-OHDA**

Nota: As células imunoreativas foram determinadas na cultura de células 24 h após a incubação com 6-OHDA (10 µg/ml) sozinha ou na presença da cafeína (10 µg/ml). Os experimentos foram realizados em triplicatas em três dias diferentes. a vs Controle, b vs 6-OHDA; com $p<0,05$ (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*).

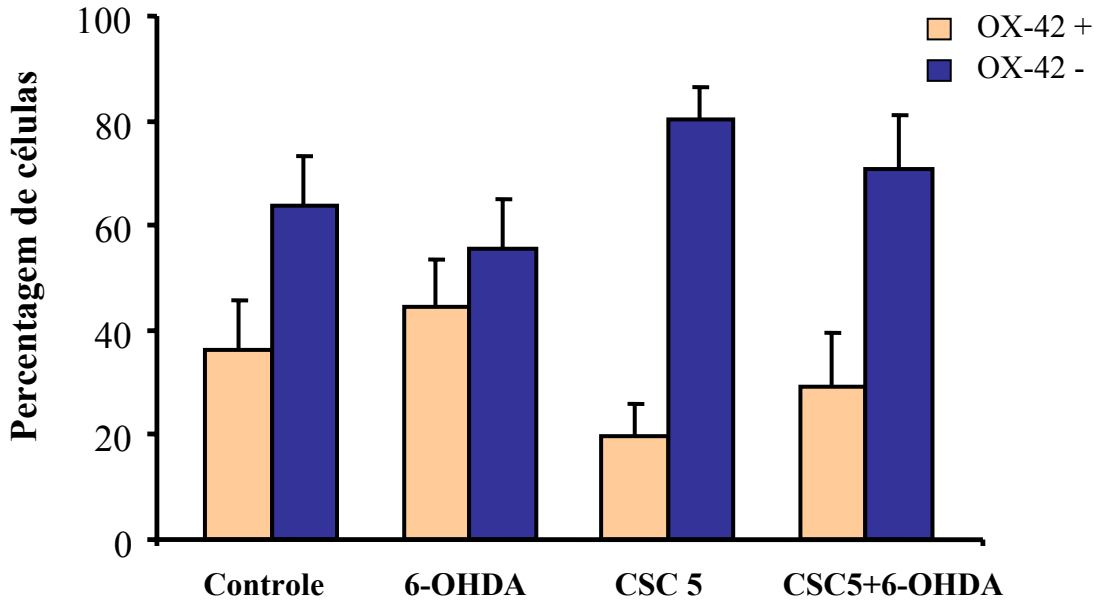



**Figura 29 - Efeitos do CSC *(8-(3-chlorostyryl caffeine)* sobre a percentagem de células OX-42 positivas em cultura de células mesencefálicas de ratos expostas a 6-OHDA**
Nota: As células imunoreativas foram determinadas na cultura de células 24 h após a incubação com 6-OHDA (10 μg/ml) sozinho ou na presença do CSC (5 μg/ml). Os experimentos foram realizados em triplicatas em três dias diferentes. (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*).

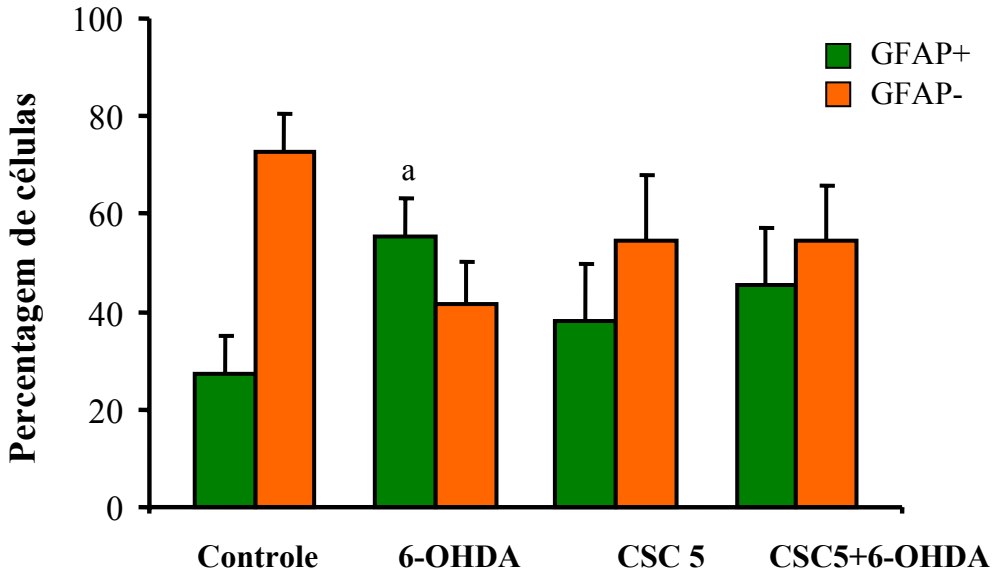



**Figura 30 - Efeitos do CSC *(8-(3-chlorostyryl caffeine)* sobre a percentagem de células GFAP positivas em cultura de células mesencefálicas de ratos expostas a 6-OHDA**
Nota: As células imunoreativas foram determinadas na cultura de células 24 h após a incubação com 6-OHDA (10 µg/ml) sozinha ou na presença do CSC (5 µg/ml). Os experimentos foram realizados em triplicatas em três dias diferentes. a vs Controle, com $p<0,05$ (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*).

## VI DISCUSSÃO

Os receptores da adenosina $A_{2A}$ tem atraído uma considerável atenção devido a sua interação com o sistema dopaminérgico, e também por ser um alvo em potencial para a farmacoterapia da doença de Parkinson (FERRE *et al.,* 2001; WARDAS, 2002). Estudos *post-mortem* (CALLON *et al.,* 2004) mostraram um aumento dos receptores $A_{2A}$ no cérebro de pacientes com doença de Parkinson que apresentavam discinesia, enquanto estudos utilizando modelos experimentais da doença de Parkinson (GRONDIN *et al*., 1999; KANDA *et al.,* 2000) sugerem que antagonistas de receptores $A_{2A}$ possuem atividade antiparkinsoniana e podem potencializar a atividade da levodopa. Além disso, vários estudos observaram efeitos benéficos dos antagonistas de receptores $A_{2A}$ nas complicações motoras induzidas por levodopa em ratos com lesão dopaminérgica unilateral induzida por 6-OHDA (MORELLI; PINNA, 2001; PINNA *et al*., 2001; BOVÈ *et al*., 2002; BIBBIANI *et al.,* 2003; LUNDBLAD *et al.,* 2003).

Os antagonistas da adenosina $A_{2A}$, incluindo a cafeína, antagonista não específico, são considerados uma estratégia não dopaminérgica para o tratamento da doença de Parkinson. Atualmente, a *istradefylline*, o primeiro dentre muitos outros antagonistas $A_{2A}$ em desenvolvimento, está sendo testado em ensaios clínicos. Os resultados indicam que essa droga pode reduzir as flutuações motoras induzidas pela L-DOPA, que continua sendo até hoje a principal droga para o tratamento da DP (YU *et al.,* 2006).

Estudos epidemiológicos têm mostrado uma associação entre o consumo de cafeína e outras bebidas cafeinadas e a redução do risco de desenvolvimento da DP. A popularidade da cafeína como uma droga psicoativa ocorre devido as suas propriedades estimulantes, as quais dependem da sua capacidade de reduzir a transmissão da adenosina no cérebro (XU *et al*., 2005).

Já foi descrito que as alterações bioquímicas mais importantes no estriado lesionado com 6-OHDA são as reduções da concentração de dopamina (DA) e dos seus metabólitos. A 6-hidroxidopamina (6-OHDA) é uma neurotoxina utilizada experimentalmente para induzir a doença de Parkinson em animais. Seu mecanismo de ação parece envolver uma degeneração do sistema nigroestriatal e a conseqüente redução dos conteúdos de dopamina no

corpo estriado e na substância negra. No modelo experimental da doença de Parkinson em ratos, as fibras nigroestriatais são destruídas unilateralmente através da injeção de 6-OHDA, e os animais respondem a agonistas dopaminérgicos, incluindo a apomorfina, apresentando rotações contralaterais (no sentido contrário ao da lesão). Por outro lado, a degeneração dos neurônios dopaminérgicos na substância negra e a conseqüente perda dos seus terminais nervosos no estriado são responsáveis pela maioria dos distúrbios motores vistos na doença de Parkinson (BLANDINI *et al.,* 2008).

O presente trabalho mostrou que a injeção unilateral com 6-OHDA no estriado produziu rotações induzidas por apomorfina, corroborando com os dados de literatura descritos no parágrafo anterior. Esse efeito provavelmente envolve supersensibilidade dos receptores dopaminérgicos causada pela perda dos terminais dopaminérgicos, resultando em uma significativa redução da concentração de dopamina no estriado lesionado com 6-OHDA (JOGHATAIE *et al.,* 2004).

Os resultados mostrados neste trabalho e já publicados (AGUIAR *et al*., 2006) demonstraram que a cafeína promoveu uma recuperação parcial no déficit motor representado pela redução do comportamento rotacional induzido pela apomorfina apresentado pelos animais com lesão estriatal por 6-OHDA. Essa redução pode ser atribuída aos efeitos benéficos da cafeína, atenuando a degeneração estriatal e pode ocorrer devido à capacidade da cafeína de bloquear os receptores $A_{2A}$ que estão concentrados nas áreas dopaminérgicas do cérebro (JOGHATAIE *et al.,* 2004).

Os receptores da adenosina $A_1$ e $A_{2A}$, estão expressos nos gânglios da base, um grupo de estruturas envolvidas em vários aspectos do controle motor, e a cafeína atua como um antagonista em ambos os tipos de receptores (FISIONE *et al.,* 2004).

Os efeitos psicoestimulantes e outros efeitos da cafeína no sistema nervoso central parecem ocorrer, pelo menos em parte, devido ao antagonismo dos receptores $A_{2A}$ da adenosina (FREDHOLM *et al*., 1999). A cafeína, assim como outros antagonistas mais específicos de receptores $A_{2A,}$ tem monstrado capacidade de atenuar a neurotoxicidade em modelos animais da doença de Parkinson.

Vários estudos mostram que, além de possuir um potencial neuroprotetor em modelos da doença de Parkinson que utilizam o MPTP e 6-OHDA como agentes neurotóxicos, a cafeína e outros antagonistas $A_{2A}$, podem também reverter os déficits motores nesses modelos (CHEN *et al*., 2002; IKEDA *et al.,* 2002). Então os antagonistas $A_{2A}$ podem possuir efeitos neuroprotetores e também promover alívio dos sintomas de DP. Esses efeitos benéficos do bloqueio dos receptores $A_{2A}$, associado com a sua marcante expressão restrita ao gânglio basal, tem tornado os antagonistas $A_{2A}$ importantes alvos para o desenvolvimento de drogas no tratamento da DP (SCHWARZSCHILD *et al*., 2002). A cafeína foi incluída na lista das 12 drogas mais promissoras como agentes neuroprotetores para ensaios clínicos na DP (RAVINA *et al.,* 2003).

Nossos resultados, publicados em Aguiar *et al*. (2008), mostraram ainda que o CSC, uma droga com dupla ação-antagonista de receptores $A_{2A}$ e inibidor da MAO B causou de maneira dose-dependente uma diminuição no comportamento rotacional de ratos com lesão intraestriatal unilateral por 6-OHDA, quando comparado ao grupo controle (lesionado com 6-OHDA e tratado com salina 0,9 %). Já é conhecido que os inibidores da MAO B possuem propriedades antiparkinsonianas, então drogas que possuem a capacidade de bloquear a MAO B e os receptores $A_{2A}$ podem apresentar um maior potencial terapêutico para o tratamento da doença de Parkinson (VLOK *et al*., 2006).

Existem evidências de que a ativação de receptores $D_2$ *in vivo* antagoniza a ativação tônica dos receptores $A_{2A}$ (SALMI *et al.,* 2005). Esses autores mostraram que os efeitos do bloqueio dos receptores $D_2$ são diferentes em camundongos *knockout* para receptores $A_{2A}$. Quando comparados com camundongos *wild-type*, os camundongos *knockout* para receptores $A_{2A}$ mostraram redução da neurodegeneração, após tratamento com MPTP, bem como uma melhora da performance motora em modelos da doença de Parkinson.

Estudos pré-clínicos e, mais recentemente estudos clínicos utilizando antagonistas $A_{2A}$ indicam que os efeitos benéficos dessa classe de drogas parecem ocorrer através da modulação dos efeitos dopaminérgicos, na disfunção estriatal associada à desordem motora (BARA-JIMENEZ *et al.,* 2003). Antagonistas $A_{2A}$ podem atenuar a indução bem como a expressão das alterações motoras produzidas pela estimulação crônica do sistema dopaminérgico em modelos animais da doença de Parkinson, possivelmente através do

bloqueio dos receptores $A_{2A}$ e conseqüentemente do bloqueio dos efeitos estimulatórios nas vias de sinalização mediada por esse receptor (BIBBIANE *et al.,* 2003). Alguns estudos mostram que o CSC também causa inibição da MAO-B, e esse efeito, como já dissemos, pode contribuir para o potencial neuroprotetor dos antagonistas $A_{2A}$ (PETZER *et al.,* 2003; CHEN *et al.,* 2004).

O presente estudo mostrou que a injeção unilateral com 6-OHDA no estriado causou uma diminuição significativa nos concentração de noradrenalina (NE), dopamina (DA), DOPAC e HVA no lado ipsilateral quando comparados ao grupo falso operado. Também foi observada uma redução na concentração de serotonina (5-HT), mas a concentração do seu metabólito, 5-HIAA não sofreu nenhuma alteração significativa. Esses resultados são consistentes com outros estudos que descrevem as alterações bioquímicas no estriado lesionado com 6-OHDA (ICHITANI *et al.,* 1994).

Embora muitos trabalhos (LUTHMAN *et al*., 1994; MOLINA-HOLGADO *et al*., 1993) na literatura tenham verificado uma diminuição significativa nas concentrações de 5-HT e 5-HIAA em estriado de ratos após lesão com 6-OHDA, muitos utilizaram animais com três dias de vida e não ratos adultos, como no nosso trabalho. Breese *et al*. (1984), mostraram um aumento e nenhuma mudança nos conteúdos de 5-HT e 5-HIAA utilizando ratos neonatos e ratos adultos, respectivamente. Além disso, Zhou *et al*. (1991) mostraram um aumento significativo nas concentrações de 5-HT e 5-HIAA em estriado de ratos adultos, embora, nesse caso, a diminuição da concentração de DA no estriado tenha excedido 90%, enquanto no nosso trabalho foi de cerca de 80%.

O presente trabalho está de acordo com os resultados obtidos por Karstaedt *et al.* (1994). Estes pesquisadores mostraram que seis semanas após a lesão com 6-OHDA, as concentrações de 5-HT e 5-HIAA diminuíram significativamente em corpo estriado de ratos. Segundo estes autores, a perda da inervação dopaminérgica no estriado leva a um aumento do "turnover" da 5-HT e uma depleção completa da 5-HT no corpo estriado.

No presente estudo, a demonstração de que o tratamento com cafeína pode atenuar os déficits motores induzidos por apomorfina sugere aumento nos concentração de dopamina no estriado lesionado e conseqüente redução da supersensibilidade do receptor.

Esses resultados foram comprovados pela dosagem das concentrações de dopamina e seus metabólitos que foram parcialmente recuperados no lado ipsilateral dos grupos tratados com cafeína, principalmente no tratamento por 14 dias. O tratamento com cafeína, nas doses de 10 e 20 mg/kg, restaurou parcialmente os conteúdos das monoaminas e dos seus metabólitos em ratos lesionados com 6-OHDA.

O presente trabalho, também demonstrou que o tratamento com CSC em ratos lesionados com 6-OHDA reverteu significativamente, e de maneira dose-dependente, a redução das concentrações estriatais das monoaminas (NE, DA e 5-HT), assim como dos conteúdos dos seus metabólitos (5-HIAA, DOPAC e HVA), indicando um potencial benéfico dos antagonistas $A_{2A}$ na doença de Parkinson. Resultados melhores foram observados no presente estudo com CSC em comparação com aqueles obtidos com cafeína, isso ocorreu provavelmente devido ao fato de que o CSC, além de bloquear receptores $A_{2A}$, também é inibidor da MAO-B, uma propriedade que provavelmente contribui para perfil farmacológico da droga (VLOK *et al*., 2006).

Recentemente, Golembrowska e Dziubina (2004), investigaram os efeitos do CSC na liberação de DA no estriado de ratos tratados e não tratados com reserpina. Estes autores observaram que o CSC aumentou significativamente a liberação de DA no estriado, após associação com L-DOPA e benserazida, em ratos tratados e não tratados com reserpina. O CSC não alterou as concentrações de DOPAC e HVA nos ratos com estriado intacto, mas promoveu um aumento das concentrações desses metabólitos nos animais tratados com reserpina que apresentaram depleção dos conteúdos de dopamina. Esses resultados sugerem que esses efeitos podem ser mediados por receptores $A_{2A}$ estriatais, e estão provavelmente relacionados à ação do CSC no metabolismo da dopamina e no aumento do transporte de L-DOPA exógena para dentro do sistema nervoso central.

Estudos recentes (MATSUYA *et al*., 2007; ROSE *et al.,* 2006) mostraram os efeitos sinérgicos da combinação dos antagonistas $A_{2A}$ e da L-DOPA, que em baixas doses, reverteram os déficits motores em modelos animais da doença de Parkinson e esse efeito poderia estar relacionado à redução da dose, bem como da incidência de efeitos colaterais da L-DOPA. O presente trabalho também demonstrou que, em ratos lesionados com 6-OHDA, a

combinação de CSC e L-DOPA apresentou efeito sinérgico, revertendo quase completamente à redução das concentrações de DA e seus metabólitos após ação da neurotoxina 6-OHDA.

Nos resultados obtidos neste trabalho foi observado que a diminuição dos níveis de NE, 5-HT e seu metabólito, no estriado de ratos lesionados com 6-OHDA, foi parcialmente recuperada após tratamento com CSC, e esses efeitos foram potencializados na associação com L-DOPA. A doença de Parkinson é indiscutivelmente uma doença que resulta primeiramente da perda de neurônios nigroestriatais dopaminérgicos e essa alteração leva a um desequilíbrio em muitos outros neurotransmissores além da dopamina, incluindo a serotonina (5-HT) (NICHOLSON; BROTCHIE, 2002). De fato, a degeneração do sistema serotonérgico foi observada após lesão com 6-OHDA em ratos, corroborando com o nosso estudo, sugerindo que as alterações no sistema serotonérgico desempenham um papel na fisiopatologia da doença de Parkinson. Embora a função exata da serotonina na doença de Parkinson permaneça desconhecida, recentes pesquisas para tentar entender essa relação e a geração de efeitos colaterais com a terapia de reposição da dopamina, têm identificado os receptores 5-$HT_{1A}$, 5-$HT_{1B}$ e 5-$HT_{2C}$ como possíveis alvos terapêuticos para a doença de Parkinson (NICHOLSON; BROTCHIE, 2002; SCHOLTISSEN *et al.*, 2005).

Lesões no sistema dopaminérgico nigroestriatal em ratos adultos estão relacionadas com aumento da estimulação dopaminérgica da adenililciclase via receptor $D_1$ (MISHA *et al*., 1974, 1980). Além disso, a literatura mostra que ratos com lesão bilateral ou unilateral por 6-OHDA apresentam alterações comportamentais no tratamento com agonistas seletivos $D_1$ devido a supersensibilidade desses receptores após a lesão (ARNT, 1985; ARNT; HYTELL, 1985), indicando uma possível *up-regulation* desses receptores. No entanto, as alterações nos receptores $D_1$ nesse modelo ainda não foram esclarecidas, vários resultados são apresentados na literatura; *binding* de receptores $D_1$ de estriado de ratos previamente lesionados com 6-OHDA, aumentado (BUONAMICI *et al.,* 1986; FORNARETTO *et al*., 1993; NARANG; WAMSLEY, 1995), inalterado (LANGER *et al.*, 1986; ALTA; MARIEN, 1987; SAVASTA *et al.,* 1988; LAWLER *et al*., 1995) ou diminuído (MARSHALL *et al.,* 1989; STROMBERG *et al.,* 1995).

Essas discrepâncias nos resultados do *binding* de receptores $D_1$ podem estar relacionadas ao período de sobrevivência dos animais após a lesão (FORNARETTO *et al*.,

1993; NARANG; WAMSLEY, 1995) ou à intensidade da perda de neurônios dopaminérgicos. Estudos indicam que ocorre uma *up-reg*ulation dos receptores $D_1$ após lesão estriatal com 6-OHDA somente quando mais de 97 % dos terminais dopaminérgicos estão destruídos (BUONAMICI *et al*., 1986; IWATA *et al*., 1996). Portanto é necessária uma extensa destruição dos terminais dopaminérgicos para que ocorra *up-regulation* dos receptores $D_1$ nesse modelo.

Existem várias evidências de que a administração unilateral de 6-OHDA em ratos adultos provoca aumento significativo da densidade dos receptores $D_2$ (STAUNTON *et al.,* 1981; CAI *et al.,* 2002). Em ratos com destruição parcial dos terminais dopaminérgicos, Chritin *et al*. (1996) demonstraramn que a redução de 50 % das células dopaminérgicas da substância negra provocou pouco efeito no *binding* dopaminérgico $D_2$ ou nos concentração do RNAm. No entanto, com uma destruição dopaminérgica mais intensa, quando o conteúdo de dopamina foi reduzido em cerca de 70 %, o *binding* de receptores $D_2$ estriatal apresentou um aumento significativo (PRZEDBORSKI *et al.,* 1995). Além disso, a maioria dos estudos tem demonstrado aumento da concentração de RNAm para receptores $D_2$ após lesão unilateral por 6-OHDA (NEVE *et al.,* 1991; ANGULO *et al.,* 1991; CADET *et al*., 1992; CHRITIN *et al*., 1993).

Os resultados apresentados no presente estudo mostraram uma redução dos conteúdos de dopamina da ordem de 78 % após a lesão estriatal com 6-OHDA e os resultados do *binding* dopaminérgico mostraram uma redução do Bmax dos receptores $D_1$ e um aumento da desidade dos receptores $D_2$ corroborando, portanto, com alguns resultados apresentados na literatura.

O principal mecanismo de ação da cafeína no cérebro consiste no bloqueio não seletivo dos receptores da adenosina. A cafeína bloqueia os receptores da adenosina $A_1$ e $A_{2A}$, causando uma redução na neurotransmissão adenosinérgica e amplificando relativamente a neurotransmissão dopaminérgica. Esses efeitos aumentam tanto a inibição mediada por receptores $D_1$ (da via direta) quanto à redução da estimulação por receptores $D_2$ (da via indireta) no globo pálido e substancia negra (XIE *et al*., 2007).

Estudos sugerem que a maioria dos efeitos psicoestimulatórios da cafeína ocorram principalmente devido ao bloqueio dos receptores $A_{2A}$ e sejam mimetizados somente pelos antagonistas dos receptores $A_{2A}$ e não pelos antagonistas do subtipo $A_1$, embora a cafeína, como já foi dito, seja um antagonista não seletivo de receptores adenosinérgicos (HUANG *et al*., 2005). Estima-se que os efeitos dos antagonistas adenosinérgicos estejam intimamente relacionados com a ativação de receptores dopaminérgicos, indicando inclusive que a integridade do sistema dopaminérgico seja imprescindível para que a cafeína exerça seus efeitos estimulatórios (FERRÉ *et al.,* 1992). De fato, existe uma co-localização entre os receptores adenosinérgicos e dopaminérgicos no SNC, sendo possível a formação de heterodímeros entre os receptores $A_1/D_1$ e $A_{2A}/D_2$, levando a alterações alostéricas que afetam a afinidade e o acoplamento à proteína G, modulando a eficácia de ativação de ambos os receptores (FUXE *et al*., 1998).

A interação entre receptores heterodiméricos mais conhecida envolvendo receptores $A_{2A}$ é aquela que ocorre com os receptores $D_2$, e a formação dos heterodímeros $A_{2A}/D_2$. A literatura tem mostrado que esses heterodímeros podem ser um alvo importante para o tratamento da doença de Parkinson. A ligação de um antagonista $A_{2A}$ que ativa o dímero $A_{2A}/D_2$ resulta em uma cascata de reações que irão estimular os receptores dopaminérgicos, modulando as atividades dependentes de dopamina (FUXE *et al.,* 1998; FERRE et al., 2007). Uma descoberta chave neste processo é a colocalização dos receptores $D_1/A_1$ e $D_2/A_{2A}$ no estriado, inicialmente observado em ratos (FERRE *et al*., 1991a, 1991b), mas posteriormente também descrito em humanos (DIAZ-CABIALE *et al*., 2001).

Bioquimicamente, os receptores $A_{2A}$ parecem interagir de maneira antagônica com os receptores $D_2$ em nível pós-sináptico. Por exemplo, foi demonstrado que o tratamento com agonista $A_{2A}$ reduz a afinidade dos receptores $D_2$ pela dopamina em estriado de ratos, sem promover alterações no Bmax (FERRE *et al.,* 1991c). Além disso, a destruição dopaminérgica estriatal ou o tratamento com o antagonista $D_2$ haloperidol estão associados com o aumento da interação antagônica entre os receptores $A_{2A}$ e $D_2$ intramembrana em estriado de rato (FERRE; FUXE, 1992; FERRE *et al*., 1994b). Além disso, foi demonstrada uma *up-regulation* de ambos os receptores $A_{2A}$ e $D_2$ em estriado de rato após destruição dopaminérgica e tratamento crônico com haloperidol (FERRE *et al.,* 1997). Da mesma forma, foi observado em preparações de membrana de estriado de rato que os receptores $A_1$ alteram o

binding de receptores $D_1$ (FERRE *et al*., 1994a) e Ferre *et al.* (1999) mostraram que o uso de agonista $A_1$ reduziu a afinidade de receptores $D_1$.

Nossos resultados mostraram que o tratamento com cafeína não promoveu nenhuma alteração na densidade dos receptores D1 e D2-símile após lesão estriatal com 6-OHDA, no entanto, promoveu uma redução significativa do Kd de ambos, mostrando que a cafeína melhorou a afinidade desses dois receptores. O tratamento com CSC, que é um antagonista seletivo de receptores $A_{2A}$, não promoveu nenhuma alteração na densidade ou no Kd dos receptores $D_1$-símile após lesão estriatal com 6-OHDA, no entanto, promoveu uma redução significativa do Kd dos receptores $D_2$-símile, mostrando que o CSC melhorou a afinidade desse receptor.

Vários estudos já demonstraram a ocorrência de alterações em outros neurotransmissores decorrentes da degeneração dos neurônios dopaminérgicos estriatais na doença de Parkinson. Entre elas a redução da concentração de serotonina no corpo estriado e na substância negra (BERNHEIMER *et al.,* 1961), a redução do conteúdo de noradrenalina na substância negra, núcleo accumbens, hipotalâmico e regiões límbicas (SHANNAK, 1994), mudanças na atividade da enzima ácido glutâmico descarboxilase, responsável pela síntese do GABA, na substância negra e no corpo estriado (KISH *et al*., 1986, 1987; HORNYKIEWICZ, 1998) e redução na densidade de receptores GABA na substância negra e no hipocampo (HATZIPETROS; YAMAMOTO, 2006).

Uma das mudanças celulares características na doença de Parkinson é a hiperativação da transmissão glutamatérgica corticoestriatal e, indiretamente, no núcleo subtalâmico. Muitos estudos em diferentes modelos experimentais da doença de Parkinson mostraram que a normalização da transmissão glutamatérgica pode ser útil na melhoria dos sintomas motores (BRADLEY *et al.,* 2000; GREENAMYRE, 2001; PLATT, 2007). No modelo experimental da doença de Parkinson obtido com lesão unilateral na substancia negra com a neurotoxina 6-OHDA, ocorre um aumento significativo da atividade glutamatérgica corticoestriatal e também alterações dos receptores glutamatérgicos dessa região (BLANDINI *et al.,* 1996; GREENAMYRE, 2001; GUBELLINI *et al*., 2002).

Os trabalhos da literatura vêm constantemente observando que a ativação de receptores $A_{2A}$ pré-sinápticos induz a estimulação da liberação de glutamato no córtex e gânglio basal (POPOLI *et al.,* 1995; FERRE *et al.,* 2008). Esse fenômeno provavelmente envolve receptores $A_{2A}$ localizados em terminais nervosos glutamatérgicos porque isso pode ser observado em sinaptosomas corticais (MARCHI *et al.,* 2002), onde um efeito indireto dos receptores $A_{2A}$ estriatais é menos plausível. Além disso, análises ultraestruturais recentes da distribuição dos receptores $A_{2A}$ têm mostrado evidências da sua localização pré-sináptica nos terminais nervosos glutamatérgicos do estriado (ROSIN *et al*., 2003). Considerando que os agonistas de receptores $A_{2A}$ geralmente aumentam a liberação, estudos têm demonstrado que antagonistas de receptores $A_{2A}$ atenuam a liberação do glutamato ou seu extravasamento desencadeado pela despolarização, isquemia e agonista glutamatérgico no estriado, hipocampo e córtex (CORSI *et al.,* 2000; MARCOLI *et al*., 2003).

Popoli *et al.* (1995) verificaram que a inibição pré-sináptica da liberação do glutamato através do bloqueio de receptores $A_{2A}$, utilizando um antagonista específico SCH 58261 em baixas doses, reduz significativamente o desequilíbrio motor, as mudanças eletroencefálicas e a gliose estriatal induzida pela injeção da exitotoxina, ácido quinolínico, em corpo estriado de rato. Portanto, a redução da liberação de um aminoácido excitatório provocada por antagonistas de receptores $A_{2A}$ pode aliviar o componente excitotóxico comum à maioria dos modelos de neurotoxicidade e neurodegeneração (KALDA *et al*., 2006).

No presente trabalho, os resultados das dosagens de GABA e glutamato mostraram um aumento das concentrações desses aminoácidos após lesão com 6-OHDA, corroborando com os dados da literatura que apontam a existência de um desequilíbrio em outros neurotransmissores após desnervação dopaminérgica. Não foi verificada nenhuma alteração nos concentração desses aminoácidos nos grupos tratados com cafeína, exceto com relação aos conteúdos de glutamato, cujo aumento foi atenuado após o tratamento com cafeína apenas na dose maior (20 mg/kg). Provavelmente esse efeito ocorreu principalmente devido a capacidade desta droga de bloquear os receptores da adenosina $A_{2A}$ e com isso restabelecer em parte o equilíbrio entre os neurotransmissores das vias direta e indireta.

Assim como foi observado que o tratamento com CSC produziu bloqueio dos efeitos da 6-OHDA nos níveis das monoaminas, o presente trabalho também observou o

bloqueio da liberação de GABA e glutamato no lado ipsilateral do estriado de ratos lesionados com 6-OHDA após o tratamento com CSC. Enquanto a L-DOPA sozinha não reverteu o efeito da 6-OHDA nos níveis de GABA e glutamato, foi demonstrada uma potencialização dos efeitos do CSC na associação com L-DOPA, quando comparado aos efeitos de cada droga sozinha.

Este trabalho está de acordo com estudos anteriores (PERRY *et al.,* 1983) que mostraram uma elevação significativa nos níveis de GABA no putâmem de pacientes com doença de Parkinson. Esses autores também dosaram o conteúdo de GABA em ambos os lados do estriado de ratos lesionados unilateralmente com 6-OHDA, e observaram que o conteúdo de GABA estava significativamente elevado no estriado ipsilateral. Além disso, a estimulação dos receptores $A_{2A}$ eleva os níveis extracelulares estriatais de glutamato (QUARTA *et al.,* 2004), e os efeitos protetores dos antagonistas $A_{2A}$ podem ser atribuídos a sua capacidade de reduzir a liberação de aminoácidos excitatórios.

A 6-OHDA provocou uma redução na ligação dos ligantes radioativos aos receptores GABAérgicos e glutamatérgicos, indicando uma possível *down-regulation* que pode ter relação com o aumento das concentrações de GABA e glutamato observadas nos grupos lesionados com 6-OHDA. Não foram observadas alterações significativas nos receptores GABAérgicos e glutamatérgicos no grupo tratado com cafeína na dose de 10 mg/kg, assim como não foram observadas alterações dos conteúdos desses aminoácidos com a cafeína nessa dose, como foi mencionado anteriormente. Da mesma forma, não foram observadas alterações significativas nos receptores glutamatérgicos no grupo tratado com CSC na dose de 1 mg/kg, no entanto, foi observado um aumento significativo da densidade dos receptores GABAérgicos. Como já foi dito, também foi observada uma redução da elevação das concentrações de GABA e glutamato induzidas por 6-OHDA no grupo tratado com CSC. Provavelmente esse efeito observado no tratamento com CSC ocorreu devido a sua capacidade de bloquear seletivamente os receptores $A_{2A}$ e com isso restabelecer, em parte, o equilíbrio dos neurotransmissores das vias direta e indireta.

Vários estudos têm demonstrado efeitos benéficos da cafeína em modelos da doença de Parkinson utilizando vários protocolos de tratamento. Alguns destes apresentam tratamento com duração de uma semana e outros com períodos maiores, inclusive para testar

se a tolerância com relação à atividade estimulante locomotora poderia se desenvolver também com relação ao seu efeito neuroprotetor (CAULI *et al.,* 2005; PEREZ *et al*., 2007; KELSEY *et al.,* 2009). XU e colaboradores (2002) verificaram os efeitos da cafeína em camundongos lesionados com MPTP tratados diariamente com cafeína ou salina por mais de uma semana e os resultados obtidos mostraram que a administração diária de cafeína, em condições que produzem tolerância locomotora, não reduziu o efeito protetor da cafeína contra a toxicidade neuronal induzida pelo MPTP.

Além disso, o efeito neuroprotetor da cafeína utilizada em tratamento crônico foi demonstrado em um outro modelo da doença de Parkinson. Joghataie *et al.* (2004) mostraram que a perda de neurônios nigroestriatais induzida pela 6-OHDA e as alterações comportamentais em resposta a estimulação dopaminérgica decorrentes dessa lesão podem ser atenuadas com o tratamento com cafeína (administrada repetidamente após ou no momento da exposição à neurotoxina).

O presente trabalho também testou os efeitos da cafeína em dois protocolos de tratamento (**Protocolo 1**) e com duas doses diferentes (10 e 20 mg/kg) e os resultados obtidos mostram que a cafeína protegeu os neurônios nigroestriatais da lesão com 6-OHDA, atenuando os efeitos tóxicos desta neurotoxina, restaurando as concentrações das monoaminas e reduzindo o comportamento rotacional, e esses efeitos foram melhores no tratamento mais prolongado (tratamento durante 14 dias).

A influência da cafeína na inervação dopaminérgica estriatal pode ser atribuída a sua capacidade de prevenir a morte dos neurônios dopaminérgicos originários da substância negra. Oztas *et al.* (2002) demonstraram que a cafeína pode prevenir a perda de neurônios dopaminérgicos da substancia negra induzida por MPTP. Joghataie *et al*. (2004) verificaram que os neurônios nigroestriatais foram significativamente protegidos dos efeitos neurodegenerativos induzidos por 6-OHDA no grupo lesionado tratado com cafeína. Um outro estudo (PIERRE *et al*., 2005) demonstrou que o antagonista $A_{2A}$ (KW-6002) apresentou efeitos neuroprotetores e antiinflamatórios na substância negra de camundongos tratados com MPTP.

Embora a etiologia da doença de Parkinon permaneça desconhecida, uma série de evidências sugere que um desequilíbrio do metabolismo energético e fatores que levam a um aumento do estresse oxidativo podem estar envolvidos. Dentre eles a disfunção mitocondrial, a peroxidação lipídica, o aumento do acúmulo de ferro livre, e o aumento da atividade da superóxido dismutase (LEVY *et al*., 2009; RAO, 2009).

No presente estudo foi utilizado um modelo *in vitro* de citotoxicidade induzida por 6-OHDA onde células mesencefálicas foram expostas a essa neurotoxina, para demonstrar um possível efeito neuroprotetor da cafeína, que é um antagonista $A_{2A}$ não-seletivo. A neurotoxina 6-OHDA têm sido amplamente usada como modelo animal da doença de Parkinson e, quando administrada *in vivo*, essa toxina provoca sintomas parkinsonianos marcados pela redução da concentração de tirosina hidroxilase, redução da recaptação de dopamina e uma marcante perda de neurônios dopaminégicos.

Estudos anteriores mostraram que a 6-OHDA é transportada para dentro dos neurônios dopaminérgicos onde é oxidada produzindo peróxido de hidrogênio, superóxido e radicais hidroxil (BLUM *et al.,* 2001; BOVE *et al.,* 2005). A administração de 6-OHDA resulta na formação de espécies reativas do oxigênio (ROS), e produz uma potente inibição dos complexos I e IV da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, *in vitro* (MAZZIO *et al.,* 2004; MILLER *et al*., 2008).

O potencial efeito neuroprotetor dos antagonistas de receptores $A_{2A}$ na doença de Parkinson está fundamentado na demonstração de que o bloqueio farmacológico da cafeína ou antagonsitas $A_{2A}$ específicos, como o CSC, ou depleção genética de receptores $A_{2A}$ atenuam a neurotoxicidade e a degeneração, em modelos animais da doença de Parkinson (KALDA *et al*., 2006).

Os resultados dos experimentos do presente trabalho *in vitro* mostraram que o número de células mesencefálicas de rato viáveis diminuiu após exposição a 6-OHDA, como demonstrado pelo teste do MTT, e que o tratamento com cafeína reverteu completamente a citotoxicidade induzida por 6-OHDA, em todas as concentrações utilizadas (0,1; 1 e 5 μg/ml). O tratamento com CSC bloqueou a citotoxicidade induzida por 6-OHDA de maneira dose-

dependente. O CSC na menor concentração (0,1 μg/ml), bloqueou apenas parcialmente os efeitos da 6-OHDA.

Clarkson *et al.* (1999) observaram que o tratamento com 6-OHDA por 24 h diminuiu a viabilidade de neurônios dopaminérgicos indiferenciados e diferenciados *in vitro*, como determinado pelo teste do MTT, e aumentou a taxa de apoptose em neurônios dopaminérgicos diferenciados. Os neurônios dopaminérgicos diferenciados são cerca de 2 vezes mais sensíveis a 6-OHDA do que os neurônios indiferenciados. Em nossos experimentos, o número de células viáveis reduziu drasticamente após a exposição a 40 μM de 6-OHDA. A cafeína recuperou de maneira significativa o número de células viáveis, e reduziu o número de células apoptóticas.

Lotharius *et al*. (1999) monitoraram marcadores de apoptose e a produção de ROS em neurônios dopaminérgicos tratados com 6-OHDA. Esses autores mostraram que o 6-OHDA promoveu morte celular por apoptose e esse efeito foi bloqueado por um inibidor da caspase. Além disso, a 6-OHDA provocou colapso no potencial de membrana mitocondrial, relacionado ao aumento da concentração de ROS. Han *et al.* (2003) demonstraram que o tratamento com 6-OHDA em culturas primárias de neurônios dopaminérgicos provoca morte celular via caspase-dependente. Eles também mostraram que a liberação de citocromo c mitocondrial no citosol leva a ativação de procaspase-9 e procaspase-3, indicando que a cascata de ativação das caspases é um evento importante na citotoxicidade da 6-OHDA.

Kumar *et al.* (1995) mostraram que ratos com lesão estriatal por 6-OHDA apresentaram um aumento de cerca de 40 % nos concentração de malonildialdeido, indicando altos índices de peroxidação lipídica. Esses efeitos foram associados à redução dos conteúdos de GSH, SOD e GSH-Px (glutationa peroxidase), juntos esses fatores podem levar ao aumento da geração de radicais livres.

Devasagayam *et al.* (1996) investigaram o potencial antioxidante da cafeína contra o dano oxidativo em microssomas de fígado de rato. Eles induziram o dano oxidativo utilizando as três espécies reativas do oxigênio de maior importância na promoção de danos à membrana celular *in vivo*, o radical hidroxil (OH), o radical pexoxil (ROO) e superóxido. Os

resultados obtidos mostraram que a cafeína promoveu uma inibição efetiva da peroxidação lipídica, contra todas as três espécies reativas do oxigênio testadas, principalmente com relação ao radical hidroxil (OH). Eles mostraram ainda que a capacidade antioxidante da cafeína foi similar àquela observada com a glutationa e significativamente maior do que o ácido ascórbico.

O presente trabalho demonstrou ainda que o aumento da formação de nitritos induzido por 6-OHDA foi completamente revertido com o tratamento com cafeína ou CSC. Também foi observado que as células mesencefálicas expostas a 6-OHDA apresentaram um aumento de mais de 2 vezes na peroxidação lipídica quando comparadas aos controles. Enquanto no tratamento com cafeína ou CSC houve uma completa inibição da citotoxicidade induzida por 6-OHDA, como foi demonstrado através do método do TBARS.

O estresse oxidativo, resultante da excessiva produção de espécies reativas do oxigênio (ROS), tem sido implicado no dano celular e eventual morte celular, devido a superativação dos receptores glutamatérgicos e da geração de NO, superóxido e peróxido de hidrogênio. Agonistas de receptores $A_1$ e antagonistas de receptores $A_{2A}$ possuem atividade protetora contra danos celulares induzidos por ROS (STONE, 2005).

Recentemente, Fatokun *et al*. (2007), mostraram que a ativação de receptores $A_1$ ou o bloqueio dos receptores $A_{2A}$ atenuaram o estresse oxidativo nos neurônios do cerebelo. Nossos resultados dos experimentos *ex vivo*, apresentaram-se de maneira semelhante, mostrando que o CSC, nas duas doses (1 e 5 mg/kg) reduziu significativamente os níveis de nitrito e a peroxidação lipídica no estriado de ratos lesionados com 6-OHDA, sugerindo que essa droga possui efeito neuroprotetor e antioxidante.

Nossos resultados mostraram que nas células mesencefálicas normais de ratos (controles), menos da metade da população celular foi corada pelo OX-42, um marcador de microglias ativadas, e esse padrão não foi alterado na presença da 6-OHDA na concentração de 10 μg/ml. No entanto, um número significativamente menor de microglias foi observado nas células tratadas com cafeína ou CSC sozinho ou combinado com 6-OHDA. Por outro lado a 6-OHDA aumentou o número de astrócitos, e o tratamento com cafeína reverteu esse

aumento. Enquanto o tratamento com CSC não alterou a percentagem de astrócitos GFAP positivos após a exposição das células à 6-OHDA.

Recentemente, Minghetti *et al*. (2007), utilizando um modelo de excitotoxicidade estriatal, verificaram que o SCH 58261 alterou de forma diferente a expressão de COX-2 induzida por ácido quinolinico, no córtex e no estriado. Esse antagonista $A_{2A}$ aumentou a expressão de COX-2 nos neurônios corticais, e preveniu a expressão de COX-2 nas células estriatais. Da mesma forma, o SCH 58261 regulou de diferentes maneiras a astrogliose e a ativação das microglias, nessas duas áreas cerebrais. Então, a redução da produção de NO microglial poderia contribuir para a ação neuroprotetora dos antagonistas $A_{2A}$ (SAURA et al., 2005), como observado no presente trabalho.

Behan e Stone (2002), trabalhando com antagonistas $A_{2A}$ diferentes, inclusive o CSC, mostraram que esses compostos protegem os neurônios da citotoxicidade induzida por ácido quinolínico, após a injeção deste em hipocampo de rato. O principal mecanismo da neuroproteção mediada pelo bloqueio dos receptores $A_{2A}$ é a supressão da liberação do glutamato. Vários estudos já demonstraram que a ativação dos receptores $A_{2A}$ apresenta efeito excitatório nos neurônios, em parte devido ao aumento da liberação do glutamato (QUARTA *et al.,* 2004; TOZZI *et al*., 2007). O bloqueio dos receptores $A_{2A}$, por conseguinte, pode reduzir as concentrações extracelulares de glutamato prevenindo o dano celular.

Os nossos resultados dos experimentos *in vitro* mostraram que o CSC apresentou um intenso efeito neuroprotetor nas células mesencefálicas de rato expostas a 6-OHDA. Esses efeitos são em grande parte devido a capacidade dos antagonistas $A_{2A}$ de reduzirem a produção de radicais livres e o estresse oxidativo que são os maiores responsáveis pela citotoxicidade induzida por 6-OHDA. Embora outras ações, como uma possível inibição da cascata das caspases, bem como a inibição da ativação das microglias, produzidas por essas drogas devam ser consideradas.

Várias evidências indicam que a ativação da proteína quinase regulada por sinais extracelulares (ERK), um membro da família de proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAP), pode exercer um papel patológico em neurônios expostos a um maior estresse oxidativo (STANCIU *et al.,* 2000; KULICH; CHU, 2003). Kulich e Chu (2003) observaram

que existe uma correlação entre a neuroproteção e a inibição da manutenção da fosforilação da ERK induzida por 6-OHDA, sugerindo que a regulação da cascata de sinalização da ERK pode contribuir para a toxicidade neuronal.

Recentemente, Gomez-Lazaro *et al.* (2008), demonstraram que alterações mitocondriais estão associadas com o efeito citotóxico da 6-OHDA, que promove o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e leva a liberação do citocromo c. Esses autores observaram que a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) p38, que está envolvida com mecanismos de morte celular, foi ativada durante a apoptose induzida por 6-OHDA, e que o tratamento com um inibidor da MAPK p38 bloqueou muitos eventos neurotóxicos induzidos por 6-OHDA.

Finalmente, a neuroproteção exercida pelo CSC e pela cafeína, nas células mesencefálicas de rato, observadas no presente estudo, poderia ser também devida à inativação da MAPK, bem como de outras quinases, visto que não só o CSC, mas também a cafeína, apresentaram efeito antiapoptótico, e inibiram intensamente o estresse oxidativo induzido por 6-OHDA.

O CSC é também um potente e seletivo inibidor da monoamino oxidase-B (MAO-B) (CHEN *et al.,* 2002) e vários estudos tem sugerido que o efeito neuroprotetor dessa droga pode ser devido ao bloqueio da conversão do MPTP em MPDP+, uma oxidação mediada pela MAO-B, no modelo da doença de Parkinson utilizando o MPTP (CHEN *et al*., 2002). A geração de espécies reativas do oxigênio induzida por 6-OHDA parece ocorrer através de dois mecanismos distintos, a desaminação através da oxidação pela MAO-B ou a auto-oxidação (BLUM *et al.,* 2001). Portanto, a 6-OHDA, assim como a dopamina, pode ser um substrato para a MAO-B (BOVÈ *et al*., 2005a,b). Estudos sugerem um envolvimento da MAO-B na neurotoxicidade induzida por 6-OHDA, após a observação de que o inibidor da MAO-B, selegilina, previne a toxicidade da 6-OHDA (SALONEN *et al*., 1996) e, conseqüentemente, a inibição da MAO-B pelo CSC pode explicar os efeitos neuroprotetores do CSC.

Evidências apontam os receptores $A_{2A}$ como os novos alvos terapêuticos das estratégias neuroprotetoras para a doença de Parkinson. Os antagonistas $A_{2A}$ específicos provavelmente apresentam maior eficácia do que os antagonistas não específicos como a

cafeína, porque o bloqueio dos receptores $A_1$ pode exacerbar a toxicidade dopaminérgica e reduzir os benefícios do bloqueio dos receptores $A_{2A}$ (CHEN *et al*., 2003).

## VII CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho mostrou que a 6-OHDA causou déficit motor evidenciado pelo aumento do comportamento rotacional induzido por apomorfina e morte neuronal, verificada através da redução nos concentração das monoaminas no corpo estriado. A redução da concentração de dopamina devido à destruição dos neurônios dopaminérgicos estriatais causou desequilíbrio em outros sistemas de neurotransmissores como os sistemas gabaérgico e glutamatérgico. Como foi observado (**tabela 6**), a 6-OHDA promoveu aumento significativo das concentrações de GABA e glutamato e também reduziu a densidade dos seus receptores.

Nossos resultados mostraram que o tratamento com cafeína promoveu uma recuperação motora parcial, reduzindo o número de rotações/h de maneira dose dependente no tratamento durante 14 dias. Verificamos também que o tratamento mais prolongado com cafeína (14 dias) foi mais efetivo na redução do comportamento rotacional do que o tratamento por 7 dias, que só promoveu redução significativa do número de rotações contralaterais na dose maior (20 mg/kg), mostrando que não só a dose, mas também o tempo de tratamento, é importante para a obtenção do efeito final da cafeína (**figuras 11 e 12**).

Da mesma forma, o tratamento com cafeína durante 14 dias também foi mais eficaz na recuperação das concentrações das monoaminas, nas duas doses utilizadas (10 e 20 mg/kg) e de maneira dose dependente (**tabelas 2 e 3**).

Os resultados apresentados mostraram uma redução dos conteúdos de dopamina na ordem de 78 % após a lesão estriatal com 6-OHDA e os resultados do *binding* dopaminérgico mostraram uma redução do Bmax dos receptores $D_1$, um aumento da densidade dos receptores $D_2$ e redução da afinidade de ambos os receptores. O tratamento com cafeína não promoveu nenhuma alteração na densidade dos receptores D1 e D2-símile após lesão estriatal com 6-OHDA, no entanto, promoveu uma redução significativa do Kd de ambos os receptores, mostrando que a cafeína melhorou a afinidade desses dois receptores no grupo lesionado com 6-OHDA e tratado com cafeína (**tabela 8**).

Os experimentos *in vitro* mostraram que a 6-OHDA reduziu a viabilidade celular em cultura de células mesencefálicas de rato e que o tratamento com cafeína promoveu bloqueio da toxicidade induzida por 6-OHDA (**figura 17**). É consenso na literatura que a produção de radicais livres e o estresse oxidativo estão entre os principais mecanismos envolvidos na citotoxicidade mediada pela 6-OHDA (BLUM *et al.*, 2001; BOVE *et al*., 2005b; MILLER *et al*., 2009). No presente trabalho, foi observado que a 6-OHDA aumentou as concentrações de nitrito e a peroxidação lipídica, assim como já foi descrito na literatura, além disso, aumentou a morte celular por apoptose e a percentagem de microglias e de astrócitos ativados.

Neste trabalho foi observado que o tratamento com cafeína reduziu o estresse oxidativo, a morte celular por apoptose, a percentagem de microglias ativadas e a percentagem de astrócitos, evidenciando um possível efeito neuroprotetor que está diretamente relacionado ao aumento da viabilidade celular e da concentração de dopamina, mostrando que a cafeína provavelmente reduziu a toxicidade da 6-OHDA e conseqüentemente a morte neuronal. Além disso, o tratamento com cafeína na dose maior (20 mg/kg) promoveu redução do aumento da concentração de glutamato induzido por 6-OHDA, mostrando que a cafeína poderia amenizar o desequilíbrio que ocorre em outros neurotransmissores devido à perda de dopamina.

Na **tabela 1** mostramos que o tratamento com CSC promoveu uma recuperação motora parcial, de maneira dose dependente, revertendo parcialmente os efeitos da neurotoxina. Verificamos também que a associação com L-DOPA não potencializou os efeitos do CSC sobre o comportamento rotacional induzido por apomorfina. Esses resultados estão de acordo com outros trabalhos na literatura que mostram que o bloqueio seletivo dos receptores da adenosina $A_{2A}$, reduzem o déficit motor em modelos animais da doença de Parkinson, sem apresentar os efeitos adversos observados com os antagonistas não seletivos derivados das xantinas, como a cafeína ou a teofilina (KOGA *et al*., 2000; PINNA *et al*., 2001).

O tratamento com L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina) é a terapia preconizada para a doença de Parkinson. Essa droga é precursora da dopamina e já foi demonstrado que uma vez administrada exogenamente a L-DOPA é convertida a dopamina pela DOPA-

descarboxilase e, subseqüentemente, liberada no espaço extracelular por exocitose (KANNARI *et al*., 2000). No entanto, após alguns anos de tratamento, surgem alguns efeitos colaterais como as discinesias, associados a mudanças nos concentração plasmáticos de L-DOPA e, conseqüentemente, flutuações na concentração de dopamina estriatal, que pioram com a progressão da doença podendo inviabilizar a continuação do tratamento da DP com L-DOPA (MURATA, 2009).

O uso de drogas que interferem no catabolismo da dopamina, como os inibidores da MAO-B ou da COMT, poderiam prolongar a presença de dopamina no cérebro e melhorar a eficiência da L-DOPA. Essas drogas poderiam inclusive permitir uma redução da dose de L-DOPA utilizada (NAGATSUA; SAWADAB, 2009). No entanto, os efeitos adversos dos inibidores do metabolismo da dopamina e também dos agonistas dopaminérgicos, que seriam uma alternativa para melhorar a eficiência da L-DOPA, limitam muito o uso dessas drogas associadas a L-DOPA (GOLEMBIOWSKA; DZIUBINA, 2004).

Já é conhecido na literatura que os inibidores da MAO-B possuem propriedades antiparkinsonianas, então drogas que promovem o bloqueio de ambos a MAO-B e os receptores $A_{2A}$ podem apresentar um potencial terapêutico ainda maior para o tratamento da doença de Parkinson (VLOK *et al*., 2006). Vários estudos têm mostrado que o CSC causa inibição da MAO-B e que esse efeito pode contribuir para uma possível atividade neuroprotetora desse antagonista específico de receptores $A_{2A}$ (CHEN *et al.,* 2002; PETZER *et al*., 2003). Além disso, Golembiowska e Dziubina (2004) mostraram que o bloqueio dos receptores $A_{2A}$ eleva a liberação de dopamina induzida por L-DOPA e que a associação dessas drogas pode ser benéfica na melhora do déficit motor.

De fato, os resultados apresentados nas **figuras 15 e 16** deste trabalho demonstraram que o tratamento com CSC promoveu recuperação das concentrações das monoaminas, nas duas doses utilizadas (1 e 5 mg/kg) e de maneira dose dependente, inclusive com resultados melhores do que aqueles apresentados no tratamento com cafeína, provavelmente devido a seletividade do CSC para os receptores $A_{2A}$ e a sua capacidade em inibir a MAO-B.

Nossos resultados (**figura 18***)* mostraram ainda que o tratamento com CSC não promoveu nenhuma alteração na densidade ou no Kd dos receptores $D_1$-símile após lesão estriatal com 6-OHDA, no entanto, promoveu uma redução significativa do Kd dos receptores $D_2$-símile, mostrando que o CSC aumentou a afinidade pelo receptor $D_2$-símile, provavelmente devido à interação antagônica entre os receptores $A_{2A}$ e $D_2$.

A associação do CSC com L-DOPA apresentou efeitos sinérgicos, recuperando quase completamente os concentração de dopamina e de seu metabólito após lesão com 6-OHDA. Esse efeito provavelmente ocorreu devido ao bloqueio dos receptores $A_{2A}$ estriatais e pode estar relacionado às ações do CSC no metabolismo da dopamina e no aumento do transporte da L-DOPA exógena no cérebro.

Os experimentos *in vitro* mostraram que a 6-OHDA reduziu a viabilidade celular em cultura de células mesencefálicas de rato e que o tratamento com CSC promoveu bloqueio da toxicidade induzida por 6-OHDA, de maneira dose dependente. Nossos resultados mostraram que o tratamento com CSC reduziu o estresse oxidativo e a morte celular por apoptose, no entanto a redução da percentagem de microglias ativadas e a percentagem de astrócitos ativados não foi significativa com a dose utilizada com relação às células expostas apenas a 6-OHDA. Esses resultados mostram um possível efeito neuroprotetor do CSC que está diretamente relacionado ao aumento da viabilidade celular e dos conteúdos de dopamina, mostrando que o CSC provavelmente reduziu a toxicidade da 6-OHDA e, conseqüentemente, a morte neuronal.

A redução da concentração de dopamina estriatal e a subsequente superativação da via indireta levam a uma redução da inibição do núcleo subtalâmico (STN) e conseqüentemente a uma excessiva ativação dos circuitos tálamo-corticais. Já foi postulado que essa desinibição subtalâmica pode contribuir para a progressão da doença de Parkinson através da superestimulação glutamatérgica dos neurônios da substancia negra parte compacta, levando a um ciclo vicioso onde a hiperatividade do STN e a lesão da substância negra são mantidas (BOVE *et al.,* 2005b).

Os antagonistas $A_{2A}$ revertem o aumento da liberação do GABA no globo pálido e o aumento na expressão de preproencefalina (PPE) no estriado de ratos lesionados com 6-

OHDA (OCHI *et al*., 2000; AOYAMA *et al*., 2000). Assim, os antagonistas $A_{2A}$ provavelmente exercem efeitos neuroprotetores, pelo menos em parte, reduzindo a hiperatividade da via estriadopalidal e, portanto a liberação de glutamato (BOVE *et al.,* 2005b). Os resultados mostrados na **tabela 7** (AGUIAR *et al.,* 2008) mostraram uma redução das concentrações de GABA e glutamato após tratamento com CSC e embora esse efeito não tenha sido observado no tratamento com L-DOPA sozinha, houve potencialização dos efeitos do CSC na associação com L-DOPA.

Essa alteração nos concentração dos aminoácidos está diretamente relacionada com os demais efeitos do CSC demonstrados nesse trabalho, sugerindo que o efeito neuroprotetor dos antagonistas $A_{2A}$ pode ser atribuído a capacidade destas drogas de reduzir a liberação de aminoácido excitatório. Além disso, o CSC promoveu aumento da densidade dos receptores GABAérgicos, o que provavelmente está relacionado à redução dos concentração do GABA e ao restabelecimento do equilíbrio entre os neurotransmisores envolvidos na lesão induzida pela 6-OHDA.

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que os efeitos dos antagonistas da adenosina ocorrem de várias maneiras, revertendo às alterações neuroquímicas na neurotransmissão monoaminérgica, glutamatérgica e gabaérgica em modelo experimental da doença de Parkinson com 6-OHDA. Alguns desses efeitos são diretos, como os que são observados nos neurônios dopaminérgicos, onde as drogas promoveram neuroproteção e ação antioxidante. Em outras circunstâncias, o CSC agiu indiretamente, reduzindo os conteúdos de GABA e glutamato na via nigroestriatal, que estão hiperativadas na doença de Parkinson, contribuindo para a recuperação do equilíbrio das vias direta e indireta.

Foi observado também que, de maneira geral, o bloqueio seletivo dos receptores $A_{2A}$ mediado pelo CSC foi mais eficiente na reversão dos efeitos da neurotoxina 6-OHDA do que o bloqueio não seletivo com a cafeína. Já foi comprovado que o uso de antagonistas $A_1$ não mimetizam os efeitos neuroprotetores da cafeína (CHEN *et al.,* 2001), mostrando que o principal receptor relacionado a esses efeitos são os receptores $A_{2A}$ e que estes seriam então os principais alvos terapêuticos para a doença de Parkinson. Além disso, o bloqueio dos

receptores $A_1$ pode exacerbar a toxicidade dopaminérgica e reduzir os benefícios do bloqueio dos receptores $A_{2A}$ (BJORKLUND *et al.*, 2008).

**Quadro 6 - Resumo das alterações comportamentais e neuroquímicas da cafeína e do CSC *(8-(3-chlorostyryl caffeine)* em corpo estriado (CE) de ratos lesionados com 6-OHDA**

| Experimentos | 6-OHDA | Cafeína (mg/kg,7d) | | CSC (mg/kg, 7d) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 10 | 20 | 1 | 5 |
| Comportamento rotacional | ↑ | - | ↓ | - | ↓ |
| **Monoaminas e metabólitos** | | | | | |
| DA | ↓ | - | - | ↑ | ↑ |
| DOPAC | ↓ | - | ↑ | ↑ | ↑ |
| HVA | ↓ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ |
| 5HT | ↓ | - | ↑ | - | ↑ |
| 5HIAA | - | - | - | - | - |
| NE | ↓ | ↑ | ↑ | - | ↑ |
| **Aminoácidos** | | | | | |
| GABA | ↑ | - | - | ↓ | ↓ |
| Glutamato | ↑ | - | ↓ | ↓ | ↓ |
| **Densidade de Receptores** | | | | | |
| Dopaminérgico $D_1$-símile | ↓ | - | ND | - | ND |
| Dopaminérgico $D_2$-símile | ↑ | - | ND | - | ND |
| GABAérgicos | ↓ | - | ND | ↑ | ND |
| Glutamatérgicos | ↓ | - | ND | - | ND |
| **Estresse oxidativo** | | | | | |
| Nitrito/Nitrato | ↑ | ND | ND | ↓ | ↓ |
| Peroxidação lipídica (TBARS) | ↑ | ND | ND | ↓ | ↓ |

**Nota: Símbolos: ↑ ou ↓ aumento ou diminuição, respectivamente em relação ao grupo controle quando estatisticamente significativo; –ausência de efeito significativo; ND, não detectado.**

**Quadro 7 - Resumo das alterações neuroquímicas da cafeína e do CSC *(8-(3-chlorostyryl caffeine)* em cultura de células mesencefálicas de rato expostas a 6-OHDA**

| Experimentos | 6-OHDA | Cafeína | CSC |
|---|---|---|---|
| **Estudos *in vitro*** | | | |
| Viabilidade celular (MTT) | ↓ | ↑ | ↑ |
| Nitrito/Nitrato | ↑ | ↓ | ↓ |
| Peroxidação lipídica (TBARS) | ↑ | ↓ | ↓ |
| Morte celular por apoptose | ↑ | ↓ | ↓ |
| Percentagem de microglias | ↑ | ↓ | - |
| Percentagem de astrócitos | ↑ | ↓ | - |

**Nota: Símbolos: ↑ ou ↓ aumento ou diminuição, respectivamente em relação ao grupo controle quando estatisticamente significativo; –ausência de efeito significativo; ND, não detectado**

## VIII CONCLUSÕES

A análise dos resultados apresentados neste trabalho nos permitiu concluir que:

- A injeção intraestriatal de 6-OHDA causou destruição celular e déficit motor evidenciado pelo comportamento rotacional induzido pela apomorfina. O tratamento com os antagonistas $A_{2A}$, tanto com a cafeína como com o CSC promoveu uma redução do número de rotações de maneira dose-dependente. Essas drogas produziram uma recuperação da lesão, provavelmente devido ao aumento das concentrações de dopamina no estriado lesionado e a redução da supersensibilidade do receptor dopaminérgico.

- O tratamento com cafeína durante 14 dias foi mais efetivo na redução do comportamento rotacional, mostrando que não só a dose, mas também o tempo de tratamento é importante para a obtenção do efeito final da cafeína. Isto ocorre provavelmente porque a lesão com 6-OHDA se estabelece de maneira progressiva e lenta, necessitando de pelo menos duas semanas para estabelecimento da lesão, e o tratamento mais prolongado mantém as concentrações de cafeína por mais tempo, inibindo a evolução da lesão.

- As concentrações de monoaminas e dos seus metabólitos diminuíram significativamente (75-85%) no estriado lesionado dos animais controle (6-OHDA) e essas concentrações foram parcialmente recuperadas nos animais lesionados e tratados com cafeína ou com CSC. O tratamento com cafeína durante 14 dias também foi mais eficaz na recuperação das concentrações das monoaminas, nas duas doses utilizadas (10 e 20mg/kg) e de maneira dose dependente.

- O tratamento com CSC promoveu recuperação das concentrações das monoaminas, nas duas doses utilizadas (1 e 5 mg/kg), e de maneira dose dependente, inclusive com resultados melhores do que aqueles apresentados no tratamento com cafeína, provavelmente devido a seletividade do CSC para os receptores $A_{2A}$ e a capacidade de inibir a MAO-B.

- A associação do CSC com L-DOPA apresentou efeitos sinérgicos, recuperando quase completamente os concentração de dopamina e seu metabólito após lesão com 6-OHDA. Esse efeito provavelmente ocorreu devido ao bloqueio dos receptores $A_{2A}$ estriatais e pode estar relacionado às ações do CSC no metabolismo da dopamina e no aumento do transporte da L-DOPA exógena no cérebro.

- Além das alterações nos concentração de dopamina, a 6-OHDA causou alterações também na densidade dos receptores $D_1$ e $D_2$-símile. Os resultados apresentados mostraram uma redução dos receptores $D_1$ e um aumento dos receptores $D_2$, provavelmente devido a intensidade da destruição dos neurônios dopaminérgicos (que foi na ordem de 78%) após lesão com 6-OHDA nos animais controles.

- O tratamento com cafeína não promoveu nenhuma alteração na densidade dos receptores $D_1$ e $D_2$-símile após lesão estriatal com 6-OHDA, no entanto, promoveu aumento da afinidade de ambos os receptores.

- O tratamento com CSC, que é um antagonista seletivo de receptores $A_{2A}$, não promoveu nenhuma alteração na densidade ou na afinidade dos receptores $D_1$-símile após lesão estriatal com 6-OHDA, no entanto, promoveu aumento da afinidade dos receptores $D_2$-símile, provavelmente devido à interação antagônica entre os receptores $A_{2A}$ e $D_2$.

- A redução da concentração de dopamina devido à destruição dos neurônios dopaminérgicos estriatais causou desequilíbrio em outros sistemas como os sistemas gabaérgico e glutamatérgico. Como foi observado, a 6-OHDA promoveu aumento significativo das concentrações de GABA e glutamato e também reduziu a densidade dos seus receptores.

- Os conteúdos de GABA e glutamato foram reduzidos após tratamento com CSC e embora esse efeito não tenha sido observado no tratamento com L-DOPA sozinha, houve potencialização dos efeitos do CSC na associação com L-DOPA. Além disso, o CSC promoveu aumento dos receptores GABAérgicos. A redução das concentrações desses aminoácidos sugere que o bloqueio dos receptores $A_{2A}$ pode reduzir a liberação do aminoácido excitatório e restabelecer o equilíbrio entre esses neurotransmissores.

- Este trabalho sugere um possível efeito neuroprotetor desses antagonistas da adenosina $A_{2A}$, visto que:

    - Ocorreu uma redução da toxicidade induzida pela 6-OHDA, evidenciada pelo aumento da viabilidade celular;
    - As concentrações de nitrito/nitrato e a geração de peroxidação lipídica apresentaram uma redução tanto *in vivo* quanto *in vitro*, mostrando um possível efeito antioxidante dessas drogas;
    - A redução da percentagem de microglias e astrócitos pode ter ocorrido devido à diminuição do processo inflamatório.
    - Houve redução da morte celular por apoptose, evidenciando a atenuação da neurotoxicidade e da degeneração celular.

## REFERÊNCIAS

ADENOSINE RECEPTOR COUPLING. **Aderis Pharmaceuticals - Science - Core Competence**. Disponível em:< http://www.aderis.com/img/art_adenosine.gif>. Acesso em: 5 Dec. 2008.

AGUIAR, L. M.; MACÊDO, D. S.; VASCONCELOS, S. M.; OLIVEIRA, A. A.; DE SOUSA, F. C.; VIANA, G. S. CSC, an adenosine A(2A) receptor antagonist and MAO B inhibitor, reverses behavior, monoamine neurotransmission, and amino acid alterations in the 6-OHDA-lesioned rats. **Brain Res.**, v. 1191, p. 192-199, 2008.

AGUIAR, L. M.; NOBRE, H. V. JR.; MACEDO, D. S.; OLIVEIRA, A. A.; FREITAS, R. M.; VASCONCELOS, S. M.; CUNHA, G. M.; SOUSA, F. C.; VIANA, G. S. Neuroprotective effects of caffeine in the model of 6-hydroxydopamine lesion in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 84, p. 415-419, 2006.

AGUIAR, L.M; VASCONCELOS, S.M.; SOUSA, F.C.F.; VIANA, G.S.B. Melatonín reverses neurochemical alterations induced by 6-OHDA in rat striatum. **Life Sci.,** v. 70, p. 1041-1051, 2002.

AGUIAR, LM.; VASCONCELOS, S.M.; MACÊDO, D.S.; FREITAS, R.M.; ALBUQUERQUE, A.O.; SOUSA, F.C.F.; VIANA, G.S.B. Protective effects of Nacetyiserotonin against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. **Life Sci.**, v. 76, p. 2193-2202, 2005.

AHMADI, F. A.; LINSEMAN, D. A.; GRAMMATOPOULOS, T. N.; JONES, S. M.; BOUCHARD, R. J.; FREED, C. R.; HEIDENREICH, K. A.; ZAWADA, W. M. The pesticide rotenone induces caspase-3-mediated apoptosis in ventral mesencephalic dopaminergic neurons. **J. Neurochem.**, v.87, p.914-921, 2003.

ALFAVARO, T. M.; VIGRA, E.; OLIVEIRA, C. R.; CUNHA, R. A. Effect of free radicals on adenosine A (2A) and dopamine D2 receptors in the striatum of young adult and aged rats. **Neurochem. Int**., v. 45, p. 733–738, 2004.

ALFINITO, P. D.; WANG, S. P.; MANZINO, L.; RIJHSINGHANI, S.; ZEEVALK, G. D.; SONSALLA, P. K. Adenosinergic protection of dopaminergic and GABAergic neurons against mitochondrial inhibition through receptors located in the substantia nigra and striatum, respectively. **J. Neurosci.,** v. 23, p. 10982-10987, 2003.

ALTAR, C. A.; MARIEN, M. R. Picomolar affinity of 125I-SCH 23982 for D1 receptors in brain demonstrated with digital subtraction autoradiography. **J. Neurosci.,** v. 7, p. 213-222, 1987.

ANGULO, J. A.; COIRINI, H.; LEDOUX, M.; SCHUMACHER, M. Regulation by dopaminergic neurotransmission of dopamine D2 mRNA and receptor levels in the striatum and nucleus accumbens of the rat. **Brain Res. Mol. Brain Res.,** v. 11, p. 161-166, 1991.

AOYAMA, S.; KASE, H.; BORRELLI, E. Rescue of locomotor impairment in dopamine D2 receptor-deficient mice by an adenosine A2A receptor antagonist. **J. Neurosci.**, v. 20, p. 5848-5852, 2000.

ARNT, J. Hyperactivity induced by stimulation of separate dopamine D-1 and D-2 receptors in rats with bilateral 6-OHDA lesions. **Life Sci.,** v. 37, p. 717-723, 1985.

ARNT, J.; HYTTEL, J. Differential involvement of dopamine D-1 and D-2 receptors in the circling behaviour induced by apomorphine, SK & F 38393, pergolide and LY 171555 in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. **Psychopharmacology,** v. 85, p. 346-352, 1985.

ASCHERIO, A.; WEISSKOPF, M. G.; O'REILLY, E. J.; MCCULLOUGH, M. L.; CALLE, E. E.; RODRIGUEZ, C.; THUN, M. J. Coffee consumption, gender, and Parkinson's disease mortality in the cancer prevention study II cohort: the modifying effects of estrogen. **Am. J. Epidemiol.,** v. 160, p. 977-984, 2004.

ASCHERIO, A.; ZHANG, S. M.; HERNÁN, M. A.; KAWACHI, I.; COLDITZ, G. A.; SPEIZER, F. E.; WILLETT, W. C. Prospective study of caffeine consumption and risk of Parkinson's disease in men and women. **Ann. Neurol.,** v.50, p. 56-63, 2001.

BARA-JIMENEZ, W.; SHERZAI, A.; DIMITROVA, T.; FAVIT, A.; BIBBIANI, F.; GILLESPIE, M.; MORRIS, M. J.; MOURADIAN, M. M.; CHASE, T. N. Adenosine A (2A) receptor antagonist treatment of Parkinson´s disease. **Neurology**, v. 61, p. 293-296, 2003.

BARALDI, P. G.; TABRIZI, M. A.; BOVERO, A.; AVITABILE, B.; PETRI, D.; FRUTTAROLO, F. Recent developments in the field of A2A and A3 adenosine receptor antagonists. **Eur. J. Med. Chem.,** p. 1–16, 2003.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências:** desvendando o sistema nervoso. 2. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2002.

BEHAN, W. M.; STONE, T. W. Enhanced neuronal damage by co-administration of quinolinic acid and free radicals, and protection by adenosine A2A receptor antagonists. **Br. J. Pharmacol.,** v. 135, p. 1435-1442, 2002.

BERNHEIMER, H.; BIRKMAYER, W.; HORNYKIEWICZ, O. Distribution of 5-hydroxytryptamine (serotonin) in the human brain and its behavior in patients with Parkinson's syndrome. **Klin. Wochenschr.,** v. 39, p. 1056-1059, 1961.

BIBBIANI, F.; OH, J. D.; PETZER, J. P.; CASTAGNOLI, N. JR.; CHEN, J. F.; SCHWARZSCHILD, M. A.; CHASE, T. N. A2A antagonist prevents dopamine agonist-induced motor complications in animal models of Parkinson´s disease. **Exp. Neurol.,** v. 184, p. 285-294, 2003.

BJÖRKLUND, O.; HALLDNER-HENRIKSSON, L.; YANG, J.; ERIKSSON, T. M.; JACOBSON, M. A.; DARÉ, E.; FREDHOLM, B. B. Decreased behavioral activation following caffeine, amphetamine and darkness in $A_3$ adenosine receptor knock-out mice. **Physiol. Behav.,** v. 95, p. 668-676, 2008.

BLANDINI, F.; ARMENTERO, M. T.; MARTIGNONI, E. The 6-hydroxydopamine model: news from the past. **Parkinsonism Relat. Disord.**, v. 2, p. 124-129, 2008.

BLUM, D.; GALAS, M. C.; PINTOR, A.; BROUILLET, E.; LEDENT, C.; MULLER, C. E.; BANTUBUNGI, K.; GALLUZZO, M.; GALL, D.; CUVELIER, L.; ROLLAND, A.S.; POPOLI, P.; SCHIFFMANN, S. N. A dual role of adenosine A2A receptors in 3-nitropropionic acid-induced striatal lesions: implications for the neuroprotective potential of A2A antagonists. **J. Neurosci.**, v. 23, p. 5361-5369, 2003.

BLUM, D.; TORCH, S.; LAMBENG, N.; NISSOU, M.; BENABID, A. L.; SADOUL, R.; VERNA, J. M. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. **Prog. Neurobiol.**, v. 65, p. 135-172, 2001.

BOISON, D. Adenosine as a neuromodulator in neurological diseases. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 8, p. 2-7, 2008.

BOISON, D. Adenosine-based cell therapy approaches for pharmacoresistant epilepsies. **Neurodegener Dis.,** v. 4, p. 28-33, 2007.

BOVÉ, J.; MARIN, C.; BONASTRE, M.; TOLOSA, E. Adenosine A2A antagonism reverses levodopa-induced motor alterations in hemiparkinsonian rats. **Synapse**, v. 46, p. 251-257, 2002.

BOVÉ, J.; PROU, D.; PERIER, C.; PRZEDBORSKI, S. Toxin-induced models of Parkinson's disease. **NeuroRx.**, v. 2, p. 484-494, 2005a.

BOVÉ, J.; SERRATS, J.; MENGOD, G.; CORTÉS, R.; TOLOSA, E.; MARIN, C. Neuroprotection induced by the adenosine A2A antagonist CSC in the 6-OHDA rat model of parkinsonism: effect on the activity of striatal output pathways. **Exp. Brain Res.,** v. 165, p. 362-374, 2005b.

BRADLEY, S. R.; MARINO, M. J.; WITTMANN, M.; ROUSE, S. T.; AWAD, H.; LEVEY, A. I.; CONN, P. J. Activation of group II metabotropic glutamate receptors inhibits synaptic excitation of the substantia Nigra pars reticulata. **J. Neurosci.,** v. 20, p. 3085-3094, 2000.

BRANTON, R. L.; CLARKE, D. J. Apoptosis in primary cultures of E14 rat ventral mesencephala: time course of dopaminergic cell death and implications for neural transplantation. **Exp. Neurol.,** v. 160, p. 88-98, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. **Boletim Epidemiológico,** Brasília, DF, 2006.

BREESE, G. R.; BAUMEISTER, A. A.; MCCOWN, T. J.; EMERICK, S. G.; FRYE, G. D.; CROTTY, K.; MUELLER, R. A. Behavioral differences between neonatal and adult 6-hydroxydopamine-treated rats to dopamine agonists: relevance to neurological symptoms in clinical syndromes with reduced brain dopamine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 231, p. 343-354, 1984.

BUONAMICI, M.; CACCIA, C.; CARPENTIERI, M.; PEGRASSI, L.; ROSSI, A. C.; DI CHIARA, G. D-1 receptor supersensitivity in the rat striatum after unilateral 6-hydroxydopamine lesions. **Eur. J. Pharmacol.,** v. 126, p. 347-348, 1986.

BURKE, R. E.; GREENBAUM, D. Effect of post-mortem factors on muscarinic receptor subtypes in rat brain**. J. Neurochem**., v. 49, p. 529–596, 1987.

CADET, J. L.; ZHU, S. M.; ANGULO, J. A. Quantitative in situ hybridization evidence for differential regulation of proenkephalin and dopamine D2 receptor mRNA levels in the rat striatum: effects of unilateral intrastriatal injections of 6-hydroxydopamine. **Brain Res. Mol. Brain Res.,** v. 12, p. 59-67, 1992.

CAI, G.; WANG, H. Y.; FRIEDMAN, E. Increased dopamine receptor signaling and dopamine receptor-G protein coupling in denervated striatum. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 302, p. 1105-1112, 2002.

CALABRESI, P.; CENTONZE, D.; GUBELLINI, P.; PISANI, A.; BERNARDI, G. Acetylcholine-mediated modulation of striatal function. **Trends Neurosci.**, v. 23, p.120-126, 2000.

CALABRESI, P.; GALLETTI, F.; SAGGESE, E.; GHIGLIERI, V.; PICCONI, B. Neuronal networks and synaptic plasticity in Parkinson's disease: beyond motor deficits. **Parkinsonism Relat Disord.**, v. 3, p. 259-262, 2007.

CALLON, F.; DRIDI, M.; HORNYKIEWICZ, O.; BÉDARD, P. J.; RAJPUT, A. H.; DI PAOLO, T. Increased adenosine A2A receptors in the brain of Parkinson´s disease patients with dyskinesias. **Brain**, v. 127, p. 1075-1084, 2004.

CARMAN, L. S.; GAGE, F. H.; SHULTS, C. W. Partial lesion of the substantia nigra: relation between extent of lesion and rotational behavior. **Brain Res.,** v. 553, p. 275-283, 1991.

CARTMELL, J.; KEMP, J. A.; ALEXANDER, S. P.; SHINOZAKI, H.; KENDALL, D. A. Modulation of cyclic AMP formation by putative metabotropic receptor agonists. **Br. J. Pharmacol.,** v. 111, p. 364-369, 1994.

CAULI, O.; PINNA, A.; MORELLI, M. Subchronic intermittent caffeine administration to unilaterally 6-hydroxydopamine-lesioned rats sensitizes turning behaviour in response to dopamine D(1) but not D(2) receptor agonists. **Behav. Pharmacol.,** v. 16, p. 621–626, 2005.

CHAUDHURI KR, NAIDU Y. Early Parkinson's disease and non-motor issues. **J. Neurol.,** v. 5, p. 33-38, 2008.

CHEN, J. C.; CHEN, P. C.; CHIANG, Y. C. Molecular mechanisms of psychostimulant addiction. **Chang Gung Med. J.,** v. 32, p. 148-154, 2009.

CHEN, J. F. The adenosine A(2A) receptor as an attractive target for Parkinson's disease treatment. **Drug News Perspect.,** v. 16, p. 597-604, 2003.

CHEN, J. F.; SONSALLA, P. K.; PEDATA, F.; MELANI, A.; DOMENICI, M. R.; POPOLI, P.; GEIGER, J.; LOPES, L. V.; DE MENDONÇA, A. Adenosine A2A receptors and brain

injury: broad spectrum of neuroprotection, multifaceted actions and "fine tuning" modulation. **Prog. Neurobiol.,** v. 83, p. 310-331, 2007.

CHEN, J. F.; STEYN, S.; STAAL, R.; PETZER, J. P.; XU, K.; SCHYF, C. V.; CASTAGNOLI, K.; SONSALLA, P. K.; CASTAGNOLI, J. R. N.; SCHWARZCHILD, M. A. 2002. 8-(3-chlorostyryl) caffeine may attenuate MPTP neurotoxicity through dual actions of monoamine oxidase inhibition and A2A receptor antagonism. **J. Biol. Chem.,** v. 277, p. 36040-36044, 2004.

CHEN, J. F.; XU, K; PETZER, J. P.; STAAL, R.; XU, Y. H.; BEILSTEIN, M.; SONSALLA, P. K.; CASTAGNOLI, K.; CASTAGNOLI, N. JR.; SCHWARZSCHILD, M. A. Neuroprotection by caffeine and A(2A) adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. **J. Neurosci.,** v. 21, p. RC143, 2001.

CHRITIN, M.; BLANCHARD, V.; RAISMAN-VOZARI, R.; FEUERSTEIN, C.; AGID, Y.; JAVOY-AGID, F.; SAVASTA, M. DA uptake sites, D1 and D2 receptors, D2 and preproenkephalin mRNAs and Fos immunoreactivity in rat striatal subregions after partial dopaminergic degeneration. **Eur. J. Neurosci.,** v. 8, p. 2511-2520, 1996.

CHRITIN, M.; FEUERSTEIN, C.; SAVASTA, M. Time-course of changes in striatal levels of DA uptake sites, DA D2 receptor and preproenkephalin mRNAs after nigrostriatal dopaminergic denervation in the rat. **Brain Res. Mol. Brain Res.,** v. 19, p. 318-322, 1993.

CIRUELA, F.; ASADÓ, V.; RODRIGUES, R. J.; LUJÁN, R.; BURGUEÑO, J.; CANALS, M.; BORYCZ, J.; REBOLA, N.; GOLDBERG, S. R.; MALLOL, J.; CORTÉS, A.; CANELA, E. I.; LÓPEZ-GIMÉNEZ, J. F.; MILLIGAN, G.; LLUIS, C.; CUNHA, R. A.; FERRÉ, S.; FRANCO, R. Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers. **J. Neurosci.**, v. 26, p. 2080-2087, 2006.

CLARKSON, E. D.; EDWARDS-PRASAD, J.; FREED, C. R.; PRASAD, K. N. Immortalized dopamine neurons: A model to study neurotoxicity and neuroprotection. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,** v. 222, p. 157-163, 1999.

COHEN, G.; HEIKKILA, R. E. The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. **J. Biol. Chem.,** v. 249, p. 2447-2452, 1974.

CORREIA-DE-SÁ, P.; SEBASTIÃO, A. M.; RIBEIRO, J. A. Inhibitory and excitatory effects of adenosine receptor agonists on evoked transmitter release from phrenic nerve endings of the rat. **Br. J. Pharmacol.,** v. 103, p. 1614-1620, 1991.

CORSI, C.; MELANI, A.; BIANCHI, L.; PEDATA, F. Striatal A2A adenosine receptor antagonism differentially modifies striatal glutamate outflow *in vivo* in young and aged rats. **Neuroreport**, v. 11, p. 2591-2595, 2000.

COSTA, C. A. DA.; PAITEL, E.; VINCENT, B.; CHECLER, F. Alpha-synuclein lowers p53-dependent apoptotic response of neuronal cells. Abolishment by 6- hydroxydopamine and implication for Parkinson's disease. **J. Biol. Chem.,** v.277, p. 50980–50984, 2002.

CROSS, A.K.; WOODROOFE, M. N. Immunoregulation of microglial functional properties. **Microsc. Res. Tech.,** v. 54, p. 10-17, 2001.

CUNHA RA. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochem. Int.,** v. 38, p. 107-125, 2006.

CUNHA, R. A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochem. Int**., v. 38, p.107-125, 2001.

CUNHA, R. A. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A(1) receptor activation to A (2A) receptor blockade. **Purinergic Signal,** v.1, p. 111-134, 2005.

CUNHA, R. A.; FERRÉ, S.; VAUGEOIS, J. M.; CHEN, J. F. Potential therapeutic interest of adenosine $A_{2A}$ receptors in psychiatric disorders. **Curr. Pharm. Des.,** v. 14, p. 1512-1524, 2008.

CUNHA, R.; RIBEIRO, J. A. Adenosine A2A receptor facilitation of synaptic transmission in the CA1 area of the rat hippocampus requires protein kinase C but not protein kinase A activation. **Neurosci. Lett.,** v. 289, p.127-130, 2000.

DALL'IGNA, O. P.; FETT, P.; GOMES, M. W.; SOUZA, D. O.; CUNHA, R. A.; LARA, D. R. Caffeine and adenosine A(2a) receptor antagonists prevent beta-amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice. **Exp. Neurol.**, v. 203, p. 241-245, 2007.

DAMIANI D. **Mecanismos da Apoptose:** Manual de Patologia e Citopatologia Oncológica. 2004. Disponível em:<http://www.sistemanervoso.com>. Acesso em: 20 abr. 2009.

DAMIER, P.; HIRSCH, E. C.; ZHANG, P.; AGID, Y.; JAVOY-AGID, F. Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. **Neuroscience,** v. 52, p. 1-6, 1993.

DARÉ, E.; SCHULTE, G.; KAROVIC, O.; HAMMARBERG, C.; FREDHOLM, B. B. Modulation of glial cell functions by adenosine receptors. **Physiol. Behav.**, v. 92, p. 15-20, 2007.

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

DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. **Science,** v. 302, p. 819-822, 2003.

DEUMENS, R.; BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Exp. Neurol.,** v. 175, p. 303-317, 2002.

DEVASAGAYAM, T. P.; KAMAT, J. P.; MOHAN, H.; KESAVAN, P. C.Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1282, p. 63-70, 1996.

DÍAZ-CABIALE, Z.; HURD, Y.; GUIDOLIN, D.; FINNMAN, U. B.; ZOLI, M.; AGNATI, L. F.; VANDERHAEGHEN, J. J.; FUXE, K.; FERRÉ, S. Adenosine A2A agonist CGS 21680 decreases the affinity of dopamine D2 receptors for dopamine in human striatum. **Neuroreport**, v. 12, p. 1831-1834, 2001.

DIXON, A. K.; GUBITZ, A. K.; SIRINATHSINGHJI, D. J.; RICHARDSON, P. J.; FREEMAN, T. C. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. **Br. J. Pharmacol.,** v.118, p. 1461-1468, 1996.

DONG, X. X.; WANG, Y.; QIN, Z. H. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 30, p. 379-387, 2009.

DOYON J. Motor sequence learning and movement disorders. **Curr. Opin. Neurol.,** v. 21, p. 478-483, 2008.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol.,** v. 186, p. 421-431, 1990.

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

EISERICH, J. P.; PATEL, R. P.; O'DONNELL, V. B. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. **Mol. Aspects Med.**, v. 19, p. 221-357, 1998.

EL-AGAMEY, A.; CANTRELL, A.; LAND, E. J.; MCGARVEY, D. J.; TRUSCOTT, T. G. Are dietary carotenoids beneficial? Reactions of carotenoids with oxy-radicals and singlet oxygen. **Photochem. Photobiol. Sci.,** v. 3, p. 802-811, 2004.

FATOKUN, A. A.; STONE, T. W.; SMITH, R. A. Cell death in rat cerebellar granule neurons induced by hydrogen peroxide in vitro: mechanisms and protection by adenosine receptor ligands. **Brain Res.,** v. 1132, p. 193-202, 2007.

FELDMAN, R. S.; MEYER, J. S.; QUENZER, L. F. **Catecholamines, Principles of neuropsychopharmacology**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1997.

FERRE, S.; CIRUELA, F.; BORYCZ, J.; SOLINAS, M.; QUARTA, D.; ANTONIOU, K.; QUIROZ, C.; JUSTINOVA, Z.; LLUIS, C.; FRANCO, R.; GOLDBERG, S. R. Adenosine $A_1$-$A_{2A}$ receptor heteromers: new targets for caffeine in the brain. **Front Biosci.**, v. 13, p. 2391-2399, 2008.

FERRÉ, S.; CIRUELA, F.; QUIROZ, C.; LUJÁN, R.; POPOLI, P.; CUNHA, R. A.; AGNATI, L. F.; FUXE, K.; WOODS, A. S.; LLUIS, C.; FRANCO, R. Adenosine receptor heteromers and their integrative role in striatal function. **Sci. World J.**, v. 7, p. 74-85, 2007.

FERRÉ, S.; FREDHOLM, B. B.; MORELLI, M.; POPOLI, P.; FUXE, K. Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. **Trends Neurosci.,** v. 20, p. 482-487, 1997.

FERRÉ, S.; FUXE, K. Dopamine denervation leads to an increase in the intramembrane interaction between adenosine A2 and dopamine D2 receptors in the neostriatum. **Brain Res.,** v. 594, p. 124-130, 1992.

FERRÉ, S.; HERRERA-MARSCHITZ, M.; GRABOWSKA-ANDÉN, M.; UNGERSTEDT, U.; CASAS, M.; ANDÉN, N. E. Postsynaptic dopamine/adenosine interaction: I. Adenosine analogues inhibit dopamine D2-mediated behaviour in short-term reserpinized mice. **Eur. J. Pharmacol.,** v. 192, p. 25-30, 1991a.

FERRÉ, S.; HERRERA-MARSCHITZ, M.; GRABOWSKA-ANDÉN, M.; CASAS, M.; UNGERSTEDT, U.; ANDÉN, N. E. Postsynaptic dopamine/adenosine interaction: II. Postsynaptic dopamine agonism and adenosine antagonism of methylxanthines in short-term reserpinized mice. **Eur. J. Pharmacol.,** v. 192, p. 31-37, 1991b.

FERRÉ, S.; KARCZ-KUBICHA, M.; HOPE, B. T.; POPOLI, P.; BURGUEÑO, J.; GUTIÉRREZ, M. A.; CASADÓ, V.; FUXE, K.; GOLDBERG, S. R.; LLUIS, C.; FRANCO, R.; CIRUELA, F. Synergistic interaction between adenosine A2A and glutamate mGlu5 receptors: implications for striatal neuronal function. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 99, p. 11940-11945, 2002.

FERRE, S.; O'CONNOR, W. T.; SNAPRUD, P.; UNGERSTEDT, U.; FUXE, K. - Antagonistic interaction between adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors in the ventral striopallidal system. Implications for the treatment of schizophrenia. **Neuroscience,** v. 63, p. 765-773, 1994a.

FERRÉ, S.; POPOLI, P.; GIMÉNEZ-LLORT, L.; FINNMAN, U. B.; MARTÍNEZ, E.; SCOTTI, D. E.; CAROLIS, A.; FUXE, K. Postsynaptic antagonistic interaction between adenosine A1 and dopamine D1 receptors. **Neuroreport,** v. 6, p. 73-76, 1994b.

FERRE, S.; POPOLI, P.; GIMENEZ-LLORT, L.; RIMONDINI, R.; MULLER, C. E.; STROMBERG, I.; OGREN, S. O.; FUXE, K. Adenosine/dopamine interaction: implications for the treatment of Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat .Disord.**, v. 7, p. 235-241, 2001.

FERRÉ, S.; RIMONDINI, R.; POPOLI, P.; REGGIO, R.; PÈZZOLA, A.; HANSSON, A. C.; ANDERSSON, A.; FUXE, K. Stimulation of adenosine A1 receptors attenuates dopamine D1 receptor-mediated increase of NGFI-A, c-fos and jun-B mRNA levels in the dopamine-denervated striatum and dopamine D1 receptor-mediated turning behaviour. **Eur. J. Neurosci.,** v. 11, p. 3884-3892, 1999.

FEUERSTEIN, T. J. Presynaptic receptors for dopamine, histamine, and serotonin. **Hand. Exp. Pharmacol.**, v. 184, p. 289-338, 2008.

FINK, K. B.; GÖTHERT, M. 5-HT receptor regulation of neurotransmitter release. **Pharmacol. Rev.**, v. 59, p. 360-417, 2007.

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

FORNARETTO, M. G.; CACCIA, C.; CARON, M. G.; FARIELLO, R. G. Dopamine receptors status after unilateral nigral 6-OHDA lesion. Autoradiographic and in situ hybridization study in the rat brain. **Mol. Chem. Neuropathol.**, v. 19, p. 147-162, 1993.

FRANCIS, P. T.; PERRY, E. K. Cholinergic and other neurotransmitter mechanisms in Parkinson's disease, Parkinson's disease dementia, and dementia with Lewy bodies. **Mov. Disord.**, v. 17, p. 351-357, 2007.

FREDHOLM, B. B.; ALTIOK, N. Adenosine A2B receptor signalling is altered by stimulation of bradykinin or interleukin receptors in astroglioma cells. **Neurochem. Int.,** v. 25, p. 99-102, 1994.

FREDHOLM, B. B.; BÄTTIG, K.; HOLMÉN, J.; NEHLIG, A.; ZVARTAU, E. E. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacol. Rev.,** v. 51, p. 83-133, 1999.

FREDHOLM, B. B.; CHEN, J. F.; CUNHA, R. A.; SVENNINGSSON, P.; VAUGEOIS, J. M. Adenosine and brain function. **Int. Rev. Neurobiol.**, v. 63, p. 191-270, 2005.

FREDHOLM, B. B.; IJZERMAN, A. P.; JACOBSON, K. A.; KLOTZ, K. N.; LINDEN, J. Nomenclature and classification of adenosine receptors. International Union of Pharmacology. XXV. **Pharmacol. Rev.,** v. 53, p. 527-552, 2001.

FREDHOLM, B. B.; SVENNINGSSON, P. Adenosine-dopamine interactions: development of a concept and some comments on therapeutic possibilities. **Neurology**, v. 61, p. 5-9, 2003.

FREDHOLM, B.B.; CHERN, Y.; FRANCO, R.; SITKOVSKY, M. Aspects of the general biology of adenosine A2A signaling. **Prog.Neurobiol.,** v. 83, p. 263-276, 2007.

FREINBICHLER, W.; BIANCHI, L.; COLIVICCHI, M. A.; BALLINI, C.; TIPTON, K. F.; LINERT, W.; CORTE, L. D. The detection of hydroxyl radicals *in vivo*. **J. Inorg. Biochem.,** v. 102, p. 1329-1333, 2008.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells:** A Manual of Basic Technique**.** 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 1994.

FUXE, K.; FERRÉ, S.; GENEDANI, S.; FRANCO, R.; AGNATI, L. F. Adenosine receptor-dopamine receptor interactions in the basal ganglia and their relevance for brain function. **Physiol. Behav.**, v. 92, p. 210-217, 2007.

FUXE, K.; FERRÉ, S.; ZOLI, M.; AGNATI, L. F. Integrated events in central dopamine transmission as analyzed at multiple levels. Evidence for intramembrane adenosine A2A/dopamine D2 and adenosine A1/dopamine D1 receptor interactions in the basal ganglia. **Brain Res. Brain Res. Rev.,** v. 26, p. 258-273, 1998.

FUXE, K.; MARCELLINO, D.; GENEDANI, S.; AGNATI, L. Adenosine A(2A) receptors, dopamine D(2) receptors and their interactions in Parkinson's disease. **Mov. Disord.**, v. 22, p. 1990-2017, 2007.

FUXE, K.; STROMBERG, I.; POPOLI, P.; RIMONDINI-GIORGINI, R. Adenosine receptors and Parkinson's disease. Relevance of antagonistic adenosine and dopamine receptor interactions in the striatum. **Adv. Neurol.**, v. 86, p. 345-353, 2001.

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

GALEFFI, F.; BIANCHI, L.; BOLAM, J. P.; DELLA CORTE, L. The effect of 6-hydroxydopamine lesions on the release of amino acids in the direct and indirect pathways of the basal ganglia: a dual microdialysis probe analysis. **Eur. J. Neurosci.,** v. 18, p. 856-868, 2003.

GERFEN, C. R. D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum animal model of Parkinson's disease. **Neuroscientist,** v. 9, p. 455-462, 2003.

GERFEN, C. R. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. **Annu. Rev. Neurosci**., v. 15, p. 285-320, 1992.

GESSI, S.; VARANI, K.; MERIGHI, S.; CATTABRIGA, E.; PANCALDI, C.; SZABADKAI, Y.; RIZZUTO, R.; KLOTZ, K. N.; LEUNG, E.; MAC LENNAN, S.; BARALDI, P. G.; BOREA, P. A. Expression, pharmacological profile, and functional coupling of A2B receptors in a recombinant system and in peripheral blood cells using a novel selective antagonist radioligand, [3H]MRE 2029-F20. **Mol. Pharmacol.,** v. 67, p. 2137-2147, 2005.

GINÉS, S.; HILLION, J.; TORVINEN, M.; LE CROM, S.; CASADÓ, V.; CANELA, E. I.; RONDIN, S.; LEW, J. Y.; WATSON, S.; ZOLI, M.; AGNATI, L. F.; VERNIERA, P.; LLUIS, C.; FERRÉ, S.; FUXE, K.; FRANCO, R. Dopamine D1 and adenosine A1 receptors

form functionally interacting heteromeric complexes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**., v. 97, p. 8606-8611, 2000.

GINSBORG, B. L.; HIRST, G. D. The effect of adenosine on the release of the transmitter from the phrenic nerve of the rat. **J. Physiol.,** v. 224, p. 629-645, 1972.

GOLEMBIOWSKA, K.; DZIUBINA, A. Effect of adenosine A2A receptor antagonist 8-(3-chlorostyryl) caffeine on L-dopa biotransformation in rat striatum. **Brain Res.**, v. 998, p. 208-217, 2004.

GOMEZ-LAZARO, M.; GALINDO, M. F.; CONCANNON, C. G.; SEGURA, M. F.; FERNANDEZ-GOMEZ, F. J.; LLECHA, N.; COMELLA, J. X.; PREHN, J. H.; JORDAN, J. 6-Hydroxydopamine activates the mitochondrial apoptosis pathway through p38 MAPK-mediated, p53-independent activation of Bax and PUMA. **J. Neurochem.**, v. 104, p. 1599-1612, 2008.

GONZALES, R. A.; JAWORSKI, J. N. Alcohol and glutamate.Alcohol. **Health Res. World,** v. 21, p. 120-127, 1997.

GOTOH, T.; SHIKAMA, K. Generation of the superoxide radical during autoxidation of oxymyoglobin. **J. Biochem.,** v. 80, p. 397-399, 1976.

GREEN, L. C.; TANNEMBAUN, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, p. 56-58, 1981.

GREENAMYRE, J. T. Glutamatergic influences on the basal ganglia. **Clin. Neuropharmacol.,** v. 24, p. 65-70, 2001.

GRONDIN, R.; BEDARD, P. J.; HADJ AHAR, A.; GREGOIRE, L.; MORI, A.; KASE, H. Antiparkinsonian effect of a new selective adenosine A2A receptor antagonist in MPTP-treated monkeys. **Neurology**, v. 52, p. 1673-1677, 1999.

GUBELLINI, P.; PICCONI, B.; BARI, M.; BATTISTA, N.; CALABRESI, P.; CENTONZE, D.; BERNARDI, G.; FINAZZI-AGRÒ, A.; MACCARRONE, M. Experimental parkinsonism alters endocannabinoid degradation: implications for striatal glutamatergic transmission. **J. Neurosci.,** v. 22, p. 6900-6907, 2002.

HALD, A.; LOTHARIUS, J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? **Exp. Neurol.,** v. 193, p. 279-290, 2005.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **Lancet.** v. 344, p. 721-724, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol.,** v. 186, p.1-85, 1990.

HAMILTON, S. E.; NATHANSON, N. M. The M1 receptor is required for muscarinic activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in murine cerebral cortical neurons. **J. Biol. Chem.,** v. 276, p. 15850– 15855, 2001.

HAN, B. S.; HONG, H. S.; CHOI, W. S.; MARKELONIS, G. J.; OH, T. H.; OH, Y. J. Caspase-dependent and -independent cell death pathways in primary cultures of mesencephalic dopaminergic neurons after neurotoxin treatment. **J. Neurosci.**, v. 23, p. 5069-5078, 2003.

HANROTT, K.; GUDMUNSEN, L.; O'NEILL, M. J.; WONNACOTT, S. 6-hydroxydopamine-induced apoptosis is mediated via extracellular auto-oxidation and caspase 3-dependent activation of protein kinase Cdelta. **J. Biol. Chem.,** v. 281, p. 5373-5382, 2006.

HATZIPETROS, T.; YAMAMOTO, B. K. Dopaminergic and GABAergic modulation of glutamate release from rat subthalamic nucleus efferents to the substantia nigra. **Brain Res.,** v.1076, p. 60-67, 2006.

HAUSER, R. A.; SCHWARZSCHILD, M. A. Adenosine A2A receptor antagonists for Parkinson's disease: rationale, therapeutic potential and clinical experience. **Drugs Aging,** v. 22, p. 471-482, 2005.

HAUSER, R. A.; SHULMAN, L. M.; TRUGMAN, J. M.; ROBERTS, J. W.; MORI, A.; BALLERINI, R.; SUSSMAN, N. M. Study of istradefylline in patients with Parkinson's disease on levodopa with motor fluctuations. Istradefylline 6002-US-013 Study Group. **Mov Disord.,** v. 23, p. 2177-2185, 2008.

HIRSCH, E. C.; HUNOT, S.; HARTMANN, A. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat. Disord.,** p.9-15, 2005.

HORNYKIEWICZ, O. Biochemical aspects of Parkinson's disease. **Neurology,** v. 51, p. 2-9, 1998.

HUANG, Z. L.; QU, W. M.; EGUCHI, N.; CHEN, J. F.; SCHWARZSCHILD, M. A.; FREDHOLM, B. B.; URADE, Y.; HAYAISHI, O. Adenosine A2A, but not A1, receptors mediate the arousal effect of caffeine. **Nat. Neurosci.,** v. 8, p. 858-859, 2005.

ICHITANI, Y.; OKAMURA, H.; NAKAHARA, D.; NAGATSU, I.; IBATA, Y. Biochemical and immunocytochemical changes induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine injection in the rat nigrostriatal dopamine neuron system: evidence for cell death in the substantia nigra. **Exp Neurol.,** v. 130, p. 269–278, 1994.

IKEDA, K.; KUROKAWA, M.; AOYAMA, S.; KUWANA, Y. Neuroprotection by adenosine A2A receptor blockade in experimental models of Parkinson's disease. **J. Neurochem.**, v. 80, p. 262-270, 2002.

ISHIWATA, K.; MISHINA, M.; KIMURA, Y.; ODA, K.; SASAKI, T.; ISHII, K. First visualization of adenosine A(2A) receptors in the human brain by positron emission tomography with [11C]TMSX. **Synapse**, v. 55, p. 133–136, 2005.

JAKOBY, W. B.; ZIEGLER, D. M. The enzymes of detoxication. **J. Biol. Chem**., v. 265, p. 20715-20718, 1990.

JENNER, P. A2A antagonists as novel non-dopaminergic therapy for motor dysfunction in PD. **Neurology,** v. 61, p. S32-38, 2003.

JOGHATAIE, M. T.; ROGHANI, M.; NEGAHDAR, F.; HASHEMI, L. Protective effect of caffeine against neurodegeneration in a model of Parkinson's disease in rat: behavioral and histochemical evidence. **Parkinsonism Relat. Disord.,** v. 10, p. 465-468, 2004.

JONES, P. A.; SMITH, R. A.; STONE, T. W. Protection against hippocampal kainate excitotoxicity by intracerebral administration of an adenosine A2A receptor antagonist. **Brain Res.,** v. 800, p. 328-335, 1998.

KALDA, A.; YU, L.; OZTAS, E.; CHEN, J. F. Novel neuroprotection by caffeine and adenosine A(2A) receptor antagonists in animal models of Parkinson's disease. **J. Neurol. Sci.**, v. 248, p. 9-15, 2006.

KANDA, T.; JACKSON, M. J.; SMITH, L. A.; PEARCE, R. K.; NAKAMURA, J.; KASE, H.; KUWANA, Y.; JENNER, P. Combined use of the adenosine A(2A) antagonist KW-6002 with L-DOPA or with selective D1 or D2 dopamine agonists increases antiparkinsonian activity but not dyskinesia in MPTP-treated monkeys. **Exp. Neurol.,** v. 162, p. 321-327, 2000.

KANNARI, K.; TANAKA, H.; MAEDA, T.; TOMIYAMA, M.; SUDA, T.; MATSUNAGA, M. Reserpine pretreatment prevents increases in extracellular striatal dopamine following L-DOPA administration in rats with nigrostriatal denervation. **J. Neurochem.**, v. 74, p. 263-269, 2000.

KARSTAEDT, P. J.; KERASIDIS, H.; PINCUS, J. H.; MELONI, R.; GRAHAM, J.; GALE, K. Unilateral destruction of dopamine pathways increases ipsilateral striatal serotonin turnover in rats. **Exp. Neurol.**, v. 126, p. 25-30, 1994.

KELSEY, J. E.; LANGELIER, N. A.; ORIEL, B. S.; REEDY, C. The effects of systemic, intrastriatal, and intrapallidal injections of caffeine and systemic injections of $A_{2A}$ and $A_1$ antagonists on forepaw stepping in the unilateral 6-OHDA-lesioned rat. **Psychopharmacology,** v. 201, p. 529-539, 2009.

KERWIN, R.; NAYLOR, R.; TRAVIS, M. J.; SIMONS, O.; MOORE, P. K. As drogas e o sistema nervoso. In: PAGE, C. P.; CURTIS, M. J.; SUTTER, M. C.; WALKER, M. J. A.; HOFFMAN, B. B. (Ed.). **Farmacologia Integrada.** São Paulo: Manole, 1999. p. 103.

KESSLER, R. M.; ANSARI, M. S.; SCHMIDT, D. E.; DE PAULIS, T.; CLANTON, J. A.; INNIS, R.; TIKRITI, M.; MANNING, R. G.; GILLESPIE, D. High affinity dopamine $D_2$ receptors. **Life Sci.**, v. 49, p. 617-629, 1991.

KIM, Y.S.; JOO, W.S.; JIN, B.K.; CHO, Y.H.; BAIK, H.H. AND PARK, C.W. Melatonin protects against 6-OHDA-induced neuronal death of nigrostriatal dopaminergic system. **Neuroreport,** v. 9, p. 2387-2390, 1998.

KISH, S. J.; RAJPUT, A.; GILBERT, J.; ROZDILSKY, B.; CHANG, L. J.; SHANNAK, K.; HORNYKIEWICZ, O. Elevated gamma-aminobutyric acid level in striatal but not extrastriatal brain regions in Parkinson's disease: correlation with striatal dopamine loss. **Ann. Neurol.,** v. 20, p. 26-31, 1986.

KISH, S.; RAJPUT, A.; GILBERT, J.; ROZDILSKY, B.; CHANG, L. J.; SHANNAK, K.; HORNYKIEWICZ, O. GABA-dopamine relationship in Parkinson's disease striatum. **Adv. Neurol.,** v. 45, p. 75-77, 1987.

KOGA, K.; KUROKAWA, M.; OCHI, M.; NAKAMURA, J.; KUWANA, Y. Adenosine A(2A) receptor antagonists KF17837 and KW-6002 potentiate rotation induced by dopaminergic drugs in hemi-Parkinsonian rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 408, p. 249-255, 2000.

KUHAR, M. J.; COUCEYRO, P. R.; LAMBERT P. D. Catecholamines. In: SIEGEL, G. J.; AGRANOFF, B. W.; ALBERS, R. W.; FISHER, S. K.; UHLER, M. D. (Ed.). **Basic Neurochemistry:** Molecular, Cellular and Medical aspects. 6th ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p. 243.

KULICH, S. M.; CHU, C. T. Role of reactive oxygen species in extracellular signal-regulated protein kinase phosphorylation and 6-hydroxydopamine cytotoxicity. **J. Biosci.,** v. 28, p. 83-89, 2003.

KULL, B.; SVENNINGSSON, P.; FREDHOLM, B. B. Adenosine A(2A) receptors are colocalized with and activate g(olf) in rat striatum. **Mol. Pharmacol.,** v. 58, p. 771-777, 2000.

KUMAR, R.; AGARWAL, A. K.; SETH, P. K. Free radical-generated neurotoxicity of 6-hydroxydopamine. **J. Neurochem.,** v. 64, p. 1703-1707, 1995.

LANGER, S. Z.; PIMOULE, C.; REYNOLDS, G. P.; SHOEMAKER, H. Dopaminergic denervation does not affect [3H]SCH23390 binding in rat striatum: similarities to Parkinson's disease. **Br. J. Phamacol.,** v. 87, p. 161, 1986.

LAUTERBACH, E. C. The neuropsychiatry of Parkinson's disease and related disorders. **Psychiatr. Clin. North Am.,** v. 27, p. 801-825, 2004.

LAWLER, C. P.; GILMORE, J. H.; WATTS, V. J.; WALKER, Q. D.; SOUTHERLAND, S. B.; COOK, L. L.; MATHIS, C. A.; MAILMAN, R. B. Interhemispheric modulation of dopamine receptor interactions in unilateral 6-OHDA rodent model. **Synapse,** v. 21, p. 299-311, 1995.

LEE C. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorpting capacity and inhibition of LDL peroxidation. **Clin. Chim. Acta**., v. 295, p. 141–154, 2000.

LEE, Y. C.; CHIEN, C. L.; SUN, C. N.; HUANG, C. L.; HUANG, N.K.; CHIANG, M.C.; LAI, H. L.; LIN, Y. S.; CHOU, S. Y.; WANG, C. K.; TAI, M. H.; LIAO, W. L.; LIN, T. N.; LIU, F. C.; CHERN, Y. Characterization of the rat A2A adenosine receptor gene: a 4.8-kb promoter-proximal DNA fragment confers selective expression in the central nervous system. **Eur. J. Neurosci.**, v. 18, p. 1786-1796, 2003.

LEIST, M.; JAATTELA, M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.,** v. 2, p. 589-598, 2001.

LEVY, O. A.; MALAGELADA, C.; GREENE, L. A. Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps. **Apoptosis**, v. 14, p. 478-500, 2009.

LEWITT, P. A.; GUTTMAN, M.; TETRUD, J. W.; TUITE, P. J.; MORI, A.; CHAIKIN, P.; SUSSMAN, N. M. Adenosine A2A receptor antagonist istradefylline (KW-6002) reduces "off" time in Parkinson's disease: a double-blind, randomized, multicenter clinical trial (6002-US-005). 6002-US-005 Study Group. **Ann. Neurol.,** v. 63, p. 295-302, 2008.

LI, X. X.; NOMURA, T.; AIHARA, H.; NISHIZAKI, T. Adenosine enhances glial glutamate efflux via A2a adenosine receptors. **Life Sci.,** v. 68, p. 1343-1350, 2001.

LIU, Y. Understanding the Biological Activity of Amyloid Proteins in Vitro: From Inhibited Cellular MTT Reduction to Altered Cellular Cholesterol Homeostatis, Prog. Neuropsychopharmacol. **Biol. Psychiatry,** v. 23, p. 377-395, 1999.

LOPES, L. V.; CUNHA, R. A.; RIBEIRO, J. A. Cross talk between A(1) and A(2A) adenosine receptors in the hippocampus and cortex of young adult and old rats. **J. Neurophysiol.**, v. 82, p. 3196-3203, 1999.

LOTHARIUS, J.; DUGAN, L. L.; O'MALLEY, K. L. Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. **J. Neurosci.,** v. 19, p. 1284-1293, 1999.

LOWRY, H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurements with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem**., v. 193, p. 265–275, 1951.

LUNDBLAD, M.; VAUDANO, E.; CENCI, M. A. Cellular and behavioural effects of the adenosine A2a receptor antagonist KW-6002 in a rat model of l-DOPA-induced dyskinesia. **J. Neurochem.**, v. 84, p. 1398-1410, 2003.

LUTHMAN, J.; HERRERA-MARSCHITZ, M.; LINDQVIST, E. Unilateral neonatal intracerebroventricular 6-hydroxydopamine administration in rats: I. Effects on spontaneous and drug-induced rotational behaviour and on postmortem monoamine levels. **Psychopharmacology**, v. 116, p. 443-450, 1994.

MARCHI, M.; RAITERI, L.; RISSO, F.; VALLARINO, A.; BONFANTI, A.; MONOPOLI, A.; ONGINI, E.; RAITERI, M. Effects of adenosine A1 and A2A receptor activation on the evoked release of glutamate from rat cerebrocortical synaptosomes. **Br. J. Pharmacol.**, v. 136, p. 434-440, 2002.

MARCOLI, M.; RAITERI, L.; BONFANTI, A.; MONOPOLI, A.; ONGINI, E.; RAITERI, M.; MAURA, G. Sensitivity to selective adenosine A1 and A2A receptor antagonists of the release of glutamate induced by ischemia in rat cerebrocortical slices. **Neuropharmacology,** v. 45, p. 201-210, 2003.

MARSHALL, J. F.; NAVARRETE, R.; JOYCE, J. N. Decreased striatal D1 binding density following mesotelencephalic 6-hydroxydopamine injections: an autoradiographic analysis. **Brain Res.,** v. 493, p. 247-257, 1989.

MASSIEU, L.; TAPIA, R. Glutamate uptake impairment and neuronal damage in young and aged rats *in vivo***. J. Neurochem.**, v. 69, p. 1151-1160, 1997.

MATSUBARA, E.; SHOJI, M.; ABE, K. The treatment of Parkinson's disease--adenosine A2A receptor antagonists. **Nippon Rinsho,** v. 60, p. 112-116, 2002.

MATSUYA, T.; TAKUMA, K.; SATO, K.; ASAI, M.; MURAKAMI, Y.; MIYOSHI, S.; NODA, A.; NAGAI, T.; MIZOGUCHI, H.; NISHIMURA, S.; YAMADA, K. Synergistic effects of adenosine A2A antagonist and L-DOPA on rotational behaviors in 6-hydroxydopamine-induced hemi-Parkinsonian mouse model. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 103, p. 329-332, 2007.

MATTSON, M. P. Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. **Ann. NY Acad. Sci.,** v. 1144, p. 97-112, 2008.

MAZZIO, E. A.; REAMS, R. R.; SOLIMAN, K. F. The role of oxidative stress, impaired glycolysis and mitochondrial respiratory redox failure in the cytotoxic effects of 6-hydroxydopamine in vitro. **Brain Res.,** v. 1004, p. 29-44, 2004.

MCGEER, P.L; MCGEER, E. G. Glial reactions in Parkinson's disease. **Mov. Disord.,** v. 23, p. 474-483, 2008.

MELTZER, H. Y.; MATSUBARA, S.; LEE, J. C. Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine $D_1$- and $D_2$- and serotonin $_2$ pK1 values. **J. Pharmacol. Exp. Ther**., v. 251, p. 238-246, 1989.

MILLER, R. L.; JAMES-KRACKE, M.; SUN, G. Y.; SUN, A. Y. Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's disease. **Neurochem. Res.**, v. 34, p. 55-65, 2009.

MINGHETTI, L.; GRECO, A.; POTENZA, R. L.; PEZZOLA, A.; BLUM, D.; BANTUBUNGI, K.; POPOLI, P. Effects of the adenosine A2A receptor antagonist SCH 58621 on cyclooxygenase-2 expression, glial activation, and brain-derived neurotrophic factor availability in a rat model of striatal neurodegeneration. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.,** v. 66, p. 363-371, 2007.

MISHRA, R. K.; GARDNER, E. L.; KATZMAN, R.; MAKMAN, M. H. Enhancement of dopamine-stimulated adenylate cyclase activity in rat caudate after lesions in substantia nigra: evidence for denervation supersensitivity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 71, p. 3883-3887, 1974.

MISHRA, R. K.; MARSHALL, A. M.; VARMUZA, S. L. Supersensitivity in rat caudate nucleus: effects of 6-hydroxydopamine on the time course of dopamine receptor and cyclic AMP changes. **Brain Res.,** v. 200, p. 47-57, 1980.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. **J. Biol. Chem.,** v. 247, p. 6960-6962, 1972a.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J. Biol. Chem.,** v. 247, p. 3170-3175, 1972b.

MIYOSHI, E.; WIETZIKOSKI, S.; CAMPLESSEI, M.; SILVEIRA, R.; TAKAHASHI, R. N.; DA CUNHA, C. Impaired learning in a spatial working memory version and in a cued version of the water maze in rats with MPTP-induced mesencephalic dopaminergic lesions. **Brain Res. Bull.,** v. 58, p. 41-47, 2002.

MOLINA-HOLGADO, E.; DEWAR, K. M.; GRONDIN, L.; VAN GELDER, N. M.; READER, T. A. Changes of amino acid and monoamine levels after neonatal 6-hydroxydopamine denervation in rat basal ganglia, substantia nigra, and Raphe nuclei. **J. Neurosci. Res.**, v. 35, p. 409-418, 1993.

MONOPOLI, A.; LOZZA, G.; FORLANI, A.; MATTAVELLI, A.; ONGINI, E. Blockade of adenosine A2A receptors by SCH 58261 results in neuroprotective effects in cerebral ischaemia in rats. **Neuroreport,** v. 9, p. 3955-3959, 1998.

MONTI, J. M..; JANTOS, H. The roles of dopamine and serotonin, and of their receptors, in regulating sleep and waking. **Prog Brain Res.**, v. 172, p. 625-646, 2008.

MORELLI, M. Adenosine A2A antagonists: potential preventive and palliative treatment for Parkinson's disease. **Exp. Neurol.,** v. 184, p. 20–23, 2003.

MORELLI, M.; PINNA, A. Interaction between dopamine and adenosine A2A receptors as a basis for the treatment of Parkinson's disease. **Neurol. Sci.**, v. 22, p. 71-72, 2001.

MORELLI, M.; PINNA, A.; WARDAS, J.; DI CHIARA, G. Adenosine A2 receptors stimulate c-fos expression in striatal neurons of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. **Neuroscience**, v. 67, p. 49-55, 1995.

MOSLEY, R. L.; BENNER, E. J.; KADIU, I.; THOMAS, M.; BOSKA, M. D.; HASAN, K.; LAURIE, C.; GENDELMAN, H. E. Neuroinflammation, Oxidative Stress and the Pathogenesis of Parkinson's Disease. **Clin. Neurosci. Res.,** v. 6, p. 261-281, 2006.

MURATA, M. Levodopa in the early treatment of Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat. Disord.,** v. 15, p. 17-20, 2009.

NAGATSU, T.; MOGI, M.; ICHINOSE, H.; TOGARI, A. Cytokines in Parkinson's disease. **J. Neural Transm. Suppl.,** v. 58, p. 143-151, 2000.

NAGATSUA, T.; SAWADAB, M. L-dopa therapy for Parkinson's disease: past, present, and future. **Parkinsonism Relat. Disord.,** v. 15, p. 3-8, 2009.

NAKAMURA, T.; LIPTON, S. A. Cell death: protein misfolding and neurodegenerative diseases. **Apoptosis**, v. 14, p. 455-468, 2009.

NARANG, N.; WAMSLEY, J. K. Time dependent changes in DA uptake sites, D1 and D2 receptor binding and mRNA after 6-OHDA lesions of the medial forebrain bundle in the rat brain. **J. Chem. Neuroanat.,** v. 9, p. 41-53, 1995.

NEVE, K. A.; NEVE, R. L.; FIDEL, S.; JANOWSKY, A.; HIGGINS, G. A. Increased abundance of alternatively spliced forms of D2 dopamine receptor mRNA after denervation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 88, p. 2802-2806, 1991.

NICHOLLS, D. G. Oxidative stress and energy crises in neuronal dysfunction. **Ann. NY Acad. Sci.,** v. 1147, p. 53-60, 2008.

NICHOLSON, S. L.; BROTCHIE, J. M. 5-hydroxytryptamine (5-HT, serotonin) and Parkinson's disease - opportunities for novel therapeutics to reduce the problems of levodopa therapy. **Eur. J. Neurol.,** v. 3, p. 1-6, 2002.

OBESO, J. A.; RODRÍGUEZ-OROZ, M. C.; BENITEZ-TEMINO, B.; BLESA, F. J.; GURIDI, J.; MARIN, C.; RODRIGUEZ, M. Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. **Mov. Disord.**, v. 23, p. 548-559, 2008.

OBESO, J. A.; RODRÍGUEZ-OROZ, M. C.; RODRÍGUEZ, M.; ARBIZU, J.; GIMÉNEZ-AMAYA, J. M. The basal ganglia and disorders of movement: pathophysiological mechanisms. **News Physiol. Sci.,** v. 17, p. 51-55, 2002.

OBESO, J. A.; RODRIGUEZ-OROZ, M. C.; RODRÍGUEZ, M.; LANCIEGO, J. L.; ARTIEDA, J.; GONZALO, N.; OLANOW, C. W. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. **Trends Neurosci**., v. 23, p. s8-s19, 2000.

OCHI, M.; KOGA, K.; KUROKAWA, M.; KASE, H.; NAKAMURA, J.; KUWANA, Y. Systemic administration of adenosine A(2A) receptor antagonist reverses increased GABA release in the globus pallidus of unilateral 6-hydroxydopamine-lesioned rats: a microdialysis study. **Neuroscience**, v. 100, p. 53-62, 2000.

OLAH, M. E.; STILES, G. L. The role of receptor structure in determining adenosine receptor activity. **Pharmacol. Ther.**, v. 85, p. 55-75, 2000.

OLANOW, C. W.; FAHN, S.; LANGSTON, J. W.; GODBOLD, J. Selegiline and mortality in Parkinson's disease. **Ann. Neurol.,** v. 40, p. 841-845, 1996.

OMONI, A. O.; ALUKO, R. E. Soybean foods and their benefits: potential mechanisms of action. **Nutr. Rev.,** v. 63, p. 272-283, 2005.

ONGINI, E.; MONOPOLI, A.; CACCIARI, B.; BARALDI, P. G. Selective adenosine A2A receptor antagonists. **Farmaco,** v. 56, p. 87-90, 2001.

O'REGAN, M. H.; SIMPSON, R. E.; PERKINS, L. M.; PHILLIS, J. W. The selective A2 adenosine receptor agonist CGS 21680 enhances excitatory transmitter amino acid release from the ischemic rat cerebral cortex. **Neurosci. Lett.**, v. 138, p. 169-172, 1992.

OZTAS, E.; KALDA, A.; XU, K.; IRRIZARY, M. C.; SCHWARZSCHILD, M. A.; CHEN, J. F. **Caffeine attenuates MPTP-induced loss of dopaminergic neurons in substantia nigra in mice**. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2002.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates.** 2nd ed. New York: Academic Press, 1986.

PÉREZ, V.; SOSTI, V.; RUBIO, A.; BARBANOJ, M.; RODRÍGUEZ-ALVAREZ, J.; KULISEVSKY, J. Modulation of the motor response to dopaminergic drugs in a parkinsonian model of combined dopaminergic and noradrenergic degeneration. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 576, p. 83-90, 2007.

PERRY, T. L.; JAVOY-AGID, F.; AGID, Y.; FIBIGER, H. C. Striatal GABAergic neuronal activity is not reduced in Parkinson's disease. **J. Neurochem**, v. 40, p. 1120-1123, 1983.

PETZER, J. P.; STEYN, S.; CASTAGNOLI, K. P.; CHEN, J. F.; SCHWARZSCHILD, M. A.; VAN DER SCHYF, C. J.; CASTAGNOLI, N. Inhibition of monoamine oxidade B by selective adenosine A2A receptor antagonists. **Bioorg. Med. Chem.,** v. 11, p. 1299-1310, 2003.

PHILLIS, J. W. The effects of selective A1 and A2a adenosine receptor antagonists on cerebral ischemic injury in the gerbil. **Brain Res.**, v. 705, p. 79-84, 1995.

PIERRI, M.; VAUDANO, E.; SAGER, T.; ENGLUND, U. KW-6002 protects from MPTP induced dopaminergic toxicity in the mouse. **Neuropharmacology**, v. 48, p. 517-524, 2005.

PINNA, A.; CORSI, C.; CARTA, A. R.; VALENTINI, V.; PEDATA, F.; MORELLI, M. Modification of adenosine extracellular levels and adenosine A(2A) receptor mRNA by dopamine denervation. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 446, p. 75-82, 2002.

PINNA, A.; FENU, S.; MORELLI, M. Motor stimulant effects of the adenosine A2A receptor antagonist SCH58261 do not develop tolerance after repeated treatments in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. **Synapse**, v. 39, p. 233-238, 2001.

PINNA, A.; WARDAS, J.; SIMOLA, N.; MORELLI, M. New therapies for the treatment of Parkinson's disease: adenosine A2A receptor antagonists. **Life Sci.**, v. 77, p. 3259-3267, 2005.

PLATT, S. R The role of glutamate in central nervous system health and disease--a review. **Vet J.,** v. 173, p. 278-286, 2007.

POPOLI, P.; BETTO, P.; REGGIO, R.; RICCIARELLO, G. Adenosine A2A receptor stimulation enhances striatal extracellular glutamate levels in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 287, p. 215-217, 1995.

POPOLI, P.; GIMÉNEZ-LLORT, L.; PEZZOLA, A.; REGGIO, R.; MARTÍNEZ, E.; FUXE, K.; FERRÉ, S. Adenosine A1 receptor blockade selectively potentiates the motor effects induced by dopamine D1 receptor stimulation in rodents. **Neurosci. Lett.,** v. 218, p. 209-213, 1996.

PRITCHARD, A. L.; RATCLIFFE, L.; SOROUR, E.; HAQUE, S.; HOLDER, R.; BENTHAM, P.; LENDON, C. L. Investigation of dopamine receptors in susceptibility to behavioural and psychological symptoms in Alzheimer's disease. **Int. J. Geriatr. Psychiatry,** v26, p. 257-60, 2009.

PRZEDBORSKI, S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat. Disord.**, v. 11, p. 3-7, 2005.

PRZEDBORSKI, S.; LEVIVIER, M.; JIANG, H.; FERREIRA, M.; JACKSON-LEWIS, V.; DONALDSON, D.; TOGASAKI, D. M. Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. **Neuroscience,** v. 67, p. 631-647, 1995.

QUARTA, D.; BORYCZ, J.; SOLINAS, M.; PATKAR, K.; HOCKEMEYER, J.; CIRUELA, F.; LLUIS, C.; FRANCO, R.; WOODS, A. S.; GOLDBERG, S. R.; FERRÉ, S. Adenosine receptor-mediated modulation of dopamine release in the nucleus accumbens depends on glutamate neurotransmission and N-methyl-D-aspartate receptor stimulation. **J. Neurochem.**, v. 91, p. 873-880, 2004.

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

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RAO, K. S. Free radical induced oxidative damage to DNA: relation to brain aging and neurological disorders. **Indian J. Biochem. Biophys.**, v. 46, p. 9-15, 2009.

RAVINA, B. M.; FAGAN, S. C.; HART, R. G.; HOVINGA, C. A.; MURPHY, D. D.; DAWSON, T. M.; MARLER, J. R. Neuroprotective agents for clinical trials in Parkinson's disease: a systematic assessment. **Neurology,** v. 60, p. 1234-1240, 2003.

REBOLA, N.; PINHEIRO, P. C.; OLIVEIRA, C. R; MALVA, J. O.; CUNHA, R. A. Subcellular localization of adenosine A(1) receptors in nerve terminals and synapses of the rat hippocampus. **Brain Res.,** v. 987, p. 49-58, 2003.

REBOLA, N.; RODRIGUES, R. J.; LOPES, L. V.; RICHARDSON, P. J.; OLIVEIRA, C, R.; CUNHA, R. A. Adenosine A1 and A2A receptors are co-expressed in pyramidal neurons and co-localized in glutamatergic nerve terminals of the rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 133, p. 79-83, 2005.

RIBEIRO, J. A.; SEBASTIAO, A.M.; DE MENDONCA, A. Participation of adenosine receptors in neuroprotection. **Drug News Perspect.**, v. 16, p. 80-86, 2003.

ROSE, S.; JACKSON, M.J.; SMITH, L.A.; STOCKWELL, K.; JOHNSON, L.; CARMINATI, P.; JENNER, P. The novel adenosine A2A receptor antagonist ST1535 potentiates the effects of a threshold dose of L-DOPA in MPTP treated common marmosets. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 546, p. 82-87, 2006.

ROSI, S.; MCGANN, K.; HAUSS-WEGRZYNIAK, B.; WENK, G. L. The influence of brain inflammation upon neuronal adenosine A2B receptors. **J. Neurochem.,** v. 86, p. 220-227, 2003.

ROSIN, D. L.; HETTINGER, B. D.; LEE, A.; LINDEN, J. Anatomy of adenosine A2A receptors in brain: morphological substrates for integration of striatal function. **Neurology**, v. 61, p. 12-18, 2003.

ROSS, G. W.; ABBOTT, R. D.; PETROVITCH, H.; WHITE, L. R.; TANNER, C. M. Relationship between caffeine intake and parkinson disease **JAMA**, v. 284, p. 1378-1379, 2000a.

ROSS, G. W.; ABBOTT, R. D.; PETROVITCH, H.; MORENS, D. M.; GRANDINETTI, A.; TUNG, K. H.; TANNER, C. M.; MASAKI, K. H.; BLANCHETTE, P. L.; CURB, J. D.; POPPER, J. S.; WHITE, L. R. Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson disease. **JAMA,** v. 283, p. 2674-2679, 2000b.

ROSS, G. W.; PETROVITCH, H. Current evidence for neuroprotective effects of nicotine and caffeine against Parkinson's disease. **Drugs Aging**, v. 18, p. 797–806, 2001.

SABATÉ, M.; LLANOS, C.; RODRÍGUEZ, M. Integration of auditory and kinesthetic information in motion: alterations in Parkinson's disease. **Neuropsychology,** v. 22, p. 462-468, 2008.

SALIM, H.; FERRÉ, S.; DALAL, A.; PETERFREUND, R. A.; FUXE, K.; VINCENT, J. D.; LLEDO, P. M. Activation of adenosine A1 and A2A receptors modulates dopamine D2 receptor-induced responses in stably transfected human neuroblastoma cells. **J. Neurochem.**, v. 74, p. 432-439, 2000.

SALMI, P.; CHERGUI, K.; FREDHOLM, B. B. Adenosine-dopamine interactions revealed in knockout mice. **J. Mol. Neurosci.**., v. 26, p. 239-244, 2005.

SALONEN, T.; HAAPALINNA, A.; HEINONEN, E.; SUHONEN, J.; HERVONEN, A. Monoamine oxidase B inhibitor selegiline protects young and aged rat peripheral sympathetic neurons against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. **Acta Neuropathol.,** v. 91, p. 466-474, 1996.

SALVESEN, G. S. Caspases and apoptosis. **Essays Biochem.,** v. 38, p. 9-19, 2002.

SAURA, J.; ANGULO, E.; EJARQUE, A.; CASADÓ, V.; TUSELL, J. M.; MORATALLA, R.; CHEN, J. F.; SCHWARZSCHILD, M. A.; LLUIS, C.; FRANCO, R.; SERRATOSA, J. Adenosine A2A receptor stimulation potentiates nitric oxide release by activated microglia. **J. Neurochem.,** v. 95, p. 919-929, 2005.

SAVASTA, M.; DUBOIS, A.; BENAVIDÈS, J.; SCATTON, B. Different plasticity changes in D1 and D2 receptors in rat striatal subregions following impairment of dopaminergic transmission. **Neurosci. Lett.,** v. 85, p. 119-124, 1988.

SCHOLTISSEN, B.; VERHEY, F. R. J.; STEINBUSCH, H. W. M.; LEENTJENS, A. F. G. Serotonergic mechanisms in Parkinson´s disease: opposing results from preclinical and clinical data. **J. Neural Transmission**, v. 113, p. 1435-1463, 2005.

SCHWARZSCHILD, M. A.; AGNATI, L.; FUXE, K.; CHEN, J. F.; MORELLI, M. Targeting adenosine A2A receptors in Parkinson's disease. **Trends Neurosci.,** v. 29, p. 647-54, 2006.

SCHWARZSCHILD, M. A.; CHEN, J. F.; ASCHERIO, A. Caffeinated clues and the promise of adenosine A(2A) antagonists in PD. **Neurology,** v. 58, p. 1154-1160, 2002.

SEBASTIÃO, A. M.; RIBEIRO, J.A. Fine-tuning neuromodulation by adenosine. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 21, p. 341-346, 2000.

SHANNAK, K.; RAJPUT, A.; ROZDILSKY, B.; KISH, S.; GILBERT, J.; HORNYKIEWICZ, O. Noradrenaline, dopamine and serotonin levels and metabolism in the human hypothalamus: observations in Parkinson's disease and normal subjects. **Brain Res.,** v. 639, p. 33-41, 1994.

SHAVALI, S.; COMBS, C. K.; EBADI, M. Reactive macrophages increase oxidative stress and alpha-synuclein nitration during death of dopaminergic neuronal cells in co-culture: relevance to Parkinson's disease. **Neurochem. Res.**, v. 31, p. 85-94, 2006.

SIEGEL, G. J. **Basic neurochemistry:** molecular, cellular and medical aspects. 7th ed. London: Elsevier, 2006.

SIMOLA, N.; MORELLI, M.; PINNA, A. Adenosine A2A receptor antagonists and Parkinson's disease: state of the art and future directions. **Curr. Pharm. Des.**, v. 14, p. 1475-1489, 2008.

SIMOLA, N.; MORELLI, M.; PINNA, A. Adenosine $A_{2A}$ receptor antagonists and Parkinson's disease: state of the art and future directions. **Curr. Pharm. Des.**, v. 14, p. 1475-1489, 2008.

SLEE, E. A. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase -9-dependent manner. **J. Cell Biol.,** v. 144, p. 281-292, 1999.

SRIRAM, K.; MATHESON, J. M.; BENKOVIC, S. A.; MILLER, D. B.; LUSTER, M. I.; O'CALLAGHAN, J. P. Mice deficient in TNF receptors are protected against dopaminergic neurotoxicity: implications for Parkinson's disease. **FASEB J.**, v. 16, p. 1474-1476, 2002.

STANCIU, M.; WANG, Y.; KENTOR, R.; BURKE, N.; WATKINS, S.; KRESS, G.; REYNOLDS, I.; KLANN, E.; ANGIOLIERI, M. R.; JOHNSON, J. W.; DEFRANCO, D. B. Persistent activation of ERK contributes to glutamate-induced oxidative toxicity in a neuronal cell line and primary cortical neuron cultures. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 12200-12206, 2000.

STAUNTON, D. A.; WOLFE, B. B.; GROVES, P. M.; MOLINOFF, P. B. Dopamine receptor changes following destruction of the nigrostriatal pathway: lack of a relationship to rotational behavior. **Brain Res.,** v. 211, p. 315-327, 1981.

STOCCHI F. The hypothesis of the genesis of motor complications and continuous dopaminergic stimulation in the treatment of Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat. Disord.,** v.15, p. 9-15, 2009.

STONE, T. W.; BEHAN, W. M.; JONES, P. A.; DARLINGTON, L. G.; SMITH, R. A. The role of kynurenines in the production of neuronal death, and the neuroprotective effect of purines. **J. Alzheimers Dis.,** v. 3, p. 355-366, 2001.

STONE, T.W. Adenosine, neurodegeneration and neuroprotection. **Neurol. Res.,** v. 27, p. 161-168, 2005.

STRÖMBERG, I.; ADAMS, C.; BYGDEMAN, M.; HOFFER, B.; BOYSON, S.; HUMPEL, C. Long-term effects of human-to-rat mesencephalic xenografts on rotational behavior, striatal dopamine receptor binding, and mRNA levels. **Brain Res. Bull.,** v. 38, p. 221-233, 1995.

SULZER, D.; ZECCA, L. Intraneuronal dopamine-quinone synthesis: a review. **Neurotox. Res.,** v. 1, p. 181-195, 2000.

SUPINO, R. MTT Assays in Methods in Molecular Biology: In: O'HARA, S. E.; ATTERWILL, C. K. **Vitro Toxicity Testing Protocols**. Totowa, NJ: Human Press Inc., 1995.

SYNTICHAKI, P.; TAVERNARAKIS, N. The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? **Nat. Rev. Neurosci.,** v. 4, p. 672-684, 2003.

TAKAHASHI, R. N.; PAMPLONA, F. A.; PREDIGER, R. D. Adenosine receptor antagonists for cognitive dysfunction: a review of animal studies. **Front Biosci.,** v. 13, p. 2614-2632, 2008.

TAKATA, M. K.; YAMAGUCHI, F.; NAKANOSE, K.; WATANABE, Y.; HATANO, N.; TSUKAMOTO, I.; NAGATA, M.; IZUMORI, K.; TOKUDA, M. Neuroprotective effect of D-psicose on 6 hydroxydopamine- induced apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells. **J. Biosci. Bioeng.,** v. 100, p. 511–516, 2005.

TANAKA, K.; OGAWA, N.; ASANUMA, M. Molecular basis of 6- hydroxydopamine-induced caspase activations due to increases in oxidative stress in the mouse striatum. **Neurosci. Lett.**, v. 410, p. 85–89, 2006.

TERAI, M.; HIDAKA, K.; NAKAMURA, Y. Comparison of [3H]YM-009151-2 with [3H]spiperone and [3H]raclopride for dopamine d-2 receptor binding to rat striatum. **Eur. J. Pharmacol**., v. 173, p. 177-182, 1989.

TOZZI, A.; TSCHERTER, A.; BELCASTRO, V.; TANTUCCI, M.; COSTA, C.; PICCONI, B.; CENTONZE, D.; CALABRESI, P.; BORSINI, F. Interaction of $A_{2A}$ adenosine and $D_2$ dopamine receptors modulates corticostriatal glutamatergic transmission. **Neuropharmacology**, v. 53, p. 783-789, 2007.

TURRENS, J. F.; ALEXANDRE, A.; LEHNINGER, A. L. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.,** v. 237, p. 408-414, 1985.

VLOK, N.; MALAN, S. F.; CASTAGNOLI JR., N.; BERGH, J. J.; PETZER, J. P. Inhibition of monoamine oxidase B by analogues of the adenosine A2A receptor antagonist (E)-8-(3 chlorostyryl) caffeine (CSC). **Bioorg. Med. Chem.,** v. 14, p. 3512–3521, 2006.

VOGEL, H.G.; VOGEL, W.H. **Drug Discovery and Evaluation:** pharmacological assays. Berlin: Springer–Verlag, 1997.

WALDMEIER, P. C.; TATTON, W. G. Interrupting apoptosis in neurodegenerative disease: potential for effective therapy? **Drug Discov. Today**, v. 9, p. 210-218, 2004.

WANG, P. G.; XIAN, M.; TANG, X.; WU, X.; WEN, Z.; CAI, T.; JANCZUK, A. J. Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. **Chem. Rev.**, v. 102, p. 1091-1134, 2002.

WARDAS, J. Neuroprotective role of adenosine in the CNS. **Polish J. Pharmacol.**, v. 54, p. 313-326, 2002.

WARDAS, J.; KONIECZNY, J.; LORENC-KOCI, E. SCH 58261, an A(2A) adenosine receptor antagonist, counteracts parkinsonian-like muscle rigidity in rats. **Synapse.**, v. 41, p. 160-171, 2001.

WICHMANN, T.; DELONG, M. R. Pathophysiology of Parkinson's disease: the MPTP primate model of the human disorder. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 991, p. 199-213, 2003.

XIE, X.; RAMKUMAR, V.; TOTH, L. A. Adenosine and dopamine receptor interactions in striatum and caffeine-induced behavioral activation. **Comp. Med**., v. 57, p. 538-545, 2007.

XU, K.; BASTIA, E.; SCHWARZSCHILD, M. A. Therapeutic potential of adenosine A2A receptor antagonists in Parkinson´s disease. **Pharmacol. Ther**., v. 105, p. 267-310, 2005.

XU, K.; XU, Y. H.; BROWN-JERMYN, D.; SCIBELLI, A.; CHEN, J. F.; SCHWARZSCHILD, M. A. **Estrogen modulates neuroprotection by caffeine in the MPTP model of Parkinson's disease**. Washington: Society for Neuroscience, 2003.

XU, K.; XU, Y. H.; CHEN, J. F.; SCHWARZSCHILD, M. A. Caffeine's neuroprotection against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity shows no tolerance to chronic caffeine administration in mice. **Neurosci. Lett.,** v. 322, p.13-16, 2002.

YAAR, R.; JONES, M. R.; CHEN, J. F.; RAVID, K. Animal models for the study of adenosine receptor function. **J. Cell Physiol.,** v. 202, p. 9-20, 2005.

YU, L.; SCHWARZSCHILD, M. A.; CHEN, J. F. Cross-sensitization between caffeine- and L-dopa induced behaviors in hemiparkinsonian mice. **Neurosci. Lett**., v. 393, p. 31–5, 2006.

ZHOU, C.; HUANG, Y.; PRZEDBORSKI, S. Oxidative stress in Parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 1147, p. 93-104, 2008.

ZHOU, F. C.; BLEDSOE, S.; MURPHY, J. Serotonergic sprouting is induced by dopamine-lesion in substantia nigra of adult rat brain. **Brain Res.**, v. 556, p. 108-16, 1991.

# ANEXOS

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Pharmacology, Biochemistry and Behavior 84 (2006) 415–419
PHARMACOLOGY BIOCHEMISTRY AND BEHAVIOR
www.elsevier.com/locate/pharmbiochembeh

# Neuroprotective effects of caffeine in the model of 6-hydroxydopamine lesion in rats

Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar *, Hélio V. Nobre Jr., Danielle S. Macêdo, Aline A. Oliveira, Rivelilson M. Freitas, Silvânia M. Vasconcelos, Geanne M.A. Cunha, Francisca Cléa F. Sousa, Glauce Socorro B. Viana

*Federal University of Ceará, Brazil*

Received 16 February 2006; received in revised form 21 May 2006; accepted 31 May 2006
Available online 14 July 2006

**Abstract**

The work shows the effects of caffeine after the intrastriatal injection of 6-OHDA in rats, considered as a model of Parkinson disease (PD). Two weeks after the 6-OHDA lesion, rats exhibit a characteristic rotation behavior as a response to the apomorphine challenge. Our results showed significant increases in the number of apomorphine-induced rotations in 6-OHDA-lesioned rats, as compared to sham-operated animals. A partial recovery was observed in 6-OHDA-lesioned rats, after caffeine (10 and 20 mg/kg, i.p., daily for 14 days) treatment. The stereotaxic injection of 6-OHDA produced loss of striatal neurons, as indicated by the decrease in monoamines levels, in the ipsilateral side (75–85%) when compared to the contralateral side. Significant decreases in noradrenaline levels were seen in the ipsilateral side of 6-OHDA group (62%), and this effect was not significantly reversed in caffeine-treated groups. While significant decreases in dopamine levels were seen in the ipsilateral side of 6-OHDA group (78%), in the caffeine-treated group (10 and 20 mg/kg, i.p.) the decreases were only 53 and 18%, indicating significant recoveries. In conclusion, our data demonstrated beneficial effects of caffeine in this model of PD, suggesting the potential use of A2A antagonists as a novel treatment for this neurodegenerative disease.
© 2006 Published by Elsevier Inc.

*Keywords:* Caffeine; 6-Hydroxydopamine; Parkinson's disease; Rat striatum

## 1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by the loss of dopaminergic neurons in the *substantia nigra*, with severe dopamine depletion in the striatum. Current therapies with antiparkinsonian agents partially alleviate the symptoms of the disease, but have not been found to avoid the progression of dopaminergic neurons degeneration. Another major limitation of PD medications is their sometimes disabling side effects. The most irreversible adverse effect of the chronic dopaminergic therapy is dyskinesia. This side effect limits symptomatic therapy, thus increasing the search for new nondopaminergic alternative or adjunctive treatments for PD.

Adenosine, an endogenous modulator of biological functions, interacts with at least four receptors classified as $A_1$, $A_{2A}$, $A_{2B}$ and $A_3$. Several data showing the co-localization of $A_{2A}$ and $D_2$ receptors suggest that the blockade of $A_{2A}$ receptors produces direct effects on $D_2$ receptors (Fredholm and Svenningsson, 2003). Evidence that adenosine $A_{2A}$ antagonists could constitute a potential therapeutic tool for the therapy of PD, is provided by results obtained in rodent and primate models of PD, which report that $A_{2A}$ antagonists exert antiparkinsonian activity (Morelli, 2003). Adenosine $A_{2A}$ receptors are abundant in the caudate-putamen, and involved in the motor control in several species.

Caffeine is an alkaloid widely consumed for its CNS stimulating properties (Moo-Puc et al., 2003). Several studies revealed an inverse association between risk of PD and caffeine intake (Ross et al., 2000; Ross and Petrovitch, 2001; Schwarzschild et al., 2002; Baraldi et al., 2003). Experimental evidence also suggests that caffeine has potential antiparkinsonian properties, as demonstrated by its protective effects (Joghataie et al., 2004) and the blockade of striatal adenosine receptors. The CNS effects of caffeine appear to be mediated primarily by its

* Corresponding author. Tel.: +55 85 3366 8337; fax: +55 85 3366 9333.
*E-mail address:* lissiana_m@yahoo.com.br (L.M.V. Aguiar).

0091-3057/$ - see front matter © 2006 Published by Elsevier Inc.
doi:10.1016/j.pbb.2006.05.027

antagonistic actions at the $A_1$ and $A_{2A}$ subtypes of adenosine receptors (Fredholm et al., 1999). $A_{2A}$ receptors are particularly relevant to PD because their expression in the brain is largely restricted to the striatum (Fisone et al., 2004), the main target of dopaminergic neurons that degenerate in PD. The presence of $A_{2A}$ receptors was also reported in the human brain (caudate nucleus and putamen) by Ishiwata and collaborators (Ishiwata et al., 2005).

The unilateral 6-hydroxydopamine nigrostriatal lesion has been widely used as a rodent model of Parkinson's disease. It has been reported that reactive oxygen radicals are involved in the toxicity of 6-OHDA-induced nigrostriatal lesions. Increased free radicals levels occur on aging and are proposed to be a contributing factor for Parkinson's disease (Alfavaro et al., 2004). Methylxanthines, including caffeine and their metabolites, have proven to inhibit oxidative damage induced by these reactive species (Lee, 2000). Joghataie et al. (2004) reported that 6-OHDA-induced loss of nigral neurons and associated alterations in behavioral responses to dopaminergic stimulation can be attenuated by caffeine. Together, the protective effects of caffeine and its metabolites in rodent models of PD support a causal basis for the inverse relationship between human caffeine consumption and the subsequent risk of PD development (Xu et al., 2005). The present study was designed to investigate the beneficial effect of caffeine in a model of PD, using unilateral intrastriatal 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-lesioned rats.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Drugs

Caffeine, 6-hydroxydopamine, ascorbic acid, apomorphine, sodium octanesulfonic acid, acetonitrile and tetrahydrofuran were purchased from Sigma Chemical Co. USA. All other drugs were of analytical grade.

### 2.2. Animals and experimental procedures

Adult male Wistar rats (from the Animal House of the Federal University of Ceará), weighing 200–250 g at the start of the experiment, were housed five to six per cage, maintained in a 12 h light/dark cycle with free access to water and standard food. All experiments were performed according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals from the US Health and Human Services Department. Animals were anesthetized with a combination of Ketamine (100 mg/kg, i.p.) and Xylasine (5 mg/kg, i.p.) and given a unilateral stereotaxic injection of 12 μg 6-OHDA (12 μg/μl) with 0.2 mg/ml L-ascorbic acid (Sigma), into the right striatum (AP 0.9/1.4, ML 3.0, DV 3.3, from Bregma), according to the Atlas of Paxinos and Watson (1986), using a 10 μl Hamilton syringe. Sham-operated animals received vehicle and were used as controls. Caffeine (Sigma, 10 and 20 mg/kg, i.p.) was administered 1 h after 6-OHDA lesions and once a day for the next 13 days. Fifteen days after the 6-OHDA injection (24 h after the last injection of caffeine or vehicle), the behavior was assessed by monitoring body rotations induced by apomorphine (3 mg/kg, i.p.). The number of net rotations (the number of 360° contralateral turns) was recorded for 60 min and, at the next day, animals were sacrificed, and the striatal tissue was collected and stored at −70 °C until use.

### 2.3. Monoamine levels

For the measurement of monoamine levels and their metabolites noradrenaline (NE), dopamine (DA), 3,4 dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanilic acid (HVA), serotonin (5-HT) and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), the brain tissue was used to prepare 10% homogenates. Homogenates were sonicated in 0.1 M $HClO_4$, for 30 s, centrifuged at 4 °C for 15 min at 15,000 rpm, and the supernatant was filtered (0.2 μm, Millipore). A 20 μl sample was then injected into a high-performance liquid chromatograph (HPLC) column. The mobile phase was 0.163 M citric acid, pH 3.0, containing 0.02 mM EDTA, with 0.69 mM sodium octanesulfonic acid (SOS), as ion pairing reagent, 4% v/v acetonitrile and 1.7% v/v tetrahydrofuran. NE, DA, 5-HT and their metabolites were electrochemically detected, using an amperometric detector (Shimadzu, Japan), by oxidation on a glassy carbon electrode at 0.85 V relative to the Ag–AgCl reference electrode. The amount of monoamines was determined by comparison with standards injected into the HPLC column at the day of experiment, and their concentrations were expressed as ng/mg tissue.

### 2.4. Cell culture and cell viability studies

Mesencephalic cells were isolated from embryo brains obtained from female Wistar rats, at their 16–18 days of gestation, as described elsewhere (Ahmadi et al., 2003). Briefly, tissue blocks from coronal sections of occipital cortical areas of embryos were submitted to a median horizontal cutting. The anterior region was discarded and the posterior one, containing predominantly mesencephalic cells, was used. After treatment with trypsin, the cells were suspended in the Neurobasal Medium without L-glutamine, supplemented with B-27 Supplement Minus from Gibco, USA, containing streptomycin, penicillin, and actinomycin. The cell suspension was platted on 96 well plates coated with poly-L-lysine, at a density of $5 \times 10^4$ cells/well. Cultures were maintained at 37 °C under a 5% $CO^2$ atmosphere. After 4 days in culture, caffeine (CAF, 5 and 10 μg/ml) was added to the cells, 3 h before 6-OHDA (40 μl). The neurotoxicity was evaluated using the MTT [3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium assay. After 24 h of incubation with 6-OHDA, the medium was replaced and MTT was added to the cell culture, at a final concentration of 200 μM, and incubated again for 3 h. Then, after cell washing with PBS, 150 μl DMSO were added and, after 5 min stirring, the absorbance was measured with a microplate reader at 595 nm. The inhibition of MTT reduction indicates the degree of 6-OHDA-induced toxicity. Experiments were performed in triplicates at three different days.

### 2.5. Statistical analysis

All results were presented as means±S.E.M. One-way ANOVA was used, followed by the Student–Newman–Keuls test, except for the MTT assay where the Tukey's test for multiple comparisons was used. Results were considered significant at $p<0.05$.

## 3. Results

Two weeks after the intrastriatal injection of 6-OHDA, rats exhibited rotational behavior in the direction opposite to the lesion (contralateral rotation), following the apomorphine administration. Significant increases in the number of apomorphine-induced rotations were seen in 6-OHDA-lesioned controls, as compared to the sham-operated group (178.7±7.8 vs. 7.0±0.5 turns/h; $F$ (3, 34)=172.8; $p<0.001$). A partial motor recovery was observed in 6-OHDA-lesioned rats treated with caffeine, that reduced profoundly the number of apomorphine-induced rotations by 47 and 69% (caffeine 10 and 20 mg/kg, i.p., respectively), when compared with the 6-OHDA-lesioned group (controls) (Fig. 1).

The 6-OHDA stereotaxic injection produced oxidative damage that resulted in the loss of neurons, as indicated by the decrease in monoamines and their metabolite levels in the ipsilateral side (75–85%), when compared with the contralateral side of controls. No differences were seen on contralateral sides among sham-operated, 6-OHDA-lesioned controls and 6-OHDA-lesioned rats after caffeine treatment.

Significant decreases in dopamine (DA) levels were seen in the ipsilateral side of controls (78%). However, in the caffeine-treated group, at the doses of 10 and 20 mg/kg, the decreases were only 53 and 18%, respectively, indicating significant recoveries which were almost complete at the higher dose of caffeine ($F$ (5, 34)=36.61; $p<0.001$). The same occurred with its metabolite DOPAC that decreased by 75% in controls, and by 41 and 33% in the caffeine-treated group, at the doses of 10 and 20 mg/kg, respectively ($F$ (5, 34)=19.66; $p<0.001$). Furthermore, HVA levels also decreased by 51% in controls, and by 10 and 5%, respectively, in the lesioned groups treated with the same doses of caffeine (10 and 20 mg/kg; $F$ (5, 34)=16.32); $p<0.001$) (Fig. 2).

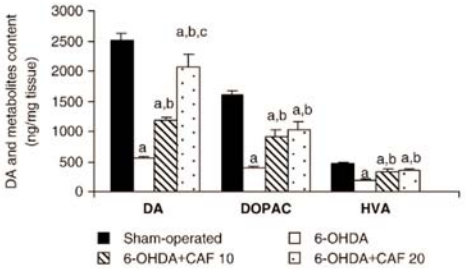



Fig. 2. Effects of caffeine (CAF) on levels of DA, DOPAC and HVA, in the rat striatum (ng/mg tissue). Animals received CAF (10 and 20 mg/kg, i.p., daily, for 14 days), starting 1 h after 6-OHDA lesion. Data are reported as means±SEM, from 6 to 8 animals. a, vs. sham-operated; b, vs. controls (6-OHDA alone); c, vs. CAF10, respectively; at $p<0.05$ (ANOVA and the Student–Newman–Keuls test).

Significant decreases in noradrenaline (NE) levels were also seen in the ipsilateral side of controls (62%) and in the caffeine-treated group, at the doses of 10 and 20 mg/kg (53 and 56% decreases, respectively; $F$ (5, 34)=22.69; $p<0.001$), as shown in Fig. 3. A decrease of 61% was observed in 5-HT levels, in the 6-OHDA-lesioned group (controls), in the ipsilateral side as related to the contralateral side ($F$ (5, 34) =29.03; $p<0.001$). On the other hand, in the caffeine-treated group, at the doses of 10 and 20 mg/kg, this decrease was 58 and 42%, respectively. No significant differences were seen in the levels of 5-HIAA among the groups (Fig. 3) ($F$ (5, 34) =3.66; $p<0.001$). Furthermore, no difference was seen between the sham-operated (contralateral and ipsilateral sides) and the contralateral side of the 6-OHDA-lesioned rats (controls).

Results of the MTT test showed that the exposure of mesencephalic dopaminergic cells to 40 μM 6-OHDA caused a 34% reduction in cell viability, as compared to controls

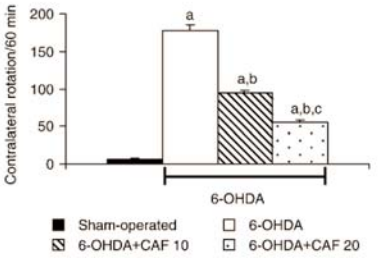



Fig. 1. Effects of caffeine treatment (CAF 10 and 20 mg/kg, i.p., for 14 days, starting 1 h after 6-OHDA lesion) on apomorphine-induced (3 mg/kg, i.p.) rotational behavior. Two weeks after 6-OHDA striatal injection, the number of net contralateral rotations was counted for 60 min. Data are reported as means±SEM, from 6 to 8 animals. (ANOVA and the Student–Newman–Keuls test). a, vs. sham-operated; b, vs. controls (6-OHDA alone); c, vs. CAF10, respectively; at $p<0.05$.

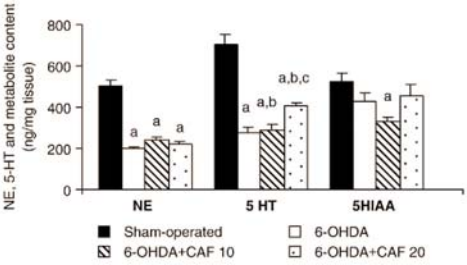



Fig. 3. Effects of caffeine (CAF) on levels of NE, 5-HT and 5-HIAA, in the rat striatum (ng/mg tissue). Animals received CAF (10 and 20 mg/kg, i.p., daily, for 14 days), starting 1 h after 6-OHDA lesion. Data are reported as means±SEM, from 6 to 8 animals. a, vs. sham-operated; b, vs. controls (6-OHDA alone); c, vs. CAF 10, respectively; at $p<0.05$ (ANOVA and the Student–Newman–Keuls test).

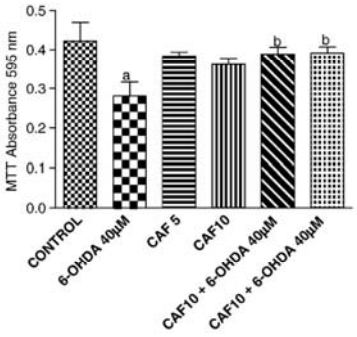



Fig. 4. Effects of caffeine (CAF) on the 6-OHDA-induced toxicity, in rat mesencephalic dopaminergic cells. After 4 days in culture, CAF was added to the cells, 3 h before 6-OHDA (40 μM). The neurotoxicity was evaluated by the MTT assay. a and b vs. control and 6-OHDA, respectively (one way ANOVA and Tukey tests, at $p<0.05$).

(MTT absorbance at 595 nm, control = 0.4223 ± 0.0476; 6-OHDA = 0.2808 ± 0.0360). While caffeine at 5 and 10 μg/ml concentrations did not alter cell viability, it blocked the 6-OHDA-induced cytotoxicity, and values of MTT reduction were closed to those of controls (in the absence of 6-OHDA) (Fig. 4).

## 4. Discussion

Adenosine $A_{2A}$ receptor antagonists, including the non-specific adenosine antagonist caffeine, are a novel non-dopaminergic therapeutic strategy for PD treatment (Yu et al., 2006). For instance, istradefylline is the first of several $A_{2A}$ receptor antagonists in development for PD and is now under clinical trials. Results indicate that the drug reduces motor fluctuation induced by L-Dopa.

Epidemiological studies have linked the consumption of coffee and other caffeinated beverages to a reduced risk of the subsequent development of PD. The popularity of caffeine as a psychoactive drug is due to its stimulant properties, which depend on its ability to reduce adenosine transmission in the brain. Adenosine $A_1$ and $A_{2A}$ receptors are expressed in the basal ganglia, a group of structures involved in various aspects of motor control, and caffeine acts as an antagonist to both types of receptors (Fisone et al., 2004). Psychomotor-stimulant and other CNS effects of caffeine appear to occur, at least in part, through its antagonism of the adenosine $A_{2A}$ receptors (Fredholm et al., 1999).

Caffeine as well as more specific antagonists of the adenosine $A_{2A}$ receptor have been found to attenuate neurotoxicity in mouse models of PD. Furthermore, in addition to possessing a neuroprotective potential, caffeine and other $A_{2A}$ antagonists have been known to reverse motor deficits in PD models and to be neuroprotective in the MPTP and 6-OHDA models of PD (Chen et al., 2002; Ikeda et al., 2002). Thus, $A_{2A}$ antagonists may offer neuroprotective benefits as well as symptomatic relief (movement enhancing). This benefit of blocking $A_{2A}$ receptors, coupled with their remarkably restricted expression in the basal ganglia, have made $A_{2A}$ antagonists attractive targets for drug development (Schwarzschild et al., 2002). Thus, caffeine has recently been included in the list of the twelve most promising neuroprotective agents for clinical trials in PD (Ravina et al., 2003).

In the present study, behavioral and biochemical effects of caffeine were investigated in a model of PD. For this purpose, apomorphine-induced rotations and monoamine levels of the SNC were quantified. Previous studies have demonstrated that the most important biochemical changes in the 6-OHDA-lesioned striatum are reductions in dopamine (DA) and its metabolite levels. This effect causes a prominent functional and motor asymmetry that can be evaluated by dopamine receptor agonists, such as apomorphine, resulting in rotations in a direction that is contralateral to the lesion, which are considered as reliable indicators of nigrostriatal dopamine depletion (Hudson et al., 1993). This is consistent with the present results, that showed apomorphine-induced rotations following a unilateral injection of 6-OHDA into the striatum. This effect would involve dopamine receptor supersensitivity caused by the loss of DA terminals, resulting in a significant reduction of DA levels in the 6-OHDA-lesioned striatum.

Our results demonstrated a reduction in apomorphine-induced rotations following caffeine administration, as compared to the untreated lesioned group (controls). This reduction could be attributed to beneficial effects of caffeine, attenuating striatal degeneration, and may be due to its ability to block adenosine $A_{2A}$ receptors that are concentrated in dopaminergic areas of the brain (Joghataie et al., 2004).

We also showed that 6-OHDA induced significant decreases in NE, DA, DOPAC and HVA levels, measured in the ipisilateral side of controls when compared with the sham-operated group. We also demonstrated that 5-HT levels decreased, but levels of its metabolite, 5-HIAA, were unchanged. These findings are consistent with other studies describing biochemical changes in the 6-OHDA-lesioned striatum (Ichitani et al., 1994).

The caffeine treatment partially restored the content of monoamines and their metabolites in 6-OHDA-lesioned rats. In the present study, the finding that the caffeine treatment can attenuate apomorphine-induced motor deficits suggests increases in DA levels in the lesioned striatum and subsequent reduction of the receptor supersensitivity. These results were supported by measurements of DA and its metabolite levels which were partially recovered in the ipsilateral side of the caffeine treated group.

The influence of caffeine on the dopaminergic innervation of the striatum can be attributed to its ability to prevent the death of dopaminergic neurons originating in the substantia nigra. Oztas et al. (2002) demonstrated that the MPTP-induced loss of nigral dopaminergic neurons (TH-immunoreactive) can be prevented by caffeine. Recently, Joghataie et al. (2004) reported that nigrostriatal neurons within the SNC were mainly preserved against neurodegenerative effects induced by 6-OHDA, in caffeine-treated lesioned group. Another work (Pierri et al., 2005) demonstrated that after MPTP treatment in mice, an $A_{2A}$

antagonist (KW-6002) was neuroprotective and had anti-inflammatory effects at the level of the substantia nigra.

In conclusion, the data of the present study demonstrated that caffeine has beneficial effects in the model of 6-OHDA-induced striatal lesions in rats, attenuating motor dysfunctions and increasing dopamine levels. Alternatively, caffeine could act as a neuromodulator, thus functionally compensating for the loss of dopaminergic neurons. Recently (Cauli et al., 2005), it was demonstrated that repeated caffeine exposure enhanced the motor stimulant effects elicited by dopamine agonists, through sensitization of D1 receptors in 6-OHDA-lesioned rats. Since the effects of caffeine appear to be mediated by its antagonistic action at $A_{2A}$ receptors, more specific antagonists of these receptors could be helpful as a novel therapeutic strategy for the treatment of PD.

## Acknowledgements

The work had financial support from the Brazilian National Research Council (CNPq) and was orthographically revised by Prof. M.O.L. Viana.

## References

Ahmadi FA, Linseman DA, Grammatopoulos TN, Jones SM, Bouchard RJ, Freed CR, et al. The pesticide retonone induces caspase-3-mediated apoptosis in ventral mesencephalic dopaminergic neurons. J Neurochem 2003;87:914–21.

Alfavaro TM, Vigra E, Oliveira CR, Cunha RA. Effect of free radicals on adenosine A (2A) and dopamine D2 receptors in the striatum of young adult and aged rats. Neurochem Int 2004;45:733–8.

Baraldi PG, Tabrizi MA, Bovero A, Avitabile B, Petri D, Fruttarolo F, et al. Recent developments in the field of A2A and A3 adenosine receptor antagonists. Eur J Med Chem 2003:1–16.

Cauli O, Pinna A, Morelli M. Subchronic intermittent caffeine administration to unilaterally 6-hydroxydopamine-lesioned rats sensitizes turning behaviour in response to dopamine D(1) but not D(2) receptor agonists. Behav Pharmacol 2005;16:621–6.

Chen JF, Steyn S, Staal R, Petzer JP, Xu K, Van Der Schyf CJ, et al. 8-(3-Chlorostyryl) caffeine may attenuate MPTP neurotoxicity through dual actions of monoamine oxidase inhibition and A2A receptor antagonism. J Biol Chem 2002;277:36040–4.

Fisone G, Borgkvist A, Usiello A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. Cell Mol Life Sci 2004;61:857–72.

Fredholm BB, Svenningsson P. Adenosine–dopamine interactions: development of a concept and some comments on therapeutic possibilities. Neurology 2003;61(11 Suppl 6):S-5-9.

Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehlig A, Zvartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. Pharm Rev 1999;51:83–133.

Hudson JL, Van Horne CG, Strömberg I, Brock S, Clayton J, Masserano J, et al. Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. Brain Res 1993;626:167–74.

Ichitani Y, Okamura H, Nakahara D, Nagatsu I, Ibata Y. Biochemical and immunocytochemical changes induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine injection in the rat nigrostriatal dopamine neuron system: evidence for cell death in the substantia nigra. Exp Neurol 1994;130:269–78.

Ikeda K, Kurokawa M, Aoyama S, Kuwana Y. Neuroprotection by adenosine $A_{2A}$ receptor blockade in experimental models of Parkinson's disease. J Neurochem 2002;80:262–70.

Ishiwata K, Mishina M, Kimura Y, Oda K, Sasaki T, Ishii K. First visualization of adenosine A(2A) receptors in the human brain by positron emission tomography with [11C]TMSX. Synapse 2005;55:133–6.

Joghataie MT, Roghani M, Negahdar F, Hashemi L. Protective effect of caffeine against neurodegeneration in a model of Parkinson's disease in rat: behavioral and histochemical evidence. Parkinsonism Relat Disord 2004;10:465–8.

Lee C. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorpting capacity and inhibition of LDL peroxidation. Clin Chim Acta 2000;295:141–54.

Moo-Puc RE, Góngora-Alfaro JL, Alvarez-Cervera FJ, Pineda JC, Arankowsky-Sandoval G, Heredia-López F. Caffeine and muscarinic antagonists act in synergy to inhibit haloperidol-induced catalepsy. Neuropharmacology 2003; 45:493–503.

Morelli M. Adenosine A2A antagonists: potential preventive and palliative treatment for Parkinson's disease. Exp Neurol 2003;184:20–3.

Oztas E, Kalda A, Xu K, Irrizary MC, Schwarzschild MA, Chen JF. Caffeine attenuates MPTP-induced loss of dopaminergic neurons in substantia nigra in mice. Program No. 487.6. Washington, DC: Society for Neuroscience; 2002. Online.

Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd Ed. New York: Academic Press; 1986.

Pierri M, Valdano E, Sager T, Englund U. KW-6002 protects from MPTP induced dopaminergic toxicity in the mouse. Neuropharmacology 2005;48:517–24.

Ravina BM, Fagan SC, Hart RG, Hovinga CA, Murphy DD, Dawson TM, et al. Neuroprotective agents for clinical trials in Parkinson's disease: a systematic assessment. Neurology 2003;60:1234–40.

Ross GW, Petrovitch H. Current evidence for neuroprotective effects of nicotine and caffeine against Parkinson's disease. Drugs Aging 2001;18:797–806.

Ross GW, Abbott RD, Petrovitch H, Morens DM, Grandinetti A, Tung KH. Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson disease. JAMA 2000;283:2674–9.

Schwarzschild MA, Chen JF, Ascherio A. Caffeinated clues and the promise of adenosine A(2A) antagonists in PD. Neurology 2002;58:1154–60.

Xu K, Bastia E, Schwarzschild M. Therapeutic potential of adenosine $A_{2A}$ receptor antagonists in Parkinson's disease. Pharmacol Ther 2005;105:267–310.

Yu L, Schwarzschild MA, Chen JF. Cross-sensitization between caffeine- and L-dopa-induced behaviors in hemiparkinsonian mice. Neurosci Lett 2006; 393:31–5.

BRAIN RESEARCH 1191 (2008) 192–199

available at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/brainres

BRAIN RESEARCH

Research Report

# CSC, an adenosine $A_{2A}$ receptor antagonist and MAO B inhibitor, reverses behavior, monoamine neurotransmission, and amino acid alterations in the 6-OHDA-lesioned rats

*Lissiana M.V. Aguiar, Danielle S. Macêdo, Silvania M.M. Vasconcelos, Aline A. Oliveira, F. Cléa F. de Sousa, Glauce S.B. Viana**

*Laboratory of Neuropharmacology, Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, Federal University of Ceará, Rua Cel. Nunes de Melo 1127, CEP 60431-970, Fortaleza, Brazil*

ARTICLE INFO

*Article history:*
Accepted 23 November 2007
Available online 5 December 2007

*Keywords:*
CSC
Parkinson disease
$A_{2A}$ receptor
Monoamine and amino acid level

ABSTRACT

The present work showed the effects of 8-(-3-chlorostyryl)-caffeine (CSC), an $A_{2A}$ receptors antagonist and MAO B inhibitor, on behavior and biochemical alterations in 6-OHDA-lesioned rats. Male Wistar rats (280 g) were injected with CSC (1 and 5 mg/kg, i.p.) alone or combined with L-DOPA (50 mg/kg+benserazide 12.5 mg/kg), starting 6 days after the striatal 6-OHDA lesions, and once daily for the next 7 days. Fourteen days after the 6-OHDA lesion (and 24 h after CSC or vehicle), the number of net body rotations/h (after the apomorphine challenge) was recorded and, at the next day, animals were sacrificed. The ipsilateral striatum was used for HPLC measurements of monoamines and amino acids or for determination of nitrite contents and lipid peroxidation. Results showed that the increase in body rotation, induced by the 6-OHDA lesion, after the apomorphine challenge, was significantly and dose-dependently reversed by CSC. Furthermore, the decreased striatal levels of DA and metabolites, in the 6-OHDA-lesioned rats, were reversed after CSC treatment, and these effects were potentiated after the combination with L-DOPA. Similar results were observed with NE, 5-HT and 5-HIAA. While glutamate and GABA were increased in the 6-OHDA-lesioned group, CSC alone or mainly combined with L-DOPA reversed these alterations. In addition, the CSC treatment of 6-OHDA-lesioned rats reversed the increased nitrite formation and lipid peroxidation induced by 6-OHDA. In conclusion, CSC by means of its dual action as $A_{2A}$ antagonist and MAO-B inhibitor reversed behavior and biochemical alterations, observed in the 6-OHDA-lesioned rats, pointing out to its potential benefit for the treatment of PD.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Adenosine, a central nervous system neuromodulador, acts through the stimulation of G-protein-coupled receptors labeled $A_1$, $A_{2A}$, $A_{2B}$ and $A_3$. Adenosine $A_{2A}$ receptors are predominantly localized in DA-innervated regions such as striatum and nucleus accumbens. In the striatum, these receptors are expressed on GABAergic striatopallidal neurons where they are co-localized

* *Corresponding author.* Fax: +55 85 3366 8333.
E-mail address: osorio@roadnet.com.br (G.S.B. Viana).

0006-8993/$ – see front matter © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.brainres.2007.11.051

with $D_2$ receptors (Fink et al., 1992). Neurochemical evidences showed that $A_{2A}$ receptors functionally oppose the actions of dopamine $D_2$ receptors on GABAergic striatopallidal neurons, and this action together with its unique CNS distribution raised the possibility that $A_{2A}$ antagonists can be used as an alternative therapy to treat Parkinson's disease (PD) (Schwarzschild et al., 2006).

Furthermore, Ikeda et al., 2002 showed a significant neuroprotective effect of $A_{2A}$ receptor antagonists in experimental models of PD. These authors showed that the oral administration of $A_{2A}$ receptor antagonists protected against the loss of dopaminergic neuronal cells induced by 6-OHDA in rat brain and also prevented the functional loss of dopaminergic nerve terminals in the striatum and the ensuing gliosis caused by MPTP in mice. In addition to possessing neuroprotective potential, caffeine and other $A_{2A}$ antagonists are known to acutely reverse motor deficits in a variety of PD models (Schwarzschild et al., 2002). As a matter of fact, istradefylline (KW-6002) is the first of several adenosine $A_{2A}$ receptor antagonists in development for PD to advance to phase III clinical trials. Initial studies indicate that in patients with motor fluctuations on levodopa, addition of istradefylline reduces the patients' off time (Hauser and Schwarzschild, 2005).

Earlier studies have shown that adenosine $A_{2A}$ receptor stimulation increases GABA release (Ferre et al., 1994), and the blockade of adenosine $A_{2A}$ receptors decreases extracellular GABA levels (Ferre et al., 1993; Ochi et al., 2000). A recent study (Xu et al., 2005) showed that $A_{2A}$ antagonists might facilitate movement by reducing GABA release from striatopallidal axon terminals. As a matter of fact, $A_{2A}$ receptor activation on widely distributed glutamatergic nerve terminals might enhance glutamate release and contribute to an excitotoxic component of neuronal death (Li et al., 2001; Marchi et al., 2002). Thus, $A_{2A}$ agonists generally enhance the release of glutamate and $A_{2A}$ receptor antagonists have been found to attenuate glutamate release in the striatum (Kalda et al., 2006).

Furthermore, $A_{2A}$ antagonists might partially improve not only the symptoms of PD but also its development. $A_{2A}$ antagonist drugs may exert their actions by slowing disease progression and reducing the maladaptative neuroplasticity that hinder the treatment with standard antiparkinsonian therapies based on dopamine replacement (Xu et al., 2005). Thus, the present study was aimed at clarifying the effects of this dual action drug, 8-(-3-chlorostyryl)-caffeine (CSC), which causes a blockade of adenosine $A_{2A}$ receptors as well as a MAO B inhibition, on behavior and on brain biochemical changes, after its systemic administration to rats submitted to striatal lesions with the neurotoxin 6-OHDA, used as a model of PD.

**Table 1 – Effects of CSC (8-(3-chlorostyryl) caffeine), alone or associated with L-DOPA (L-DOPA 50 mg/kg + benserazide 30 mg/kg), on apomorphine-induced rotational behavior in rats, after 6-OHDA-induced striatal lesion**

| Group | Rotation/h |
|---|---|
| Sham-operated | 4.2±0.4 |
| Control (6-OHDA) | 210.0±11.4[a] |
| CSC 1 mg | 173.1±16.7[a] |
| CSC 5 mg | 122.5±14.1[a,b,c] |
| CSC 1 mg+L-DOPA 50 mg | 274.4±15.0[a,b,c,d] |
| L-DOPA 50 mg | 238.3±14.2[a,c] |

The number of net contralateral rotations was counted for 60 min. Data are reported as means±SEM, from 8 to 10 animals (one-way ANOVA, followed by Tukey's *post-hoc* test).
[a] vs. sham-operated; [b] vs. controls (6-OHDA alone); [c, d] vs. CSC 1 and 5; respectively, at $p<0.05$.

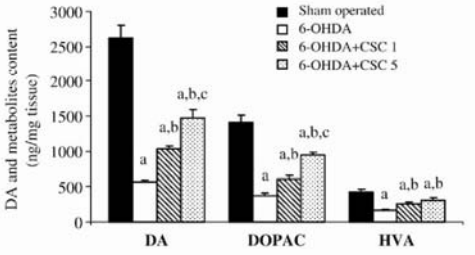



**Fig. 1 – Effects of CSC (8-(3-chlorostyryl) caffeine) on levels of DA, DOPAC and HVA, in the rat striatum (ng/mg tissue). Animals received CSC (1 and 5 mg/kg, i.p., starting 6 days after the 6-OHDA lesion and continuing daily for 7 days), starting 1 h after 6-OHDA lesion. Data are reported as means± SEM, from 8 to 10 animals. [a] vs. sham-operated; [b] vs. controls (6-OHDA alone); [c] vs. CSC 1, respectively; at $p<0.05$ (one-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test).**

## 2. Results

### 2.1. *Rotational behavior*

Our results showed that, while almost no contralateral rotational behavior was observed in sham-operated controls (4.2±0.4 turns/h), the striatal 6-OHDA-lesioned group showed an average of 210.0±11.4 turns/h, after the apomorphine challenge [$F(3,34)=43.31$; $p<0.001$]. The number of rotations per hour decreased by 18% and 42% in the 6-OHDA-lesioned group, after the treatment with CSC 1 (173.1±16.7 turns/h) and CSC 5 mg/kg (122.5±14.1 turns/h). Altogether, our results showed that CSC significantly and dose-dependently diminishes the apomorphine-induced rotations resulted from the striatal 6-OHDA lesion, and partially reversed the neurotoxin effects. However, the CSC effect on body rotation in the 6-OHDA group was not potentiated by its association with L-DOPA. As a matter of fact, no significant difference was observed between L-DOPA (L-DOPA 50 mg/kg+benserazide 30 mg/kg) and CSC 1+L-DOPA (CSC 1 mg/kg+L-DOPA 50 mg/kg+benserazide 30 mg/kg) (Table 1).

### 2.2. *Striatal monoamine contents*

We also showed that (Fig. 1) 6-OHDA caused a drastic decrease of 79%, 73% and 61% in striatal DA (565.9±32.5 ng/mg tissue), DOPAC (373.2±41.1 ng/mg tissue) and HVA (167.9±18.1 ng/mg tissue) contents, respectively, as compared to the sham-operated control group (DA: 2631.0±171.9 ng/mg tissue; DOPAC: 1405.0± 108.8 ng/mg tissue; HVA: 429.0±34.5 ng/mg tissue). On the other hand, the sub-chronic treatment of 6-OHDA-lesioned rats with

**Table 2 – Effects of CSC (8-(3-chlorostyryl) caffeine), alone or combined with L-DOPA, on the levels of DA, DOPAC and HVA (ng/mg tissue), in the rat striatum after 6-OHDA-induced lesion**

| Group | DA | DOPAC | HVA |
|---|---|---|---|
| Sham-operated | 2631.0±171.9 | 1405.0±108.8 | 429.0±34.5 |
| Control (6-OHDA) | 565.9±32.5[a] | 373.2±41.1[a] | 167.9±18.1[a] |
| CSC 1 mg | 1031.0±41.2[a,b] | 610.6±42.8[a] | 261.5±20.4[a] |
| CSC 1 mg+ L-DOPA 50 mg | 2129.0±102.0[a,b,c,d] | 1320.0±136.2[b,c,d] | 430.7±35.9[b,c] |
| L-DOPA 50 mg | 1243.0±112.0[a,b,e] | 664.7±66.1[a,b,e] | 245.0±29.1[a,e] |

CSC (1 and 5 mg/kg, i.p.), alone or combined to L-DOPA (CSC 1 mg/kg, i.p., with L-DOPA 50 mg/kg+benserazide 12.5 mg/kg, i.p.), were administered daily for 7 days (starting 6 days after the 6-OHDA lesion and continued for 7 days). Controls were treated with saline. Two weeks after the lesion, animals were decapitated and the ipsilateral striata were dissected for monoamine determination (ng/mg tissue) by HPLC-EC. Results are expressed as means±SEM of the number of experiments (6–8 animals).
[a] vs. sham-operated; [b] vs. control (6-OHDA); [c] vs. CSC 1; [d] vs. CSC 5; [e] vs. CSC 1+L-DOPA, respectively; at $p<0.05$ (ANOVA and Tukey's *post hoc* test).

CSC (1 and 5 mg/kg, i.p.) also caused decreases in DA levels (61% and 49%) and its metabolites DOPAC (57% and 33%) and HVA (39% and 26%), respectively, although to a much smaller extent as compared to values observed in the 6-OHDA-lesioned group. The percentages decreases were also dose-dependent either with DA (6-OHDA-lesioned group: 565.9±32.5 ng/mg tissue; CSC 1: 1031.0±41.2 ng/mg tissue; CSC 5: 1477.0±118.5 ng/mg tissue) or with DOPAC (6-OHDA-lesioned group: 373.2±41.1 ng/mg tissue; CSC 1: 610.6±42.8 ng/mg tissue; CSC 5: 940.0±43.2 ng/mg tissue) or HVA (6-OHDA-lesioned group: 167.9±18.1 ng/mg tissue; CSC 1: 261.5±20.4 ng/mg tissue; CSC 5: 316.0±35.0 ng/mg tissue).

In order to demonstrate a potentiation of L-DOPA effects by CSC on the striatal DA and metabolites levels after the 6-OHDA lesion, these two drugs were combined. We showed that after

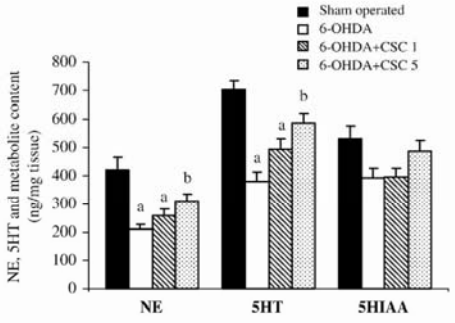



**Fig. 2 – Effects of CSC (8-(3-chlorostyryl) caffeine) on the levels of NE, 5-HT and 5-HIAA (ng/mg tissue) in the rat striatum. Animals received CSC 1 and 5 mg/kg, i.p., starting 6 days after the 6-OHDA lesion and continuing daily for 7 days. Data are reported as means±SEM, from 8 to 10 animals. [a] vs. sham-operated; [b] vs. controls (6-OHDA alone); [c] vs. CSC 1, respectively; at $p<0.05$ (one-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test).**

6-OHDA lesion, contents of DA, DOPAC and HVA decreased by 79%, 73% and 61%, respectively, as compared to the sham-operated group. On the other hand, with the 6-OHDA group treated with CSC (1 mg/kg, i.p.), smaller decreases in DA, DOPAC and HVA values (61%, 57% and 39%, respectively) were observed. Values of DA and metabolites were very close to those shown by the sham-operated group, in the 6-OHDA group treated with the combination of CSC and L-DOPA+benserazide (CSC 1 mg/kg and L-DOPA 50 mg/kg+benserazide 12,5 mg/kg), indicating an almost total reversal of the 6-OHDA neurotoxic effect (Table 2).

Similarly (Fig. 2), decreases in the striatal NE, 5-HT and 5-HIAA contents observed after the 6-OHDA lesion were of the order of 50%, 46% and 26%, respectively (NE: 210.3±15.7 ng/mg tissue; 5-HT: 378.4±34.5 ng/mg tissue; 5-HIAA: 394.3±33.4 ng/mg tissue), as compared to the sham-operated controls (NE: 420.6±44.7 ng/mg tissue; 5-HT: 704.6±29.3 ng/mg tissue; 5-HIAA: 532.0±45.4 ng/mg tissue).These decreases were smaller in the 6-OHDA-lesioned group, after the treatment with the two doses of CSC, and the effects were dose dependent. Thus, CSC (1 mg/kg) decreased 39%, 30% and 25% the contents in ng/mg tissue of NE (257.8±25.8), 5-HT (494.6±38.0) and 5-HIAA (397.1±32.0), respectively, indicating a partial reversal of the 6-OHDA effect. Similarly, the higher dose of CSC (5 mg/kg) brought NE, 5-HT and 5-HIAA contents even closer to normal values (CSC 5, NE: 311.9±23.3 ng/mg tissue; 5-HT: 587.8±32.7 ng/mg tissue; 5-HIAA: 487.5±36.3 ng/mg tissue). While L-DOPA 50 mg/kg (L-DOPA 50+Benz 30) did not reverse 6-OHDA effects on NE, 5-HT and 5-HIAA concentrations in the striatum of 6-OHDA-lesioned rats, its association with CSC 1 mg/kg brought values closer to those of the sham-operated group (Table 3).

### 2.3. *Striatal glutamate and GABA contents*

We showed that the striatal 6-OHDA lesion also increases glutamate (96.4±4.7 μmol/g tissue) and GABA (57.8±6.9 μmol/g tissue) contents by 3.8 and 3 times, respectively, as compared

**Table 3 – Effects of CSC (8-(3-chlorostyryl) caffeine), alone or combined with L-DOPA, on the levels of NE, 5-HT and 5-HIAA (ng/mg tissue), in the rat striatum after 6-OHDA-induced lesion**

| Group | NE | 5HT | 5-HIAA |
|---|---|---|---|
| Sham-operated | 420.6±44.7 (6) | 704.6±29.3 (6) | 532.0±45.4 (6) |
| Control (6-OHDA) | 210.3±15.7 (10)[a] | 378. 4±34.5(10)[a] | 394.3±33.4 (10) |
| CSC 1 mg | 257.8±25.8 (8)[a] | 494.6±38.0 (7)[a] | 397.1±32.0 (7) |
| CSC 1 mg+ L-DOPA 50 mg | 390.8±18.6 (7)[b,c] | 586.8±32.9 (7)[b] | 448.7±51.5 (6) |
| L-DOPA 50 mg | 222.3±16.7 (7)[a,e] | 420.6±24.1 (7)[a,d,e] | 398.4±37.5 (6) |

CSC (1 and 5 mg/kg, i.p.), alone or combined to L-DOPA (CSC 1 mg/kg, i.p. with L-DOPA 50 mg/kg+benserazide 12.5 mg/kg, i.p.), were administered daily for 7 days (starting 6 days after the 6-OHDA lesion and continued for 7 days). Controls were treated with saline. Two weeks after the lesion, animals were decapitated and the ipsilateral striata were dissected for monoamine determination (ng/mg tissue) by HPLC-EC. Results are expressed as means±SEM of the number of experiments (6–8 animals).
[a] vs. sham-operated; [b] vs. control (6-OHDA); [c] vs. CSC 1; [d] vs. CSC 5; [e] vs. CSC 1+L-DOPA; respectively, at $p<0.05$ (ANOVA and Tukey's *post hoc* test).

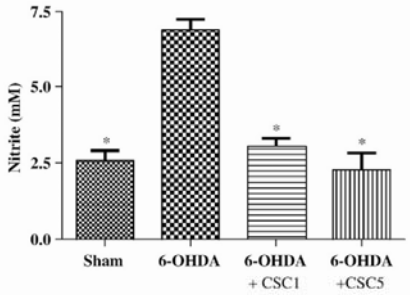



**Fig. 3 – Effects of CSC (8-(3-chlorostyryl) caffeine) on the nitrite formation, in the rat striatum (mM). Animals received CSC 1 and 5 mg/kg, i.p., starting 6 days after the 6-OHDA lesion and continuing once daily for 7 days. Ipsilateral striata were dissected 24 h after the last drug injection. Data are reported as means ± SEM, from 8 animals. * vs. 6-OHDA-lesioned rats, at $p<0.05$ (one-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test).**

to the sham-operated controls (GLU: 25.4±2.6; GABA: 19.3 ±1.9 μmol/g tissue). The alterations were lower after the treatment with CSC, at the doses of 1 and 5 mg/kg (CSC 1: GLU, 72.4±6.0; GABA, 44.3±6.0; CSC 5: GLU, 57.1±4.9; GABA, 25.5 ±3.9 μmol/g tissue), as compared to the 6-OHDA-lesioned group without CSC treatment. These results indicate a partial but significant reversal of the neurotoxin effect after the CSC treatment. The effects of 6-OHDA lesion on glutamate and GABA levels were not reversed by L-DOPA 50 mg/kg (L-DOPA 50 +Benz 30). However, a potentiation was demonstrated in the 6-OHDA-lesioned animals treated with the association of CSC 1+L-DOPA 50 (Table 4).

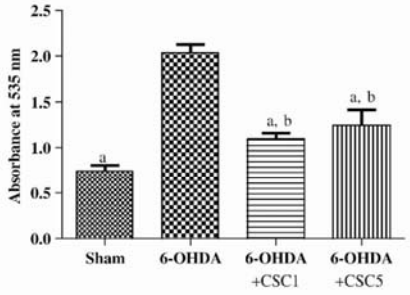



**Fig. 4 – Effects of CSC (8-(3-chlorostyryl) caffeine) on the lipid peroxidation, in the rat striatum (mM). Animals received CSC 1 and 5 mg/kg, i.p., starting 6 days after the 6-OHDA lesion and continuing once daily for 7 days. Ipsilateral striata were dissected 24 h after the last drug injection. Data are reported as means ± SEM, from 8 animals. [a] vs. 6-OHDA-lesioned rats; [b] vs. sham-operated rats; at $p<0.05$ (one-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test).**

**Table 4 – Effects of CSC (8-(3-chlorostyryl) caffeine), alone or combined with L-DOPA, on the levels of glutamate and GABA (μmol/g tissue), in the rat striatum after 6-OHDA-induced lesion**

| Group | Glutamate | GABA |
|---|---|---|
| Sham-operated | 25.4±2.6 | 19.3±1.9 |
| Control (6-OHDA) | 96.4±4.7[a] | 57.8±6.9[a] |
| CSC 1 mg | 72.4±6.0[a,b] | 44.3±6.0[a,b] |
| CSC 1 mg+L-DOPA 50 mg | 56.0±3.5[a,b,c] | 37.1±3.1[a,b,d] |
| L-DOPA 50 mg | 85.3±6.7[a,d,e] | 51.0±2.7[a,d,e] |

CSC (1 and 5 mg/kg, i.p.), alone or combined to L-DOPA (CSC 1 mg/kg, i.p. with L-DOPA 50 mg/kg+benserazide 12.5 mg/kg, i.p.), were administered daily for 7 days (starting 6 days after the 6-OHDA lesion and continued for 7 days). Controls were treated with saline. Two weeks after the lesion, animals were decapitated and the ipsilateral striata were dissected for monoamine determination (ng/mg tissue) by HPLC-EC. Results are expressed as means ± SEM of the number of experiments (7–8 animals).
[a] vs. sham-operated; [b] vs. control (6-OHDA); [c] vs. CSC 1; [d] vs. CSC 1+ L-DOPA; [e] vs. L-DOPA; respectively, at $p<0.05$ (ANOVA and Tukey's *post hoc* test).

### 2.4. *Nitrite concentration*

Nitrite levels, which are an index of free radical formation, were drastically increased by 2.7 times in the ipsilateral striata of 6-OHDA-lesioned rats, as compared to the sham-operated group. The 6-OHDA groups after treatment with CSC (1 and 5 mg/kg) showed an almost total reversal of these effects, and nitrite concentration returned to values not significantly different from those of the sham-operated group (Fig. 3).

### 2.5. *Lipid peroxidation measurements*

The ipsilateral striata of 6-OHDA-lesioned rats showed a 2.8-times increase in TBARS content, as measured by the increased absorbance values compared to those of the sham-operated group. These effects were partially but significantly reversed in the 6-OHDA group treated with CSC at the doses of 1 and 5 mg/kg (Fig. 4).

## 3. Discussion

Adenosine $A_{2A}$ receptors have attracted considerable attention because of their interaction with the dopaminergic system, and as potential targets for PD pharmacotherapy (Ferre et al., 2001; Wardas, 2002). A post-mortem study (Callon et al., 2004) showed increased $A_{2A}$ receptors in the brain of patients with Parkinson's disease (PD) presenting dyskinesias, while studies using experimental models of PD (Grondin et al., 1999; Kanda et al., 2000) suggest that the $A_{2A}$ receptor antagonists have an antiparkinsonian activity and potentiate the activity of levodopa. Furthermore, comparable effects of $A_{2A}$ receptor antagonists on levodopa-induced motor complications are found, in rats with a unilateral 6-OHDA-induced dopaminergic lesion (Morelli and Pinna, 2001; Pinna et al., 2001; Bové et al., 2002; Bibbiani et al., 2003; Lundblad et al., 2003).

In the present study, we showed that CSC, a dual action drug, showing a $A_{2A}$ receptor antagonism and MAO B inhibition,

caused a dose-dependent decrease in the rotational behavior of rats unilaterally lesioned with the striatal injection of 6-OHDA, as compared to the 6-OHDA group without CSC treatment. Since MAO B inhibitors are also thought to possess antiparkinsonian properties, dual targeting drugs that block both MAO B and $A_{2A}$ receptors may enhance the therapeutic potential in PD treatment (Vlok et al., 2006). There is evidence that $D_2$ receptor activation *in vivo* antagonizes tonic activation of $A_{2A}$ receptors (Salmi et al., 2005). These authors showed that the effects of $D_2$ blockade are different after $A_{2A}$ receptors blockade or on $A_{2A}$ receptors knockout mice. Compared to wild-type mice, $A_{2A}$ knockout mice show decreased neurodegeneration, after treatment with MPTP as well as improved motor performance in models of PD.

Furthermore, not only pre-clinical but also clinical studies carried out with $A_{2A}$ antagonists indicate that the benefit seen in PD may occur through the modulation of dopaminergic effects, on the striatal dysfunction, associated with motor disability (Bara-Jimenez et al., 2003). Adenosine $A_{2A}$ receptor antagonists can attenuate the induction as well as the expression of motor response alterations to chronic dopaminergic stimulation in parkinsonian animals, possibly by blocking $A_{2A}$ receptor-stimulated signaling pathways (Bibbiani et al., 2003). It has been shown that CSC also causes MAO-B inhibition, and this effect may contribute to the neuroprotective potential of $A_{2A}$ receptor antagonists (Petzer et al., 2003; Chen et al., 2002).

In a recent study (Aguiar et al., 2006), we showed significant increases in the number of apomorphine-induced rotations in 6-OHDA-lesioned rats, as compared to sham-operated animals. A partial recovery was seen in 6-OHDA-lesioned rats, after caffeine treatment that as CSC is an $A_{2A}$ antagonist. We also demonstrated that the unilateral stereotaxic injection of 6-OHDA produced decreases in monoamine levels, in the ipsilateral side when compared to the contralateral unlesioned side. Although significant decreases in NE and DA levels were seen in the ipsilateral side of the 6-OHDA group, the caffeine treatment partially reversed the 6-OHDA effects on DA levels, indicating that significant recoveries occurred on dopaminergic but not on noradrenergic neurons.

These results partially agree with the present work demonstrating that CSC treatment significantly and dose-dependently reversed the striatal decreases in monoamines (NE, DA and 5-HT) as well as their metabolite contents (5-HIAA, DOPAC and HVA), in the 6-OHDA-lesioned rats, indicating the potential benefit of $A_{2A}$ antagonism in PD. The better results observed, in the present study, with CSC as related to caffeine, are probably due to the fact that CSC is also a MAO B inhibitor, a property that probably contributes to its pharmacological profile.

Recently, Golembrowska and Dziubina (2004), investigated the effects of CSC on DA release in the striatum of intact and reserpine-treated rats. CSC significantly increased striatal DA release, after its combination with L-DOPA and benserazide, in intact and reserpine-injected rats. CSC did not change the elevated level of DOPAC and HVA in intact rats, but raised it in DA-depleted rats. Their results suggest that these effects may be mediated by striatal adenosine $A_{2A}$ receptors, and are probably related to the CSC action on DA metabolism and the increased transport of exogenous L-DOPA into the brain.

Recent studies (Matsuya et al., 2007; Rose et al., 2006) showed synergistic effects of $A_{2A}$ antagonists and L-DOPA combination, at lower doses, in reversing motor deficits in animal models of PD, what could allow a decrease in dosage as well as in the incidence of L-DOPA side effects. We also showed that, in 6-OHDA-lesioned rats, the combination of CSC and L-DOPA presented a synergistic effect, reversing almost completely the decreases in DA and metabolite contents seen after the 6-OHDA neurotoxic action.

In the present study, we observed that the decreases in NE, 5-HT and its metabolite levels, in the striatum of 6-OHDA-lesioned rats, were also partially blocked after the CSC treatment, and its effects were potentiated by the association with L-DOPA. PD is undoubtedly a disorder that primarily results from a dopamine neuronal loss, and this alteration leads to imbalances in many other non-dopaminergic transmitter systems, including 5-HT (Nicholson and Brotchie, 2002). As a matter of fact, degeneration of the serotonergic system was already observed after 6-OHDA-lesions in rats, and this finding agrees with ours suggesting that alterations in the serotonergic system play a role in the pathophysiology of PD. Although the exact role of 5-HT in PD remains unclear, recent advances in its understanding and the generation of side-effects of dopamine replacement therapy have identified 5-$HT_{1A}$, 5-$HT_{1B}$ and 5-$HT_{2C}$ receptors as potential therapeutic targets in PD (Nicholson and Brotchie, 2002; Scholtissen et al., 2005).

Similarly to the CSC blockade of the 6-OHDA effect on monoamine contents, we also observed a blockade in glutamate and GABA releases, in the ipsilateral side of the striatum of 6-OHDA-lesioned rats after CSC treatment. While the effect of 6-OHDA on glutamate and GABA contents were not reversed by L-DOPA alone, a potentiation was demonstrated, in 6-OHDA-lesioned animals treated with the association of CSC and L-DOPA, as compared to the effects of either drug alone. Our data agree with an earlier study (Perry et al., 1983) showing that the mean GABA content was significantly elevated in the putamen of Parkinson's disease patients. These authors also measured GABA contents in both sides of the striatum of rats unilaterally injected with 6-OHDA, and found that the GABA content was significantly elevated in the ipsilateral striatum. Furthermore, $A_{2A}$ receptor stimulation enhances striatal glutamate extracellular levels (Simpson et al., 1992; Popoli et al., 1995; Sebastião and Ribeiro, 1996), and the protective effect of $A_{2A}$ receptor antagonists may be attributed to their ability to reduce excitatory amino acid release.

Oxidative stress, resulting from excessive production of reactive oxygen species (ROS), is known to cause cellular damage and eventual death, due to the overactivation of glutamate receptors and the generation of NO, superoxide and hydrogen peroxide. Agonists at $A_1$ receptors and antagonists at $A_{2A}$ receptors are known to protect against cell damage induced by ROS (Stone, 2005). Recently, Fatokun et al. (2007), showed that oxidative stress in cerebellar granule neurons was ameliorated by $A_1$ receptor activation or $A_{2A}$ receptor blockade. These findings agree with our results, showing that CSC at both doses significantly decreased nitrite levels and lipid peroxidation in the 6-OHDA lesioned rats, pointing out to a neuroprotective and antioxidant effect of this drug.

All together, our data showed that CSC acts in several ways, reversing neurochemical alterations on monoaminergic,

glutamatergic and GABAergic neurotransmission in the 6-OHDA model of PD, in rats. Some of these effects are direct ones, such as that seen mainly on dopaminergic neurons where the drug causes a neuroprotection and is an antioxidant. In other circumstances, CSC acts indirectly, decreasing the contents of GABA and glutamate in the nigrostriatal pathway which is overactive in PD, contributing to restore the balance between the direct and indirect pathways. However, the MAO B inhibitory effect of CSC certainly plays a role, adding to its pharmacological profile and possible benefits in PD treatment.

## 4. Experimental procedures

### 4.1. Animals

Adult male Wistar rats (260–280 g, aged 3 months) from the Animal House of the Federal University of Ceará, were kept on a 12-h light/dark cycle with free access to water and standard food. All experiments were performed according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals from the US Health and Human Services Department. Animals were anesthetized with a combination of ketamine (100 mg/kg, i.p.) and xylazine (5 mg/kg, i.p.) and given an unilateral stereotaxic injection of 12 μg 6-OHDA (12 μg/μl) with 0.2 mg/ml L-ascorbic acid (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), into the right striatum (AP 0.9/1.4, ML 3.0, DV 3.3, from bregma), according to the Atlas of Paxinos and Watson (1986), using a 10-μl Hamilton syringe. Sham-operated animals received vehicle and were used as controls. The treatment with 8-(-3-chlorostyryl)-caffeine (CSC, 1 and 5 mg/kg, i.p.) alone or in combination with L-DOPA (CSC 1 mg/kg, i.p. and L-DOPA 50 mg/kg plus benserazide 12.5 mg/kg, i.p.) started 6 days after the 6-OHDA-induced lesion, and continued daily for 7 days. Twenty-four hours after the last drug administration (2 weeks after the 6-OHDA injection), the behavior was assessed by monitoring body rotations induced by apomorphine (3 mg/kg, i.p.). The number of net rotations (the number of 360° contralateral turns) was recorded for 60 min and, at the next day, animals were sacrificed, and the striatal tissue was collected and stored at −70 °C until use.

### 4.2. Drugs

8-(3-chlorostyryl)-caffeine (CSC), 6-hydroxydopamine, ascorbic acid, apomorphine, sodium octanesulfonic acid, acetonitrile, tetrahydrofuran, standard monoamines and amino acids were purchased from Sigma. L-3,4-Dihydrophenylalanine (L-DOPA) and benserazide (Prolopa 100/25 mg) were purchased from Roche. All other drugs were of analytical grade.

### 4.3. Monoamine levels' determination

For the measurement of monoamine levels and their metabolites noradrenaline (NE), dopamine (DA), 3,4 dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanilic acid (HVA), serotonin (5-HT) and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), the brain tissue was used to prepare 10% homogenates. Homogenates were sonicated in 0.1 M $HClO_4$, for 30 s, centrifuged at 4 °C for 15 min at 15,000 rpm, and the supernatant was filtered (0.2 μm, Millipore). A 20-μl sample was then injected into a high-performance liquid chromatograph (HPLC) column. The mobile phase was 0.163 M citric acid, pH 3.0, containing 0.02 mM EDTA, with 0.69 mM sodium octanesulfonic acid (SOS), as ion pairing reagent, 4% v/v acetonitrile and 1.7% v/v tetrahydrofuran. NE, DA, 5-HT and their metabolites were electrochemically detected, using an amperometric detector (Shimadzu, Japan), by oxidation on a glassy carbon electrode at 0.85 V relative to the Ag–AgCl reference electrode. The amount of monoamines was determined by comparison with standards injected into the HPLC column at the day of experiment, and their concentrations were expressed as ng/mg tissue.

### 4.4. Measurement of extracellular glutamate and GABA

Glutamate and GABA were determined on a high-performance liquid chromatograph (HPLC) system with pre-column derivatization with o-phthaldialdehyde/2-mercaptoethanol/borate reagent (pH 10.4) and fluorimetric detection. Briefly, a 10% homogenate (of 0.1 M perchloric acid) was derivatized with the same volume of the o-phthaldialdehyde reagent solution (Sigma), and after a 60-s reaction period was immediately injected into an HPLC with a 4-mm C18 reverse-phase column (Shimadzu, Japan). The mobile phase A (pH 6.95) was composed of sodium acetate (0.1 M), methanol (6%) and tetrahydrofuran (1.5%) and flowed at 1.0 ml/min in a gradient (30-min duration) and mobile phase B was 100% methanol (Massieu and Tapia, 1997). The fluorimetric detector (Model RF 535; Shimadzu, Japan) had the excitation and emission wavelengths set at 370 and 450 nm, respectively. The amount of amino acids was determined by comparison with standards injected into the HPLC column at the day of experiment, and their concentrations were expressed as μmol/g tissue.

### 4.5. Nitrite determination

Immediately after decapitation of the sham-operated 6-OHDA-lesioned, 6-OHDA+CSC 1 and 5 mg/kg, i.p., groups, the ipsilateral striata from all animals were dissected for the preparation of 10% homogenates (w/v). After centrifugation (800×*g*, 10 min), supernatants were collected and the NO production was determined by the Griess reaction (Green et al., 1981). Briefly, 100 μl of the supernatant were incubated with 100 μl of the Griess reagent [1% sulfanilamide in 1% $H_3PO_4$/0.1% *N*-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride/1% $H_3PO_4$/distilled water (1:1:1:1)] at room temperature for 10 min. The absorbance was measured at 550 nm via a microplate reader. Nitrite concentration (μM) was determined from a standard $NaNO_2$ curve.

### 4.6. Evaluation of lipid peroxidation

Immediately after decapitation, ipsilateral striata from all groups were dissected for the preparation of 10% homogenates (w/v, in 1.15% KCl). The formation of lipid peroxides during lipid peroxidation was followed by measuring the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), as previously described by Draper and Hadley, 1990. Briefly, samples were mixed with 1 ml of 10% trichloroacetic acid and 1 ml of 0.6% thiobarbituric acid. The reaction media was heated in a boiling water bath for 15 min, and *n*-butanol (2:1 v/v) was added to the media. After centrifugation (800×*g*, 5 min), TBARS contents were determined at 535 nm.

### 4.7. *Statistical analysis*

All results were presented as means ± SEM. One-way ANOVA was used, followed by Tukey's as the *post-hoc* test. Results were considered significant at $p<0.05$.

## Acknowledgments

The authors are grateful to the financial support of the Brazilian National Research Council (CNPq) and to Professor M.O.L. Viana for the orthographic revision of the manuscript.

## REFERENCES

Aguiar, L.M., Nobre Jr., H.V., Macedo, D.S., Oliveira, A.A., Freitas, R.M., Vasconcelos, S.M., Cunha, G.M., Sousa, F.C., Viana, G.S., 2006. Neuroprotective effects of caffeine in the model of 6-hydroxydopamine lesion in rats. Pharmacol. Biochem. Behav. 84, 415–419.

Bara-Jimenez, W., Sherzai, A., Dimitrova, T., Favit, A., Bibbiani, F., Gillespie, M., Morris, M.J., Mouradian, M.M., Chase, T.N., 2003. Adenosine $A_{2A}$ receptor antagonist treatment of Parkinson's disease. Neurology 61, 293–296.

Bibbiani, F., Oh, J.D., Petzer, J.P., Castagnoli Jr., N., Chen, J.F., Schwarzschild, M.A., Chase, T.N., 2003. $A_{2A}$ antagonist prevents dopamine agonist-induced motor complications in animal models of Parkinson's disease. Exp. Neurol. 184, 285–294.

Bové, J., Marin, C., Bonastre, M., Tolosa, E., 2002. Adenosine $A_{2A}$ antagonism reverses levodopa-induced motor alterations in hemiparkinsonian rats. Synapse 46, 251–257.

Callon, F., Dridi, M., Hornykiewicz, O., Bédard, P.J., Rajput, A.H., Di Paolo, T., 2004. Increased adenosine $A_{2A}$ receptors in the brain of Parkinson's disease patients with dyskinesias. Brain 127, 1075–1084.

Chen, J.F., Steyn, S., Staal, R., Petzer, J.P., Xu, K., Schyf, C.V., Castagnoli, K., Sonsalla, P.K., Castagnoli Jr., N., Schwarzschild, M.A., 2002. 8-(3-Chlorostyryl) caffeine may attenuate MPTP neurotoxicity through dual actions of monoamine oxidase inhibition and $A_{2A}$ receptor antagonism. J. Biol. Chem. 277, 36040–36044.

Draper, H.H., Hadley, M., 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Methods Enzymol. 186, 421–431.

Fatokun, A.A., Stone, T.W., Smith, R.A., 2007. Cell death in rat cerebellar granule neurons induced by hydrogen peroxide in vitro: mechanisms and protection by adenosine receptor ligands. Brain Res. 1132, 193–202.

Ferre, S., O'Connor, W.T., Fuxe, K., Ungerstedt, U., 1993. The striatopallidal neuron: a main locus for adenosine–dopamine interactions in the brain. J. Neurosci. 13, 5402–5406.

Ferre, S., O'Connor, W.T., Snaprud, P., Ungerstedt, U., Fuxe, K., 1994. Antagonistic interaction between adenosine $A_{2A}$ receptors and dopamine $D_2$ receptors in the ventral striatopallidal system. Implications for the treatment of schizophrenia. Neuroscience 63, 765–773.

Ferre, S., Popoli, P., Gimenez-Llort, L., Rimondini, R., Muller, C.E., Stromberg, I., Ogren, S.O., Fuxe, K., 2001. Adenosine/dopamine interaction: implications for the treatment of Parkinson's disease. Parkinsonism Relat. Disord. 7, 235–241.

Fink, J.S., Weaver, D.R., Rivkees, S.A., Peterfreund, R.A., Pollak, A.E., Adler, E.M., Reppert, S.M., 1992. Molecular cloning of the rat $A_2$ adenosine receptor: selective coexpression with $D_2$ dopamine receptors in rat striatum. Brain Res. Mol. Brain Res. 14, 186–195.

Golembrowska, K., Dziubina, A., 2004. Effect of adenosine $A_{2A}$ receptor antagonist 8-(3-chlorostyryl) caffeine on L-DOPA biotransformation in rat striatum. Brain Res. 998, 208–217.

Green, L.C., Tannenbaum, S.R., Goldman, P., 1981. Nitrate synthesis in the germ free and conventional rat. Science 212, 56–58.

Grondin, R., Bedard, P.J., Hadj Tahar, A., Gregoire, L., Mori, A., Kase, H., 1999. Antiparkinsonian effect of a new selective adenosine $A_{2A}$ receptor antagonist in MPTP-treated monkeys. Neurology 52, 1673–1677.

Hauser, R.A., Schwarzschild, M.A., 2005. Adenosine $A_{2A}$ receptor antagonists for Parkinson's disease: rationale, therapeutic potential and clinical experience. Drugs Aging 22, 471–482.

Ikeda, K., Kurokawa, M., Aoyama, S., Kuwana, Y., 2002. Neuroprotection by adenosine $A_{2A}$ receptor blockade in experimental models of Parkinson's disease. J. Neurochem. 80, 262–270.

Kalda, A., Yu, L., Oztas, E., Chen, J.F., 2006. Novel neuroprotection by caffeine and adenosine $A_{2A}$ receptor antagonists in animal models of Parkinson's disease. J. Neurol. Sci. 25, 9–15.

Kanda, T., Jackson, M.J., Smith, L.A., Pearce, R.K., Nakamura, J., Kase, H., Kuwana, Y., Jenner, P., 2000. Combined use of the adenosine $A_{2A}$ antagonist KW-6002 with L-DOPA or with selective $D_1$ or $D_2$ dopamine agonists increases antiparkinsonian activity but not dyskinesia in MPTP-treated monkeys. Exp. Neurol. 162, 321–327.

Li, X.X., Nomura, T., Aihara, H., Nishizaki, T., 2001. Adenosine enhances glial glutamate efflux via $A_{2A}$ adenosine receptors. Life Sci. 9, 343–350.

Lundblad, M., Vaudano, E., Cenci, M.A., 2003. Cellular and behavioural effects of adenosine $A_{2A}$ receptor antagonist KW-6002 in a rat model of L-DOPA -induced dyskinesia. J. Neurochem. 84, 1398–1410.

Marchi, M., Raiteri, L., Risso, F., Vallarino, A., Bonfanti, A., Monopoli, A., Ongini, E., Raiteri, M., 2002. Effects of adenosine $A_1$ and $A_{2A}$ receptor activation on the evoked release of glutamate from rat cerebrocortical synaptosomes. Br. J. Pharmacol. 136, 434–440.

Massieu, L., Tapia, R., 1997. Glutamate uptake impairment and neuronal damage in young and aged rats *in vivo*. J. Neurochem. 69, 1151–1160.

Matsuya, T., Takuma, K., Sato, K., Asai, M., Murakami, Y., Miyoshi, S., Noda, A., Nagai, T., Mizoguchi, H., Nishimura, S., Yamada, K., 2007. Synergistic effects of adenosine $A_{2A}$ antagonist and L-DOPA on rotational behaviors in 6-hydroxydopamine-induced hemi-Parkinsonian mouse model. J. Pharmacol. Sci. 103, 329–332.

Morelli, M., Pinna, A., 2001. Interaction between dopamine and adenosine $A_{2A}$ receptors as a basis for the treatment of Parkinson's disease. Neurol. Sci. 22, 71–72.

Nicholson, S.L., Brotchie, J.M., 2002. 5-Hydroxytryptamine (5-HT, serotonin) and Parkinson's disease – opportunities for novel therapeutics to reduce the problems of levodopa therapy. Eur. J. Neurol. 3, 1–6.

Ochi, M., Koga, K., Kurokawa, M., Kase, H., Nakamura, J., Kuwana, Y., 2000. Systemic administration of adenosine $A_{2A}$ receptor antagonist reverses increased GABA release in the globus pallidus of unilateral 6-hydroxydopamine-lesioned rats: a microdialysis study. Neuroscience 100, 53–62.

Paxinos, G., Watson, C., 1986. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd Ed. Academic Press, New York.

Perry, T.L., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Fibiger, H.C., 1983. Striatal GABAergic neuronal activity is not reduced in Parkinson's disease. J. Neurochem. 40, 1120–1123.

Petzer, J.P., Steyn, S., Castagnoli, K.P., Chen, J.F., Schwarzschild, M.A., Van der Schyf, C.J., Castagnoli, N., 2003. Inhibition of monoamine oxidase B by selective adenosine $A_{2A}$ receptor antagonists. Bioorg. Med. Chem. 11, 1299–1310.

Pinna, A., Fenu, S., Morelli, M., 2001. Motor stimulant effects of the adenosine $A_{2A}$ receptor antagonist SCH58261 do not develop tolerance after repeated treatments in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. Synapse 39, 233–238.

Popoli, P., Betto, P., Reggio, R., Ricciarello, G., 1995. Adenosine $A_{2A}$ receptor stimulation enhances striatal extracellular glutamate levels in rats. Eur. J. Pharmacol. 12 (287), 215–217.

Rose, S., Jackson, M.J., Smith, L.A., Stockwell, K., Johnson, L., Carminati, P., Jenner, P., 2006. The novel adenosine $A_{2A}$ receptor antagonist ST1535 potentiates the effects of a threshold dose of L-DOPA in MPTP treated common marmosets. Eur. J. Pharmacol. 546, 82–87.

Salmi, P., Chergui, K., Fredholm, B.B., 2005. Adenosine–dopamine interactions revealed in knockout mice. J. Mol. Neurosci. 26, 239–244.

Scholtissen, B., Verhey, F.R.J., Steinbusch, H.W.M., Leentjens, A.F.G., 2005. Serotonergic mechanisms in Parkinson's disease: opposing results from preclinical and clinical data. J. Neural Transm. 113, 1435–1463.

Schwarzschild, M.A., Chen, J.F., Ascherio, A., 2002. Caffeinated clues and the promise of adenosine $A_{2A}$ antagonists in PD. Neurology 23 (58), 1154–1160.

Schwarzschild, M.A., Agnati, L., Fuxe, K., Chen, J.F., Morelli, M., 2006. Targeting adenosine $A_{2A}$ receptors in Parkinson's disease. Trends Neurosci. 29, 647–654.

Sebastião, A.M., Ribeiro, J.A., 1996. Adenosine $A_2$ receptor-mediated excitatory actions on the nervous system. Prog. Neurobiol. 48, 167–189.

Simpson, R.E., O'Regan, M.H., Perkins, L.M., Phillis, J.W., 1992. Excitatory transmitter amino acid release from the ischemic rat cerebral cortex: effects of adenosine receptor agonists and antagonists. J. Neurochem. 58, 1683–1690.

Stone, T.W., 2005. Adenosine, neurodegeneration and neuroprotection. Neurol. Res. 27, 161–168.

Vlok, N., Malan, S.F., Castagnoli Jr., N., Bergh, J.J., Petzer, J.P., 2006. Inhibition of monoamine oxidase B by analogues of the adenosine $A_{2A}$ receptor antagonist (E)-8-(3-chlorostyryl) caffeine (CSC). Bioorg. Med. Chem. 14, 3512–3521.

Wardas, J., 2002. Neuroprotective role of adenosine in the CNS. Pol. J. Pharmacol. 54, 313–326.

Xu, K., Bastia, E., Schwarzschild, M.A., 2005. Therapeutic potential of adenosine $A_{2A}$ receptor antagonists in Parkinson's disease. Pharmacol. Ther. 105, 267–310.

# Livros Grátis

( http://www.livrosgratis.com.br )

Milhares de Livros para Download:


Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo