



EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRACEREBRAL DA (-)-EPICATEQUINA EM RATOS  
LESIONADOS EM UM MODELO ANIMAL DE PARKINSONISMO

Letícia Ribeiro

Dissertação de mestrado

Porto Alegre, RS/ 2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRACEREBRAL DA (-)-EPICATEQUINA  
EM RATOS LESIONADOS EM UM MODELO ANIMAL DE  
PARKINSONISMO

Letícia Ribeiro

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para obtenção do Grau de Mestre em Psicologia

Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lisiane Bizarro

Co-orientação Prof. Dr. Alcyr Oliveira

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Instituto de Psicologia**

**Programa de Pós-Graduação em Psicologia**

**Agosto, 2009.**

## Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a Deus e à vida pela oportunidade de concluir mais um importante passo na minha carreira.

Agradeço também muito a meus pais, Maria Julia e Sérgio, por propiciarem, às custas de muito esforço, que eu pudesse ingressar, permanecer e concluir meus estudos nesse programa de pós-graduação sem o auxílio financeiro de uma bolsa.

À minha irmã Flávia pelo apoio, solidariedade e sábios conselhos acadêmicos.

Ao Prof. Dr. Tadeu Mello e Souza pela co-orientação deste projeto. Por ter me acolhido em seu laboratório, permitindo que eu realizasse os experimentos. Agradeço a disponibilidade para auxiliar nas pequenas dificuldades no dia-a-dia da experimentação e pela disposição dos materiais.

Agradeço aos colegas do laboratório 35 do Departamento de Bioquímica pela ajuda, e pelos momentos de descontração. Em especial à Cristiane e a Roberta, que me auxiliaram muito nos experimentos.

Agradeço também aos funcionários dos Departamentos de Bioquímica e Psicologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelas inúmeras ações que propiciaram e asseguraram o meu trabalho nesses dois anos.

À Profa. Dra. Lisiane Bizarro, minha “orientadora de direito”, por ter me acolhido em seu laboratório, e pela orientação acadêmica “nos 45 minutos do segundo tempo!”, meu segundo ano de mestrado.

Aos colegas do LPNeC pelas trocas de conhecimento e também pelos momentos de descontração, em especial à Alba pelas fofocas e sessões de catarse!

Aos alunos de iniciação científica Renata Ribas e João Pinheiro pelo auxílio e por participarem meu trabalho nos salões de Iniciação Científica da UFRGS e da UFCSPA, onde receberam premiações de destaque. Valeu!

*And last but not least*, agradeço ao Prof. Dr. Alcyr Oliveira, meu “orientador de fato” que inicialmente me aceitou como aluna neste programa, e permitiu que eu pudesse realizar mais essa meta na minha carreira. Agradeço o apoio nos momentos de desespero, o adequado manejo da minha ansiedade, e a disposição para ouvir e ajudar sempre. Agradeço o suporte didático e o incentivo, mas também as discussões sobre estatística (por e-mail!) durante as madrugadas,

as correções dos meus textos prolixos, a ajuda no envio dos resumos para os eventos sempre em cima da hora! Obrigada, obrigada mesmo.

Agradeço também o suporte financeiro da CAPES através do Programa de Apoio a Projetos Institucionais com a Participação de Recém-Doutores, do CNPq através do PRONEX e do FINEP através da Rede Instituto Brasileiro de Neurociência que possibilitam o desenvolvimento dessa pesquisa.

À todos, meus sinceros agradecimentos.

*“Conhecimento real é saber a extensão da própria ignorância”*

*Confúcio*

## SUMÁRIO

Lista de tabelas.....	7
Lista de figuras.....	8
Lista de siglas e abreviaturas .....	9
Resumo.....	10
Abstract .....	11
Capítulo I – Introdução.....	12
Referências.....	22
Capítulo II - Déficits proprioceptivos na doença de Parkinson: dos relatos clínicos à experimentação animal.....	27
Resumo.....	28
Abstract.....	29
Introdução.....	30
2.1 Doença de Parkinson .....	31
2.2 Propriocepção: definições e conceituação.....	32
2.3 Alterações sensoriais na DP e suas implicações para a propriocepção.....	33
2.4 Evidências experimentais de alterações proprioceptivas na DP.....	35
2.5 Déficits proprioceptivos em modelos animais da DP.....	40
2.6 Possíveis vias de degeneração cortical da propriocepção na DP.....	45
2.7 Considerações finais.....	48
Referências.....	51
Capítulo III - Efeito da administração intracerebral da (-)-epicatequina em ratos lesionados em um modelo animal de parkinsonismo.....	61
Resumo.....	62
Abstract.....	63
Introdução.....	64
4. Material e métodos.....	68
4.1 Sujeitos.....	68
4.1.1 Procedimentos cirúrgicos.....	68
4.2 Tratamento com EC.....	69
4.3 Avaliação comportamental.....	69
4.3.1. Teste de motricidade sobre grade.....	69

4.3.2	rotações induzidas por apomorfina e metilfenidato.....	70
4.3.3	Teste da fita adesiva .....	70
4.3.4.	Análise imunoistoquímica da tirosina hidroxilase.....	70
4.3.5.	Análise estatística.....	71
5.	Resultados.....	73
5.1	Teste das rotações induzidas por apomorfina e metilfenidato.....	73
5.2	- Teste de motricidade sobre grade.....	73
5.3	Teste da fita adesiva.....	74
5.4	Imunoistoquímica.....	76
6.	Discussão.....	77
	Referências.....	81
	Capítulo IV- Discussão geral.....	85
	Referências.....	92
	Capítulo V - Considerações finais.....	94
	Anexos.....	96
	Anexo A- Aprovação do comitê de ética em pesquisa.....	97

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Porcentagem de Animais por Grupo que Apresentou Rotações no Teste de Motricidade sobre Grade.....	74
Tabela 2- Preferência por Pata no Teste da Fita Adesiva .....	75

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I

Figura 1. Vias dopaminérgicas no Sistema Nervoso Central.....	14
Figura 2. Catequinas do chá verde.....	17
Figura 3. Campo aberto.....	19
Figura 4. Teste da fita adesiva.....	20
Figura 5. Teste de motricidade sobre grade.....	21

### Capítulo II

Figura 1. Plataforma utilizada para medir oscilações posturais.....	37
Figura 2. Aparato utilizado para verificar a capacidade de proprioceptiva de sujeitos com DP através da escrita.....	39
Figura 3. <i>Rotarod</i> .....	42
Figura 4. <i>Staircase test</i> .....	44
Figura 5. Area motora suplementar.....	48

### Capítulo III

Figura 1. Aparato onde é realizado o teste de motricidade sobre grade .....	69
Figura 2. Medianas (intervalo interquartil) do número de giros ipsilaterais à lesão realizados pelos animais no teste de rotações induzidas por metilfenidato por 30 minutos.....	73
Figura 3. Médias (DP±) de reação à pata direita em logaritmos naturais de todos os grupos.....	75
Figura 4. Médias do grau de lesão (em porcentagem) provocada pela 6-OHDA na SN de 3 ratos por grupo.....	76
Figura 5. <i>Fatias de mesencéfalo com expressão de células TH- positivas (45µm)</i> .....	76

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DP- Doença de Parkinson .....	10
6- OHDA - 6 – Hidroxidopamina.....	10
SN - Substância Negra.....	14
FPM- Feixe prosencefálico medial.....	14
ERO- Espécies reativas de oxigênio.....	14
GSH – glutathiona reduzida.....	15
MPTP- 1-metil-4-fenil-1-2-3-6-tetraidropiridina.....	15
COMT- Catecol-O-metiltransferase .....	15
L-DOPA – Levodopa.....	16
EGCG- (-)-epigallocatequina-3-galato.....	17
ECG- (-)-epicatequina-3-galato.....	17
EGC- (-)-epigallocatequina.....	17
EC- (-) –epicatequina.....	17
C- (-)- catequina.....	17
PRE- potenciais relacionados ao evento.....	34
NO - Óxido nítrico.....	67
PBS (do inglês “ <i>phosphate buffered saline</i> ”)-.....	71

## RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) caracteriza-se por sintomas motores típicos e déficits proprioceptivos. Considerando-se o papel do estresse oxidativo na doença, o uso de agentes antioxidantes pode ter potencial terapêutico. Depois de uma revisão sobre déficits proprioceptivos na DP, esta dissertação apresenta um estudo empírico sobre o efeito da epicatequina (EC), sobre o modelo animal da 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA). Ratos (n = 75) infundidos unilateralmente com 6-OHDA na via nigroestriatal receberam, após 24h, infusões intracerebrais de EC no estriado (0,031mg/mL, 0,1mg/mL, 0,31mg/mL, 1mg/mL ou veículo). O tratamento foi avaliado através dos testes de rotações induzidas por metilfenidato (40mg/kg) e apomorfina (1mg/kg), teste de motricidade sobre grade e teste da fita adesiva, além de imunistoquímica. Os resultados mostraram que não houve diferenças entre os grupos em nenhuma das avaliações. Com base nesses resultados, concluímos que a EC, nas concentrações e condições empregadas, não foi capaz de retardar a lesão nigroestriatal ou recuperá-la.

Palavras-chave: Doença de Parkinson; propriocepção; 6-hidroxi-dopamina; epicatequina

## ABSTRACT

### EFFECTS OF INTRACEREBRAL INFUSION OF (-) - EPICATECHIN IN AN ANIMAL MODEL OF PARKINSONISM

Besides the typical motor symptoms, Parkinson's disease (PD) is characterized by deficits in proprioception. Considering the putative role of oxidative stress in PD, antioxidants might have therapeutic value. After a review on proprioception in PD, this dissertation presents an empirical study based on the evaluation of epicatechin (EC), in 6-hydroxidopamine (6-OHDA) model of Parkinsonism. Rats (n=75) were unilaterally lesioned into the nigrostriatal pathway and treated 24h later with intracerebral infusions of EC in the striatum (0.031mg/mL, 0.1mg/mL, 0.31mg/mL, 1mg/mL or vehicle). The behavioral effects were assessed through methylphenidate (40 mg/kg) and apomorphine (1 mg/kg)-induced rotations, footfault and stick-tape tests; and brain tissue was analyzed by immunohistochemistry. There were no significant differences between groups neither in the behavioral assessments nor the histological analyses. These results showed that EC was incapable to act on either the reversal or retardation of the lesion in the nigrostriatal pathway.

Keywords: Parkinsonism; proprioception; 6-hydroxidopamine; epicatechin

## CAPITULO I

### INTRODUÇÃO

Em 1817 o médico inglês James Parkinson publicou o livro “*Shaking Palsy*” descrevendo pela primeira vez os sintomas de uma síndrome que afetava progressivamente a motricidade de alguns pacientes (Kumar, Huamas & Calne, 2005). Atualmente, a doença de Parkinson (DP), como a síndrome se popularizou anos mais tarde, é reconhecida como a 2ª patologia neurodegenerativa que mais afeta a população idosa mundialmente. Estatísticas apontam que em torno de 2,5% dos idosos sejam afetados pela doença em todo o mundo (Hattori, 2003). A temática acerca da enfermidade, seus sintomas e possíveis formas de tratamento serviu de base para o desenvolvimento da dissertação aqui apresentada.

Genericamente caracterizada pela manifestação de alterações motoras, a patologia é evidenciada pela presença de tremores em repouso, rigidez muscular, acinesia e dificuldade para iniciar movimentos (Alexi, 2000). A degeneração da motricidade leva à manifestação clínica de sintomas inicialmente moderados até mais específicos e graves como dificuldades na escrita e na fala, perda da habilidade de movimentar-se com desenvoltura, postura em flexão e distúrbios respiratórios e digestivos como a sialorréia (Chou & Hurtig, 2004). Perdas cognitivas como dificuldades de atenção e memória além de perturbações psiquiátricas e fisiológicas como alterações do humor e do sono também são freqüentemente observadas (Kumar, Huamas & Calne, 2005).

Apesar de promover sintomas muito debilitantes que afetam de forma extensa a qualidade de vida desses pacientes, a doença *per se*, não é capaz de levar esses indivíduos à morte. Entretanto, estudos apontam que a taxa de óbitos é maior entre os portadores da doença se comparados com indivíduos normais de mesma idade (Uitti et al., 1993). Uma das explicações para este fenômeno são as mortes geradas por complicações dos sintomas, como mortes por “sufocamento” em função da sialorréia ou por complicações clínicas geradas por fraturas adquiridas em quedas (Korell & Tanner, 2005).

As quedas sofridas pelos portadores da doença estão entre as suas maiores preocupações. É comum que pacientes com DP apresentem a clássica postura em flexão, na qual o tronco fica debruçado sobre os membros inferiores (Jacobs & Horak, 2006). Essa característica, somada à bradicinesia e à rigidez muscular

contribuem em grande parte para que as quedas ocorram. Entretanto, é possível que outros mecanismos em prejudicados na patologia estejam implicados na dificuldade de manutenção da postura ereta e adequada reposta motora frente aos obstáculos do ambiente. Considerando tais possibilidades, estudos têm apontado que pacientes com DP apresentam perdas na propriocepção (Contreras-Vidal & Gold, 2004; Demirci, Grill, McShane, & Hallett, 1997; Rocchi et al., 2004).

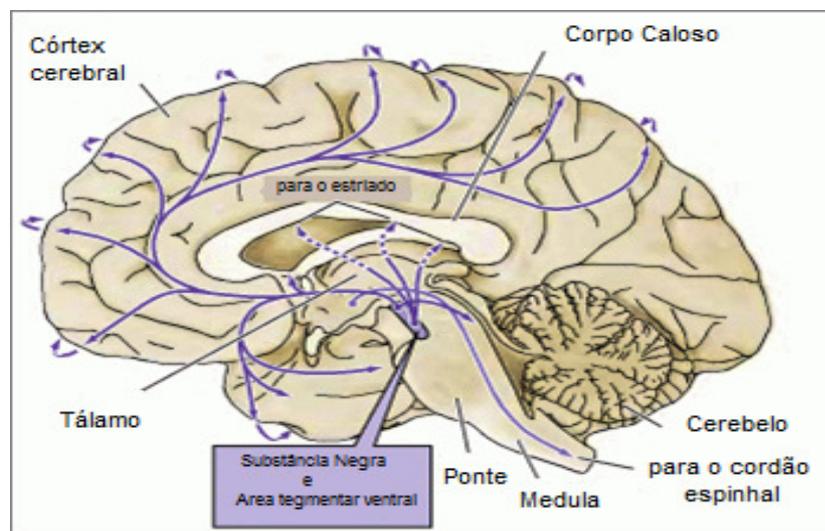
O capítulo II desta dissertação traz uma revisão de relatos clínicos e experimentais sobre os déficits proprioceptivos em portadores da patologia. No capítulo, organizado sob a forma de um artigo, também são discutidas a presença de alterações proprioceptivas em animais submetidos aos modelos animais de parkinsonismo, e as relações entre a circuitaria da propriocepção e os circuitos neuronais envolvidos na DP. Nesta dissertação, o manuscrito contribui tanto para a problematização das perdas proprioceptivas na DP quanto para a ampliação dos conhecimentos acerca do sistema proprioceptivo, um aspecto psicobiológico pouco estudado na patologia.

A DP ainda é uma doença sem cura e grande parte disso deve-se ao pouco conhecimento que se tem sobre suas origens e evolução. Acredita-se que a enfermidade tenha uma origem multifatorial, envolvendo uma combinação entre fatores ambientais e genéticos (Korell & Tanner, 2005). Estudos epidemiológicos têm apontado para alguns fatores de risco como etnia, gênero e presença de casos anteriores da doença na família. De acordo com esses dados, homens caucasianos, de idade avançada e que já apresentaram casos de DP na família, estão entre os mais prováveis afetados pela enfermidade (Morens et al., 1996; Mayeux et al., 1995).

Também foi identificado que traços de personalidade como timidez, rigidez de opinião e comportamento evitativo estão estatisticamente vinculados ao aparecimento da doença (Schulte, 1982; Golbe & Langston, 1993; de la Fuente-Fernandez & Calne, 2001). Informações sobre o ambiente também são consideradas na manifestação da patologia já que alguns estudos têm apontado que viver em áreas rurais representa um alto fator de risco para a doença. Aparentemente, a vida rural expõe os sujeitos a elementos identificados como promotores dos sintomas da doença tais como utilização de água advinda de poços, exposição a pesticidas e demais produtos agrícolas, além de intoxicação por contato com metais e outros descartes industriais (Koller et. al., 1990; Wong, Gray, Hassanein, & Koller, 1991; Korell & Tanner, 2004) É possível também que

todos esses fatores ambientais atuam interagindo entre si. Os traços de personalidade podem fazer a manutenção de um estilo de vida favorável à exposição aos elementos ambientais tóxicos disponíveis em áreas rurais, e perpetuar esses hábitos nos membros de uma família por gerações, facilitando a reincidência da DP em determinados contextos (Kumar, Huamas & Calne, 2005).

Em termos fisiológicos, os sintomas motores da doença são desencadeados pela morte progressiva de neurônios dopaminérgicos na parte compacta da Substância Negra (SN) (Murrin, 2004). Essa estrutura conecta-se ao estriado através de um feixe de axônios conhecido como feixe prosencefálico medial (FPM) e a morte de tais neurônios levam à depleção da dopamina estriatal (ver Figura 1) comprometendo diversos circuitos encefálicos e sendo a base para manifestação dos sintomas da doença (Jenner & Olanow, 1996). A presença de inclusões citoplasmáticas como os corpos de Lewy nas células dopaminérgicas remanescentes à morte neuronal, denuncia o mal-enovelamento de proteínas com a parkina e a  $\alpha$ -sinucleína, uma importante característica na fisiopatologia da doença (Kruger et al., 1998).



*Figura 1.* Vias dopaminérgicas no Sistema Nervoso Central. A via nigroestriatal compreende o caminho entre a substância negra e os núcleos caudado e putâmen do corpo estriatal. Adaptado de Purves et al., 2008.

Os fenômenos bioquímicos que desencadeiam a morte neuronal na DP ainda são desconhecidos, embora estudos pré-clínicos apontem alguns fatores. O estresse oxidativo parece ser um elemento fundamental na patologia, levando à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) e contribuindo para a peroxidação lipídica. Também já foi relatada uma redução dos níveis de glutatona

reduzida (GSH), uma importante enzima antioxidante endógena (Jha, Juma, Lalli, Liu & Pettus, 2000). Esse aumento de ERO somado ao acúmulo de ferro na SN e os baixos níveis de GSH geram um quadro favorável à destruição dos neurônios por meio da interrupção da cadeia respiratória mitocondrial e por fim, da destruição do DNA (do inglês “*Deoxyribonucleic acid*”) das células (Merad-Boudia, Nicole, Santiard-Baron, Saille, & Ceballos-Picot, 1998). A morte dos primeiros grupos neuronais induz respostas inflamatórias, aumentando ainda mais a produção de ERO e elevando os níveis de óxido nítrico e demais espécies reativas de nitrogênio, agravando o quadro (Antunes, Han, Rettori, & Cadenas, 2002).

O conhecimento sobre a fisiopatologia da síndrome contribuiu para o desenvolvimento de modelos animais que pudessem mimetizar os sintomas da doença e assim facilitar a exploração de possíveis causas e potenciais tratamentos. A utilização de substâncias capazes de destruir seletivamente neurônios dopaminérgicos, principalmente, da indução de estresse oxidativo tem sido muito útil no estudo da DP. Da mesma forma, novas tecnologias que permitem a exploração de animais geneticamente modificados, têm facilitado a exploração dos danos fisiológicos que estão na base do aparecimento de sintomas da DP. A exploração experimental de neurotoxinas como a 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) e a 1-metil-4-fenil-1-2-3-6-tetraidropiridina (MPTP) além de considerações sobre os modelos genéticos de indução da DP também foi brevemente contemplada no capítulo II da dissertação.

Os tratamentos disponíveis para DP ainda são recursos paliativos, geralmente, pouco efetivos e que visam basicamente conter o progresso da doença e minimizar sintomas. Entre os principais tratamentos disponíveis está a administração de fármacos com a L - Dopa, um precursor dopaminérgico e o uso de inibidores da catecol-O-metil-transferase (COMT) (Marsden & Parkes, 1976; Huang, Kumar & Tsui, 2002). Tratamentos cirúrgicos como a estimulação cerebral profunda e a palidotomia, ambos os procedimentos visam interromper a ativação dos neurônios estriatais localizados no globo pálido, propiciam o fim dos tremores e facilitam o controle da motricidade (Koller, Wilkinson, Pahwa, & Miyawaki, 1998; Lang & Widner, 2002). Entretanto, tais tratamentos também possuem limitações: os procedimentos cirúrgicos são invasivos e somente utilizados em casos avançados da doença (Jankovic, 2006). O tratamento farmacoterápico, por sua vez, pode gerar efeitos colaterais, como a discinesia, um

reconhecido efeito da administração prolongada da L-Dopa (Olanow & Stocchi, 2000). Tais considerações reforçam a necessidade da busca por terapias alternativas que possam impedir a progressão da patologia e promover a recuperação das funções motoras.

Considerando-se o papel fundamental que o estresse oxidativo tem para o desenvolvimento da DP, tratamentos baseados na administração de substâncias antioxidantes têm sido bastante investigados, com destaque para o uso de flavonóides. Os flavonóides pertencem a uma classe de polifenóis que são encontrados em alimentos como chocolates, vinhos, chás e óleo de oliva (Mandel & Youdim, 2004). São substâncias com alta capacidade antioxidante e antiinflamatória e tem como benefício, o fato de serem naturalmente consumidos como parte da dieta (Weinreb, Mandel, Amit, & Youdim, 2004).

Estudos epidemiológicos realizados no último século, nas décadas de 80 e 90 apontavam para uma baixa prevalência da DP em países asiáticos, onde o consumo de chás, e em especial o chá verde, é um hábito cultural (Li et al., 1985; Wang, Shi, Wu, He, & Zhang, 1991). Pesquisas realizadas com essas populações fizeram relações entre consumo do chá verde e a baixa prevalência de doenças neurodegenerativas. Um estudo mais recente apontou uma correlação entre o consumo médio de 2 xícaras de chá verde ao dia e baixos riscos de DP (Checkoway et al., 2002). Tais considerações alertaram os pesquisadores para os benefícios do consumo do chá verde e desencadearam uma série de pesquisas voltadas para a exploração dos componentes do chá.

O chá verde é extraído das folhas da *Camellia sinenses*, uma planta nativa da Ásia, cultivada, principalmente, na China, Japão, Índia e leste Europeu (Weinreb et al., 2004). Da mesma planta também podem ser extraídos os chás preto, oolong e branco, bebidas também reconhecidas por propiciarem benefícios ao organismo, através de propriedades antioxidantes, antiinflamatórias, antibacterianas e antialérgicas (Schmidt & Ferger, 2004). A diferença entre os chás depende do processo de oxidação à que as folhas são expostas antes do consumo (Takeo, 2004). Dentre essas bebidas, o chá verde é a que conserva as maiores propriedades, pois é feita com folhas apenas secas, não - oxidadas, garantindo maior disponibilidade de flavonóides no composto, em especial das catequinas (Matsubara & Rodrigues-Amaya, 2006).

As catequinas são fitonutrientes que compõem entre 30 e 40% dos compostos extraídos do chá verde, o que o torna umas das maiores fontes de

flavonóides na natureza. Foram identificados 5 tipos de catequinas: (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG), o maior componente entre os flavonóides do extrato (40-60%), seguida pelas (-)-epigallocatequina (EGC) e (-)-epicatequina-3-galato (ECG) ambas compoendo cerca de 10-20%, a (-)-epicatequina (EC) que contribui com 4-6% das catequinas do chá e a (-)-catequina (C), com 2-4% (Babich, Krupka, Nissin, Zuckerbraun, 2004).

Ricas em anéis aromáticos e grupamentos hidroxil (ver Figura 2), as catequinas têm uma reconhecida e potente habilidade de “varredura” (*scavenger*) sobre as ERO e também de atuar como quelante sobre o ferro, o que garante sua eficaz atuação frente ao estresse oxidativo (Weinreb et al., 2004). Esses dados têm sido corroborados através de vários estudos baseados no uso preventivo ou como tratamento das catequinas em uma série de patologias. Ensaio *in vitro* e experimentos *in vivo* com animais e humanos demonstram que tais substâncias são efetivas no combate a doenças cardiovasculares (Shroeter, Williams, Matin, Iversen, & Rice-Evans, 2000), câncer e doenças neurodegenerativas, com destaques para as doenças de Alzheimer e Parkinson (para uma revisão ver Mandel e Youdim, 2004).

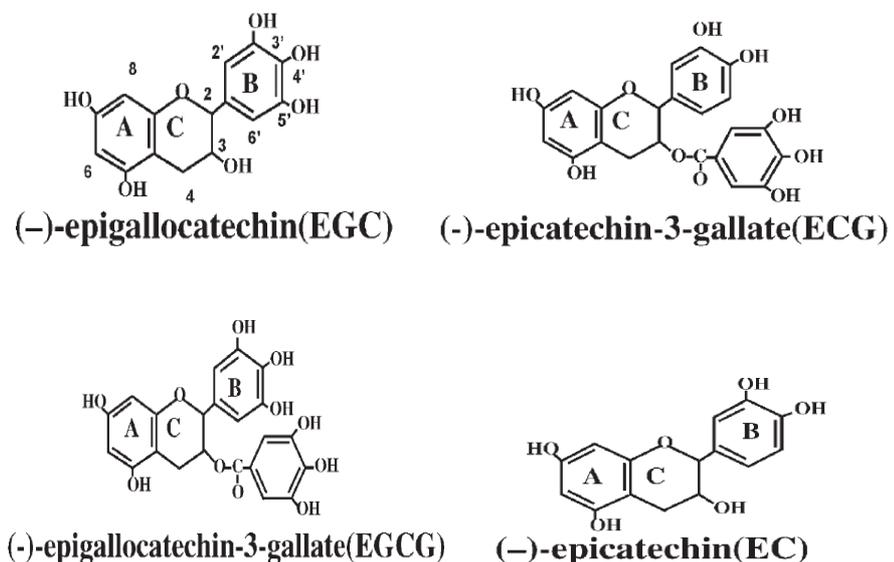


Figura 2. Catequinas do chá verde. As quatro principais catequinas do Chá Verde. Adaptado de Ramassamy, 2006.

Especificamente em relação à DP, as catequinas têm sido apontadas como uma excelente possibilidade de tratamento. Além da capacidade antioxidante e antiinflamatória, as catequinas são capazes de atuar sobre uma série de alvos

intracelulares, ativando cascatas bioquímicas fundamentais para a modulação de genes apoptóticos e elevando a expressão de enzimas antioxidantes endógenas como a superóxido dismutase e catalase (Levites, Weinreb, Maor, Youdim, & Mandel, 2001; Levites, Amit, Mandel, & Youdim, 2003; Owuor & Kong, 2002). Também podem atuar inibindo a ação da COMT, o que indica um potencial benefício no uso dessas substâncias tanto para um tratamento agudo, quanto em longo prazo para essa patologia (Lu, Meng & Yang, 2003; Pan et al., 2003).

O capítulo III desta dissertação está organizado na forma de artigo e traz os resultados de um experimento feito com o objetivo de testar os efeitos da administração intracerebral da (-)-epicatequina no modelo animal de parkinsonismo da 6-OHDA. Até o momento de finalização desta dissertação, este é o primeiro estudo a testar os efeitos da EC in vivo neste modelo animal. No experimento, foi testado o efeito da EC sob neurônios dopaminérgicos previamente lesionados com 6-OHDA. Apesar do que sugere a literatura, nossos resultados não apontaram para a eficácia da EC como neuroprotetor capaz de retardar a ação da toxina. É provável que características da própria EC e fatores como a forma e o protocolo de administração estejam entre os motivos que explicam este efeito.

Embora os resultados de nosso experimento não tenham sido positivos, a análise dos testes comportamentais dos animais trouxe dados interessantes. O modelo animal de parkinsonismo da 6-OHDA tem sido testado comportamentalmente através de aparatos como o campo aberto (ver figura 3). A depleção dopaminérgica provocada pela infusão unilateral da toxina provoca uma assimetria motora no animal fazendo com que este apresente rotações ipsi ou contralaterais ao sítio da lesão quando desafiados com a injeção de anfetaminas ou agonistas dopaminérgicos. Este tipo de teste comportamental é considerado clássico para este modelo de lesão, sendo largamente utilizado. No experimento apresentado no capítulo III, o efeito da epicatequina foi testado através da observação da redução do comportamento de rotações frente aos fármacos metilfenidato e apomorfina.



*Figura 3.* Campo aberto. Aparato onde são realizados os testes de rotações induzidas por fármacos no modelo a animal da 6-OHDA.

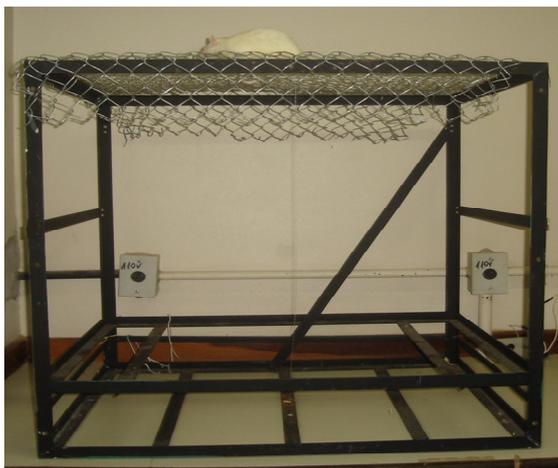
Além da forma clássica de testar a assimetria dopaminérgica provocada pela lesão, foram utilizados mais dois testes: o teste da fita adesiva e o teste de motricidade sobre grade (TMG).

No Teste da fita adesiva são colocadas fitas adesivas nas patas dianteiras do animal e contabilizadas as latências para a retirada das fitas de ambas as patas (ver figura 4). Animais com lesões cerebrais unilaterais tendem a demonstrar a assimetria motora através da preferência do animal por tirar a fita de uma das patas mais rapidamente. A testagem da assimetria motora no modelo animal da 6-OHDA através do teste da fita adesiva é recente, mas tem mostrado ser efetiva na detecção de perdas na sensomotricidade do animal na pata ipsilateral à lesão (Castañeda et al., 2005, Park, Lee, Bang, Lee, & Ahn, 2008). A preferência do animal pela pata ipsilateral, sugere deficiências no processamento da informação dos receptores sensoriais e musculares da pata contrária à lesão, apontando que a lesão dopaminérgica foi efetiva. Essa evidencia de alterações na sensomotricidade sugere também a existência de déficits proprioceptivos na pata afetada pela lesão nigroestriatal. Esses resultados confirmam a participação das estruturas cerebrais envolvidas na Doença de Parkinson e sua relação com a manifestação de déficits no sistema proprioceptivo nos indivíduos portadores da doença.



*Figura 4.* Teste da fita adesiva. O animal é colocado em campo aberto com fitas presas às patas e a latência para a retirada das fitas é contada. Retirado de Castañeda et al., 2005.

O capítulo III apresenta também os resultados do comportamento de animais lesionados com 6-OHDA no TMG. O TMG é um teste amplamente utilizado para identificar a presença de lesões cerebrais unilaterais em ratos em modelos animais de isquemia-reperfusão (Lubics et al., 2005) e piramidotomia (Starkey et al., 2005). O aparato consiste de uma grade elevada do solo, sobre a qual os animais são colocados e têm contabilizados os desequilíbrios que cometem ao moverem-se sobre a mesma (ver figura 5). Entretanto, em um trabalho anterior do nosso grupo com ratos lesionados unilateralmente no modelo animal da 6-OHDA, foi demonstrado que a exposição a essa tarefa é capaz de provocar rotações ipsilaterais à lesão de forma espontânea em animais com lesões extensas na SN (Silvestrin, de Oliveira, Batassini, Oliveira, & Souza, 2009). O mesmo fenômeno foi observado nos animais utilizados para o experimento apresentado no capítulo III, confirmando a observação de rotações no TMG como uma nova ferramenta comportamental para a exploração do modelo animal de parkinsonismo da 6-OHDA. Os motivos pelos quais os animais apresentam tais rotações, entretanto, ainda não foram identificados. Outros estudos estão sendo desenvolvidos para que essas questões sejam esclarecidas.



*Figura 5.* Teste de motricidade sobre grade. O animal é colocado sobre e durante 3 minutos, seu comportamento é observado quanto à presença de rotações ipsilaterais à lesão.

Uma discussão final sobre os produtos dessa dissertação, bem como suas implicações em relação à produção de conhecimento sobre a DP é encontrada no capítulo IV. Encerrando o documento, o capítulo V, traz considerações sobre a experiência de conduzir este trabalho que foi o primeiro deste programa de pós-graduação a ser realizado com animais.

## REFERÊNCIAS

- Alexi, T. (2000). Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Progress in Neurobiology* 60, 409-470.
- Antunes, F., Han, D., Rettori, D., & Cadenas, E. (2002). Mitochondrial damage by nitric oxide is potentiated by dopamine in PC12 cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1556(2-3), 233-238.
- Babich, H., Krupka, M. E., Nissim, H. A., & Zuckerbraun, H. L. (2005). Differential in vitro cytotoxicity of (-)-epicatechin gallate (ECG) to cancer and normal cells from the human oral cavity. *Toxicology in Vitro*, 19(2), 231-242.
- Checkoway, H., Powers, K., Smith-Weller, T., Franklin, G. M., Longstreth, W. T., Jr., & Swanson, P. D. (2002). Parkinson's disease risks associated with cigarette smoking, alcohol consumption, and caffeine intake. *American Journal of Epidemiology*, 155(8), 732-738.
- Chou, K. L., & Hurtig, H. I. (2005). Classical Motor Features of Parkinson's disease. In M. Ebadi & R. F. Pfeiffer (Eds.), *Parkinson's Disease*. Washington D.C.: CRC Press.
- Contreras-Vidal, J. L., & Gold, D. R. (2004). Dynamic estimation of hand position is abnormal in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 10(8), 501-506.
- de la Fuente-Fernandez, R., & Calne, D. B. (2001). Evidence for environmental causation of Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders* 8(4), 235-241.
- Demirci, M., Grill, S., McShane, L., & Hallett, M. (1997). A mismatch between kinesthetic and visual perception in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 41, 781-788.
- Golbe, L. I., & Langston, J. W. T. (1993). The etiology of Parkinson's disease: new directions for research. In J. Jankovic & E. Tolosa (Eds.), *Parkinson's disease and movement disorders* (pp. 93-101). Baltimore: Williams and Wilkins.
- Hattori, N., Kobayashi, H., Sasaki-Hatano, Y., Sato, K., & Mizuno, Y. (2003). Familial Parkinson's disease: a hint to elucidate the mechanisms of nigral degeneration. *Journal of Neurology*, 250 Suppl 3, III2-10.

- Huang, Z., Kumar, A., Tsui, J. K. C. (2002). COMT inhibition in Parkinson's disease. *Geriatrics and Aging*, 5(4):32-3.
- Jacobs, J. V., & Horak, F. B. (2006). Abnormal proprioceptive-motor integration contributes to hypometric postural responses of subjects with Parkinson's disease. *Neuroscience*, 141(2), 999-1009.
- Jankovic, J. (2006). An update on the treatment of Parkinson's disease. *The Mount Sinai Journal of Medicine*, 73(4), 682-689.
- Jenner, P., & Olanow, C. W. (1996). Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology*, 47(6 Suppl 3), S161-170.
- Jha, N., Jurma, O., Lalli, G., Liu, Y., Pettus, E. H., Greenamyre, J. T., et al. (2000). Glutathione depletion in PC12 results in selective inhibition of mitochondrial complex I activity. Implications for Parkinson's disease. *Journal of Biological Chemistry*, 275(34), 26096-26101.
- Koller, W., Vetere-Overfield, B., Gray, C., Alexander, C., Chin, T., Dolezal, J., et al. (1990). Environmental risk factors in Parkinson's disease. *Neurology*, 40(8), 1218-1221.
- Koller, W. C., Wilkinson, S., Pahwa, R., & Miyawaki, E. K. (1998). Surgical treatment options in Parkinson's disease. *Neurosurgery Clinics of North America*, 9(2), 295-306.
- Korell, M., & Tanner, C. M. (2005). Epidemiology of Parkinson's Disease: an overview In M. Ebadi & R. F. Pfeiffer (Eds.). *Parkinson's disease*. Washington D.C.: CRC Press.
- Kruger, R., Kuhn, W., Muller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kosel, S., et al. (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nature Genetics*, 18(2), 106-108.
- Kumar, A., Huang, Z., & Calne, D. B. (2005). Parkinson's disease: Where are we? In M. Ebadi & R. F. Pfeiffer (Eds.), *Parkinson's disease*. Washington D.C.: CRC Press.
- Lang, A. E., & Widner, H. (2002). Deep brain stimulation for Parkinson's disease: patient selection and evaluation. *Movement Disorders*, 17 Suppl 3, S94-101.
- Levites, Y., Amit, T., Mandel, S., & Youdim, M. B. (2003). Neuroprotection and neurorescue against Abeta toxicity and PKC-dependent release of nonamyloidogenic soluble precursor protein by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 7(8), 952-954.

- Levites, Y., Weinreb, O., Maor, G., Youdim, M. B., & Mandel, S. (2001). Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry*, *78*(5), 1073-1082.
- Li, S. C., Schoenberg, B. S., Wang, C. C., Cheng, X. M., Rui, D. Y., Bolis, C. L., et al. (1985). A prevalence survey of Parkinson's disease and other movement disorders in the People's Republic of China. *Archives of Neurology*, *42*(7), 655-657.
- Lu, H., Meng, X., & Yang, C. S. (2003). Enzymology of methylation of tea catechins and inhibition of catechol-O-methyltransferase by (-)-epigallocatechin gallate. *Drug Metabolism and Disposition*, *31*(5), 572-579.
- Lubics, A., Reglodi, D., Tamas, A., Kiss, P., Szalai, M., Szalontay, L., et al. (2005). Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. *Behavioural Brain Research*, *157*(1), 157-165.
- Mandel, S., & Youdim, M. B. (2004). Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radical Biology & Medicine*, *37*(3), 304-317.
- Marsden, C. D., & Parkes, J. D. (1976). "On-off" effects in patients with Parkinson's disease on chronic levodopa therapy. *Lancet*, *1*(7954), 292-296.
- Matsubara, S., & Rodriguez-Amaya, D. B. (2006). Teores de catequinas e teaflavinas em chás comercializados no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, *26*(2), 401-407.
- Mayeux, R., Marder, K., Cote, L. J., Denaro, J., Hemenegildo, N., Mejia, H., et al. (1995). The frequency of idiopathic Parkinson's disease by age, ethnic group, and sex in northern Manhattan, 1988-1993. *American Journal of Epidemiology*, *142*(8), 820-827.
- Merad-Boudia, M., Nicole, A., Santiard-Baron, D., Saille, C., & Ceballos-Picot, I. (1998). Mitochondrial impairment as an early event in the process of apoptosis induced by glutathione depletion in neuronal cells: relevance to Parkinson's disease. *Biochemical Pharmacology*, *56*(5), 645-655.
- Morens, D. M., Davis, J. W., Grandinetti, A., Ross, G. W., Popper, J. S., & White, L. R. (1996). Epidemiologic observations on Parkinson's disease: incidence and mortality in a prospective study of middle-aged men. *Neurology*, *46*(4), 1044-1050.

- Murrin, L. C. (2005). The Role of Dopamine in Parkinson's Disease: A Historical Review. In M. Ebadi & R. F. Pfeiffer (Eds.), *Parkinson's disease*. Washington D.C.: CRC Press.
- Owuor, E. D., & Kong, A. N. (2002). Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochemical Pharmacology*, *64*(5-6), 765-770.
- Olanow, C. W., & Stocchi, F. (2000). Why delaying levodopa is a good treatment strategy in early Parkinson's disease. *European Journal of Neurology*, *7 Suppl 1*, 3-8.
- Purves, D., Brannon, E.M., Cabeza,R., Huettel, S.A., LaBar, K.S., Platt, M.L., Woldorff, M. (2008). Principles of Cognitive Neuroscience. Retrieved in Sep. 18, 2009 from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=neurosci&part=A405&redertype=figure&id=A412>
- Ramassamy, C. (2006). Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: A review of their intracellular targets. *European Journal of Pharmacology*, *545*, 51-64.
- Rocchi, L., Chiari, L., Gross, A., & Horak, F. (2004). Voluntary and induced steps in Parkinson's disease, starting from different stance conditions. *Movement Disorders*, *19*, S257-S258.
- Schmidt, N., & Ferger, B. (2001). Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*, *108*(11), 1263-1282.
- Schroeter, H., Williams, R. J., Matin, R., Iversen, L., & Rice-Evans, C. A. (2000). Phenolic antioxidants attenuate neuronal cell death following uptake of oxidized low-density lipoprotein. *Free Radical Biology & Medicine*, *29*(12), 1222-1233.
- Schulte, P. A., Burnett, C. A., Boeniger, M. F., & Johnson, J. (1996). Neurodegenerative diseases: occupational occurrence and potential risk factors, 1982 through 1991. *Am J Public Health*, *86*(9), 1281-1288.
- Silvestrin, R. B., de Oliveira, L. F., Batassini, C., Oliveira, A., & e Souza, T. M. (2009). The footfault test as a screening tool in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience Methods*, *177*(2), 317-321.
- Starkey, M. L., Barritt, A. W., Yip, P. K., Davies, M., Hamers, F. P., McMahon, S. B., et al. (2005). Assessing behavioural function following a

- pyramidotomy lesion of the corticospinal tract in adult mice. *Experimental Neurology*, 195(2), 524-539.
- Takeo, T. (2004). Green tea and semi-fermented teas. In K. C. Wilson & M. N. Clifford (Eds.), *Tea: Cultivation to consumption* (Vol. 1992 pp. 413-414.). London: Chapman and Hall.
- Uitti, R. J., Ahlskog, J. E., Maraganore, D. M., Muentner, M. D., Atkinson, E. J., Cha, R. H., et al. (1993). Levodopa therapy and survival in idiopathic Parkinson's disease: Olmsted County project. *Neurology*, 43(10), 1918-1926.
- Wang, Y. S., Shi, Y. M., Wu, Z. Y., He, Y. X., & Zhang, B. Z. (1991). Parkinson's disease in China. Coordinational Group of Neuroepidemiology, PLA. *Chinese Medical Journal(Engl)*, 104(11), 960-964.
- Weinreb, O., Mandel, S., Amit, T., & Youdim, M. B. (2004). Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15(9), 506-516.
- Wong, G. F., Gray, C. S., Hassanein, R.S., & Koller, W. C. (1991). Environmental risk factors in siblings with Parkinson's disease. *Archives of Neurology*, 48(3), 287-289.

## CAPÍTULO II

### DÉFICITS PROPRIOCEPTIVOS NA DOENÇA DE PARKINSON: DOS RELATOS CLÍNICOS À EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Letícia Ribeiro<sup>1</sup>, Lisiane Bizarro<sup>1,2</sup> e Alcyr Oliveira<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Psicologia - Instituto de Psicologia da UFRGS

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Neurociências – Instituto de Ciências Básicas e da Saúde UFRGS

<sup>3</sup>Departamento de Psicologia - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

## RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é caracterizada pela manifestação clínica de acinesia e lentidão para iniciar movimentos, rigidez muscular e tremores em repouso. Entretanto, estudos têm demonstrado que a patologia também provoca alterações na propriocepção. Uma diminuição nos mecanismos proprioceptivos influencia diretamente o controle postural dificultando sua capacidade de calcular a amplitude e velocidade de seus movimentos, sugerindo que estejam relacionados ao aparecimento de grande parte dos sintomas motores relacionados ao parkinsonismo. O presente capítulo, organizado em formato de artigo, apresenta uma revisão crítica dos relatos clínicos sobre esses sintomas e estudos experimentais realizados com humanos e animais acerca do tema, buscando evidências que apontem a relação dos déficits proprioceptivos com a fisiopatologia da DP. A exploração desse sintoma na patologia pode contribuir com o conhecimento sobre origem e manutenção dos sintomas da doença, e com novas estratégias para intervenção na enfermidade.

Palavras-chave: Propriocepção; parkinsonismo; modelos animais de parkinsonismo

## ABSTRACT

### PROPRIOCEPTIVE DEFICITS IN PARKINSON'S DISEASE: FROM CLINIC DATA TO ANIMAL EXPERIMENTATION

Parkinson's disease (PD) is characterized by the presence of clinical symptoms such as muscular rigidity, bradykinesia, and tremors. Although the pathology has been recently linked to deficits in proprioception, disturbance in proprioceptive mechanisms can affect postural control diminishing the ability to calculate the speed and amplitude of movements, suggesting that these alterations may be related to the majority of Parkinson's symptoms. This chapter, organized as an article, presents a review study of this symptom exposing clinic and scientific data through animal experimentation, suggesting a connection between the physiology of proprioception and the damaged neuronal circuitry of PD.

Keywords: Proprioception; animal models of parkinsonism, Parkinson's Disease

## INTRODUÇÃO

A Doença de Parkinson (DP) constitui-se de uma afecção neurodegenerativa causada pela morte progressiva dos neurônios dopaminérgicos na Substância Negra (SN) (Snider, Fahn, Isgreen, & Cote, 1976). Desde 1817, quando foi descrita pela primeira vez, a patologia é caracterizada pela manifestação clínica de acinesia e lentidão para iniciar movimentos, rigidez muscular e tremores em repouso (Alexi, 2000). Entretanto, além dos sintomas motores clássicos, estudos têm demonstrado que a patologia também provoca alterações na propriocepção (Wright et. al., 2007; Almeida, 2005; Jacobs & Horak, 2006; Vaugoyeau, Viel, Assaiante, Amblard, & Azulai, 2007).

A propriocepção é o mecanismo responsável pela noção da posição que o organismo ocupa no espaço. É esse mecanismo que confere a capacidade de consciência de um indivíduo sobre onde se encontram seus membros, se permanece estático ou em movimento (Crossman & Neary, 1997). Uma diminuição nos mecanismos proprioceptivos influencia diretamente o controle postural do sujeito, dificultando também sua capacidade de calcular a amplitude e velocidade de seus movimentos. A implicação da propriocepção no desenvolvimento e manutenção da motricidade sugere que a existência de déficits em seus mecanismos esteja relacionada ao aparecimento de grande parte dos sintomas motores relacionados ao parkinsonismo (Vaugoyeau et. al., 2007).

Já foi relatado experimentalmente que indivíduos com a DP apresentam dificuldades em uma série de movimentos que dependem de uma boa integração proprioceptiva. Sujeitos com Parkinson tendem a apresentar dificuldades significativas na realização de tarefas em que lhes é solicitado que movimentem seus membros superiores ou estimem sua posição sem que possam vê-los. (Klockgether, Borutta, Rapp, Spieker, & Dichgans, 1995; Moore, 1987; Seiss, Praamstra, Hesse, & Richards, 2003). Tarefas onde estes sujeitos devem alcançar um alvo com as mãos sem a possibilidade de ver seu dedo indicador, ou que caminhar até determinado local sem que possam ver suas pernas, também sofrem prejuízos já nas fases iniciais da doença (Adamovich, Berkinblit, Henig, Sage, & Poizner, 2001; Keijsers, Admiraal, Cools, Bloem, & Gielen, 2005). Portadores da DP freqüentemente apresentam postura em flexão, que se caracteriza pela dificuldade em manter o corpo ereto. Além da incapacidade na manutenção da postura, esses indivíduos apresentam perda da habilidade em utilizar os membros

inferiores na recuperação do equilíbrio, frente à perturbações na marcha. (Maki & McIlroy, 2005; Rocchi, Chiari, Gross, & Horak, 2004). Acredita-se que a dificuldade desses pacientes nessas tarefas seja integrar adequadamente as informações proprioceptivas, a fim de que possam ajustar os movimentos para restaurar o equilíbrio corporal (Contreras-Vidal & Gold, 2004; Demirci, Grill, McShane, & Hallett, 1997; Jacobs & Horak, 2006).

Evidências experimentais têm sugerido que as anormalidades no sistema sensório-motor decorrentes da doença não são produto dos danos aos receptores proprioceptivos periféricos mas sim de prejuízos na integração cortical dos estímulos (Boecker et al., 1999; Seiss, Praamstra, Hesse, & Richards, 2003). A dificuldade de interpretação da informação sensorial parece estar relacionada à degeneração cortical das áreas sensório-motoras, o que impede um *feedback* proprioceptivo adequado, levando o sujeito a fracassar na estimativa de sua posição em relação ao ambiente.

Com base no importante papel do sistema proprioceptivo na DP, o presente artigo apresenta uma revisão sobre o tema, abordando estudos que exploram a existência de déficits proprioceptivos na patologia e buscando por evidências que sugiram bases fisiológicas para o fenômeno.

## **2.1 Doença de Parkinson**

Afetando 2,5 % da população mundial, a DP é a segunda afecção neurodegenerativa que mais incide sobre a população idosa em todo mundo, depois da Doença de Alzheimer (Hattori, Kobayashi, Sasaki-Hatano, Sato, & Mizuno, 2003). Apesar de ser mais prevalente entre os idosos, a doença também se manifesta de forma precoce afetando indivíduos jovens (Alexi, 2000).

A enfermidade é desencadeada pela morte dos neurônios dopaminérgicos na parte compacta da SN de causas ainda desconhecidas. Estudos têm indicado uma origem multifatorial envolvendo questões genéticas e ambientais (Hattori et al., 2003; Horak, Dimitrova, & Nutt, 2005; Shimohama, Sawada, Kitamura, & Taniguchi, 2003). A presença de disfunções mitocondriais, estresse oxidativo, alterações genéticas da expressão das proteínas parkina e  $\alpha$ -sinucleína e a conseqüente presença de corpos de Lewy nos neurônios da SN têm sido apontados como contribuintes para o desenvolvimento da patologia (Hattori et al., 2003).

A perda de cerca de 50% dos neurônios na parte compacta da SN acarreta em uma depleção dopaminérgica em torno de 80% no estriado, estrutura alvo das

projeções nigrais. Quando a deterioração neuronal atinge tais níveis, os mecanismos de compensação do organismo não são mais suficientes para conter os déficits e os primeiros sintomas motores da doença começam a se manifestar (Deumens et al., 2002).

Os distúrbios na motricidade presentes na DP afetam largamente a qualidade de vida dos portadores da doença. No dia-a-dia dos pacientes, essas dificuldades na motricidade se manifestam ao realizarem tarefas simples como caminhar, sentar-se e mover os membros com rapidez para alcançar objetos, por exemplo. O desempenho adequado de todas essas tarefas requer uma boa integração entre as informações vindas do ambiente, a capacidade de processamento das mesmas pelo indivíduo e a forma como seu organismo se organiza para responder às demandas do meio. Esse mecanismo de integração depende basicamente da propriocepção.

## **2.2 Propriocepção: definições e conceituação**

O termo propriocepção deriva do latim *proprius* que significa “de si mesmo”. Foi utilizado pela primeira vez pelo fisiologista Charles Sherrington para nomear os processos sensoriais envolvidos na noção consciente de um sujeito sobre sua localização espacial, postura e movimento (Jones, 2001). Esse mecanismo é fundamental para que o indivíduo estabeleça uma relação apropriada com o espaço em que se encontra e seja capaz de executar movimentos adequados.

O controle postural e os movimentos dos membros dependem, em última instância, de retroalimentação orquestrada de estímulos de contração ou estiramento dos músculos esqueléticos e a correspondente resposta reflexa da medula espinhal. Dessa forma, os movimentos do organismo dependem da velocidade e precisão com a qual os mecanorreceptores, localizados nas fibras musculares, atendem a essas alterações musculares (Jones, 2001). Entretanto, desde a década de 70, estudos têm sugerido que nenhuma fonte de estímulos aferentes pode ter sua contribuição excluída da propriocepção (Craske, 1977; Goodwin, McCloskey, & Matthews, 1972, O’Suilleabhain, 2004; Vaugoyeau et al. 2007). Outras fontes de informação como os estímulos advindos de receptores localizados na pele e articulações também contribuem para a capacidade de apreciação da consciência sobre a atividade cinética e estática do organismo (Goodwing et al., 1976; Vaugoyeau et al. 2007). Alterações na percepção

sensorial encontradas em portadores da DP alertam para a importância do funcionamento adequado desses receptores como contribuição ao sistema proprioceptivo.

### **2.3 Alterações sensoriais na DP e suas implicações para a propriocepção**

Pacientes com a enfermidade podem manifestar sensações de coceiras, formigamento, ardor ou entorpecimento nos membros, conhecidas como parestesias (O'Suilleabhain, 2004). Um estudo com 101 pacientes diagnosticados com DP revelou que 42% destes sofriam de parestesias (Snaider et al., 1976). Em um estudo semelhante, no qual 99 pacientes foram entrevistados, 63% afirmaram sofrer essas sensações e relacionaram-nas ao aparecimento e curso da DP (Shulman et al., 1996). Koller (1984) investigou 50 pacientes quanto a esses sintomas e relatou que 20% apresentavam parestesias de forma contínua, enquanto 18% tinham essas sensações de forma intermitente. Um relato com uma amostra de 85 portadores da doença reportou que cerca de 70% tinham queixas sobre parestesias, sendo que essas se manifestavam com mais intensidade nos períodos em que não estavam sob o efeito de agonistas dopaminérgicos (Gunal et al. 2002).

Pacientes que apresentam tremores no tronco tendem a experimentar a sensação de um excesso de vibrações truncais que são, em geral, incompatíveis com a intensidade dos tremores visíveis. Esse sintoma reflete a experiência subjetiva de que houve um aumento na movimentação corporal quando, na verdade, não ocorreu (Shulman, Singer, Bean, & Weiner, 1996). Tal fenômeno sugere alterações na forma como as informações sensoriais advindas dos receptores periféricos estão sendo decodificadas e interpretadas no encéfalo. Sintomas como este e a presença de parestesias em casos de DP alertam para o papel do sistema sensorial periférico na patologia, bem como, para sua relação com os sistemas motor e proprioceptivo tanto na DP, quanto no funcionamento normal (Seiss et al., 2003).

Existem poucos estudos longitudinais sobre a presença de parestesias na DP e em sua maioria, são baseados em auto-relatos dos pacientes, sem que haja uma quantificação sistemática do aparecimento, curso ou magnitude de tais sintomas (O'Suilleabhain, 2004). Snaider e colaboradores, (1976), afirmaram que em cerca de 20% das vezes, as parestesias emergem como os primeiros sinais da doença. Entretanto, a maior parte dos estudos tem sugerido que essas alterações

sensoriais seguem o curso da doença e tendem a manifestar-se conforme o aparecimento dos demais sintomas motores. A ausência de estudos mais focados na presença desses sintomas também não permite correlações precisas entre a manifestação das parestesias e outros dados pertinentes ao curso da patologia. É possível que questões como a manifestação precoce da doença ou a exposição prolongada a L-DOPA estejam relacionados à presença e intensidade dessas manifestações (O'Suilleabhain, 2004).

Sabe-se pouco sobre a circuitaria envolvida na fisiopatologia das parestesias nos casos da DP. Estudos realizados com o objetivo de rastrear danos detectáveis nas terminações cutâneas ou nervosas de portadores da patologia têm revelado a ausência de alterações periféricas observáveis (Koller, 1984; O'Suilleabhain, 2004). Apesar disso, um estudo realizado com 26 idosos portadores da doença concluiu que 53% dos sujeitos apresentaram anormalidades eletrofisiológicas quanto à condução nervosa na coluna cervical, enquanto 73% apresentaram as mesmas dificuldades na coluna lombar (Lee et al. 2002). A ausência de evidências de radiculopatias em outros estudos com portadores da DP, entretanto, sugere que as parestesias, nesses casos, tenham outras origens.

Estímulos aplicados à pele geram respostas nos núcleos da base, principalmente na SN, que tem um importante papel na modulação do processamento sensorial que ocorre no tálamo (Bendrup & McKenzie, 1974). Dados obtidos através de técnicas de detecção de potenciais relacionados ao evento (PRE) revelaram que os potenciais sensoriais evocados no córtex parietal de pacientes com DP em geral, são normais (Nakashima, Nitta, & Takahashi, 1992; Drory, Inzelberg, Groozman & Korczyn, 1998; Huttunen, & Teravainen, 1993). Esses dados reforçam a provável ausência de danos no sistema sensorial dos portadores da enfermidade, por outro lado, porém, apontam para que a provável origem das parestesias nos casos de DP esteja vinculada às alterações no sistema extrapiramidal decorrentes da depleção dopaminérgica.

Em consonância com essas evidências, a administração de agonistas dopaminérgicos parece reduzir as parestesias, sendo utilizada como estratégia clínica (Nutt & Carter, 1984). Há também relatos sobre a redução destes sintomas em pacientes submetidos à estimulação cerebral profunda do globo pálido, uma das técnicas cirúrgicas utilizadas para o tratamento da DP (Loher, Burgunder, Weber, Sommerhalder, & Krauss, 2002).

Tais achados mostram a importante relação entre as aferências sensoriais e a circuitaria motora envolvida na DP. Os núcleos da base são fundamentais na execução automática de respostas motoras já aprendidas pelo organismo, sendo responsáveis pelo *output* motor que completa o circuito iniciado pelas informações recebidas dos receptores periféricos (Marsden, 1982). Já se considera que tais núcleos exerçam um papel ainda maior nesse processo, estando envolvidos na modulação desses *inputs* periféricos, pois para produzir uma resposta motora adequada é necessária uma análise completa das condições em que o organismo se encontra (Abbruzzese & Berardelli, 2002). Um funcionamento motor adequado depende da harmonia na relação entre essas estruturas e quaisquer alterações nos sistemas envolvidos nessa tarefa, podem contribuir para a geração de déficits na motricidade. Dificuldades na integração de informações dos receptores sensoriais e proprioceptivos podem, por exemplo, levar o indivíduo a subestimar a posição de seus membros ou a um cálculo errôneo da velocidade a ser empregada para determinada ação, produzindo movimentos bradicinéticos (Demirci et al., 1997; Berardelli, Rothwell, Thompson, & Hallett, 2001). Em igual proporção, danos ao sistema extrapiramidal podem conduzir a erros na interpretação quanto à quantidade de estímulos sensoriais recebidos. Tal fenômeno pode conduzir o sujeito à execução automática e inconsciente de movimentos desnecessários, como pode ser o caso de sintomas como a discinesia (O'Suilleabhain, 2004).

Sendo assim, as parestesias e outras alterações sensoriais presentes em casos da DP, alertam para perturbações nesse sistema e podem ser um sinalizador de alterações na interpretação de informações proprioceptivas, já que as aferências sensoriais são também uma importante fonte de informação para a propriocepção.

#### **2.4 Evidências experimentais de alterações proprioceptivas na DP**

A primeira evidência empírica de alterações na propriocepção em casos da DP relatou que tais pacientes apresentavam deficiências no *feedback* proprioceptivo dos receptores musculares, o que contribui para a rigidez muscular característica da doença (Tatton & Lee, 1975). Estudos posteriores demonstraram a presença de dificuldades na percepção da movimentação dos membros além de uma diminuição do controle da postura estática nesses pacientes (Contreras-Vidal & Gold, 2004; Jacobs & Horak, 2006).

A perda do controle postural é um dos sintomas que mais afeta a qualidade de vida de portadores da DP. Em fases mais avançadas da doença, os pacientes costumam apresentar uma posição característica, conhecida como postura em flexão. Nessa posição, a cabeça e o tronco ficam relativamente para frente, afetando sua capacidade de controle dos demais movimentos e contribuindo para eventuais quedas (Keranen et al., 2003). Por este motivo, dificuldades na manutenção do equilíbrio e da postura desses sujeitos tem sido alvo de diversos relatos (Contreras-Vidal & Gold, 2004; Demirci et al., 1997; Horak et al., 2005; Jacobs & Horak, 2006; Maki & McIlroy, 2005; Rocchi et al., 2004; Schieppati, Hugon, Grasso, Nardone, & Galante, 1994).

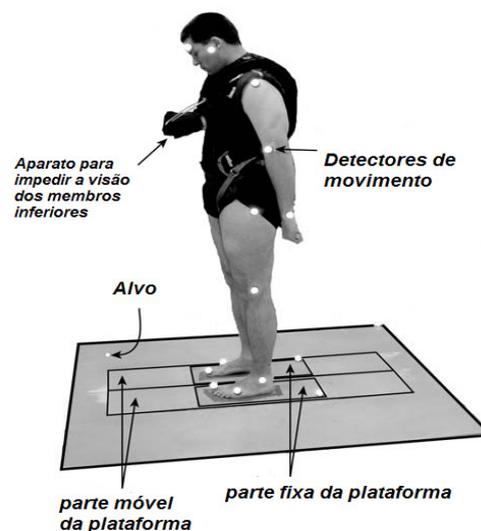
Em uma tarefa onde os participantes deveriam alcançar um alvo enquanto sentados, Schenkman e colaboradores (2001) observaram que em comparação com indivíduos saudáveis, os portadores de DP apresentavam redução da habilidade de controle sobre a rotação da coluna para executar movimentos longitudinais. Com o auxílio de uma plataforma giratória unidirecional sobre a qual os sujeitos foram colocados em pé, Vaugoyeau e colaboradores (2007) verificaram que portadores de DP apresentam maior dificuldade em re-estabilizar a postura após perturbações laterais na base da plataforma que os indivíduos controle. Em um aparato semelhante, outro estudo também identificou um aumento da latência para a reorganização postural dos pacientes após perturbações na plataforma quando comparados com indivíduos normais de faixa etária semelhante, entre 65 e 75 anos, em média. (De Nunzio et al. 2007).

Experimentos têm demonstrado que o processamento cortical das informações proprioceptivas é mais importante para a manutenção do equilíbrio do que o sistema vestibular, principalmente no equilíbrio estático (Higashiyama & Koga, 1998; Teasdale et al., 1999). Um estudo com indivíduos saudáveis demonstrou que mesmo privados do sistema vestibular e visual estes foram capazes de perceber pequenas e lentas mudanças na orientação do seu corpo (Bringoux et. al, 2002). Bronstein (1999) relatou que portadores de desordem unilateral aguda do sistema vestibular não apresentavam dificuldades para estimar corretamente sua postura. Corroborando estas evidências, até o momento, não há indícios de que a DP esteja relacionada a disfunções vestibulares. Pastor e colaboradores (1993) concluíram não haver diferenças entre portadores da DP e indivíduos controle na percepção de alterações na movimentação corporal quando expostos à estimulação galvânica do sistema vestibular. O estudo fornece dados

empíricos para a conclusão de que possíveis disfunções vestibulares não são a causa das dificuldades no controle postural exibidas pelos portadores da doença, reforçando o papel da propriocepção (Pastor, Day & Marsden, 1993).

As dificuldades na manutenção da postura também afetam a qualidade da marcha. Alguns estudos têm sugerido que na DP há uma redução da capacidade de utilizar os membros inferiores para retomar o equilíbrio através de passos compensatórios (Fahn & Elton, 1987; Jacobs & Horak, 2006; Maki & McIlroy, 2005; Rocchi et al., 2004). Alterações na propriocepção podem levar os portadores da doença a superestimar sua posição no ambiente, produzindo movimentos em amplitude reduzida (Berardelli, Rothwell, Thompson, & Hallett, 2001; Demirci et al., 1997). Estudos têm demonstrado que esses pacientes tendem a apresentar passos anormalmente pequenos e desorientados, o que compromete significativamente sua marcha (Morris, Iansek, McGinley, Matyas, & Huxham, 2005; Schubert, Prokop, Brocke, & Berger, 2005).

Com o objetivo de verificar a habilidade de reequilíbrio através de passos compensatórios adequados frente a perturbações na marcha, Jacobs e Horak (2006) submeteram portadores da DP a uma tarefa através de uma plataforma móvel. Neste experimento, os sujeitos permaneceram em pé sobre a plataforma onde deveriam mover-se em direção a um alvo sem que pudessem ver suas pernas, enquanto a base do aparato sofria perturbações laterais (ver figura 1). Os pesquisadores observaram que os pacientes apresentam passos de amplitude menor que os sujeitos do grupo controle, o que os leva a fracassar na reorganização da postura.



*Figura 1.* Plataforma utilizada para medir oscilações posturais. Adaptado de Jacobs & Horak, 2006.

Embora o controle postural tenha grande parcela na manifestação das dificuldades de marcha dos portadores da doença, é possível que tais problemas sejam causados por déficits proprioceptivos nos próprios membros inferiores. É possível que estes pacientes apresentem dificuldades no controle da força aplicada ou exercida pelas pernas durante a execução de movimentos. Deficiências na integração de informações dos mecanorreceptores localizados na musculatura das pernas poderiam ser a causa do problema, e contribuir para a falta de habilidade em reorganizar a marcha diante de perturbações ambientais (Delwaide, Pepin, & Maertens de Noordhout, 1991; Dietz & Duysens, 2000; Stelmach, 1991).

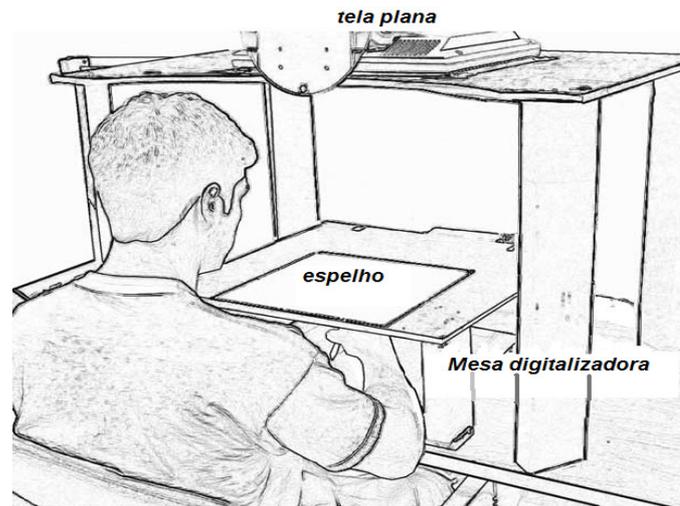
Déficits proprioceptivos nos membros superiores em casos da DP também já foram relatados pela literatura. Utilizando uma tarefa em que os sujeitos deveriam atingir um alvo móvel através da manipulação de um *joystick*, Flowers (1976) concluiu que os pacientes com Parkinson aparentavam não saber onde estavam suas mãos no espaço, necessitando auxílio de pistas visuais para poder controlar os movimentos.

Outros estudos têm demonstrado que tanto a noção da posição do membro antes do início do movimento, quanto à consciência sobre este durante a execução de movimentos estão afetadas (Rossetti, Desmurget, & Prablanc, 1995; Sainburg, Lateiner, Latash, & Bagesteiro, 2003). Quando os pacientes foram solicitados a duplicar movimentos ou atingir determinada posição com seus membros superiores sem que pudessem vê-los, foi verificado que estes apresentam dificuldades para a execução da tarefa com precisão, não conseguindo atingir a posição ou movimento desejado (Jacobs & Horak, 2006; Moore, 1987; Seiss et al., 2003).

Kockgether e colaboradores (1995) solicitaram que participantes privados de percepção visual estimassem a amplitude da extensão de seus braços, enquanto os mesmos eram passivamente flexionados: os portadores de DP tenderam a superestimar o movimento imposto aos seus membros. Em um estudo semelhante, pacientes com DP erraram mais que sujeitos-controle na capacidade de estimar, sem o auxílio da visão, a extensão da flexão passiva de seus cotovelos (Zia, Cody & O'Boyle, 2002).

Contreras-Vidal e Gold (2004) pediram que portadores da doença desenhassem em um papel o caminho que conectava desenhos-alvo dispostos no centro e laterais de uma folha de papel, através da projeção de um monitor (ver figura 2). Após um período de treino, os sujeitos deveriam executar os

movimentos sem que os alvos fossem apresentados e sem que pudessem ver suas mãos, baseando-se na representação interna da posição do membro. Os resultados apontaram que estes sujeitos erram mais nas tentativas de acertar os alvos e levam mais tempo para fazê-lo, quando comparados a indivíduos saudáveis. Esse resultado indicou que a patologia é capaz de atrapalhar a representação mental da posição dos membros, recurso que facilita o planejamento da movimentação do organismo (Wolpert, Goodbody, & Husain, 1998).



*Figura 2.* Aparato utilizado para verificar a capacidade de proprioceptiva de sujeitos com DP através da escrita. Adaptado de Contreras-Vidal & Gold (2004).

A visão parece ser facilitadora do mecanismo proprioceptivo nos casos de DP, pois o organismo passa a valer-se mais da visão para equilibrar a deficiência de outras informações aferentes sobre a posição dos membros. Ou seja, quanto maiores as perdas proprioceptivas decorrentes da progressão da patologia, mais os sujeitos dependerão da visão para organizar e planejar seus movimentos de acordo com o ambiente (Contreras-Vidal & Gold, 2004; Demirci et al., 1997; Klockgether et al., 1995).

Embora já tenha sido sugerido que a enfermidade afete a coordenação periférica da propriocepção, através de alterações no funcionamento de receptores musculares (Dietz & Duysens, 2000; Dietz, Zijlstra, Prokop, & Berger, 1995), faltam mais dados empíricos que comprovem esse fenômeno. Com base nessa premissa, a maioria dos pesquisadores acredita que os déficits proprioceptivos encontrados na DP sejam dependentes de falhas na integração cortical desses impulsos (Boecker et al., 1999; Seiss et al., 2003).

A reprodução de deficiências proprioceptivas em modelos animais da DP baseados na indução da morte neuronal dopaminérgica nos núcleos da base, sugere que tais sintomas estejam relacionados ao desequilíbrio químico da alça motora cortical responsável pela motricidade (Alam, Mayerhofer & Schmidt, 2004; Lu et al., 2008; Wright et al., 2007; Jankovic, 2000), o que abordaremos a seguir.

## **2.5 Déficits proprioceptivos em modelos animais da DP**

Com o objetivo de reproduzir a perda neuronal dopaminérgica, protocolos pré-clínicos da patologia têm sido desenvolvidos principalmente com a utilização de roedores. Entre as principais técnicas utilizadas estão a manipulação genética e, mais comumente, a indução de depleção dopaminérgica através da administração de neurotoxinas (Meredith, Sonsalla, & Chesselet, 2008; Brooks, Chadwick, Gelbard, Cory-Slechta, & Federoff, 1999; Simola et al., 2007).

Por ser uma patologia de origem e causas ainda desconhecidas, a DP tem sido alvo de inúmeras tentativas de mimetização em laboratório. Pesquisadores têm seguido indícios das possíveis formas de manifestação da doença através de patologias que apresentam sintomas semelhantes aos da DP idiopática, porém de causas conhecidas, quadro denominado parkinsonismo. Uma das formas mais estudadas de parkinsonismo é a por exposição a pesticidas. Em populações rurais, a exposição a pesticidas como a Rotenona e o Paraquat estão relacionados ao aparecimento de sintomas motores semelhantes aos da DP. Por este motivo, esses dois componentes têm sido bastante utilizados para a indução de modelos animais da DP (Dick et al., 2007).

A Rotenona é um composto químico encontrado na raiz e talos de algumas plantas, e por seu caráter altamente citotóxico, é amplamente utilizado como pesticida (Meredith, Sonsalla, & Chesselet, 2008). Infusões intracerebrais da droga na SN de ratos induzem a morte neuronal dopaminérgica através da inibição do complexo I da cadeia respiratória e da formação de microtúbulos, além de induzir a formação de corpos de Lewy nos neurônios remanescentes, contribuindo para sua degeneração. (Uversky, 2004). Sintomas como instabilidade postural, lentidão motora e dificuldade para iniciar movimentos foram também observados em ratos expostos à toxina (Alam Mayerhofer & Schmidt, 2004).

O Paraquat, outra substância utilizada na indução de modelos animais de DP, atua de forma semelhante à Rotenona para induzir à morte neuronal: inibindo

o processo de respiração celular e facilitando a produção de espécies reativas de oxigênio (Shimizu et al., 2001). O Paraquat também gera o aparecimento de inclusões citoplasmáticas, contribuindo para a caracterização da DP (Uversky, 2004). Faltam evidências conclusivas neste modelo, no que tange a prejuízos motores específicos, entretanto, já é evidente que a exposição ao Paraquat é capaz de gerar danos a motricidade, evidenciando principalmente bradicinesia e marcada redução na atividade locomotora (Brooks et al., 1999).

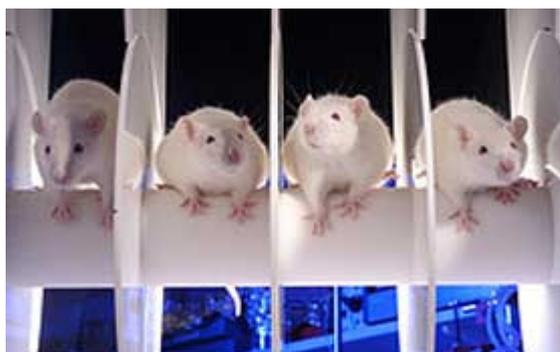
Apesar da ausência de dados mais específicos quanto a déficits na estimulação de membros ou alterações sensoriais em roedores nesses dois modelos, a presença de sintomas como bradicinesia, acinesia e perda da estabilidade postural apontam para a possível existência de degeneração do sistema proprioceptivo. Esta idéia reforça a concepção da participação do circuito dopaminérgico nos núcleos da base para a manutenção de uma resposta proprioceptiva adequada.

Outra forma de parkinsonismo por exposição a substâncias é responsável pela concepção de um dos modelos animais que mais têm contribuído para os estudos sobre a doença. Trata-se da 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), substância manufaturada acidentalmente em 1982, com o objetivo de fabricação de MPPP, toxina conhecida como heroína sintética. Um erro na produção da droga e seu consumo custou aos usuários a manifestação de sintomas motores e cognitivos da DP (Langston, Ballard, Tetrad, & Irwin, 1983). Desde então, a toxina têm sido utilizada para a indução de um modelo animal da afecção.

O MPTP é uma molécula altamente lipofílica, atravessando com facilidade a barreira hematoencefálica quando injetada sistemicamente. Quando no cérebro, reações químicas transformam o MPTP em MPP+, molécula que tem alta afinidade com o transportador de dopamina (DAT) (Barneoud et al., 1995) Dentro das células dopaminérgicas, o MPP+ age de forma semelhante à Rotenona e ao Paraquat, agindo sobre as mitocôndrias e interrompendo o ciclo da cadeia transportadora de elétrons. A ação mitocondrial além da redução da produção de ATP facilita a produção de espécies reativas de oxigênio como o peroxinitrito, que atua na oxidação da Tirosina hidroxilase (TH), enzima envolvida na síntese de dopamina (Przedborski et al., 2000; Przedborski & Vila, 2003).

Nesse modelo é possível observar perdas proprioceptivas através da avaliação da atividade locomotora de camundongos frente ao *rotarod*. O *rotarod* é um teste em que os animais são dispostos em uma espécie de rampa no formato de

um “rolo” na qual o animal é induzido a mover-se utilizando diversas habilidades motoras para manter-se sobre o aparato (ver figura 3) . Animais intoxicados com MPTP apresentam mais dificuldades de sustentação quando comparados com animais controle ficando evidente lentidão, dificuldade para iniciar os movimentos e rigidez nos membros, dificultando sua permanência sobre o aparato (Lu et al., 2008).



*Figura 3.* Rotarod. Aparato utilizado para acessar a motricidade em camundongos. Retirado de Bayer, 2009.

A capacidade de permanecer sobre o *rotarod* requer o bom funcionamento do sistema proprioceptivo, pois são necessárias habilidades importantes como domínio e capacidade de correção sobre a posição de seus membros, já que o aparato está se movendo. Também é fundamental a adequada regulação da força e da velocidade a serem aplicadas em determinados movimentos, reforçando a idéia de que déficits na execução deste teste podem apontar perdas na propriocepção.

A contribuição dos modelos animais induzidos por neurotoxinas à compreensão dos processos fisiológicos que sustentam a DP passa ainda pela utilização da 6-hidroxidopamina (6-OHDA). O mais antigo e amplamente divulgado modelo experimental da DP foi testado inicialmente por Üngerstedt em 1968, através de uma infusão bilateral na SN de ratos. Experimentos posteriores com uma infusão unilateral da toxina possibilitaram a observação dos danos provocados pela droga comparando as alterações no lado intacto com o lado afetado (Deumens, Blokland, & Prickaerts, 2002; Üngerstedt, 1971).

A 6-OHDA tem uma estrutura análoga à das catecolaminas sendo também transportada para dentro dos neurônios dopaminérgicos pelo DAT. No citosol, desencadeia mecanismos muito semelhantes aos já descritos para as outras

toxinas, sua ação também envolve o bloqueio da cadeia respiratória na mitocôndria e a indução de estresse oxidativo (Simola et al., 2007).

Este método, por ser um dos mais antigos, tem sido o mais amplamente explorado, dispondo de mais dados sobre seus efeitos. Análises do comportamento exploratório de ratos lesionados com 6-OHDA em campo aberto demonstram que animais com lesões unilaterais no feixe prosencefálico medial (FPM) apresentam maior latência em tarefas onde o objetivo é a correção postural, demonstrando maior lentidão motora (Srinivasan & Schmidt 2004).

Infusões unilaterais de 6-OHDA no FPM também geram prejuízos em tarefas como o Staircase test (ver figura 3). A tarefa exige do animal boa coordenação motora e motricidade fina apurada nas patas dianteiras para que possa buscar a recompensa (alimento) disposta em degraus (Montoya, Campbell-Hope, Pemberton, & Dunnett, 1991). Lesões nigroestriatais afetam a sensomotricidade da pata contralateral à lesão encefálica, fazendo com que o animal apresente preferência pela utilização da pata ipsilateral (Barneoud, Depoortere, Moser, & Sanger, 1999; Jeyasingham, Baird, Meldrum, & Dunnett, 2001). No mesmo aparato, infusões unilaterais de 6-OHDA na SN, gerando uma perda de 95% da dopamina no estriado dorsal do hemisfério lesionado foi capaz de provocar danos a sensomotricidade em ambas as patas. Estes resultados sugerem tanto a possibilidade de efeitos compensatórios do organismo frente há a assimetria provocada pela unilateralidade da lesão, quanto alertam para que a perda dopaminérgica, ainda que em apenas unilateral seja suficiente para provocar danos à propriocepção em ambos os membros (Whishaw, S. M. Pellis, & Gorny, 1992). Esses dados podem ser importantes na consideração quanto aos possíveis efeitos compensatórios observados em pacientes que apresentam hemiparkinsonismo, principalmente nas fases iniciais da doença (Wright et al., 2007).



*Figura 4.* Staircase test. As recompensas ficam sobre os degraus e os animais devem alcançá-las com as patas dianteiras. Retirado de Levy, 2008.

A preferência pela pata ipsilateral à lesão foi também observada em outros dois testes: o teste do cilindro e o teste da fita adesiva (Sticky tape test). No teste do cilindro, o animal é colocado em um cilindro de vidro e é contabilizado o número de vezes que as patas são apoiadas na parede do aparato durante o comportamento exploratório. A redução de cerca de 80% da dopamina estriatal provoca a preferência dos animais por apoiar-se na pata correspondente ao lado da lesão, denotando negligência sensorial na pata contrária (Tillerson et al., 2001; Vergara-Aragon et al., 2003). O Teste da fita adesiva consiste em prender fitas nas patas dianteiras do animal e contabilizar as latências para comportamentos de tocar as fitas e retirá-las. Animais lesionados tendem a notar e retirar a fita presa à pata ipsilateral à lesão com mais rapidez, sugerindo a existência de déficits proprioceptivos na pata afetada pela lesão nigroestriatal (Castañeda et al., 2005, Park, Lee, Bang, Lee, & Ahn, 2008).

Olsson e colaboradores (1995) utilizaram o *adjusting steps test*, uma tarefa em que os animais foram movidos sobre uma superfície horizontal e para recompor a postura corporal devem utilizar as patas dianteiras para reequilibrar-se, produzindo passos compensatórios. Os pesquisadores reportaram que animais lesionados no FPM demonstram menor número de passos compensatórios, o que pode ser interpretado como a existência de dificuldades em iniciar movimentos (Olsson, Nikkhah, Bentlage, & Bjorklund, 1995; Simola et al., 2007). Outros estudos demonstram que uma depleção de 80% de dopamina no estriado é suficiente para afetar a capacidade dos animais em ajustar a postura através de passos compensatórios (Chang, Wachtel, Young, & Kang, 1999; Deumens et al., 2002). Essa tarefa é realizada de forma muito semelhante às tarefas de mesmo intuito realizadas em experimentos com humanos, conforme já citado

anteriormente. O que se pode observar é que da mesma forma que os pacientes com DP fracassam em tarefas cujo objetivo é reorganização postural e de marcha, ratos lesionados no FPM com 6-OHDA também apresentam dificuldades. Tais dados reiteram a importância do circuito para a manutenção da propriocepção e alertam para a implicação das perdas proprioceptivas no aparecimento dos sintomas motores da DP (Jacobs & Horak, 2006).

Os modelos animais baseados na manipulação genética têm como objetivo reproduzir em laboratório as disfunções gênicas encontradas em alguns casos da DP. Cerca de 5 a 10% dos casos da doença correspondem às formas herdadas (Meredith, et al. 2008). As descobertas apontam para mutações em genes responsáveis pela codificação de proteínas como a parkina (genes DJ-1 e PINK1) e a  $\alpha$ -sinucleína (genes LRRK2 e ATP13A2)(Lee & Trojanowski, 2006; West & Maidment, 2004). Entre as técnicas mais utilizadas no desenvolvimento de modelos animais baseados em alterações genéticas, está a criação de linhagens transgênicas visando a expressão ou deleção dos genes envolvidos (Meredith, et al.,2008).

Os relatos experimentais de manipulações com animais nestes modelos reportam que camundongos com mutações no gene DJ-1 apresentam dificuldades motoras a longo prazo, em geral, passam a apresentar as deficiências motoras clássicas em torno dos 11 meses. Entretanto, prejuízos na propriocepção já foram relatados nesses animais aos 5 meses. Quando submetidos ao teste da fita adesiva, tais camundongos tendem a apresentar um aumento de latência para a retirada da fitas das patas, quando comparados com animais controle (Jankovic, 2000). Além de dados sobre a perda proprioceptiva nesse modelo, esse resultado reforça a possibilidade da existência de tais déficits antes da manifestação dos demais sintomas, corroborando alguns achados clínicos (Snider et al., 1976).

## **2.6 Possíveis vias de degeneração cortical da propriocepção na DP**

Assim como as origens da DP ainda são desconhecidas, muitos de seus sintomas precisam ser mais bem explorados para que suas dimensões sejam conhecidas e formas de tratamento mais adequadas possam ser desenvolvidas para os mesmos. Essa necessidade é ainda mais ampla quando nos referimos à propriocepção.

A administração da L-DOPA tem capacidade de atuar sobre o sistema proprioceptivo, diminuindo a presença de parestesias (Nutt & Carter, 1984) e

facilitando a senso-percepção (Rickards & Cody, et al.,1997). O mesmo já foi observado em animais quando submetidos a modelos experimentais (Alam et al., 2004), reforçando as relações entre a circuitaria envolvida na DP e na propriocepção.

Entretanto, experimentos comparativos realizados com pacientes sob efeito da medicação e sem a mesma demonstraram que a utilização do medicamento não afetou significativamente o desempenho dos sujeitos em tarefas que exigiam a propriocepção (Contreras-Vidal & Gold, 2004; De Nunzio, Nardone, & Schieppati, 2007; Jacobs & Horak, 2006; Schieppati et al., 1994; Vaugoyeau et al., 2007). Essas aparentes dissonâncias relatadas pela literatura mostram que a circuitaria responsável pela redução da propriocepção na DP ainda requer elucidações.

É provável que o comprometimento no sistema proprioceptivo esteja ligado de forma indireta à disfunção dopaminérgica nos núcleos da base. A depleção de dopamina no estriado modula a atividade dos neurônios presentes na estrutura, comprometendo assim o funcionamento de toda a alça motora (Graybiel, 1998; Middleton & Strick, 2000). Estudos têm apontado que alterações em vias córtico-estriatais afetam diretamente a forma como o sistema nervoso central recebe e interpreta as aferências proprioceptivas periféricas (Dettmers et al., 1995; Jacobs & Horak, 2006).

Considerando-se a propriocepção como a base para o planejamento de uma adequada resposta motora, fica evidente o envolvimento dos córtices motor e pré-motor no circuito responsável pela mesma. As densas projeções do córtex somatosensorial primário (S1) para o córtex motor primário (M1) confirmam a hipótese de que um mecanismo cortical motor tem um papel na modulação proprioceptiva (Jones, Couter, & Hendry, 1978). Achados neuroanatômicos e eletrofisiológicos quanto às aferências desses dois córtices para o putamen, região estriatal mais afetada pela depleção dopaminérgica nos casos de DP, retomam a idéia de que comprometimentos nas vias córtico-estriatais estão fortemente vinculados ao aparecimento de alterações na propriocepção na patologia (Flaherty & Graybiel, 1991, 1993; McGeer, Itagaki, Akiyama, & McGeer, 1988; Nyberg, Nordberg, Wester, & Winblad, 1983).

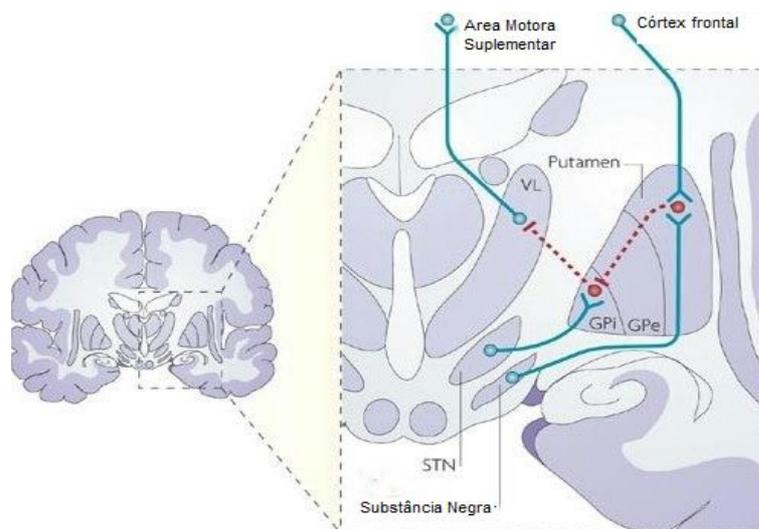
Foi demonstrado que as projeções de S1 contribuem para a modulação dos *inputs* sensoriais recebidos pelo putamen. Tal fenômeno implica em posteriores alterações das vias que chegam ao globo pálido, outra estrutura do corpo estriado

que desempenha um papel crucial na circuitaria dos distúrbios motores da DP (Flaherty & Graybiel, 1991).

Baseando-se em técnicas de neuroimagem, Boecker et al. (1999) encontraram evidências de anormalidade no processamento sensorial em estruturas corticais e subcorticais em portadores da DP. Uma estimulação dos tendões dos pacientes provocou uma diminuição da ativação dos córtices sensório-motor, somatosensorial secundário, e pré-motor lateral, além de alterações no cíngulo posterior e núcleos basais contralaterais à estimulação periférica. Esse resultado reflete os danos que a DP pode gerar em diversos circuitos encefálicos, alertando também para a participação de diversas regiões corticais na manutenção da propriocepção.

Os estudos têm evidenciado que as perdas proprioceptivas na DP são fruto de uma complexa interação entre as vias que ligam os gânglios da base, o tálamo e regiões corticais. Algumas hipóteses têm sido levantadas na tentativa de encontrar sítios encefálicos mais específicos, e entre as principais estruturas apontadas está a área motora suplementar (AMS) (Jacobs & Horak, 2006; Seiss et al., 2003).

Pertencente ao córtex motor (área 6), a AMS é uma região circunscrita ao lobo frontal que recebe aferências de impulsos proprioceptivos e visuais do córtex parietal posterior (áreas 5 e 7), sendo uma das principais vias para as projeções do trato córtico-espinhal descendente (ver Figura 5). Assim, essa região é tida como um importante ponto de junção entre as noções quanto à posição do organismo, a compreensão do movimento solicitado e a maneira como este será executado (Cunnington et al., 2001; Ohara et al., 2000; Toma et al., 1999).



*Figura 5.* Área motora suplementar. Conexões dopaminérgicas entre a Substância Negra, Estriado e Área Motora Suplementar. Adaptado de Kringelbach, Jenkinson, Owen & Aziz, 2007.

Através de técnicas de neuroimagem, observou-se aumento na atividade da AMS frente à estimulação proprioceptiva periférica, como estimulação dos tendões por aparelhos que emitem vibração (Radovanovic et al., 2002). Também foi encontrado que a AMS manifesta-se também, quando o sujeito é exposto a tarefas em que deve guiar-se somente pelas pistas proprioceptivas (Debaere, Wenderoth, Sunaert, Van Hecke, & Swinnen, 2003).

A AMS é uma região rica em inervações dopaminérgicas (Williams & Goldman-Rakic, 1993) e sua degeneração ocorre nos estágios mais avançados da doença (Braak et al., 2002). A administração de agonistas dopaminérgicos em portadores de DP contribui para o aumento da atividade da área, favorecendo o desenvolvimento de estratégias para a execução dos movimentos (Ball et al., 1999; Halsband, Matsuzaka, & Tanji, 1994; Haslinger et al., 2001; Jenkins et al., 1992; Rascol et al., 1992). Essas evidências apontam para uma importante função da AMS no processo de degeneração do sistema proprioceptivo nos casos de DP idiopática. Entretanto, mais estudos são necessários para que a região possa ser experimentalmente explorada e as dimensões de seu impacto na propriocepção possam ser mensuradas.

## **2.7 Considerações finais**

Por não se configurarem como uma queixa consciente dos pacientes, as perdas proprioceptivas na DP não constituem propriamente um sintoma da doença e sim um sinal. A dificuldade acerca da percepção dessas deficiências prejudica a

investigação clínica sobre essa condição. Sem a noção consciente do problema é provável que mecanismos compensatórios e o auxílio de outros sistemas, como o visual, por exemplo, auxiliem os pacientes na execução dos movimentos, encobrendo déficits proprioceptivos mais leves. Tais ocorrências podem levar os clínicos a subestimar a presença, prevalência e magnitude dessas alterações na DP. Por este motivo, são necessários mais estudos sobre o tema, a fim de que se possam traçar dados sobre o curso de tais alterações, bem como, estratégias de intervenção visando minimizar seu impacto sobre os outros sintomas motores.

Entretanto, os poucos estudos voltados para a propriocepção na DP indicam as dificuldades nessa investigação. A implicação de alterações no sistema proprioceptivo em sintomas clássicos como bradicinesia, acinesia e instabilidade postural é exatamente o que a torna um mecanismo tão complexo e difícil de ser explorado experimentalmente. A dificuldade no isolamento dessa função é um elemento desfavorável, já que a simples observação de alterações no *output* motor não é suficiente para a compreensão de dificuldades na integração sensório-motora.

Outra complicação pode ser a própria forma como alguns estudos empíricos são conduzidos. Embora fundamentais na construção de conhecimento sobre o tema, situações geradas em laboratório são falhas na reprodução da magnitude real da interferência que os danos à propriocepção possam gerar na vida dos indivíduos (O'Suilleabhain, 2004). Quando estimulados a prestar atenção sobre a posição de seus membros em testes experimentais, por exemplo, os sujeitos fornecem dados que certamente diferem da realidade. É provável que a real influência do sistema proprioceptivo em situações rotineiras tais como: sentar ou adequar a postura corporal, sejam muito mais complexas do que aquelas que esses sujeitos são submetidos em laboratório.

Os estudos baseados em recursos como neuroimagem e PRE têm facilitado a compreensão da propriocepção na DP por possibilitarem uma imediata correlação entre a estimulação periférica e as áreas encefálicas envolvidas no processo. Porém, muito ainda precisa ser investigado até que possa conhecer mais sobre as formas de interação entre os sistemas proprioceptivo e sensório-motor no planejamento e execução de movimentos na patologia (Bonfim & Barela, 2007). É provável, também, que outras implicações como o surgimento precoce dos sintomas e as diversas formas de parkinsonismo, ofereçam formas distintas de

manifestação desse sintoma, o que pode trazer pistas importantes sobre a fisiopatologia da propriocepção na DP idiopática.

Os modelos animais têm auxiliado nesse sentido, fornecendo indícios para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos. Manipulações no sistema dopaminérgico, sobretudo nos núcleos da base e os consequentes reflexos comportamentais gerados pela morte neuronal, têm evidenciado a complexa rede de conexões entre essas estruturas e a manifestação de determinados comportamentos. A exploração dos modelos animais, no entanto, é ainda mais complexa que em experimentos com humanos. Os testes de avaliação comportamental em animais são ainda mais falhos em captar os prejuízos à propriocepção isoladamente, oferecendo apenas medidas motoras. Porém, manipulações experimentais com animais são fontes muito importantes nessa investigação, sobretudo no que tange à exploração de estratégias terapêuticas farmacológicas.

Apesar de recente, a preocupação com a propriocepção na DP é pertinente e ainda precisa ser mais bem explorada para que seja possível contornar as limitações que impõe aos pacientes. Exercícios e outras estratégias fisioterapêuticas podem promover melhorias específicas na propriocepção, auxiliando também os pacientes a lidar com os outros sintomas da doença (Hasse, Machado & Oliveira, 2008). O teste de novos fármacos no tratamento da DP, em especial, à recente atenção dada aos polifenóis encontrados em chás, também podem contribuir para melhoras desse sintoma, devendo ser mais bem investigados em sua ação sobre a propriocepção.

Em suma, a existência de comprometimentos no sistema proprioceptivo de pacientes com DP tem contribuído para uma maior compreensão das origens e limitações da doença. Em contrapartida, o fenômeno também contribui para demonstrar que a propriocepção tem um alcance ainda mais amplo do que se supunha. O conhecimento sobre a perda proprioceptiva na DP pode auxiliar na ampliação do entendimento sobre os mecanismos que subjazem essa função.

## REFERÊNCIAS

- Bendrup, A., & McKenzie, J. (1974). Suppression of extralemiscal thalamic unit responses by substantia nigra stimulation. *Brain Research*, 80, 131–134.
- Berardelli, A., Rothwell, J. C., Thompson, P. D., & Hallett, M. (2001). Pathophysiology of bradykinesia in Parkinson's disease. *Brain*, 124(Pt 11), 2131-2146.
- Abbruzzese, G., & Berardelli, A. (2002). Sensorimotor integration in Movement Disorders. *Movement Disorders*, 18(3), 231–240.
- Adamovich, S., Berkinblit, M., Henig, W., Sage, J., & Poizner, H. (2001). The interection of visual and proprioceptive inputs in pointing to actual and remembered targets in Parkinson´s disease. *Neuroscience*, 104, 1027-1041.
- Almeida, Q. J., Frank, J. S., Roy, E. A., Jenkins, M. E., Spaulding, S., Patla, A. E., et al. (2005). An evaluation of sensorimotor integration during locomotion toward a target in Parkinson's disease. *Neuroscience*, 134(1), 283-293.
- Alam, M., Mayerhofer, A., & Schmidt, W. J. (2004). The neurobehavioral changes induced by bilateral rotenone lesion in medial forebrain bundle of rats are reversed by L-DOPA. *Behavioural & Brain Research*, 151(1-2), 117-124.
- Alexi, T. (2000 ). Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Progress in Neurobiology*, 60, 409-470.
- Ball, T., Schreiber, A., Feige, B., Wagner, M., Lucking, C. H., & Kristeva-Feige, R. (1999). The role of higher-order motor areas in voluntary movement as revealed by high-resolution EEG and fMRI. *Neuroimage*, 10, 682–694.
- Barneoud, P., Parmentier, S., Mazadier, M., Miquet, J. M., Boireau, A., Dubedat, P., et al. (1995). Effects of complete and partial lesions of the dopaminergic mesotelencephalic system on skilled forelimb use in the rat. *Neuroscience*, 67, 837–848., 124(Pt 11), 2131-2146.
- Bayer (2009). No more animals than legally required. Retrieved from <http://www.animalstudies.bayer.com/img/content/ tier- einfuehrung.jpg>
- Boecker, H., Ceballos-Baumann, A., Bartenstein, P., Weindl, A., Siebner, H. R., Fassbender, T., et al. (1999). Sensory processing in Parkinson's and Huntington's disease: investigations with 3D H(2)(15)O-PET. *Brain*, 122 ( Pt 9), 1651-1665.

- Braak, H., Del Tredici, K., Bratzke, H., Hamm-Clement, J., Sandmann-Keil, D., & Rub, U. (2002). Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). *Journal of Neurology*, *249*, :III/1–III/5.
- Bringoux, L., Schmerber, S., Nougier, V., Dumas, G., Barraud, P. A., & Raphel, C. (2002). Perception of slow pitch and roll body tilts in bilateral labyrinthine-defective subjects. *Neuropsychologia*, *40*(4), 367-372.
- Bonfim, T. R., & Barela, J. A. (2007). Efeito da manipulação da informação sensorial na propriocepção e no controle postural. *Fisioterapia em Movimento*, *20*(2), 107-117.
- Brooks, A. I., Chadwick, C. A., Gelbard, H. A., Cory-Slechta, D. A., & Federoff, H. J. (1999). Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. *Brain Research*, *823*(1-2), 1-10.
- Castañeda, E. T., Fleming, S., Paquette, M. A., Boat, K., Moffett, J., Stachowiak, E. K., et al. (2005). Assessment of recovery in the hemiparkinson rat: Drug-induced rotation is inadequate. *Physiology & Behavior*, *84*, 525–535.
- Cham, R., Perera, S., Studenski, S. A., & Bohnen, N. I. (2007). Striatal dopamine denervation and sensory integration for balance in middle-aged and older adults. *Gait Posture*, *26*(4), 516-525.
- Chang, J. W., Wachtel, S. R., Young, D., & Kang, U. J. (1999). Biochemical and anatomical characterization of forepaw adjusting steps in rat models of Parkinson's disease: Studies on medial forebrain bundle and striatal lesions. *Neuroscience*, *88*, 617–628.
- Contreras-Vidal, J. L., & Gold, D. R. (2004). Dynamic estimation of hand position is abnormal in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, *10*(8), 501-506.
- Craske, B. (1977). Perception of impossible limb positions induced by tendon vibration. *Science*, *196*, 71-73.
- Crossman, A. R., & Neary, D. (1997). *Neuroanatomia. Ilustrado e colorido*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Cunnington, R., Lalouchek, W., Dirnberger, G., Walla, P., Lindinger, G., Asenbaum, S., et al. (2001). A medial to lateral shift in pre-movement cortical activity in hemi-Parkinson's disease. *Journal of Clinical Neurophysiology*, *112*(4), 608-618.

- De Nunzio, A. M., Nardone, A., & Schieppati, M. (2007). The control of equilibrium in Parkinson's disease patients: delayed adaptation of balancing strategy to shifts in sensory set during a dynamic task. *Brain Research Bulletin*, *74*(4), 258-270.
- Debaere, F., Wenderoth, N., Sunaert, S., Van Hecke, P., & Swinnen, S. P. (2003). Internal vs external generation of movements: differential neural pathways involved in bimanual coordination performed in the presence or absence of augmented visual feedback. *Neuroimage*, *19*, 764–776.
- Delwaide, P. J., Pepin, J. L., & Maertens de Noordhout, A. (1991). Short latency autogenic inhibition in patients with parkinsonian rigidity. *Annals of Neurology*, *30*, 83–89.
- Demirci, M., Grill, S., McShane, L., & Hallett, M. (1997). A mismatch between kinesthetic and visual perception in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, *41*, 781–788.
- Dentresangle, C., Le Cavorsin, M., Savasta, M., & Leviel, V. (2001). Increased extracellular DA and normal evoked DA release in the rat striatum after a partial lesion of the substantia nigra. *Brain Research*, *893*, 178–185.
- Dettmers, C., Fink, G. R., Lemon, R. N., Stephan, K. M., Passingham, R. E., Silbersweig Holmes, A., et al. (1995). Relation between cerebral activity and force in the motor areas of the human brain. *Journal of Neurophysiology*, *74*, 802–815.
- Deumens, R., Blokland, A., & Prickaerts, J. (2002). Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Experimental Neurology*, *175*(2), 303-317.
- Dick, F. D., De Palma, G., Ahmadi, A., Scott, N. W., Prescott, G. J., Bennett, J., et al. (2007). Environmental risk factors for Parkinson's disease and parkinsonism: the Geoparkinson study. *Occupational & Environmental Medicine*, *64*(10), 666-672.
- Dietz, V., & Duysens, J. (2000). Significance of load receptor input during locomotion: a review. *Gait and Posture*, *11*, 102–110.
- Dietz, V., Zijlstra, W., Prokop, T., & Berger, W. (1995). Leg muscle activation during gait in Parkinson's disease: adaptation and interlimb coordination. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology Journal*, *97*(6), 408-415.

- Drory, V. E., Inzelberg, R., Groozman, G. B., & Korczyn, A. D. (1998). N30 somatosensory evoked potentials in patients with unilateral Parkinson's disease. *Acta Neurologica Scandinavica*, *97*(2), 73-76.
- Fahn, S., & Elton, R. (1987). Unified Parkinson's disease rating scale. In S. Fahn, D. Marsden & D. Calne (Eds.). *Recent developments in Parkinson diseases* (pp. 153–163). London: Macmillan.
- Flaherty, A. W., & Graybiel, A. M. (1991). Corticostriatal transformations in the primate somatosensory system. Projections from physiologically mapped body-part representations. *Journal of Neurophysiology*, *66*(4), 1249-1263.
- Flaherty, A. W., & Graybiel, A. M. (1993). Two input systems for body representations in the primate striatal matrix: experimental evidence in the squirrel monkey. *Journal of Neuroscience*, *13*(3), 1120-1137.
- Goodwin, G. M., McCloskey, D. I., & Matthews, P. B. C. (1972). The contribution of muscle afferents to kinaesthesia shown by vibration induced illusions of movement and by the effects of paralysing the joint afferents. *Brain*, *95*, 705-748.
- Graybiel, A. M. (1998). The basal ganglia and chunking of action repertoires. *Neurobiology of learning and memory*, *70*, 119-136.
- Halsband, U., Matsuzaka, Y., & Tanji, J. (1994). Neuronal activity in the primate supplementary, pre-supplementary and premotor cortex during externally and internally instructed sequential movements. *Neuroscience Research*, *20*, 149–155.
- Haslinger, B., Erhard, P., Kampfe, N., Boecker, H., Rummeny, E., Schwaiger, M., et al. (2001). Event-related functional magnetic resonance imaging in Parkinson's disease before and after levodopa. *Brain*, *124*, 558–570.
- Haase, D. C. B. V., Machado, D. C., & Oliveira, J. G. D. (2008). Atuação da fisioterapia no paciente com doença de Parkinson. *Fisioterapia em Movimento*, *21*(1), 79-85.
- Hattori, N., Kobayashi, H., Sasaki-Hatano, Y., Sato, K., & Mizuno, Y. (2003). Familial Parkinson's disease: a hint to elucidate the mechanisms of nigral degeneration. *Journal of Neurology*, *250 Suppl 3*, III2-10.
- Higashiyama, A., & Koga, K. (1998). Apparent body tilt and postural after effect. *Perception & Psychophysics*, *60*, 331-347.

- Horak, F. B., Dimitrova, D., & Nutt, J. G. (2005). Direction-specific postural instability in subjects with Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, *193*(2), 504-521.
- Huttunen, J., & Teravainen, H. (1993). Pre- and postcentral cortical somatosensory evoked potentials in hemiparkinsonism. *Movement Disorders*, *8*(4), 430-436.
- Jacobs, J. V., & Horak, F. B. (2006). Abnormal proprioceptive-motor integration contributes to hypometric postural responses of subjects with Parkinson's disease. *Neuroscience*, *141*(2), 999-1009.
- Jenkins, I. H., Fernandez, W., Playford, E. D., Lees, A. J., Frackowiak, R. S., Passingham, R. E., et al. (1992). Impaired activation of the supplementary motor area in Parkinson's disease is reversed when akinesia is treated with apomorphine. *Annals of Neurology*, *32*, 749-757.
- Jeyasingham, R. A., Baird, A. L., Meldrum, A., & Dunnett, S. B. (2001). Differential effects of unilateral striatal and nigrostriatal lesions on grip strength, skilled paw reaching and drug-induced rotation in the rat. *Brain Research Bulletin*, *55*, 541-548.
- Jones, E. G., Couter, J. D., & Hendry, S. H. (1978). Intracortical connectivity of architectonic fields in the somatic sensory, motor, and parietal cortex of monkeys *The Journal of Comparative Neurology*, *181*, 291-374.
- Keränen, T., Kaakkola, S., Sotaniemi, K., Laulumaa, V., Haapaniemi, T., Jolma, T., et al. (2003). Economic burden and quality of life impairment increase with severity of PD. *Parkinsonism & Related Disorders*, *9*(3), 163-168.
- Keijsers, N. L., Admiraal, M. A., Cools, A. R., Bloem, B. R., & Gielen, C. C. (2005). Differential progression of proprioceptive and visual information processing deficits in Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience*, *21*(1), 239-248.
- Klockgether, T., Borutta, M., Rapp, H., Spieker, S., & Dichgans, J. (1995). A defect of kinesthesia in Parkinson's disease. *Movement Disorder*, *10*, 460-465.
- Koller, W. C. (1984). Sensory symptoms in Parkinson's disease. *Neurology*, *34*(7), 957-959.
- Kringelbach, M. L., Jenkinson, N., Owen, S. L., & Aziz, T. Z. (2007). Translational principles of deep brain stimulation. *Nature Reviews Neuroscience*, *8*(8), 623-635.

- Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W., & Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, *219*(4587), 979-980.
- Lee, V. M., & Trojanowski, J. Q. (2006). Mechanisms of Parkinson's disease linked to pathological alpha-synuclein: new targets for drug discovery. *Neuron*, *52*(1), 33-38.
- Levy, R. M. (2008). Cortical Stimulation for the Treatment of Motor Deficit following Ischemic Stroke. Retrieved in Oct. 07, 2009 from [http://msnmoney.brandegaronline.com/EFX\\_dll/EDGARpro.dll?FetchFilingHTML1?ID=5977358&SessionID=eo0iW38FF7fhhO9](http://msnmoney.brandegaronline.com/EFX_dll/EDGARpro.dll?FetchFilingHTML1?ID=5977358&SessionID=eo0iW38FF7fhhO9)
- Loher, T. J., Burgunder, J. M., Weber, S., Sommerhalder, R., & Krauss, J. K. (2002). Effect of chronic pallidal deep brain stimulation on off period dystonia and sensory symptoms in advanced Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *73*(4), 395-399.
- Lu, K. T., Ko, M. C., Chen, B. Y., Huang, J. C., Hsieh, C. W., Lee, M. C., et al. (2008). Neuroprotective effects of resveratrol on MPTP-induced neuron loss mediated by free radical scavenging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(16), 6910-6913.
- Maki, B. E., & McIlroy, W. E. (2005). Change-in-support balance reactions in older persons: an emerging research area of clinical importance. *Clinical Neurology*, *23*(3), 751-783, vi-vii.
- Marsden, C. D. (1982). The mysterious motor function of the basal ganglia: the Robert Wartenberg Lecture. *Neurology*, *32*(5), 514-539.
- McGeer, P. L., Itagaki, S., Akiyama, H., & McGeer, E. G. (1988). Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. *Annals of Neurology*, *24* 574-576.
- Meredith, G. E., Sonsalla, P. K., & Chesselet, M. F. (2008). Animal models of Parkinson's disease progression. *Acta Neuropathologica*, *115*(4), 385-398.
- Middleton, F. A., & Strick, P. L. (2000). Basal ganglia and cerebellar loops: motor and cognitive circuits. *Brain Research*, *31*(2-3), 236-250.
- Montoya, C. P., Campbell-Hope, L. J., Pemberton, K. D., & Dunnett, S. B. (1991). The "staircase test": A measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. *Journal of Neuroscience Methods*, *36*, 219-228.

- Moore, A. (1987). Impaired sensorimotor integration in parkinsonism and dyskinesia: a role for colorally discharges? *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *50*, 544-552.
- Morris, M., Iansek, R., McGinley, J., Matyas, T., & Huxham, F. (2005). Three-dimensional gait biomechanics in Parkinson's disease: evidence for a centrally mediated amplitude regulation disorder. *Movement Disorders*, *20*(1), 40-50.
- Nakashima, K., Nitta, T., & Takahashi, K. (1992). Recovery functions of somatosensory evoked potentials in parkinsonian patients. *Journal of Neurology Sciences*, *108*(1), 24-31.
- Nutt, J. G., & Carter, J. H. (1984). Sensory symptoms in parkinsonism related to central dopaminergic function. *Lancet*, *2*(8400), 456-457.
- Nyberg, P., Nordberg, A., Wester, P., & Winblad, B. (1983). Dopaminergic deficiency is more pronounced in putamen than in nucleus caudatus in Parkinson's patients. *Neurochemical pathology*, *1*, 193-202.
- O'Suilleabhain, P. (2004). Sensory symptoms and sensorimotor distortion Parkinson's disease. In M. Ebadi & R. F. Pfeiffer (Eds.), *Parkinson's disease*. Washington D.C.: CRC Press.
- Ohara, S., Ikeda, A., Kunieda, T., Yazawa, S., Baba, K., Negamine, T., et al. (2000). Movement-related change of electrocorticographic activity in human supplementary motor area proper. *Brain*, *123*, 1203-1215.
- Olsson, M., Nikkhah, G., Bentlage, C., & Bjorklund, A. (1995). Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: Differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *Journal of Neuroscience Methods*, *15*, 3863-3875.
- Park, H. J., Lee, P. H., Bang, O. Y., Lee, G., & Ahn, Y. H. (2008). Mesenchymal stem cells therapy exerts neuroprotection in a progressive animal model of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, *107*(1), 141-151.
- Pastor, M. A., Day, B. L., & Marsden, C. D. (1993). Vestibular induced postural responses in Parkinson's disease. *Brain*, *116* ( Pt 5), 1177-1190.
- Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., Djaldetti, R., Liberatore, G., Vila, M., Vukosavic, S., et al. (2000). The parkinsonian toxin MPTP: action and mechanism. *Restorative Neurology and Neuroscience*, *16*(2), 135-142.
- Przedborski, S., & Vila, M. (2003). The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model: a tool to explore the pathogenesis of

- Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 991, 189-198.
- Radovanovic, S., Korotkov, A., Ljubisavljevic, M., Lyskov, E., Thunberg, J., Kataeva, G., et al. (2002). Comparison of brain activity during different types of proprioceptive inputs: a positron emission tomography study. *Experimental Brain Research*, 143(3), 276-285.
- Rascol, O., Sabatini, U., Chollet, F., Celsis, P., Montastruc, J. L., Marc-Vergnes, J. P., et al. (1992). Supplementary and primary sensory motor area activity in Parkinson's disease. Regional cerebral blood flow changes during finger movements and effects of apomorphine. *Archives of Neurology*, 49, 144-148.
- Rickards, C., & Cody, F. W. (1997). Proprioceptive control of wrist movements in Parkinson's disease: Reduced muscle vibration-induced errors. *Brain*, 120(part 6), 977-990.
- Rocchi, L., Chiari, L., Gross, A., & Horak, F. (2004). Voluntary and induced steps in Parkinson's disease, starting from different stance conditions. *Movement Disorders*, 19, S257-S258.
- Rossetti, Y., Desmurget, M., & Prablanc, C. (1995). Vectorial coding of movement: Vision proprioception or both? *Journal of Neurophysiology*, 74, 457-463.
- Sainburg, R. L., Lateiner, J. E., Latash, M. L., & Bagesteiro, L. B. (2003). Effects of altering initial position on movement direction and extent. *Journal of Neurophysiology*, 89(1), 401-415.
- Schieppati, M., Hugon, M., Grasso, M., Nardone, A., & Galante, M. (1994). The limits of equilibrium in young and elderly normal subjects and in parkinsonians. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology Journal*, 93(4), 286-298.
- Schubert, M., Prokop, T., Brocke, F., & Berger, W. (2005). Visual kinesthesia and locomotion in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 20(2), 141-150.
- Seiss, E., Praamstra, P., Hesse, C., & Richards, H. (2003). Proprioceptive sensorymotor function in Parkinson's disease and Huntington's disease: evidence from proprioception-related EEG potentials. *Experimental Brain Research*, 148(308-319).
- Shimizu, K., Ohtaki, K., Matsubara, K., Aoyama, K., Uezono, T., Saito, O., et al. (2001). Carrier-mediated processes in blood-brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. *Brain Research*, 906(1-2), 135-142.

- Shimohama, S., Sawada, H., Kitamura, Y., & Taniguchi, T. (2003). Disease model: Parkinsons disease. *Trends in molecular medicine*, 9 (8), 360-365.
- Shulman, L. M., Singer, C., Bean, J. A., & Weiner, W. J. (1996). Internal tremor in patients with Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 11(1), 3-7.
- Simola, N., Morelli, M., & Carta, A. R. (2007). The 6- hydroxidopamine moldel of parkinson´s disease. *Neurotoxicity Research*, 11(43), 151-167.
- Snider, S. R., Fahn, S., Isgreen, W. P., & Cote, L. J. (1976). Primary sensory symptoms in parkinsonism. *Neurology*, 26(5), 423-429.
- Srinivasan, J., & Schmidt , W. (2004). Treatment with alpha2-adrenoceptor antagonist, 2-methoxy idazoxan, protects 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonian symptoms in rats: neurochemical and behavioural evidence. *Behavioral Brain Research*, 154, 353-363.
- Stelmach, G. E. (1991). Basal ganglia impairment and force control. In J. Requin & G. E. Stelmach (Eds.). *Tutorials in Motor Neuroscience* (Vol. 137-48). Kluwer: Dordrecht.
- Teasdale, N., Nougier, V., Barraud, P. A., Bourdin, C., Debu, B., Poquin, D., et al. (1999). Contribution of ankle, knee, and hip joints to the perception threshold for support surface rotation. *Perception & Psychophysics*, 61(4), 615-624.
- Tillerson, J. L., Cohen, A. D., Philhower, J., Miller, G. W., Zigmond, M. J., & Schallert, T. (2001). Forced limb-use effects on the behavioral and neurochemical effects of 6-hydroxydopamine. *Journal of Neuroscience Methods*, 21, 4427-4435.
- Toma, K., Honda, M., Hanakawa, T., Okada, T., Fukuyama, H., Ikeda, A., et al. (1999). Activities of the primary and supplementary motor areas increase in preparation and execution of voluntary muscle relaxation: an event-related fMRI study. *Journal of Neuroscience*, 19(9), 3527-3534.
- Ungerstedt, U. (1971). Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiologica Scandinavia Supplement*, 367, 69-93.
- Uversky, V. N. (2004). Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. *Cell and Tissue Research*, 318(1), 225-241.
- Vaugoyeau , M., Viel, S., Assaiante, C., Amblard, B., Azulay, J. P.(2007). Impaired vertical postural control and proprioceptive integration deficits in parkinson´s disease. *Neuroscience*, 146, 852-863.

- Vergara-Aragon, P., Gonzalez, C. L. R., & Whishaw, I. Q. (2003). A Novel Skilled-Reaching Impairment in Paw Supination on the “Good” side of the Hemi-Parkinson Rat Improved with Rehabilitation. *The Journal of Neuroscience*, *23*(2), 579-586.
- West, A. B., & Maidment, N. T. (2004). Genetics of parkin-linked disease. *Human Genetics*, *114*(4), 327-336.
- Whishaw, I. Q., S. M. Pellis, & Gorny., B. P. (1992). Skilled reaching in rats and humans: Evidence for parallel development or homology. *Behavioural & Brain Research*, *47*, 59–70.
- Williams, S. M., & Goldman-Rakic, P. S. (1993). Characterization of the dopaminergic innervation of the primate frontal cortex using a dopamine-specific antibody. *Cerebral Cortex*, *3*, 199–222.
- Wolpert, D. M., Goodbody, S. J., & Husain, M. (1998). Maintaining internal representations: the role of the human superior parietal lobe. *Nature Neuroscience*, *1*(6), 529-533.
- Wright, W. G., Gurfinkel, V., King, L., & Horak, F. (2007). Parkinson's disease shows perceptuomotor asymmetry unrelated to motor symptoms. *Neuroscience Letters*, *417*(1), 10-15.
- Zia, S., Cody, F. W., & O'Boyle, D. J. (2002). Identification of unilateral elbow-joint position is impaired by Parkinson's disease. *Clinical Anatomy*, *15*(1), 23-31.

### CAPÍTULO III

## EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRACEREBRAL DA (-)-EPICATEQUINA EM RATOS LESIONADOS EM UM MODELO ANIMAL DE PARKINSONISMO

Letícia Ribeiro<sup>1</sup>, Cristiane Batassini<sup>2</sup>, Roberta Silvestrin<sup>2</sup>, Tadeu Mello e Souza<sup>2</sup>, Lisiane Bizarro<sup>1,2</sup> e Alcyr Oliveira<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Psicologia - Instituto de Psicologia da UFRGS

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Neurociências – Instituto de Ciências básicas e da Saúde da UFRGS

<sup>3</sup>Departamento de Psicologia - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

## RESUMO

O efeito da Epicatequina (EC) foi investigado através de infusão intracerebral no modelo animal de parkinsonismo da 6-OHDA. Para tanto, 75 ratos Wistar machos receberam infusões de 6-OHDA na via nigroestriatal do hemisfério direito e 24h depois, 1,5 $\mu$ L de EC por uma cânula colocada no estriado (0,031mg/mL, 0,1mg/mL, 0,31mg/mL, 1mg/mL ou veículo). Os animais foram submetidos aos testes de rotações induzidas por metilfenidato (40mg/kg) e apomorfina (1mg/kg), ao teste da fita adesiva e tiveram a atividade rotacional observada no teste de motricidade sobre grade. Análises estatísticas comparando o comportamento dos animais nos testes realizados não apontaram diferenças significativas entre os grupos. Os cérebros dos animais foram analisados para rastreamento da Tirosina hidroxilase, porém também não houve diferenças significativas entre os grupos quanto ao grau de lesão. Os dados mostram que a EC em administração intracerebral e nas concentrações testadas não é efetiva na reversão da lesão nigroestriatal provocada pela 6-OHDA.

Palavras-chave: Doença de Parkinson; 6-OHDA; flavonóides, Epicatequina.

## ABSTRACT

### EFFECTS OF EPICATECHIN ON ROTATIONAL BEHAVIOUR AFTER 6-OHDA INFUSIONS IN A PARKINSON'S DISEASE MODEL

The effect of intracerebral infusions of Epicatechin (EC) in 6-OHDA animal model of Parkinsonism was investigated. Therefore, 75 male Wistar rats received infusions of 6-OHDA into the right medial forebrain bundle (MFB) in two portions. After 24 hours, they were infused with 1.5 $\mu$ L of EC (0.031 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.31mg/mL, 1mg/mL and vehicle) through a cannula in the striatum. Animals were tested for rotational behavior by the administration i.p. of methylphenidate (40mg/Kg) and apomorfine (1mg/Kg), were submitted to the sticky tape test and had their rotational activity observed in the footfault test. Immunohistochemistry for the detection of tyrosine hidroxilase was also made. Our results showed that there was no significant difference between groups in the behavioral tests and in the immunocontent of tyrosine hidroxilase. These results shows that EC in an intracerebral administration and in the tested doses was not effective on reversal of nigrostriatal lesion caused by 6-OHDA.

Keywords: Parkinson's Disease; 6-OHDA; Flavonoids, Epicatechin.

## INTRODUÇÃO

A Doença de Parkinson (DP) atualmente é a 2ª patologia neurodegenerativa que mais afeta a população idosa, ficando atrás apenas da Doença de Alzheimer (Hattori, 2003). Estima-se que a DP atinja 2,5% da população mundial (Alexi, 2000). Caracteriza-se pela perda de neurônios dopaminérgicos na parte compacta da Substância Negra (SN), gerando sintomas motores como tremores em repouso, lentidão, dificuldade para iniciar movimentos e alterações no sistema proprioceptivo (Jacobs & Horak, 2006). Fatores como estresse oxidativo, excessivo acúmulo de ferro na SN e ativação microglial em processos inflamatórios estão entre os fenômenos relacionados à morte neuronal dopaminérgica (Mandel e Youdim, 2004).

Estudos epidemiológicos demonstrando, a baixa prevalência da DP em populações de países asiáticos tem atraído a atenção de pesquisadores de diversas áreas sobre as dietas ricas em flavonóides, em especial sobre o consumo do chá verde (Li et al., 1985; Wang, Shi, Wu, He & Zhang, 1991; Checkoway et al, 2002). Extraído das folhas da *Camellia sinenses*, o chá verde é rico em catequinas, fitonutrientes que contribuem para o amargor e para a adstringência da bebida (Balentine, Wiseman & Bouwens, 1997). As catequinas compõem cerca de 30 a 45 % das folhas utilizadas para o consumo do chá, tornando-o um dos alimentos com mais alta concentração de flavonóides (Wang et al. 1994; Yang & Wang, 1993). Entre as principais catequinas encontradas no chá verde estão: (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG), a (-)-epigallocatequina (EGC), (-)-epicatequina-3-galato (ECG), a (-)-epicatequina (EC) e a (-)-catequina (C) (Weinreb, Mandel, Amit, & Youdim, 2004).

Estes compostos são potentes agentes antioxidantes, superando até mesmo a ação de vitaminas C e E (Rice-Evans, Miller, Bolwell, Bramley, & Pridham, 1995; Mandel & Youdim, 2004). Sua estrutura rica em anéis aromáticos e grupamentos hidroxil são os principais responsáveis por sua ação quelante sobre metais de transição e potente ação de “varredura” (“*scavenger*”) das espécies reativas de oxigênio (ERO) (Weinreb, Mandel, Amit & Youdim, 2004).

Estudos *in vivo* e *in vitro* dessas substâncias têm revelado seu envolvimento em uma série de alvos intracelulares. Entre os principais, está a elevação da expressão de enzimas antioxidantes endógenas como a catalase e a superóxido dismutase (Levites, Weinreb, Maor, Youdim & Mandel, 2001), a

ativação da proteína cinase C (Levites, Amit, Mandel, & Youdim, 2003) e da proteína cinase ativada por mitógenos (Owuor & Kong, 2002), além de atuar na regulação da homeostase do cálcio e na modulação de diversos genes apoptóticos (Mandel & Youdim, 2004).

Estudos pré-clínicos para o tratamento da DP com extratos de chá verde, em especial a EGCG, têm demonstrado que essas substâncias são capazes de exercer um papel neuroprotetor na patologia (Nie, Jin, Cao, Shen, & Zhao, 2002; Deleu, Northway, & Hanssens, 2002; Lu, Meng, & Yang, 2003). As catequinas protegeram células PC12 (Nie et al., 2002) e neurônios mesencefálicos (Nobre Júnior et al., 2003) da intoxicação por 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em modelos da DP *in vitro*. Estudos apontam também uma ação das catequinas como inibidoras da recaptação da dopamina e da ação da catecol-O-metil-transferase (Deleu, Northway, & Hanssens, 2002; Lu, Meng, & Yang, 2003). Em um estudo *in vivo*, uma única dose em administração intraperitoneal foi o suficiente para reduzir significativamente a recaptação de 1-metil-4-fenilpiridina (MPP+) pelo transportador de dopamina, evitando uma maior lesão em camundongos lesionados no modelo animal de parkinsonismo da 1-metil-4-fenil-1-2-3-6-tetraidropiridina, o MPTP (Pan et al., 2003). Protocolos baseados em administração oral do extrato de 2 a 4 semanas têm sido reportados como capazes de atenuar a lesão provocada por MPTP em camundongos (Levites et al. 2001) e 6-OHDA em ratos (Shachar, Kahana, Kampel, Warshawsky & Youdim, 2004). Tais achados sugerem benefícios no uso dessas substâncias tanto como tratamento agudo quanto de longo prazo na DP.

Já foram identificados os principais metabólitos das catequinas que atingem o encéfalo, quando consumidas oralmente, denotando a capacidade dessas substâncias de ultrapassar a barreira hematocefálica (Abd El Mohsen et al., 2006). Entretanto, ao ser metabolizada, a droga perde muitas de suas características e, por apresentar baixos níveis de absorção pelo sistema gastrointestinal - apenas 35% das catequinas consumidas são absorvidas pelo organismo -, são necessárias doses em concentrações elevadas para que expressem seus efeitos benéficos (Donavan et al., 2001, Weinreb et al., 2004). A necessidade de alto consumo para a obtenção dos benefícios pode gerar complicações como a hepatotoxicidade, além de possíveis efeitos tóxicos sobre as

catecolaminas periféricas (Mandel e Youdim, 2004). Administrações intraperitoneais ou intravenosas da droga também incorrem em lesões no fígado quando em altas dosagens ou em administração por períodos longos (Weinreb, 2004; Abd El Mohsen et al. 2006; Mandel & Youdim, 2004). Recentemente, estudos reportaram que concentrações elevadas da EGCG e da ECG podem exercer efeitos pró-oxidantes e provocar danos ao DNA das células (Elbling et. al., 2005, Abib et al. 2008). Protocolos *in vitro* com a ECGC em concentração elevada (>50 µM) identificaram um aumento da expressão dos genes apoptóticos *bax*, *bad*, *gadd45*, e um decréscimo na expressão dos genes anti-apoptóticos *bcl/xL*, *bel-2* e *bcl-w* (Levites Amit, Youdim, & Mandel, 2002).

Por ser o maior componente do chá, a ECGC tem sido o principal alvo de estudos entre as catequinas. Esse componente também é o que possui a maior ação antioxidante, sendo o mais efetivo experimentalmente no combate à neurodegeneração. Em contrapartida, em altas concentrações, a EGCG parece ser o componente mais tóxico dentre essas substâncias, o que conduz o interesse para a exploração dos outros componentes do chá, como a (-) - epicatequina (EC) (Weinreb, 2004).

Dentre as catequinas da bebida, a EC é a que demonstra menor habilidade antioxidante, entretanto, é também a menos tóxica quando administrada em maiores concentrações. Experimentos apontaram sua habilidade na reversão de danos gerados por isquemia cerebral e patologias cardiovasculares (Hirata et al., 2004; Schroeter, 2005). Esses efeitos são atribuídos à sua capacidade vasodilatadora que ocorre por intermédio do aumento dos níveis de óxido nítrico (NO) no organismo (Schroeter, 2005). A droga também já teve sua eficácia como neuroprotetor relatada em modelos de toxicidade neuronal *in vitro*. A exposição de células estriatais de camundongos à EC antes de sua oxidação por exposição a lipídios oxidados, na forma de lipoproteínas de baixa densidade, demonstrou a capacidade do flavonóide em atenuar a morte neuronal, retardando significativamente a destruição do DNA dessas células (Schroeter, Williams, Martin, Iversen, & Rice-Evans, 2000). Em células PC12, esta catequina foi capaz de promover uma taxa de sobrevivência de cerca de 80 % em um protocolo de exposição celular à 6-OHDA (Nie et al., 2002). Entretanto, ainda faltam estudos sobre o efeito da EC em modelos de parkinsonismo *in vivo*, sobretudo no modelo da 6-OHDA. A investigação dos efeitos dessa catequina nesse modelo animal é

importante para que a ação da EC possa ser melhor observada através dos testes comportamentais.

O presente estudo apresenta, pela primeira vez, os efeitos da administração intracerebral da (-)-epicatequina em animais lesionados em modelo animal de parkinsonismo da 6-OHDA. Além da observação das rotações induzidas por apomorfina e metilfenidato, testes padrão para esse modelo animal, este estudo explorou os efeitos da droga sobre prejuízos na propriocepção evidenciados pela negligência sensorial das patas dianteiras no teste da fita adesiva (Castañeda et al., 2005). O efeito da EC também foi verificado sobre o teste de motricidade sobre grade (TMG). Recentemente nosso grupo mostrou que animais lesionados com 6-OHDA tendem a apresentar rotações ipsilaterais à lesão de forma espontânea quando colocados sobre a grade (Silvestrin, de Oliveira, Batassini, Oliveira, & Souza, 2009). A capacidade do TMG enquanto ferramenta para este modelo animal também foi replicado no presente estudo.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Sujeitos

Ratos Wistar machos (N= 75) com idades entre 110 e 150 dias e peso entre 250 e 400g foram alojados em grupos de cinco com acesso a água e comida *ad libitum*. Os ratos foram cedidos pelo biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, onde foram mantidos em um ambiente com temperatura controlada de 22°C e alternância de 12 horas em ciclos claro-escuro.

Uma acentuada perda de peso foi observada em todos os animais após o procedimento cirúrgico, descrito abaixo. Para facilitar sua recuperação, a partir do 15º dia após a cirurgia, os animais receberam 5 mL de soro glicosado (Baxter, glicose 5%) e, por mais 3 dias, em administração subcutânea. Também devido a perda de peso, os ratos receberam parte da ração macerada para facilitar alimentação.

#### 4.1.1 Procedimentos cirúrgicos

A lesão foi feita através de cirurgia estereotáxica com animais anestesiados com Tiopental (40 mg/kg) e receberam duas infusões de 6-OHDA (*Sigma*, Brasil, 16,5µg) ou veículo (solução salina adicionada a 0,2 % de ácido ascórbico) em diferentes porções do feixe prosencefálico medial do hemisfério direito (Simola, Morelli & Carta, 2007). As infusões foram realizadas usando bomba de infusão (*Insight*, Brasil) acoplada a uma microseringa de 10µL (*Hamilton*, 701N), a uma velocidade de 0,5 µL/min, nas seguintes coordenadas (em mm) em relação ao bregma: (1) AP: -4,4, LL: -1,8, DV: -8,8 (2,5 µl) e (2) AP: -4,0, LL: -1,6, DV: -9,0 (3,0 µl). Após a infusão de 6-OHDA, os animais receberam o implante de uma cânula de 0,9 cm (22 *gauge*) no corpo estriado nas seguintes coordenadas: AP= +0,06, LL= -0,29, DV= -0,40 mm. A cânula foi fixada no crânio com o auxílio de acrílico autopolimerizante e de um parafuso de aço (1cm), e fechada com um mandril imediatamente após sua implantação.

Tanto nas infusões quanto na implantação da cânula, a coordenada dorso-ventral foi aprofundada em 0,2 mm para animais com peso acima de 350g. Após o procedimento cirúrgico, os ratos receberam cuidados pós-operatórios até que estivessem aptos ao retorno às suas gaiolas.

## 4.2 Tratamento com EC

A administração intracerebral da (-)-epicatequina (*Sigma*, Brasil) foi feita 24 horas após a infusão da 6-OHDA através da cânula implantada no estriado. Os animais foram randomicamente alocados em quatro grupos cada um recebendo 1,5  $\mu\text{L}$  de EC, a uma velocidade de 0,75 $\mu\text{L}/\text{min}$ , em uma das quatro diferentes concentrações: EC1 (0,031mg/mL; n=12), EC2 (0,1mg/mL; n=17), EC3 (0,31mg/mL; n=13) e EC4 (1mg/mL; n=10). Um grupo adicional de animais constituiu o grupo controle, recebendo solução veículo (salina; n=23) no mesmo volume e sob as mesmas condições que o grupo experimental.

## 4.3 Avaliação comportamental

A avaliação comportamental dos animais foi feita no ciclo claro, em locais específicos para a observação comportamental de animais oferecidas pelo Departamento de Bioquímica da UFRGS. Antes dos testes comportamentais os animais permaneceram por 20 minutos no local da testagem para habituação.

### 4.3.1. Teste de motricidade sobre grade

O aparato consiste em uma grade retangular de 80 cm x 60 cm, com aberturas de 3 cm x 3 cm e elevada a 76 cm do chão (ver figura 1). Após 14 dias da infusão da 6-OHDA, os ratos foram colocados sobre a grade e tiveram as rotações induzidas pela exposição ao contexto observadas e contadas por 3 minutos conforme sugere a literatura (Silvestrin, de Oliveira, Batassini, Oliveira, & Souza, 2009). Vale salientar que nenhuma droga foi administrada nesse dia, para certificar a ausência de indução farmacológica das rotações dos animais sobre o aparato.



*Figura 1.* Aparato onde é realizado o teste de motricidade sobre grade.

### **4.3.2 Rotações induzidas por apomorfina e metilfenidato**

Quinze dias depois da cirurgia, os animais receberam 40 mg/kg de metilfenidato i.p. (Ritalina®, Novartis, Brasil) e, imediatamente após a injeção, foram colocados em um campo aberto onde as rotações (ipsilaterais à lesão) foram contadas por 30 minutos.

Também foram realizadas rotações induzidas pela apomorfina. Para este experimento, os ratos receberam 1mL/kg de apomorfina (Sigma, 1mg/mL) e, após um período de 15 minutos para o início do efeito do fármaco, foram colocados em campo aberto e tiveram suas rotações contralaterais à lesão contadas durante 10 minutos.

A fim de evitar possíveis efeitos de *priming* relacionado aos receptores dopaminérgicos (Morelli, Fenu, Garau & Di Chiara, 1989), os animais foram induzidos pela apomorfina dez dias após o teste com metilfenidato.

### **4.3.3 Teste da fita adesiva**

Com o objetivo de verificar alterações proprioceptivas através da observação da negligência sensório-motora das patas dianteiras, os animais foram submetidos ao teste da fita adesiva 22 dias após a cirurgia. Em uma versão sem sessões prévias de treinamento, os animais foram colocados para exploração em um campo aberto com fitas adesivas (3 cm x 0,5 cm) presas na superfície ulnar de suas patas dianteiras. Os ratos foram observados durante 2 minutos e tiveram o tempo para notar e efetivamente retirar as fitas contabilizadas separadamente para as duas patas, conforme sugere a literatura (Castañeda et al., 2005). O ato de ‘notar’ a fita foi considerado como sendo os primeiros movimentos direcionados à retirada da mesma, tais como tocá-las ou mordê-las. A retirada foi contabilizada no momento em que a fita fosse desprendida da pata.

### **4.3.4. Análise imunoistoquímica da tirosina hidroxilase**

As análises imunoistoquímicas para o rastreamento da expressão de tirosina hidroxilase (TH) foram realizadas a partir da seleção amostral de 3 animais por grupo. Como critério de seleção foi utilizado o número de rotações dos animais no teste das rotações induzidas por metilfenidato, sendo selecionados os animais com o maior e o menor número de rotações por grupo. Uma escolha aleatória selecionou o terceiro animal para o procedimento. Todos os ratos foram anestesiados com cetamina e xilasina e transcárdiacamente perfundidos com uma

solução de 0,9% de NaCl (150 mL) seguida pela infusão de uma solução de paraformaldeído 4% (150 mL). Após a perfusão, os cérebros foram removidos e permaneceram imersos nessa última solução por mais 24 horas para fixação dos tecidos. Ao final do processo, foram submersos em solução de sacarose 30% e congelados para armazenamento. Fatias de 45  $\mu$ m do mesencéfalo foram obtidas usando-se criostato (-20 °C, *Leica Microsystems GmbH*).

Para a incubação com os anticorpos, 3 fatias de mesencéfalo por animal foram selecionadas. As fatias sofreram 5 lavagens com uma solução tampão de fosfato (PBS, do inglês “*phosphate buffered saline*”) em temperatura ambiente e posteriormente incubadas com anticorpo primário anti-TH (rabbit, AB152, Chemicon/Millipore, USA, 1:800) em temperatura ambiente por cerca de 18 horas. Após 5 lavagens com PBS, o anticorpo secundário (AlexaFluor 568 A11036, Molecular Probes, USA, 1:400) foi incubado por 60 minutos também em temperatura ambiente. Ambos os anticorpos foram diluídos em PBS duplamente filtrado. Uma lavagem final foi realizada antes que as fatias fossem montadas nas lâminas onde foram embebidas em *Fluorsave* (Calbiochem, USA) uma solução para preservação do material e da qualidade de luminescência.

Com o auxílio de microscopia fluorescente, imagens da SN foram observadas e fotografadas. Para a contabilização do grau de lesão nessa região, foi utilizado o programa *Scion Image for Windows*. A área correspondente à quantidade de neurônios nigrais TH-positivos nas fatias foi identificada e uma comparação entre os dois hemisférios determinou a quantidade da perda neuronal. A quantidade de células TH-positivas presentes no lado contralateral à infusão de 6-OHDA foi considerada 100% e comparada com a quantidade presente no hemisfério lesionado. A percentagem correspondente ao lado que recebeu a infusão de 6-OHDA foi estabelecida como grau de lesão neuronal provocado pela toxina.

#### **4.3.5. Análise estatística**

As medidas comportamentais obtidas através dos testes de rotações induzidas por fármacos e TMG foram analisadas através do programa SPSS 13-0 para Windows. Os dados sobre rotações induzidas com ambas as drogas e no teste de motricidade sobre grade não tiveram a mesma variância (teste de Levene,  $p < 0,05$ ), sendo comparados através da análise de variância de Kruskal-Wallis.

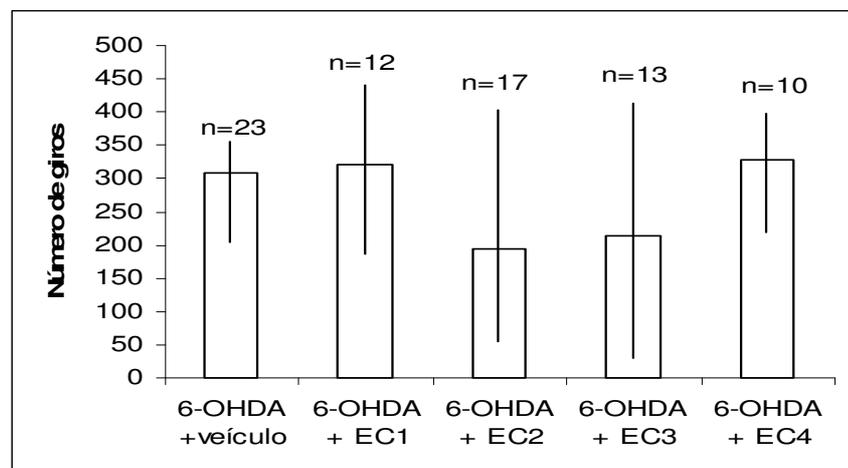
No teste da fita adesiva, as latências para notar e retirar a fita em ambos os lados foram transformadas em logaritmos naturais, sendo subtraídos os valores entre os lados direito e esquerdo de cada rato. Esses valores foram comparados entre os grupos através do teste do sinal para se verificar se havia alguma preferência de lateralidade. Uma ANOVA de uma via comparou as diferenças entre as médias dos grupos quanto ao tempo de reação à pata quando houve preferência por uma das patas.

Foi feita uma correlação entre o comportamento dos animais no TMG e no teste de rotações induzidas por apomorfina através do teste exato de Fisher.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Teste das rotações induzidas por apomorfina e metilfenidato

A Figura 2 mostra as medianas (intervalo interquartil) do número de giros ipsilaterais à lesão, realizados pelos animais no teste de rotações induzidas por metilfenidato, não havendo diferença entre os grupos nessa variável (teste de Kruskal-Wallis;  $GL=4$ ,  $\chi^2=1,799$ ,  $p=0,773$ ). Uma comparação preliminar das rotações induzidas por apomorfina (dados não mostrados) também não detectou diferenças significativas entre os grupos ( $GL=4$ ,  $\chi^2=6,602$ ,  $P=0,158$ ).



*Figura 2.* Medianas (intervalo interquartil) do número de giros ipsilaterais à lesão realizados pelos animais no teste de rotações induzidas por metilfenidato por 30 minutos. Não houve diferença entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis; G.L.=4,  $\chi^2=1,799$ ,  $p=0,773$ ).

### 5.2 - Teste de motricidade sobre grade

A Tabela 1 mostra a análise do comportamento dos animais quanto à presença ou não de atividade rotacional sobre a grade. A maioria dos animais do grupo EC2 (58%) não apresentou rotações, quando colocada sobre o aparato. O grupo EC3 apresentou tendência semelhante (61% apresentando rotações) quando comparados com os grupos controle (47%), EC1 (66%) e EC4 (77%). Entretanto, essas diferenças não foram significativas (teste exato de Fisher,  $p > 0,16$ ).

Também foi realizada uma verificação em relação ao número de rotações sobre o aparato, onde os grupos não diferiram significativamente (teste de Kruskal-Wallis; G.L.=4,  $\chi^2=5,147$ ;  $p=0,273$ )

Tabela 1

*Porcentagem de Animais por Grupo que Apresentou Rotações no Teste de Motricidade sobre Grade*

Grupos	Apresentaram giros (%)	n	Total de animais
Controle	47,82	11	23
EC1	66,66	8	12
EC2	41,17	7	17
EC3	61,53	8	13
EC4	77,77	7	10
Total de animais			75

*Nota.* A tabela mostra em porcentagem o número de animais por grupo que apresentou ou não atividade rotacional quando colocados sobre o aparato, independentemente da quantidade de giros apresentados.

Conforme sugerido anteriormente pela literatura (Silvestrin et al., 2009) o comportamento dos animais de apresentar rotações sobre a grade está correlacionado positivamente com a apresentação de rotações quando desafiados com a apomorfina. No presente estudo, ma comparação entre os dados dos testes TMG e do testes de rotações induzidas por apomorfina também apontou a existência de uma correção positiva entre os testes através do teste exato de Fischer (Pearson = 0,322,  $p < 0,01$ ).

### 5.3 Teste da fita adesiva

Grande número de animais falhou ao retirar as fitas das patas durante o tempo estipulado (66%), não permitindo sua análise (dados não mostrados). A menor latência para o contato da fita em alguma das patas foi considerada como “preferência pela pata”, o que é mostrado na Tabela 2. Houve preferência significativa pela pata direita nos grupos controle, EC2, EC3 e EC4 (teste do sinal,  $p < 0,05$ ), mas não para EC1 (teste do sinal,  $p = 0,23$ ).

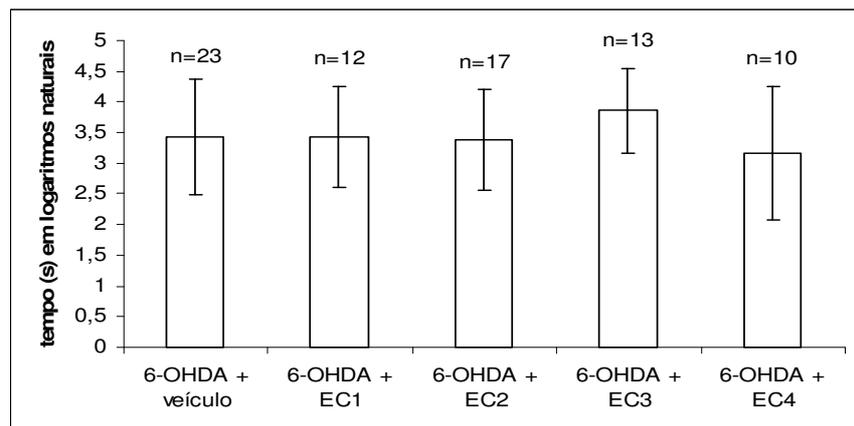
Tabela 2

*Preferência por Pata no Teste da Fita Adesiva*

Grupos	Preferência por pata			Significância estatística no teste do sinal	Total de animais
	Pata direita	Pata esquerda	Nenhuma das patas		
Controle	18	4	1	0,004*	23
EC1	8	3	1	0,227	12
EC2	13	4	0	0,049*	17
EC3	10	2	1	0,039*	13
EC4	9	1	0	0,021*	10
Total de animais					75

*Nota.* A tabela mostra a preferência por pata dos animais no teste da fita adesiva em números absolutos e a significância estatística obtida através do teste do sinal.\* $p < 0,05$ .

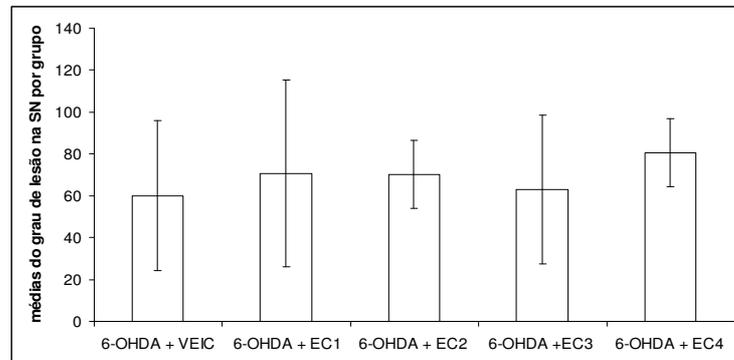
Considerando-se essa preferência pela pata direita entre quase todos os grupos (exceto EC1), uma ANOVA de uma via comparando as latências em logaritmos naturais para notar a pata direita foi feita. Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $F(3, 59) = 1,297$ ,  $p = 0,284$ ; Figura 5).



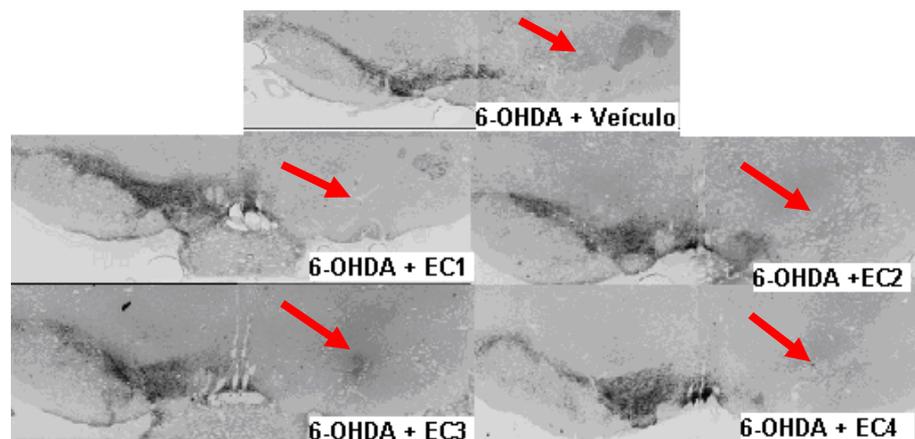
*Figura 3.* Médias ( $DP \pm$ ) de reação à pata direita em logaritmos naturais de todos os grupos.

## 5.4 Imunoistoquímica

O grau da lesão na SN provocado foi calculado comparando-se o hemisfério que recebeu a infusão de 6-OHDA com hemisfério controle. A Figura 4 mostra um gráfico com as médias do grau de lesão (%) provocada pela 6-OHDA na SN de 3 ratos por grupo. Os grupos EC1, EC2 e EC3 mantiveram a média de lesão (60-70%) bastante próxima ao do grupo controle, sugerindo que a EC não atuou impedindo a morte celular. O grupo EC4 apresentou uma média de lesão mais acentuada que os demais, cerca de 80% de perda de neurônios dopaminérgicos, embora não tenha havido diferenças significativas entre os grupos (ANOVA de uma via:  $F(4,10) = 0,153$ ,  $p = 0,957$ ). A Figura 5 mostra imagens do mesencéfalo de alguns dos animais que passaram pelo procedimento.



*Figura 4.* Médias do grau de lesão (em porcentagem) provocada pela 6-OHDA na SN de 3 ratos por grupo.



*Figura 5.* Fatias de mesencéfalo com expressão de células TH-positivas (45µm). As flechas indicam a lesão na via nigroestriatal. Graus de lesão: 6-OHDA+Veí.= 85,33%; 6-OHDA+EC1= 85,63%; 6-OHDA+EC2= 77,7%; 6-OHDA+EC3= 73,45 %; 6-OHDA+EC4= 88,56%.

## 6. DISCUSSÃO

A utilização da (-)-epicatequina *in vivo* no modelo animal de parkinsonismo da 6-OHDA foi o procedimento usado no presente artigo sendo este um estudo inédito sem referências similares na literatura. Os resultados mostram que a droga foi pouco efetiva como neuroprotetor dopaminérgico, não produzindo alterações comportamentais significativas em relação aos animais do grupo controle em nenhum dos testes realizados. As médias semelhantes do grau de lesão na SN detectados através do rastreo das células TH-positivas reforça a idéia de que a EC não atuou como neuroprotetor capaz de impedir ou reverter a ação neurotóxica da 6-OHDA.

Silvestrin e colaboradores (2009) mostraram a existência de atividade rotacional ipsilateral à lesão em animais submetidos ao TMG. Neste trabalho também observamos a existência de referida atividade rotacional. No estudo anterior, os pesquisadores encontraram uma correlação positiva entre a presença de rotações no TMG e no teste de rotações induzidas por apomorfina, um teste amplamente utilizado no modelo animal da 6-OHDA. No presente estudo, a mesma correlação positiva foi encontrada. A significância estatística da correlação entre estes dois testes reforça a utilização da presença de rotações no TMG como uma ferramenta de detecção de lesão nigroestriatal no modelo animal da 6-OHDA. A indução de rotações por fármacos é um recurso limitado em termos de observação comportamental. O uso de um teste como o TMG, capaz de detectar lesões sem a indução por drogas, oferece novas oportunidades para a observação de alterações comportamentais. Mais estudos precisam ser realizados para a identificação dessas alterações, bem como os processos bioquímicos envolvidos no processo.

Embora os resultados não tenham sido estatisticamente significativos, observamos um acentuado grau de perda neuronal no grupo EC4 (1mg/mL), entorno de 80%. Um estudo preliminar com animais não lesionados pela 6-OHDA e tratados com essa dose no estriado apontou, através do rastreo da tirosina hidroxilase, uma perda neuronal dopaminérgica de 37% na SN dos ratos (dados não mostrados). A toxicidade provocada pela administração de antioxidantes quando em elevadas concentrações já foi demonstrada em diversos experimentos, principalmente entre os flavonóides (Elbling et al., 2005; Levites et al., 2002; Weinreb et al., 2004; Abd El Mohsen et al., 2006). Estudos com as catequinas

ECGC e ECG também já reportaram que, em doses elevadas, esses compostos geram danos às células por uma série de mecanismos, como o aumento na expressão de genes apoptóticos e destruição das fitas de DNA (Mandel e Youdim, 2004; Abib et al., 2008). É possível que estes mecanismos estejam relacionados, ao menos, em parte, à acentuada morte neuronal observada no grupo EC4 e pela perda neuronal observada nos animais que apenas receberam essa dose da catequina.

A atuação ineficaz da EC neste estudo também ficou evidente através dos resultados do teste da fita adesiva. As análises demonstraram uma preferência significativa dos animais dos grupos controle, EC2, EC3 e EC4 pela pata direita, ipsilateral à lesão. Tal resultado aponta para a efetividade da lesão provocada pela 6-OHDA, indicando que a mesma foi capaz de debilitar a senso-motricidade da pata contralateral do animal, levando-o a perceber a pata ipsilateral em uma latência menor. Essa preferência pela pata ipsilateral em animais hemi-lesionados pela 6-OHDA já havia sido demonstrada em outros estudos, indicando que o comprometimento da via nigroestriatal é capaz de afetar alças córtico-estriatais necessárias para um bom funcionamento das funções sensório-motoras (Castañeda et al., 2005; Park, Lee, Bang, Lee, & Ahn, 2008).

A integração sensório-motora depende de uma adequada manutenção do sistema proprioceptivo. Estudos com portadores da DP têm demonstrado que prejuízos na propriocepção é um importante sintoma da doença, contribuindo para o agravamento de outros sintomas motores (Vaugoyeau, Viel, Assaiante, Amblard, & Azulay, 2007; Contreras-Vidal & Gold, 2004; Jacobs & Horak, 2006). Dessa forma, o estudo de tratamentos que possam reverter tais déficits é fundamental para propiciar um aumento da qualidade de vida dos pacientes com DP. Neste estudo, as análises da preferência por pata denunciaram a baixa efetividade da EC enquanto tratamento para a recuperação dos déficits proprioceptivos gerados pela 6-OHDA nos grupos EC2, EC3 e EC4.

O grupo EC1, que recebeu a dose menos concentrada do experimento (0,031mg/mL), não apresentou uma preferência significativa pela pata direita. Esse resultado sugere que a EC nessa concentração foi efetiva para a reversão dos danos proprioceptivos nesses animais. Entretanto, o comportamento dos animais desse grupo nos demais experimentos não reforça a idéia de uma recuperação propiciada pelo tratamento. É possível que a não-preferência por pata neste caso,

seja resultado de mecanismos compensatórios do sistema sensório-motor. Conforme apontado em estudos com testes de avaliação da negligência sensorial, lesões extensas, com elevada depleção dopaminérgica estriatal, podem afetar a sensomotricidade em ambas as patas, eliminando a preferência pela pata ipsilateral à lesão. Acredita-se que mecanismos de compensação decorrentes da assimetria dopaminérgica estejam relacionados a este fenômeno (Wishaw, Pellis e Gorny, 1992). A não existência de diferenças entre as latências para a preferência pela pata direita em nenhum dos grupos reforça a hipótese de uma ação pouco efetiva da EC na melhora da sensomotricidade.

A EC tem sido apontada como um potente antioxidante em outros modelos de indução de morte neuronal (Schroeter, 2000), além de ser útil na restauração de danos cardiovasculares e ter uma ação preventiva sobre isquemias (Hirata et. al, 2004; Schroeter, 2006). Embora já tenha sido reportado que esta catequina *in vitro* possa ser capaz de promover uma taxa de sobrevivência de cerca de 80 % em células PC12 expostas à 6-OHDA (Nie et. al, 2002) os efeitos da EC *in vivo* não apontaram as mesmas características. O presente estudo demonstrou que a EC, ao menos nas concentrações testadas, não foi efetiva como tratamento para a lesão nigroestriatal provocada pela 6-OHDA em ratos.

Havia sido demonstrado que uma dose única de EGCG em administração i.p. foi capaz de minimizar significativamente os efeitos da intoxicação por MPTP em camundongos, sugerindo que o efeito agudo positivo das catequinas no combate ao estresse oxidativo induzido por toxinas (Pan et al., 2003). A atuação das catequinas sobre a inibição da COMT e da recaptação dopaminérgica são alguns dos prováveis fenômenos que propiciaram tal efeito (Deleu et al., 2002; Lu et al., 2003) Esses resultados prévios apóiam a hipótese de que apenas uma dose seria capaz de reverter os danos provocados pela 6-OHDA. Entretanto, é possível que a escolha por uma única dose em administração intracerebral em nosso estudo, tenha sido desfavorável à ação da EC. Apesar da possível potencialização dos efeitos da droga *in situ*, a administração intracerebral, pode ter sido até mesmo prejudicial ao potencial antioxidante da EC.

Já foi demonstrado que a EC é capaz gerar um aumento na expressão da oxido nítrico sintase (NOS), induzindo um aumento de NO e outras espécies reativas de nitrogênio no organismo (Schroeter, 2005). Se neste estudo a EC produziu um aumento de NO e houve aumento natural de NO pelo processo

inflamatório provocado pela lesão, é possível que esse fenômeno tenha comprometido o potencial antioxidante da droga no experimento. A administração da EC pós-lesão com a 6-OHDA visou principalmente, a atuação da droga no retardo da ação da toxina. É possível que um protocolo de administração intracerebral da EC anterior à infusão de 6-OHDA possibilite um desempenho mais favorável à neuroproteção. Nesse sentido, outros protocolos de administração com diferentes doses e concentrações, administradas em diferentes tempos antes e depois da lesão neuronal, possam produzir resultados positivos. Esses questionamentos reforçam a necessidade de que mais estudos sejam feitos a fim de que se possam obter dados mais específicos quanto aos possíveis efeitos da EC nesse modelo animal.

## REFERÊNCIAS

- Abib, R. T., Quincozes-Santos, A., Nardin, P., Wofchuk, S. T., Perry, M. L., Goncalves, C. A., et al. (2008). Epicatechin gallate increases glutamate uptake and S100B secretion in C6 cell lineage. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *310*(1-2), 153-158.
- Abd El Mohsen, M. M., Kuhnle, G., Rechner, A. R., Schroeter, H., Rose, S., Jenner, P., et al. (2002). Uptake and metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion. *Free Radical Biology & Medicine*, *33*, 1693-1702.
- Alexi, T. (2000). Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Progress in Neurobiology*, *60*, 409-470.
- Balentine, D. A., Wiseman, S. A., & Bouwens, L. C. (1997). The chemistry of tea flavonoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *37*(8), 693-704.
- Castañeda, E. T., Fleminga, S., Paquette, M. A., Boat, K., Moffett, J., Stachowiak, E. K., et al. (2005). Assessment of recovery in the hemiparkinson rat: Drug-induced rotation is inadequate. *Physiology & Behavior*, *84*, 525-535.
- Checkoway, H., Powers, K., Smith-Weller, T., Franklin, G. M., Longstreth, W. T., Jr., & Swanson, P. D. (2002). Parkinson's disease risks associated with cigarette smoking, alcohol consumption, and caffeine intake. *American Journal of Epidemiology*, *155*(8), 732-738.
- Deleu, D., Northway, M. G., & Hanssens, Y. (2002). Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of drugs used in the treatment of Parkinson's disease. *Clinical Pharmacokinetics*, *41*(4), 261-309.
- Donovan, J. L., Crespy, V., Manach, C., Morand, C., Besson, C., Scalbert, A., et al. (2001). Catechin is metabolized by both the small intestine and liver of rats. *Journal of Nutrition*, *131*(6), 1753-1757.
- Elbling, L., Weiss, R. M., Teufelhofer, O., Uhl, M., Knasmueller, S., Schulte-Hermann, R., et al. (2005). Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities. *Journal of the federation of American Societies for Experimental Biology*, *19*(7), 807-809.

- Hattori, N., Kobayashi, H., Sasaki-Hatano, Y., Sato, K., & Mizuno, Y. (2003). Familial Parkinson's disease: a hint to elucidate the mechanisms of nigral degeneration. *Journal of Neurology*, 250 Suppl 3, III2-10.
- Hirata, K., Shimada, K., Watanabe, H., Otsuka, R., Tokai, K., Yoshiyama, M., et al. (2004). Black tea increases coronary flow velocity reserve in healthy male subjects. *The American Journal of Cardiology*, 93(11), 1384-1388, A1386.
- Jacobs, J. V., & Horak, F. B. (2006). Abnormal proprioceptive-motor integration contributes to hypometric postural responses of subjects with Parkinson's disease. *Neuroscience*, 141(2), 999-1009.
- Levites, Y., Amit, T., Mandel, S., & Youdim, M. B. (2003). Neuroprotection and neurorescue against Abeta toxicity and PKC-dependent release of nonamyloidogenic soluble precursor protein by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(8), 952-954.
- Levites, Y., Amit, T., Youdim, M. B., & Mandel, S. (2002). Involvement of protein kinase C activation and cell survival/ cell cycle genes in green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate neuroprotective action. *Journal of Biological Chemistry*, 277(34), 30574-30580.
- Levites, Y., Weinreb, O., Maor, G., Youdim, M. B., & Mandel, S. (2001). Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry*, 78(5), 1073-1082.
- Li, S. C., Schoenberg, B. S., Wang, C. C., Cheng, X. M., Rui, D. Y., Bolis, C. L., et al. (1985). A prevalence survey of Parkinson's disease and other movement disorders in the People's Republic of China. *Archives of Neurology*, 42(7), 655-657.
- Lu, H., Meng, X., & Yang, C. S. (2003). Enzymology of methylation of tea catechins and inhibition of catechol-O-methyltransferase by (-)-epigallocatechin gallate. *Drug Metabolism and Disposition*, 31(5), 572-579.
- Mandel, S., & Youdim, M. B. (2004). Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radical Biology & Medicine*, 37(3), 304-317.
- Morelli M, S Fenu, L Garau and G Di Chiara (1989). Time and dose dependence of the 'priming' of the expression of dopamine receptor supersensitivity. *European Journal of Pharmacology*, 162-165.

- Nie, G., Jin, C., Cao, Y., Shen, S., & Zhao, B. (2002). Distinct Effects of Tea Catechins on 6-Hydroxydopamine-Induced Apoptosis in PC12 Cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 397(1), 84–90.
- Nobre Junior, H. V., Cunha, G. M., Maia, F. D., Oliveira, R. A., Moraes, M. O., & Rao, V. S. (2003). Catechin attenuates 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced cell death in primary cultures of mesencephalic cells. *Comparative Biochemistry & Physiology- Part C: Toxicology & Pharmacology*, 136(2), 175-180.
- Owuor, E. D., & Kong, A. N. (2002). Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochemical Pharmacology*, 64(5-6), 765-770.
- Pan, T., Fei, J., Zhou, X., Jankovic, J., & Le, W. (2003). Effects of green tea polyphenols on dopamine uptake and on MPP+ -induced dopamine neuron injury. *Life Sciences*, 72(9), 1073-1083.
- Park, H. J., Lee, P. H., Bang, O. Y., Lee, G., & Ahn, Y. H. (2008). Mesenchymal stem cells therapy exerts neuroprotection in a progressive animal model of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 107(1), 141-151.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., & Pridham, J. B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22(4), 375-383.
- Shachar, D. B., Kahana, N., Kampel, V., Warshawsky, A., & Youdim, M. B. (2004). Neuroprotection by a novel brain permeable iron chelator, VK-28, against 6-hydroxydopamine lesion in rats. *Neuropharmacology*, 46(2), 254-263.
- Schroeter, H., Heiss, C., Balzer, J., Kleinbongard, P., Keen, C. L., Hollenberg, N. K., et al. (2006). (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(4), 1024-1029.
- Schroeter, H., Williams, R. J., Matin, R., Iversen, L., & Rice-Evans, C. A. (2000). Phenolic antioxidants attenuate neuronal cell death following uptake of oxidized low-density lipoprotein. *Free Radical Biology & Medicine*, 29(12), 1222-1233.
- Silvestrin, R. B., de Oliveira, L. F., Batassini, C., Oliveira, A., & e Souza, T. M. (2009). The footfault test as a screening tool in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience Methods*, 177(2), 317-321.

- Simola, N., Morelli, M., & Carta, A. R. (2007). The 6- hydroxidopamine model of parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*, *11*(43), 151-167.
- Vaugoyeau, M., Viel, S., Assaiante, C., Amblard, B., & Azulay, J. P. (2007). Impaired vertical postural control and proprioceptive integration deficits in Parkinson's disease. *Neuroscience*, *146*(2), 852-863.
- Yang, C. S., & Wang, Z. Y. (1993). Tea and cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, *85*(13), 1038-1049.
- Wang, Y. S., Shi, Y. M., Wu, Z. Y., He, Y. X., & Zhang, B. Z. (1991). Parkinson's disease in China. Coordinational Group of Neuroepidemiology, PLA. *Chinese Medical Journal(Engl)*, *104*(11), 960-964.
- Wang, Z. Y., Huang, M. T., Lou, Y. R., Xie, J. G., Reuhl, K. R., Newmark, H. L., et al. (1994). Inhibitory effects of black tea, green tea, decaffeinated black tea, and decaffeinated green tea on ultraviolet B light-induced skin carcinogenesis in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-initiated SKH-1 mice. *Cancer Research*, *54*(13), 3428-3435.
- Weinreb, O., Mandel, S., Amit, T., & Youdim, M. B. (2004). Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *15*(9), 506-516.
- Whishaw, I. Q., S. M. Pellis, & Gorny., B. P. (1992). Skilled reaching in rats and humans: Evidence for parallel development or homology. *Behavioural & Brain Research*, *47*, 59-70.

## CAPÍTULO IV

### DISCUSSÃO GERAL

No capítulo II desta dissertação foi apresentada uma revisão sobre os déficits proprioceptivos na Doença de Parkinson (DP), destacando as contribuições dos estudos realizados com humanos e animais. Apesar de recente, a preocupação com esse sintoma na patologia é bastante relevante, considerando-se que a diminuição da acuidade do sistema proprioceptivo pode favorecer e agravar o aparecimento dos sintomas motores clássicos do parkinsonismo (Vaugoyeau, Viel, Assaiante, Amblard, & Azulay, 2007).

No capítulo são apresentadas evidências da relação entre as disfunções dos gânglios da base e áreas corticais motoras como a área motora suplementar e o aparecimento de tais deficiências em portadores da DP (Jacobs & Horak, 2006). Um maior conhecimento e exploração dos fenômenos fisiológicos que compõem a perda proprioceptiva nesses pacientes podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias terapêuticas que possam melhorar sua qualidade de vida. Nesse sentido, a exploração experimental é fundamental.

Entretanto, os estudos empíricos nessa área são escassos e limitados. O caráter inconsciente das alterações proprioceptivas e sua profunda relação com outros aspectos da motricidade prejudicam a execução de estudos mais específicos sobre a propriocepção. Os estudos realizados buscam avaliar a capacidade dos sujeitos em reorganizar a postura ou realizar movimentos com membros superiores e inferiores sem que nenhuma outra fonte de informação seja utilizada que não às pertencentes ao sistema proprioceptivo. Embora sejam corretos e relativamente precisos na observação de déficits nesse sistema, através desse tipo de investigação é difícil compreender exatamente o que se encontra prejudicado em tais pacientes. Por mais elaborados que possam ser os delineamentos experimentais, o observado sempre será uma resposta motora, o que torna o processo proprioceptivo em si, que se refere à integração das informações sensório-motoras, algo de difícil investigação.

A mesma dificuldade é encontrada nas pesquisas com modelos animais. O isolamento das funções proprioceptivas é ainda mais complexo em roedores, limitando as contribuições dos estudos nessa área. Entretanto, conforme enfatizado no capítulo II, o investimento em estudos com animais que apontem

para o envolvimento da propriocepção na DP pode contribuir muito para o conhecimento dos processos psicofisiológicos e bioquímicos que subjazem o aparecimento desses sintomas.

O texto também chama atenção para o fato de que esse caráter inconsciente da propriocepção seja um obstáculo na detecção de alterações nesse sistema (O'Suilleabhain, 2004). É possível que tais déficits apareçam já nas fases iniciais da doença, mas mecanismos compensatórios impeçam o reconhecimento da perda proprioceptiva pelos pacientes, dificultando aos clínicos a identificação do sintoma. Conforme proposto no capítulo II, são necessários mais estudos voltados para o curso da manifestação e prevalência da perda proprioceptiva na DP. Tais dados podem tanto facilitar o diagnóstico precoce da doença como auxiliar na busca de estratégias terapêuticas mais adequadas.

Por ser uma patologia ainda sem cura, a DP conta apenas com tratamentos paliativos, visando a diminuição dos sintomas. Além disso, os tratamentos disponíveis têm limitações. Os procedimentos cirúrgicos são invasivos e pouco utilizados nas fases iniciais na doença (Koller, Wilkinson, Pahwa, & Miyawaki, 1998; Lang & Widner, 2002). Entre os fármacos, a opção pela L-DOPA, um precursor dopaminérgico, também tem suas desvantagens. Em exposição prolongada, a L-DOPA desencadeia e agrava sintomas como a discinesia (Marsden & Parkes, 1976). Em conjunto, os tratamentos disponíveis têm em comum a dificuldade em atuar no retardo da progressão da patologia. Por este motivo, a terapia com os polifenóis presentes no chá verde é tão visada atualmente. Ela promete ser um eficiente desacelerador da progressão da doença.

Entretanto, a característica natural dessas substâncias, parece ser um dos principais motivos dos investimentos nessa alternativa terapêutica. Dados da Organização Mundial da Saúde estimam que cerca de 80% da população mundial, sobretudo nos países em desenvolvimento, faz uso de plantas e seus derivados como assistência primária à saúde. E nesses países, cerca da metade dos medicamentos têm origem em produtos naturais (Organización Mundial de la Salud, 2002). Esses dados mostram o quanto é importante investigar as propriedades presentes nessas substâncias para poder avaliar o seu investimento para o desenvolvimento de fármacos.

A investigação acerca dos benefícios oferecidos pelas catequinas encontradas no chá verde tem demonstrado sua ação positiva no tratamento de doenças coronarianas, arteriosclerose, síndromes metabólicas, doenças

neurodegenerativas e diversos tipos de câncer em modelos animais (Mandel & Youdim, 2004). Esses resultados impulsionam a pesquisa de fármacos baseados nesses componentes. Os benefícios encontrados pela utilização das catequinas tanto no combate a determinadas patologias quanto no retardo de processos do envelhecimento, também têm tornado popular sua utilização nas indústrias alimentícia e cosmética.

Atualmente, a Divisão de Câncer do Instituto Nacional do Câncer nos Estados Unidos está desenvolvendo um composto contendo polifenóis do chá verde para ser usado como terapia preventiva ao câncer. A droga, chamada de Polyphenol E®, contém cerca de 90% de catequinas purificadas, incluindo a (-)-epicatequina (EC) e já está segunda fase de testes. Entretanto ainda são necessários estudos sobre os efeitos dessas substâncias individualmente e em longo prazo. Um estudo longitudinal recente com o Polyphenol E® realizado com cães da raça *beagle* encontrou resultados bastante preocupantes. A administração oral do composto em jejum por 6 meses, desencadeou uma série de danos fisiológicos, incluindo mortes, nos grupos de animais que receberam as doses mais elevadas do estudo (600-1000mg/kg/dia). Amostras de tecidos dos animais pesquisados demonstraram a presença de distúrbios gastrointestinais, inflamações no fígado, rins e pulmões, além de danos ao baço e medula óssea, provocando alterações sanguíneas (Kapetanovic et al., 2009). Resultados como os deste estudo alertam para os perigos do uso indiscriminado dessas substâncias e para a necessidade de mais pesquisas sobre os efeitos *in vivo* das catequinas.

O capítulo III trouxe um estudo sobre os efeitos da administração da EC em um modelo animal da DP. Dos quatro maiores componentes do chá verde, a EC é a catequina menos tóxica quando em administração prolongada e/ou em altas doses, o que a torna sua exploração uma alternativa aos efeitos tóxicos provocados pelas catequinas nessas condições (Weinreb, Mandel, Amit, & Youdim, 2004).

Os efeitos da EC ainda não haviam sido testados experimentalmente no modelo animal da 6-OHDA. A avaliação dos benefícios de um fármaco em modelos animais propicia uma avaliação mais ampla da atuação da droga através da observação comportamental. Nosso estudo buscou verificar a capacidade da EC em reduzir a expressão de rotações em animais lesionados unilateralmente com 6-OHDA, tanto quando estimulados com fármacos, quanto de forma espontânea, através do teste de motricidade sobre grade (TMG).

Conforme relatado no capítulo II, o modelo de lesão unilateral da 6-OHDA é o modelo animal de parkinsonismo mais difundido e mais utilizado. A observação das rotações *ipsi* ou *contralaterais* à lesão a partir da injeção de agonistas dopaminérgicos ou drogas dopaminomiméticas são indicadores de lesões unilaterais acima de 50% na Substância Negra (SN), já bem estabelecidos pela literatura (Simola, Morelli, & Carta, 2007). Sendo assim, a diminuição desse comportamento é uma indicação de que houve alguma melhora ou retardo na lesão nigroestriatal. Em nossos resultados, a exposição ao metilfenidato e à apomorfina, não apontou redução significativa das rotações nos animais tratados com EC em nenhuma das quatro doses testadas. Houve uma relativa diminuição das rotações induzidas por metilfenidato nos grupos tratados com as doses intermediárias EC2 (0,1mg/mL) e EC3 (0,31mg/mL), entretanto, a ausência de significância estatística com relação às diferenças entre os grupos, demonstra que a droga não foi suficiente para alterar essa expressão comportamental.

O mesmo ocorreu no TMG, os animais dos grupos tratados com as doses EC2 e EC3 tiveram menor expressão de atividade rotacional nesse teste, indicando a possibilidade de uma atuação da EC na supressão do comportamento, no entanto, a diferença entre a expressão de rotações no TMG entre os grupos, não foi significativa. Devemos considerar que a observação da atividade rotacional no TMG é uma proposta recente para a investigação de lesão nesse modelo animal e os motivos que levam os animais a apresentar rotações quando sobre a grade, ainda estão sendo investigados. Um maior conhecimento sobre os mecanismos responsáveis por essas rotações espontâneas no TMG facilitaria uma compreensão mais objetiva quanto aos processos desencadeados pela EC e observados nos animais expostos ao teste neste estudo. Mais estudos precisam ser realizados para que possamos ter uma noção mais clara sobre as bases fisiológicas do comportamento rotacional de ratos lesionados pela 6-OHDA nesse aparato.

Também buscamos verificar os efeitos da droga sobre a sensomotricidade dos animais através do teste da fita adesiva. Nosso objetivo foi explorar a capacidade da EC em atuar revertendo déficits proprioceptivos evidenciados pela negligência sensorial das patas dianteiras nesse teste (Castañeda et. al., 2005). No capítulo II, sobre as perdas proprioceptivas na DP, foram descritos alguns estudos em que animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA apresentavam déficits na sensomotricidade da pata contralateral à lesão, o que os leva utilizar mais a pata *ipsilateral*. A lesão nigroestriatal compromete circuitos encefálicos

importantes para a motricidade e estudos recentes têm revelado que essa circuitaria está bastante envolvida na propriocepção (Graybiel, 1998; Middleton & Strick, 2000; Dettmers et al., 1995; Jacobs & Horak, 2006). O ato de perceber o incômodo gerado pela fita presa em uma pata em um tempo de reação menor que na outra e direcionar-se a retirá-la, denota que os estímulos enviados pelos receptores da pele e articulações desta pata do animal foram mais rapidamente interpretados pelos circuitos encefálicos responsáveis pela decodificação desses estímulos. Nesse sentido, a preferência por uma das patas, denota a possível degeneração da circuitaria proprioceptiva da pata negligenciada.

Nossos resultados demonstram que houve uma preferência pela pata direita em todos os grupos, com exceção do grupo EC1. Essa preferência pela pata direita sugere que a EC não foi capaz de atuar na reversão dos danos provocados pela depleção dopaminérgica na circuitaria córtico-estriatal da propriocepção. Conforme já proposto no capítulo III, é provável que a ausência de uma preferência significativa pela pata direita no grupo EC1 aponte para mecanismos compensatórios por comprometimentos na sensomotricidade de ambas as patas que para melhoras na propriocepção provocadas pela EC (Wishaw, Pellis e Gorny, 1992).

Apesar da literatura já ter relatado a capacidade da EC em combater o estresse oxidativo provocado pela 6-OHDA em modelos *in vitro*, nosso estudo não apontou resultados significativamente positivos para seu uso *in vivo*. A 6-OHDA é uma toxina de fácil acesso e manuseio, que tem a preferência frente ao uso dos outros modelos animais disponíveis quanto à avaliação de tratamentos farmacológicos, sobretudo quando infundida unilateralmente (Simola, Morelli, & Carta, 2007; Dauer & Przedborski, 2002; Deumens, Blokland, & Prickaerts, 2002). Entretanto, o modelo reserva suas limitações. Conforme já citado, a observação de comprometimento neuronal só é observada comportamentalmente nesse modelo com lesões acima de 50%, e geralmente a infusão da droga provoca lesões extensas entorno de 90% na SN (Deumens et al., 2002). Em outros modelos animais de parkinsonismo, alguns destes citados no capítulo II, déficits podem ser observados sem que seja necessária uma extensa perda neuronal (Meredith, Sonsalla, & Chesselet, 2008). No experimento demonstrado no capítulo III, houve uma perda média de 70 a 80% dos neurônios dopaminérgicos nigrais entre os grupos. O alto grau de morte neuronal indica a potência da ação neurotóxica da droga, que também pode ter sido um ponto desfavorável à ação da EC no

experimento. Há a possibilidade de que em outro modelo animal, as doses testadas de EC tivessem um melhor desempenho no retardo da lesão. No entanto, o modelo animal de parkinsonismo da 6-OHDA pode ser considerado o “padrão ouro” para testes farmacológicos e sua utilização para a investigação de novos tratamentos é fundamental.

Além dessas implicações, é possível também que a forma de administração e o protocolo de exposição à EC tenham dificultado sua ação antioxidante, ao invés de potencializá-la conforme nossa intenção inicial. Os diferentes resultados encontrados na literatura sobre a ação antioxidante ou pro-oxidante das catequinas apontam a quantidade de droga administrada como um fator determinante, mas também sugerem que esses efeitos dependam do microambiente no qual estas são utilizadas (Nie, Jin, Cao, Shen, & Zhao, 2002). Nosso estudo demonstrou que a EC administrada intracerebralmente no estriado não foi efetiva no combate à lesão desencadeada pela 6-OHDA no feixe prosencefálico medial. Entretanto, outros estudos realizados com extratos do chá verde que contém a EC apontam para uma eficaz redução da intoxicação provocada pela toxina quando administrados intraperitonealmente (Shachar, Kahana, Kampel, Warshawsky, & Youdim, 2004).

Outro ponto a ser considerado é a escolha pela administração de EC posterior à infusão da 6-OHDA. A toxina age através da sua recaptação pelos neurônios dopaminérgicos e posterior indução de estresse oxidativo, desencadeando um processo que leva cerca de 14 dias para atingir o nível de comprometimento neuronal necessário para a observação comportamental. (Simola, Morelli, & Carta, 2007). A opção por administrar o tratamento com a EC após 24h da lesão tinha como objetivo interromper o processo e assim, retardar a lesão. Nossos resultados apontaram que a EC, ao menos nas doses testadas, não foi eficiente nesse processo. É possível que infusões de EC anteriores à infusão de 6-OHDA, tivessem favorecido seu potencial como neuroprotetor, conforme apontam outros protocolos na literatura (Nie, Jin, Cao, Shen, & Zhao, 2002).

A literatura também tem sugerido que o melhor efeito das catequinas como recurso terapêutico em quaisquer patologias é sua utilização conjunta (Kapetanovic et al., 2009). Alguns estudos já apontaram a possibilidade de uma interação sinérgica entre as catequinas EGCG e EC, potencializando sua ação no combate à proliferação de células cancerígenas (Suganuma et al., 1999; Morre et al., 2003). É possível que no consumo diário de alimentos como o chá verde,

essas drogas interajam sinergicamente no organismo, potencializando seus benefícios e minimizando seus possíveis efeitos danosos. Ainda assim, a investigação dos efeitos de cada catequina ainda é necessária para seja possível compreender os mecanismos dessa interação no organismo a fim de que possam ser desenvolvidas estratégias terapêuticas mais eficazes.

## REFERÊNCIAS

- Castañeda, E. T., Fleminga, S., Paquette, M. A., Boat, K., Moffett, J., Stachowiak, E. K., et al. (2005). Assessment of recovery in the hemiparkinson rat: Drug-induced rotation is inadequate. *Physiology & Behavior*, *84*, 525–535.
- Dauer, W., & Przedborski, S. (2002). Parkinson's Disease: Mechanisms and Models *Neuron* *39*, 889-909.
- Dettmers, C., Fink, G. R., Lemon, R. N., Stephan, K. M., Passingham, R. E., Silbersweig Holmes, A., et al. (1995). Relation between cerebral activity and force in the motor areas of the human brain. *Journal of Neurophysiology*, *74*, 802–815.
- Deumens, R., Blokland, A., & Prickaerts, J. (2002). Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol*, *175*(2), 303-317.
- Graybiel, A. M. (1998). The basal ganglia and chunking of action repertoires. *Neurobiology of learning and memory*, *70*, 119-136.
- Jacobs, J. V., & Horak, F. B. (2006). Abnormal proprioceptive-motor integration contributes to hypometric postural responses of subjects with Parkinson's disease. *Neuroscience*, *141*(2), 999-1009.
- Kapetanovic, I. M., Crowell, J. A., Krishnaraj, R., Zakharov, A., Lindeblad, M., & Lyubimov, A. (2009). Exposure and toxicity of green tea polyphenols in fasted and non-fasted dogs. *Toxicology*, *260*(1-3), 28-36.
- Koller, W. C., Wilkinson, S., Pahwa, R., & Miyawaki, E. K. (1998). Surgical treatment options in Parkinson's disease. *Neurosurgery Clinics of North America*, *9*(2), 295-306.
- Lang, A. E., & Widner, H. (2002). Deep brain stimulation for Parkinson's disease: patient selection and evaluation. *Movement Disorders*, *17 Suppl 3*, S94-101.
- Marsden, C. D., & Parkes, J. D. (1976). "On-off" effects in patients with Parkinson's disease on chronic levodopa therapy. *Lancet*, *1*(7954), 292-296.
- Mandel, S., & Youdim, M. B. (2004). Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radical Biology & Medicine*, *37*(3), 304-317.
- Meredith, G. E., Sonsalla, P. K., & Chesselet, M. F. (2008). Animal models of Parkinson's disease progression. *Acta Neuropathologica*, *115*(4), 385-398.

- Middleton, F. A., & Strick, P. L. (2000). Basal ganglia and cerebellar loops: motor and cognitive circuits. *Brain Research*, 31(2-3), 236-250.
- Morre, D. J., Morre, D. M., Sun, H., Cooper, R., Chang, J., & Janle, E. M. (2003). Tea catechin synergies in inhibition of cancer cell proliferation and of a cancer specific cell surface oxidase (ECTO-NOX). *Pharmacology and Toxicology*, 92(5), 234-241.
- Nie, G., Jin, C., Cao, Y., Shen, S., & Zhao, B. (2002). Distinct Effects of Tea Catechins on 6-Hydroxydopamine-Induced Apoptosis in PC12 Cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 397(1), 84–90.
- Simola, N., Morelli, M., & Carta, A. R. (2007). The 6- hydroxydopamine model of parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*, 11(43), 151-167.
- Suganuma, M., Okabe, S., Kai, Y., Sueoka, N., Sueoka, E., & Fujiki, H. (1999). Synergistic effects of (–)-epigallocatechin gallate with (–)-epicatechin, sulindac, or tamoxifen on cancer-preventive activity in the human lung cancer cell line PC-9. *Cancer Research*, 59(1), 44-47.
- Shachar, D. B., Kahana, N., Kampel, V., Warshawsky, A., & Youdim, M. B. (2004). Neuroprotection by a novel brain permeable iron chelator, VK-28, against 6-hydroxydopamine lesion in rats. *Neuropharmacology*, 46(2), 254-263.
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2002) Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. Ginebra: OMS.
- O'Suilleabhain, P. (2004). Sensory symptoms and sensorimotor distortion Parkinson's disease. In M. Ebadi & R. F. Pfeiffer (Eds.), *Parkinson's disease*. Washington D.C.: CRC Press.
- Vaugoyeau, M., Viel, S., Assaiante, C., Amblard, B., & Azulay, J. P. (2007). Impaired vertical postural control and proprioceptive integration deficits in Parkinson's disease. *Neuroscience*, 146(2), 852-863.
- Weinreb, O., Mandel, S., Amit, T., & Youdim, M. B. (2004). Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15(9), 506-516.
- Whishaw, I. Q., S. M. Pellis, & Gorny, B. P. (1992). Skilled reaching in rats and humans: Evidence for parallel development or homology. *Behavioural & Brain Research*, 47, 59–70

## CAPITULO V

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

O programa de Pós-Graduação em Psicologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) iniciou suas atividades em 1988. O recente reconhecimento e recomendação do programa pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) que atribui ao curso o nível máximo de sua avaliação mostram o quanto o programa é coeso e o quanto foi construído ao longo de todos esses anos de dedicação à Psicologia como Ciência.

Através da experimentação animal, a dissertação aqui apresentada inaugura uma nova fase no programa. Nesses 21 anos de existência, ainda não havia sido desenvolvida uma dissertação ou tese diretamente vinculada ao programa usando animais como sujeitos de pesquisa. Essa dissertação então, marca o início de muitos outros projetos nesses termos, que irão compor a produção científica dessa instituição.

A instituição se encontra em fases iniciais de estabelecimento desse tipo de experimentação, e evidentemente, ainda apresenta limitações quanto às instalações. O presente projeto, vinculado ao Laboratório de Psicologia Experimental, Neurociência e Comportamento (LPNeC), exigiu aparatos e outros recursos não disponíveis ao longo de sua execução. Essas limitações foram responsáveis pela condução do projeto no Departamento de Bioquímica da mesma Universidade, junto ao PPG em Neurociências. Essa parceria, além de facilitar o desenvolvimento do estudo, possibilitou trocas de conhecimento fundamentais para a compreensão dos dados aqui apresentados.

As parcerias propiciadas pela Ciência promovem trocas de conhecimento entre profissionais de diferentes áreas ampliando as fronteiras do conhecimento. Cada vez mais as modalidades de experimentação científica deixam de pertencer a determinadas áreas, passando a contar com o olhar de outras ciências. Por este motivo, é muito enriquecedor que a o Programa de Pós-Graduação em Psicologia possa desenvolver estudos próprios com a experimentação animal sem jamais deixar de contar com parcerias de outros institutos.

O presente estudo testou pela primeira vez a administração de uma substância, a (-) – epicatequina (EC), no modelo animal da 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA). Também, pela primeira vez, foi estada a administração intracerebral

dessa droga. A utilização do teste de motricidade sobre grade como uma ferramenta de detecção de lesão nigroestriatal para este modelo animal também é recente, sendo este um dos trabalhos primeiros trabalhos a testar sua eficácia. A exploração da propriocepção através da negligência sensorial das patas dianteiras pelo do teste da fita adesiva nesse modelo, também é recente. Todas essas circunstâncias nos levaram à opção pela não inclusão de outras variáveis, como a investigação dos efeitos cognitivos da EC sobre este modelo animal. A inclusão da avaliação de aspectos cognitivos mais evidentes certamente forneceria dados interessantes, enriquecendo o trabalho. No entanto, a inclusão de mais experimentos, dependentes de sessões de treinamento e outras condições de experimentação, poderiam gerar dados mais complexos que desfavorecessem a interpretação dos efeitos da droga sobre os comportamentos motores alvo. Por estes motivos, a dissertação aqui apresentada é baseada em considerações voltadas unicamente para o comportamento motor.

O desejo pela avaliação de aspectos cognitivos e emocionais norteia a investigação psicológica. Entretanto, a Psicologia, como ciência do comportamento, também se presta à compreensão de todos os processos que compõe a expressão comportamental. Nesse sentido, a avaliação da motricidade tanto em sua expressão enquanto comportamento quanto suas bases fisiológicas, também é objeto de estudo da Psicologia.

O estudo sobre os efeitos da EC no modelo animal de parkinsonismo da 6-OHDA não forneceu dados positivos aos efeitos da droga, contrariando o que sugeria a literatura. Esse resultado reforça a necessidade de mais estudos para que as variáveis envolvidas sejam mais bem exploradas e que possam ter conclusões mais amplas sobre o potencial neuroprotetor dessa droga como possível tratamento da Doença de Parkinson.

Embora com resultados negativos, o presente trabalho deu início a uma nova fase nesse programa Pós-Graduação, sugerindo que sua execução, gerou resultados positivos em termos muito mais amplos e mais significativos que os passíveis de detecção pelas análises estatísticas empregadas no estudo. Espera-se que esses resultados positivos sejam também bastante replicados e ampliados nos próximos anos dentro dessa instituição

Anexo

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

Número : 2007985

Título : Avaliação em Modelo Animal de Potenciais Terapias para a Doença de Parkinson

Pesquisador (es) :

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
TADEU MELLO E SOUZA	PESQ RESPONSÁVEL	tmelloesouza@yahoo.com.br	33087754
ALCYR ALVES DE OLIVEIRA JUNIOR	PESQUISADOR	alcyr.oliveirajr@gmail.com	
CARMEM JURACY SILVEIRA GOTTFRIED	PESQUISADOR	cgottfried@ufrgs.br	33087754
CRISTIANE BATASSINI	PESQUISADOR	crisbatassini@hotmail.com	
JÚLIA HENNIG PIMENTEL	PESQUISADOR	julinha_pi@hotmail.com	
LETICIA RIBEIRO DA SILVA DOS SANTOS	PESQUISADOR	00162343@ufrgs.br	

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 40 , ata nº 120 , de 27/11/2008 , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, quinta-feira, 27 de novembro de 2008



ILMA SIMONI BRUM DA SILVA  
Coordenador do CEP-UFRGS

# 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](#)