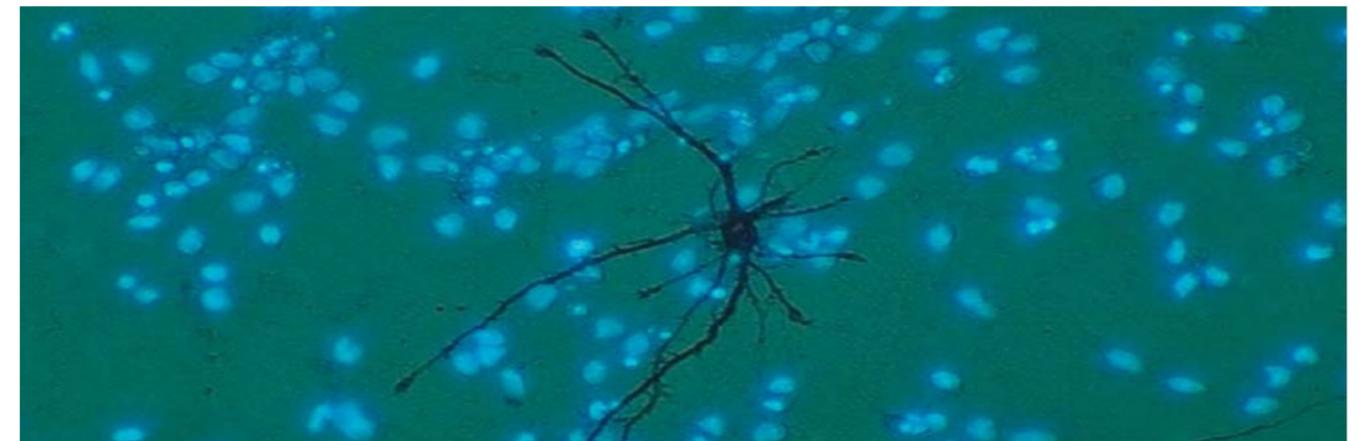




UNIVERSIDADE DE COIMBRA
FACULDADE DE MEDICINA

Protecção pela sitagliptina num modelo de neurotoxicidade induzida pelo MPTP no murganho



Andréa Machado da Silva

Mestrado em Patologia Experimental

2011



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

FACULDADE DE MEDICINA

**Protecção pela sitagliptina num modelo de
neurotoxicidade induzida pelo MPTP no
murganho.**

Dissertação de Mestrado em Patologia Experimental

Trabalho realizado sob a orientação do

Professor Doutor Carlos Alberto Fontes Ribeiro e do

Professor Doutor Frederico Guilherme de Sousa da Costa Pereira

Junho 2011

*Aos meus Pais que tudo fizeram para eu
chegar até aqui.*

E a memória do meu Avô.

Índice

| | |
|---|------------|
| Agradecimentos | I |
| Resumo | III |
| Abstract | IV |
| Índice de Figuras e de Tabelas | VII |
| Lista de Abreviaturas..... | XI |
| | |
| CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS..... | 1 |
| | |
| INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1. Doença de Parkinson..... | 2 |
| 1.1.Generalidades da Doença de Parkinson | 2 |
| 1.2.Etiologia | 3 |
| 1.3.Sintomatologia | 4 |
| 1.4.Neuropatologia | 5 |
| 2. Neurotransmissão Dopaminérgica | 7 |
| 2.1.Dopamina..... | 7 |
| 2.2.Biosíntese da Dopamina..... | 7 |
| 2.3.Metabolismo da Dopamina..... | 9 |
| 2.4.Via Dopaminérgica Nigroestriatal..... | 10 |

| | |
|---|-----------|
| 3. Neurotransmissão Serotoninérgica | 12 |
| 3.1.Serotonina..... | 12 |
| 3.2.Biosíntese da Serotonina..... | 12 |
| 4. Modelos animais da DP | 16 |
| 4.1.Modelo do MPTP | 16 |
| 4.2.Modelo da 6-OHDA | 22 |
| 4.3.Modelo do <i>Paraquat</i> | 23 |
| 4.4.Modelo da Rotenona..... | 25 |
| 5. Possível estratégia farmacológica para a DP: A Sitagliptina..... | 26 |
| 5.1.A Sitagliptina | 26 |
| 5.2.Farmacocinética da Sitagliptina..... | 27 |
| 5.3.Neuroprotecção dopaminérgica pela Sitagliptina..... | 27 |
| OBJECTIVOS | 31 |
| | |
| CAPÍTULO II: Componente experimental | 33 |
| | |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 34 |
| Animais | 34 |
| 1. Fármacos utilizados..... | 34 |
| 2. Desenho experimental | 35 |
| 3. Teste de actividade locomotora – “ <i>Rotarod</i> ” | 36 |
| 4. Sacrifício dos animais e isolamento do estriado | 38 |

| | |
|---|----|
| 5. Determinação dos níveis de monoaminas e dos seus metabolitos por HPLC..... | 38 |
| 6. Quantificação da expressão de TH e de GFAP por <i>Western Blotting</i> ... | 40 |
| 7. Análise estatística..... | 42 |

RESULTADOS43

| | |
|---|----|
| 1. Administração Aguda de Sitagliptina..... | 43 |
| 1.1. Peso Corporal | 43 |
| 1.2. Alterações comportamentais após a administração de MPTP | 44 |
| 1.3. Teste comportamental – “ <i>Rotarod</i> ” | 44 |
| 1.4. Níveis estriatais totais de DA e dos seus metabolitos (DOPAC e HVA)..... | 45 |
| 1.4.1. <i>Turnover</i> total da DA, pré-sináptico e sináptica | 47 |
| 1.5. Níveis estriatais totais de 5-HT e do seu metabolito (5-HIAA) | 48 |
| 1.6. Expressão da proteína TH | 51 |
| 1.7. Expressão da proteína GFAP | 52 |
| 2. Administração Sub-crónica de Sitagliptina | 53 |
| 2.1. Peso Corporal | 53 |
| 2.2. Alterações comportamentais após a administração de MPTP | 54 |
| 2.3. Teste comportamental – “ <i>Rotarod</i> ” | 54 |
| 2.4. Níveis estriatais totais de DA e dos seus metabolitos (DOPAC e HVA)..... | 55 |
| 2.5. Níveis estriatais de 5-HT e do seu metabolito (5-HIAA) | 57 |

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO III: DISCUSSÃO E CONCLUSÕES..... | 59 |
| DISCUSSÃO..... | 60 |
| CONCLUSÕES..... | 64 |
| | |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 66 |

Agradecimentos

A realização deste trabalho foi conseguida com a ajuda, companheirismo, generosidade e boa vontade de muitos, por isso não queria deixar passar a oportunidade de agradecer a todos os que de algum modo contribuíram para a sua concretização.

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais, António e Maria Eugénia, por tudo o que têm feito por mim e por tudo o que passaram para poder concluir mais uma etapa, porque sem eles isto não seria possível. Um muito obrigada por estarem sempre comigo, pelos pais que são e por me darem esta oportunidade de seguir mestrado.

Aos restantes membros da família, Irmãs e Irmão, Tios, Tias e Avós, por me acompanharem sempre e por me darem força para continuar e conseguir ser muito mais.

Ao Professor Doutor Carlos Alberto Fontes Ribeiro, por me ter dado sempre apoio e também pelas importantes sugestões que proporcionaram um trabalho mais completo.

Ao Professor Doutor Frederico Guilherme de Sousa da Costa Pereira, pela sua disponibilidade, simpatia, sabedoria, pelo apoio e ajuda no que necessitava.

Aos meus amigos, por serem as pessoas que são e por me proporcionarem momentos inesquecíveis e sem duvida pelo apoio imenso que prestam e prestaram nos momentos mais difíceis e também naqueles de grande felicidade. Obrigada por existirem na minha vida.

A todos o meu MUITO OBRIGADA!

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa progressiva caracterizada pela perda de neurónios dopaminérgicos na substância negra pars compacta (SNpc) e consequente depleção de dopamina (DA) no estriado, bem como pela presença de corpos de Lewi (CL). Estas características neuropatológicas estão associadas a vários sintomas motores como o tremor em repouso, a rigidez, a bradicinesia e a instabilidade postural. Neste estudo pretendeu-se investigar um possível efeito neuroprotector da sitagliptina (tratamento agudo e sub-crónico) no sistema dopaminérgico nigroestriatal num modelo da DP por injeção de MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) em murganhos C57BL/6. Para avaliar o impacto da sitagliptina na neurotoxicidade nigroestriatal produzida por MPTP, as seguintes estratégias foram seguidas: 1- avaliação do equilíbrio e da coordenação motora dos animais pelo teste *rotarod*; 2- quantificação dos níveis de dopamina, de serotonina (5-HT), bem como os dos seus respectivos metabolitos, por recurso ao método de HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência); 3-determinação da expressão de TH (Tirosina Hidroxilase – marcador da perda de neurónios dopaminérgicos) e de GFAP (Proteína Glial Fibrilar Ácida – marcador de astrócitos) por *Western Blotting*. A diminuição dos valores estriatais de DA e seus metabolitos, da enzima TH, o aumento do *turnover* da dopamina e finalmente o aumento da astrogliose são sugestivos de que o MPTP produziu neurodegenerescência dos terminais dopaminérgicos, sendo um bom modelo para estudar estratégias neuroprotectoras. Neste estudo ficou demonstrado que para além da administração sistémica de sitagliptina não ter protegido a via dopaminérgica nigroestriatal induzida pela administração do MPTP, alterou o perfil de letalidade do MPTP incluindo a potenciação da perda de peso dos animais induzida por esta toxina.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, neurotoxicidade, nigroestriatal, astrócitos, sitagliptina.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disorder characterized by loss of dopaminergic neurons in the *substantia nigra pars compacta* (SNpc) accompanied by depletion of dopamine (DA) in the striatum and the appearance of Lewy bodies. These neuropathological symptoms are related to motor symptoms such as resting tremor, rigidity, bradykinesia and postural instability. In this study, we investigated a possible neuroprotective effect of sitagliptin (acute and subchronic treatment) on nigrostriatal dopaminergic system from the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) mouse model of PD. To evaluate whether sitagliptin protects against MPTP-induced nigrostriatal degeneration, the following tasks using C57BL/6 mice were executed: assessment of locomotor function by using Rotarod test; quantification of the levels of DA, serotonin (5-HT), and their metabolites by using HPLC (High Performance Liquid Chromatography); determination of TH (tyrosine hydroxylase - a marker of loss of dopaminergic neurons) and GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein - a marker of astrocytes) expression by using Western Blot method. The results allowed us to confirm that MPTP induced striatal neurotoxicity as seen by depletion of DA and its metabolites (DOPAC and HVA), by decreased TH expression and by the increase in DA turnover as well as of GFAP expression. This demonstrates the usefulness of this MPTP model for studying neuroprotective strategies. It was also shown that systemic administration of sitagliptin did not protect against MPTP-induced dopaminergic striatal toxicity. In addition, sitagliptin increased the weight loss of animals caused by MPTP and altered its profile of mortality induction.

Keywords: Parkinson's disease, neurotoxicity, nigrostriatal, astrocytes, sitagliptin.

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|-----------|
| Figura 1 - Apresentação esquemática da morte neuronal na DP. | 3 |
| Figura 2 - Estátua de Paul Richer, representando a postura de um paciente com DP descrita por James Parkinson. | 5 |
| Figura 3 - Estrutura química da dopamina. | 7 |
| Figura 4 - Biosíntese da dopamina. | 8 |
| Figura 5 - Via catabólica da dopamina. | 9 |
| Figura 6 - Representação da via nigroestriatal. | 10 |
| Figura 7 - Estrutura química da serotonina. | 12 |
| Figura 8 - Biosíntese e catabolismo da serotonina. | 13 |
| Figura 9 - Libertação da 5-hidroxitriptina no SNC. | 14 |
| Figura 10 - Apresentação esquemática do mecanismo de acção do MPTP. | 17 |
| Figura 11 - Estrutura química do MPTP e do seu metabolito. | 18 |
| Figura 12 - Representação esquemática da via intracelular do MPP ⁺ . | 19 |
| Figura 13 - Estrutura química da 6-hidroxidopamina. | 22 |
| Figura 14 - Estrutura química do <i>paraquat</i> . | 24 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 15 - Estrutura da rotenona. | 25 |
| Figura 16 - Estrutura química da sitagliptina. | 26 |
| Figura 17 – (A) Avaliação do equilíbrio e da coordenação motora de dois murganhos <i>num RotaRod</i> de 5 pistas (B) Detalhe da separação entre dois murganhos em duas pistas diferentes. | 36 |
| Figura 18 - Sistema de HPLC utilizado neste estudo para a quantificação de monoaminas. | 38 |
| Figura 19 - Avaliação do peso corporal dos murganhos CL57B/6 nos dias 0, 1, 6 e 7 de tratamento com SAL, MPTP (4x 20mg/kg) e/ou sitagliptina (4x 10mg/kg). | 42 |
| Figura 20 - Tempo de permanência no rod no dia 7 após a administração de MPTP (4x 20mg/kg) e/ou sitagliptina (4x 10mg/kg). | 44 |
| Figura 21 - Efeito da administração de MPTP (4x 20 mg/kg) e/ou sitagliptina (4x 10 mg/kg) nos níveis estriatais, totais de DA e dos seus metabolitos, DOPAC e HVA. | 45 |
| Figura 22 - Efeito da administração de MPTP (4x 20 mg/kg) e/ou sitagliptina (4x 10 mg/kg) no <i>turnover</i> da dopamina, no <i>turnover</i> pré-sináptico e no <i>turnover</i> sináptico. | 46 |
| Figura 23 - Efeito da administração de MPTP (4x 20 mg/kg) e/ou Sitagliptina (4x 10 mg/kg) nos níveis estriatais, totais de 5-HT e do seu metabolito 5-HIAA. | 48 |
| Figura 24 - Cromatogramas representativos para cada uma das condições experimentais em estudo. | 49 |
| Figura 25 - A expressão de tirosina hidroxilase (TH) no estriado de murganhos C57BL/6J controlo e em murganhos administrados com MPTP (4x20 mg/kg, i.p.) e/ou Sitagliptina (4x10 mg/kg, i.p.). | 50 |

- Figura 26** - A expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) no estriado de murganhos C57BL/6J controlo e de murganhos administrados com MPTP (4x20 mg/kg, i.p.) e/ou sitagliptina (4x10 mg/kg, i.p.). **51**
- Figura 27** - Avaliação do peso corporal dos murganhos CL57B/6 nos dias 0, 3 e 7 de tratamento com SAL, MPTP (4x 20mg/kg) e/ou Sitagliptina (20 mg/kg, diariamente durante 9 dias). **52**
- Figura 28** - Tempo de permanência no *rod* no dia 3 após a administração de MPTP (4x20mg/kg) e/sitagliptina (20 mg/kg, diariamente durante 9 dias). **54**
- Figura 29** - Efeito da administração de MPTP (4x 20 mg/kg) e/ou de sitagliptina (20 mg/kg diariamente, durante 9 dias) nos níveis estriatais de DA e dos seus metabolitos, DOPAC e HVA. **55**
- Figura 30** - Efeito da administração de MPTP (4x 20 mg/kg) e/ou de sitagliptina (20 mg/kg diariamente, durante 9 dias) nos níveis estriatais de 5-HT e do seu metabolito 5-HIAA. **56**

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1** - Tempos de retenção obtidos a partir da elaboração das curvas padrão de cada monoamina. **39**
- Tabela 2** - Descrição dos anticorpos utilizados no método de *Western Blotting*. **41**

Lista de Abreviaturas

•OH - radical hidroxilo

5-HIAA - ácido 5-hidroxiindolacético

5-HT - serotonina

5-HTP - 5-hidroxitriptofano

5-HTT - transportador serotoninérgico de recaptção

6-OHDA - 6-hidroxidopamina

β A - péptido amilóide

AADC - descarboxilase dos aminoácidos aromáticos

APP - proteína precursora do péptido amilóide

ATV - área tegmentar ventral

BCA - ácido bicinconínico

BHE - barreira hemato-encefálica

cAMP - adenosina monofosfato cíclica

CL – corpos de Lewi

COMT - catecol-O-metil transferase

DA - dopamina

DAT - transportadores de DA

DOPAC - ácido 3,4-diidroxifenilacético

DP - doença de Parkinson

DPP-4 - dipeptidilpeptidase-4

DTT - ditioneitol

ECF - *Enhanced Chemifluorescence*

ex-4 - exenatide,

GFAP - *Glial fibrillary acidic protein*

GLP-1 - *glucagon-like peptide-1*

GLP-1r - receptor do GLP-1

H₂O₂ - peróxido de hidrogénio

hOAT 3 - transporte de aniões orgânicos humanos 3

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência

HVA - ácido homovanílico

i.p. - intraperitoneal

IF - filamentos intermediários

MAO - monoamina oxidase

MPDP⁺ - 1-metil-2-fenil-2,3-dihidropiridina

MPP⁺ - 1-metil-4-fenilpiridinina

MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

NaCl - cloreto de sódio

PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonilo

PVDF - difluoreto de polivinildieno

ROS - espécies reactivas de oxigénio

SDS - dodecil sulfato de sódio

SERT - transportador serotoninérgico de recaptção

SITA – sitagliptina

SN - substância negra

SNC - sistema nervoso central

SNpc - substância negra *pars compacta*

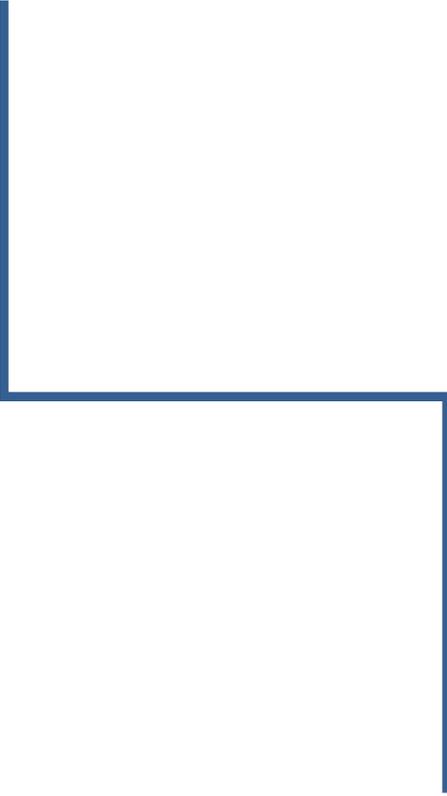
TH - tirosina hidroxilase

TNF- α - factores α de necrose tumoral

TRP - triptofano

VMAT - transportadores vesiculares de monoaminas

CAPÍTULO I:



INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

1. Doença de Parkinson

1.1. Generalidades da Doença de Parkinson

As características clínicas da doença de Parkinson (DP) foram, primeiramente, descritas por James Parkinson.

Em 1817, Parkinson descreve seis doentes com as seguintes características clínicas: bradicinesia, tremor em repouso e instabilidade postural. A título de curiosidade, torna-se pertinente referir que, apesar do sintoma rigidez ter sido descrito por Jean-Martin Charcot, é o próprio Charcot quem sugere a designação atribuída à doença, em homenagem a Parkinson (Mizuno *et al.*, 2008).

A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum, a seguir à doença de Alzheimer, afectando seis milhões de pessoas, em todo o mundo. Trata-se de uma doença particularmente frequente na população idosa, dando-se o seu início clínico após os 65 anos de idade (Litteljohn *et al.*, 2011), e entrando, seguidamente, num período “silencioso”, que mais não é do que uma fase assintomática da mesma.

Clinicamente, é caracterizada por diversos sintomas motores e sintomas não-motores. No âmbito dos primeiros, destacam-se os supracitados bradicinesia, rigidez, tremor em repouso, bem como instabilidade corporal; relativamente as segundas, merecem menção os distúrbios cognitivos, as alucinações, os delírios, a depressão, a perda do olfacto e o distúrbio do sono (Mizuno *et al.*, 2008). Tais sintomas são resultantes de perdas severas de neurónios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* (SNpc) e, conseqüentemente, da diminuição dos níveis de dopamina (DA) no estriado, impedindo a execução de movimentos coordenados (Dauer e Przedborski, 2005).

A esta doença está também associada a presença de inclusões citoplasmáticas fibrilares, conhecidas como corpos de Lewy (CL), as quais são compostas por ubiquitina e α -sinucleína. Tratam-se, portanto, de lesões e serão responsáveis pelos sintomas não-motores da DP (Gandhi *et al.*, 2005; Asanuma *et al.*, 2004; Thomas, 2009; Mizuno *et al.*, 2008).

Embora a DP possa ser diagnosticada com precisão, as estratégias terapêuticas a aplicar não conseguem curar ou bloquear totalmente a sua progressão (Mounsey *et al.*, 2010).

1.2. Etiologia

A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum, afectando 2% de indivíduos com idade superior a 65 anos e 4-5% acima dos 85 anos (Panneton *et al.*, 2010). Uma vez que a incidência da doença aumenta com a idade (o factor de risco mais importante), é provável que, futuramente, o número de pessoas que sofram de DP aumente, de forma constante (Prediger *et al.*, 2011).

Embora a etiologia da DP ainda não esteja bem compreendida, sabe-se que 95% dos casos são idiopáticos, de causa multifactorial, resultando de contribuições ambientais e genéticas (Mounsey e Teismann, 2010). Acredita-se, igualmente, na interacção entre ambas, podendo provocar disfunção mitocondrial e stresse oxidativo (Mizuno *et al.*, 2008). A etiologia bem como factores patogénicos encontram-se resumidos na Figura 1.

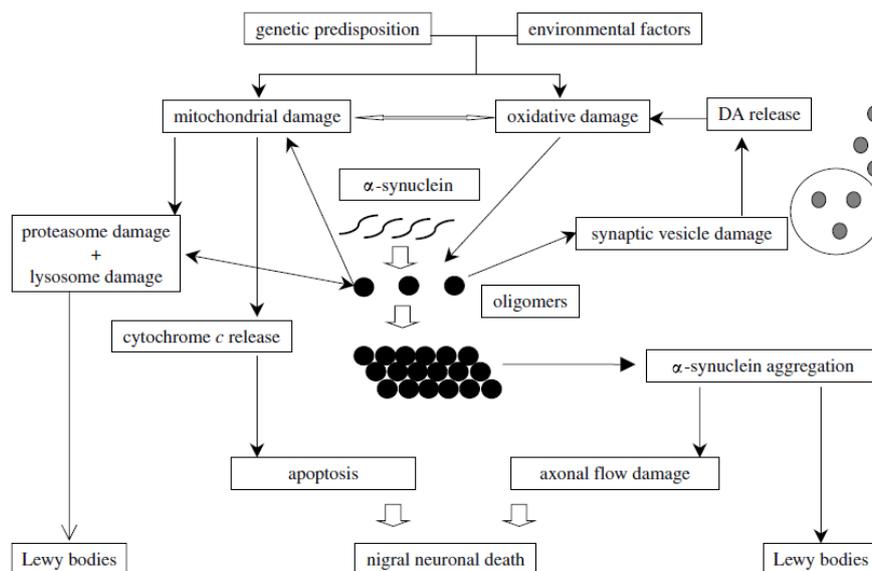


Figura 1 – Apresentação esquemática da morte neuronal na DP (adaptado de Mizuno *et al.*, 2008)

A caracterização de formas familiares permitiu a identificação de dez *loci* (PARK1 a PARK10) e seis genes, nos quais a transmissão pode ser de carácter dominante (SNCA e LRRK2) ou de carácter recessivo (PARK2, DJ-1 e PINK1). Dentro dos mais conhecidos, o gene SNCA codifica a α -synucleína, localizada principalmente nos CL, no caso da DP idiopática. As mutações destes genes têm por consequência o aumento de inclusões protofibrilares, considerados como a forma mais tóxica da α -synucleína (Horowitz e Greenamyre, 2010).

Com a descoberta de síndromes da DP em jovens intoxicados, acidentalmente, com MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), a hipótese ambiental foi fortemente evocada nos últimos vinte anos. Assim, sabe-se que a administração de MPTP causa toxicidade em ratos e que a sua exposição em humanos conduz a síndromes que mimetizam os sintomas neurológicos, causando neurodegeneração dopaminérgica (Meredith *et al.*, 2008).

Atente-se que numerosas substâncias com uma estrutura semelhante à do MPTP (6-hidroxi-dopamina, *paraquat* e rotenona) são utilizadas, na indústria agronómica, para o fabrico de pesticidas, de herbicidas e de insecticidas (Horowitz *et al.*, 2010). Estas substâncias podem, portanto, dependendo da dose e do tempo de exposição, induzir processos de neurotoxicidade, na medida em que os tóxicos em questão apresentam capacidade de inibir a função mitocondrial, levando a uma disfunção no complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, e, conseqüentemente, a morte celular (Meredith *et al.*, 2008). Neste sentido, a neurodegeneração progressiva pode, pois, ser provocada por uma exposição crónica a neurotoxinas dopaminérgicas, ou, apenas, por uma breve exposição, que, de alguma forma, é capaz de levar ao início de uma cascata de eventos prejudiciais (Dauer e Przedborski, 2003; Horowitz *et al.*, 2010).

1.3. Sintomatologia

Clinicamente, a DP é definida pela presença dos sinais cardinais: tremor, rigidez, bradicinesia e instabilidade postural (Dauer e Przedborski, 2005) (Figura 2). No entanto, sintomas não-motores, como o déficite cognitivo, a depressão, os distúrbios olfactivos, os delírios e as perturbações do sono, podem também estar relacionados com a DP.

A disfunção motora ocorre pela perda progressiva de células dopaminérgicas na *SNpc*. Os sintomas da DP são aparentes somente quando ocorre perda de cerca de 60-70% dos neurónios dopaminérgicos da *SNpc*, levando a uma redução aproximada de 80% dos níveis de DA estriatal (Bekris *et al.*, 2010).

Não prejudicando as actividades diárias, o tremor da DP ocorre em repouso, diminuindo com os movimentos voluntários. A rigidez refere-se ao aumento do tónus muscular. A acinesia (ausência de movimentos inconscientes normais, como o balançar dos braços ao caminhar), a hipocinesia (redução da amplitude dos movimentos) e a bradicinesia (lentidão de movimentos) ocorrem como uma variedade de sintomas, incluindo inexistência da expressão facial normal (hipomímia), tonalidade da voz reduzida (hipofonia), “*drooling*” (incapacidade de deglutição), redução da velocidade e do tamanho da escrita (micrografia), assim como diminuição do tamanho dos passos durante a caminhada. A bradicinesia, em particular, pode reduzir significativamente a qualidade de vida, uma vez que a execução das tarefas diárias é mais lenta (como o acto de comer ou de se vestir).

Outro sintoma da DP prende-se com a incapacidade para iniciar movimentos voluntários, como a caminhada (Dauer e Predborski, 2005).

Tendo em conta o referido neste subponto, pode dizer-se que os doentes de Parkinson desenvolvem uma postura inclinada e perdem os reflexos posturais normais, situação que pode gerar quedas.

1.4. Neuropatologia

A DP é caracterizada pela degeneração progressiva de neurónios dopaminérgicos, e conseqüente diminuição dos níveis de DA estriatais, e por outra característica não específica, isto é, a presença de corpos de Lewi (CL) em neurónios.



Figura 2 – Estátua de Paul Richer, representando a postura de um paciente com DP descrita por James Parkinson.

Tal situação verifica-se, igualmente, na doença de Alzheimer, assim como em demências com corpos de Lewy, mas é pouco frequente em pessoas saudáveis com idade avançada (Dauer e Predborski, 2005).

Os CL são inclusões citoplasmáticas eosinofílicas de proteínas, como a parkina, a ubiquitina, neurofilamentos e agregados de α -sinucleína. A α -sinucleína é uma pequena molécula e constitui o principal componente dos CL, sendo predominante no neocórtex, no hipocampo, na SN, tálamo e cerebelo (Bekris *et al.*, 2010).

Os CL podem formar agregados proteicos que, acumulando-se nos neurónios, provocam neurotoxicidade e, conseqüentemente, morte neuronal com redução da DA no estriado (Dauer e Predborski, 2005).

O facto dos doentes com Parkinson apresentarem níveis reduzidos de DA é explicado como resultado da disfunção da via dopaminérgica nigroestriatal.

2. Neurotransmissão Dopaminérgica

2.1. Dopamina (DA)

A DA é uma catecolamina sintetizada nos terminais dos neurónios dopaminérgicos a partir da tirosina (Figura 3). Embora presente em várias regiões cerebrais, o estriado é a principal região que contém DA, nos neurónios como origem na *SNpc*. Desempenha um papel fundamental na coordenação motora. Na DP, os neurónios dopaminérgicos da *SNpc* degeneram, conduzindo, assim, a disfunção motora característica (Vallone *et al.*, 2000).

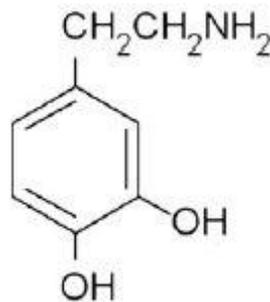


Figura 3 – Estrutura química da dopamina.

2.2. Biosíntese da Dopamina

A síntese da DA (Figura 4), intraneuronal, dá-se, principalmente, ao nível dos terminais, se bem que uma parte seja, igualmente, sintetizada nos corpos celulares, nos axónios e nas dendrites.

São necessárias duas etapas enzimáticas para a conversão da L-tirosina em DA. A primeira etapa consiste na transformação da L-tirosina em L-Dopa, no citoplasma. Esta reacção é catalisada pela tirosina hidroxilase (TH) e constitui a etapa limitante da síntese da DA. Uma inibição da actividade da TH induz a diminuição da formação de L-Dopa. A segunda etapa é caracterizada pela formação de DA a partir de L-Dopa, sendo a dopa-decarboxilase a enzima responsável por esta reacção. Esta é, pois, a razão pela

qual a administração de L-Dopa exógena permite aumentar a síntese da DA (Vallone *et al.*, 2000).

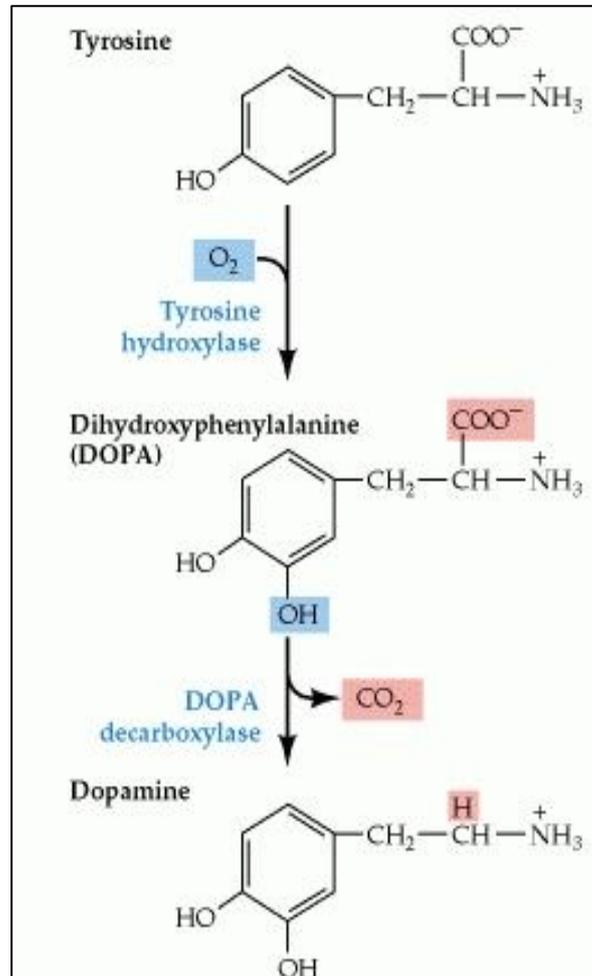


Figura 4 - Biosíntese da dopamina (adaptado de Purves *et al.*, 2001).

Uma parte da DA sintetizada é armazenada nas vesículas sinápticas presentes, em grande quantidade, ao nível dos terminais neuronais. Existe também DA citoplasmática sob a forma livre (embora em pouca abundância), regulada em permanência por uma enzima de degradação intracelular: a monoamina oxidase (MAO). Esta enzima pode estar localizada no interior (na membrana externa das mitocôndrias) ou no exterior dos neurónios. Sabe-se que existem dois tipos de MAO: a MAO-A, selectivamente inibida pela clorgilina e a MAO-B, inibida pelo deprenil (selegilina). A

DA é desaminada maioritariamente pela MAO-A, no rato, e pela MAO-B, no homem (Andrade e Ferraz, 1997). A MAO- B predomina na glia, onde é responsável pelo efeito tóxico do MPTP, transformando-o em MPP⁺ (1-metil-4-fenilpiridinina).

2.3. Metabolismo da DA

Na ocorrência de um potencial de acção, a libertação de DA no espaço sináptico dá-se, por exocitose dos terminais pré-sinápticos, pelo aumento de cálcio citosólico e despolarização do neurónio. A DA libertada liga-se aos seus receptores pré ou pós-sinápticos. Seguidamente, para não se acumular progressivamente na fenda sináptica e impedir a neurotransmissão, por saturação, a DA pode seguir dois caminhos: pode ser recaptada pelo neurónio pré-sináptico, através de um mecanismo activo de membrana, ou então sofrer inactivação enzimática. O mecanismo de recaptação pode ser influenciado/bloqueado por determinados fármacos, de maneira a que a DA permaneça na fenda sináptica e possa exercer a sua acção nos receptores por mais tempo (Andrade e Ferraz, 1997).

O metabolismo da DA intraneuronal ocorre pela acção sequencial da MAO e da catecol-O-metil transferase (COMT) (Figura 5).

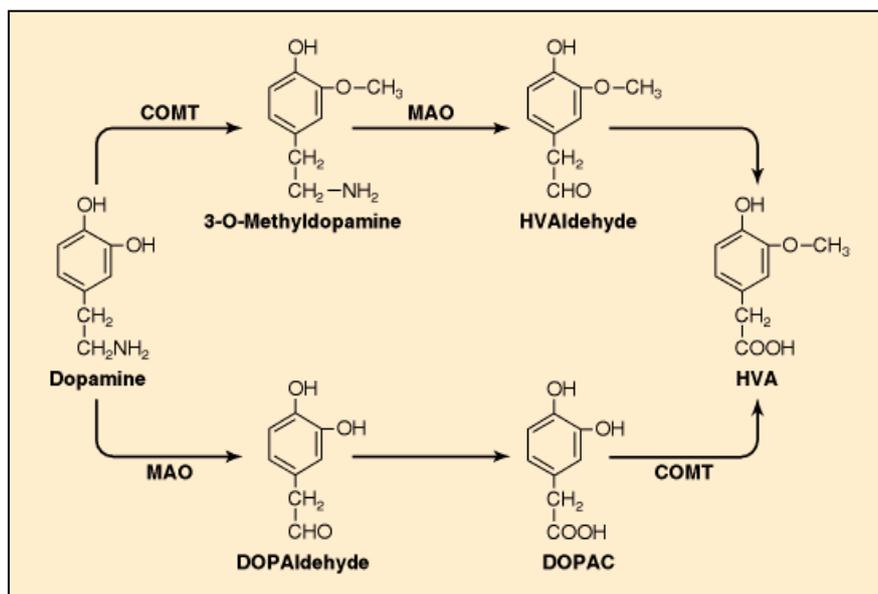


Figura 5 – Via catabólica da dopamina (adaptado de Siegel *et al.*, 1999).

Esta degradação dá origem a dois produtos metabólicos, a saber: o ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC), por acção da MAO, e o ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilacético (HVA), por acção da MAO e da COMT, sendo estes os principais metabolitos da síntese da dopamina nos seres humanos (Mannisto *et al.*, 1992; Andrade e Ferraz, 1997).

2.4. Via dopaminérgica nigroestriatal

A DA é um dos neurotransmissores mais abundantes no cérebro. Diferentes projecções provenientes de várias áreas encefálicas dão origem a quatro vias axonais: a via nigroestriatal, a via mesolímbica, a via mesocortical e a via tuberoinfundibular (Lopes *et al.*, 2003; Vallone *et al.*, 2000).

A via nigroestriatal (Figura 6) engloba neurónios localizados na SN_{pc} que se projectam para o estriado; está relacionada com o controlo dos movimentos e a sua disfunção provoca a DP, caracterizada por tremores, rigidez, instabilidade postural e bradicinesia (Vallone *et al.*, 2000).

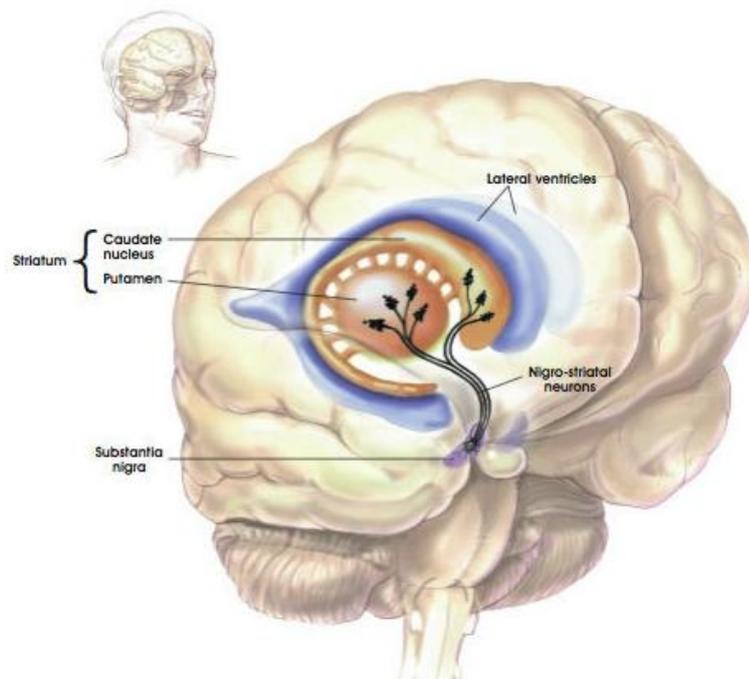


Figura 6 – Representação da via nigroestriatal. Projecção dos neurónios da substância negra para o estriado (núcleo caudado e putmen) (adaptado de *Biotechnology Industry Organization*).

Os neurónios que constituam as vias mesolímbica e mesocortical têm os seus corpos celulares na área tegmentar ventral (ATV), projectando-os para estruturas do sistema límbico e do córtex frontal, respectivamente. Enquanto a via mesolímbica parece estar envolvida no comportamento autónomo, a via mesocortical parece influenciar a aprendizagem e a memória.

Na via tuberoinfundibular, os neurónios dopaminérgicos são projectados do hipotálamo para a eminência mediana e para a hipófise, cujas secreções são por eles reguladas. Detectou-se a co-localização com vários neuropeptídeos e com o neurotransmissor GABA. A actividade dopaminérgica hipotalâmica esteja relacionada com a regulação neuroendócrina (Vallone *et al.*, 2000).

3. Neurotransmissão Serotoninérgica

3.1. Serotonina

A serotonina (5-HT) é uma molécula que exibe uma identidade funcional central e periférica (Figura 7) (Warden *et al.*, 2010).

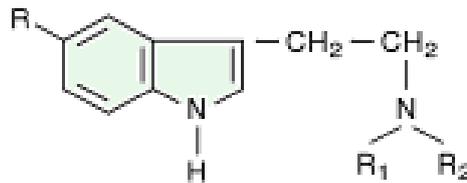


Figura 7 – Estrutura química da Serotonina.

Estudos recentes da patologia da DP mostram, no estriado, uma depleção dos níveis de 5-HT de cerca de 66% e de DA de cerca de 98% (Fox *et al.*, 2009). Outros estudos mostram que a redução dos níveis de serotonina pode ser considerada como um mecanismo compensatório da diminuição dos níveis de dopamina na DP (Silberman *et al.*, 2004).

A 5-HT apresenta um papel importante na regulação do humor; pensa-se, os seus subtipos de receptores estão fortemente envolvidos nas acções de antidepressivos e antipsicóticos (Visser *et al.*, 2011).

3.2. Biosíntese da Serotonina

A síntese da 5-HT (Figura 8) realiza-se nos neurónios, especialmente nos terminais serotoninérgicos, ocorrendo em duas etapas enzimáticas: o primeiro passo relaciona-se com a conversão da molécula precursora, o aminoácido triptofano (Trp), em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela enzima triptofano hidroxilase. A segunda etapa prende-se com a produção de 5-HT, envolvendo a enzima descarboxilase dos aminoácidos aromáticos (AADC), em que a L-Dopa e o 5-HTP actuam como

substratos. A 5-HT pode ser, eventualmente, degradada, formando o seu principal metabolito, o ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), pela MAO e pelo aldeído desidrogenase (Visser *et al.*, 2011; Warden *et al.*, 2010).

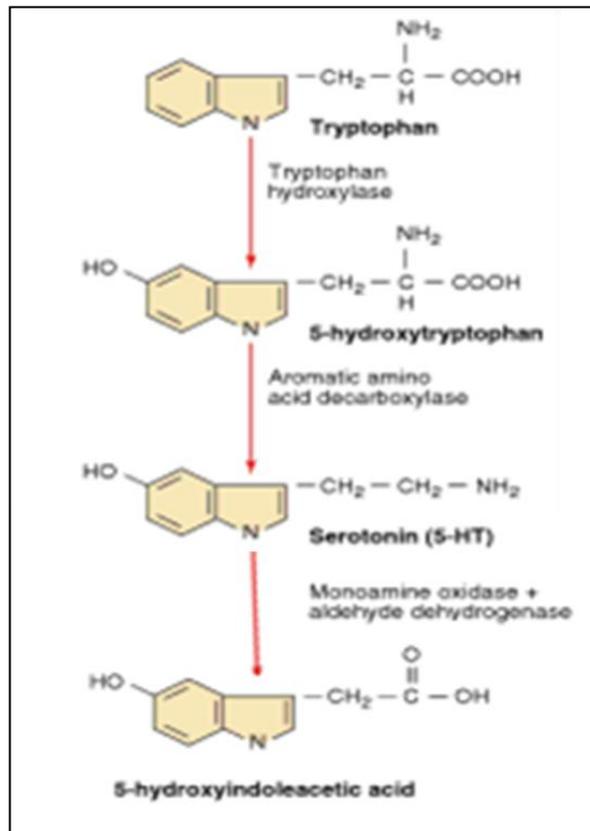


Figura 8 - Biosíntese e catabolismo da serotonina

(adaptado de Siegel *et al.*, 1999).

Depois da sua síntese, a 5-HT é transportada pelos transportadores de monoaminas vesiculares (VMAT) e armazenada, em vesículas, nos terminais dos neurónios pré-sinápticos. Perante um estímulo, estas vesículas difundem-se para a membrana sináptica, ocorrendo a libertação da 5-HT na fenda sináptica. A 5-HT pode ligar-se a uma variedade de receptores, tais como receptores pré- e pós-sinápticos ou pode, ainda, ser transportada pelo transportador serotoninérgico de recaptação (SERT ou 5-HTT) (Figura 9).

Existem pelo menos 15 receptores distintos de 5-HT, divididos em sete famílias distintas [5-HT₁ (1-7)] e localizados em várias regiões cerebrais, sendo que,

provavelmente, regulam funções comportamentais, fisiológicas e cognitivas (Visser *et al.*, 2011; Warden *et al.*, 2010).

As ligações pós-sinápticas ao receptor podem ser inibitórias ou excitatórias, dependendo do subtipo de receptor que é estimulado. Os receptores pré-sinápticos (5-TH_{1A}, localizado na região somatodendrítica, e 5-TH_{1B}, encontrado nos terminais) são autoreceptores que inibem a neurotransmissão serotoninérgica. No entanto, os heteroreceptores de 5-HT influenciam a liberação de outros neurotransmissores.

Outras evidências sugerem que a liberação da DA no estriado é regulada pela 5-HT e que a simulação do receptor 5-HT_{1A} inibe a liberação da DA e interfere a enzima tirosina hidroxilase (TH).

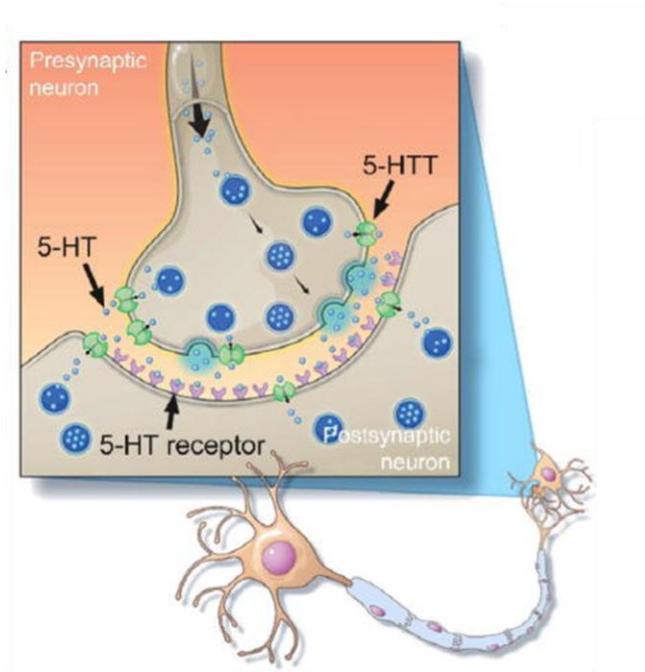


Figura 9 – Liberação da 5-hidroxitriptina no SNC (adaptado de Warden *et al.*, 2010).

Nas doenças neurodegenerativas, as alterações dos níveis de 5-HT estão relacionadas com alterações neuropsiquiátricas, designadamente alterações do sono, depressão e ansiedade. Na DP, as alterações do metabolismo da 5-HT podem estar ligadas a sintomas motores da doença (Falsone *et al.*, 2011)

O sistema serotoninérgico é um dos mais extensamente distribuído, permitindo a enervação de praticamente todas as regiões do sistema nervoso central. Este sistema participa em funções fisiológicas, como é o caso do sono, da excitação, da alimentação e da saciedade, bem como em actividades mais complexas, das quais se destacam o humor e a emoção. Esta diversidade de funções manifesta-se pelo grande número e pela extensa distribuição dos receptores 5-HT (Fox *et al.*, 2009).

4. Modelos animais da DP

Os modelos experimentais da DP tentam reproduzir artificialmente, no animal, a degeneração dopaminérgica nigroestriatal observada na DP, simulando as alterações patológicas, histológicas e bioquímicas da doença, assim como os distúrbios funcionais. Estes modelos têm como objectivos não só ajudar na compreensão dos mecanismos que favorecem a instalação do processo degenerativo, mas também desenvolver estratégias terapêuticas. Servem, igualmente, de suporte para melhor compreender a anatomia e a funcionalidade das estruturas cerebrais.

A DP é exclusivamente humana, não se manifestando espontaneamente em animais, pelo que é uma patologia observada, em animais, apenas por recurso à administração de agentes neurotóxicos (Dauer e Przedborski, 2003). Assim sendo, têm sido desenvolvidos vários modelos animais, tendo em vista o estudo do mecanismo e da intervenção terapêutica na DP, dos quais se distinguem o MPTP, a 6-hidroxidopamina, o *paraquat* e a rotenona (Przedborski *et al.*, 2001; Meredith *et al.*, 2008; Newhouse *et al.*, 2004; Dauer *et al.*, 2003).

4.1. Modelo do MPTP

O modelo do MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) é relativamente recente e deve a sua existência à descoberta fortuita do MPTP, um produto da síntese química de um análogo da meperidina, com efeitos semelhantes aos da heroína (Przedborski *et al.*, 2001).

Em humanos e primatas não humanos, o MPTP pode induzir uma síndrome parkinsoniana quase indistinguível da DP, exercendo efeitos sobre os neurónios dopaminérgicos nigroestriatais, tanto do ponto de vista clínico como neuropatológico. Acredita-se que na DP os processos neurodegenerativos ocorrem ao longo de vários anos, ao passo que após a administração de MPTP a fase neurodegenerativa mais activa é concluída em poucos dias (Przedborski *et al.*, 2001).

O MPTP produz morte dos neurónios dopaminérgicos da SNpc, com consequente redução dos níveis de DA no estriado (Meredith *et al.*, 2008), embora raramente ocasione a formação de CL.

De forma a corroborar o supracitado, torna-se, igualmente, relevante referenciar que, em humanos e primatas não humanos, o MPTP replica quase todas as características da DP, incluindo tremor, lentidão, rigidez de movimentos, e instabilidade postural (Przedborski *et al.*, 2001).

Por outro lado, o MPTP constitui a base do estudo da DP relacionada com factores não genéticos (Abe *et al.*, 2005).

A descoberta deste composto foi fundamental para a compreensão dos mecanismos que conduzem à neurodegeneração dopaminérgica (Przedborski *et al.*, 2001). Assim, depois de uma administração sistémica de MPTP (molécula altamente lipofílica), este atravessa, facilmente, a barreira hemato-encefálica (BHE) (Figura 10).

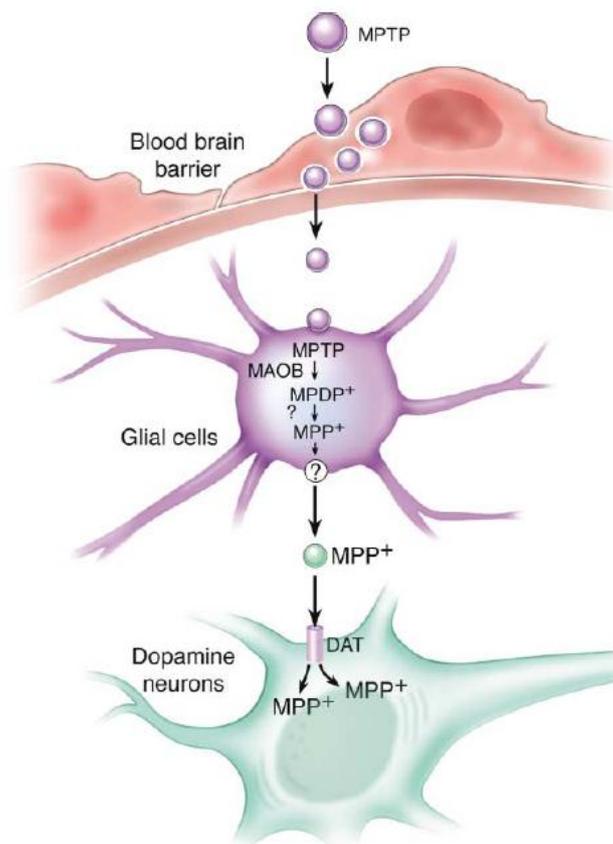


Figura 10 - Apresentação esquemática do mecanismo de acção do MPTP (adaptado de Dauer e Przedborski, 2003).

Uma vez no encéfalo, é, rapidamente, convertido em 1-metil-4-fenilpiridinina (MPP^+), o metabólito activo e tóxico do MPTP (Figura 11). A transformação do MPTP para MPP^+ é um processo bifásico. Primeiramente, o MPTP sofre a acção da MAO-B, originando o 1-metil-2-fenil-2,3-dihidropiridina ($MPDP^+$). Esta conversão ocorre, especificamente, na glia e nas células serotoninérgicas e não em neurónios dopaminérgicos. Uma vez formado, o MPP^+ é libertado, por um mecanismo desconhecido, para o espaço extracelular, a fim de entrar nos neurónios dopaminérgicos (Przedborski *et al.*, 2001). Numa segunda fase, o MPP^+ entra nos neurónios dopaminérgicos, através dos transportadores de DA (DAT) localizados na membrana plasmática dos axónios e dos terminais (Hersch *et al.*, 1997), com os quais tem alta afinidade.

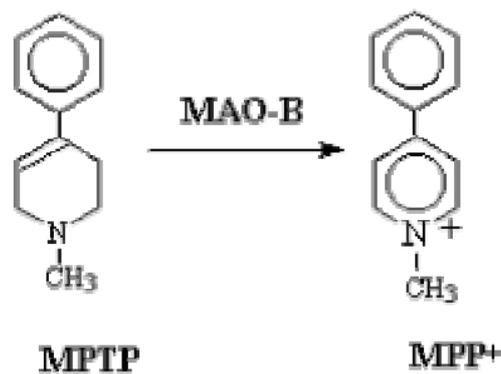


Figura 11 – Estrutura química do MPTP e do seu metabólito, formado por acção da MAO-B.

Uma vez dentro daqueles neurónios (Figura 12), o MPP^+ acumula-se, rapidamente, na matriz mitocondrial e expulsa a DA das vesículas, havendo uma acumulação de DA no citosol. O excesso de DA citosólica pode sofrer acção enzimática, presente nos neurónios dopaminérgicos, e gerar a formação de DA-quinona (molécula que danifica proteínas reagindo com resíduos de cisteína) (Dauer e Przedborski, 2003). Ora, esse acréscimo de DA no citosol neuronal pode aumentar a formação de neuromelanina, implicando um importante incremento da morte neuronal. Sabe-se que o MPP^+ intramitocondrial inibe a fosforilação oxidativa e está concentrado nos neurónios monoaminérgicos, produzindo alterações bioquímicas nestas células, embora a degeneração seja mais acentuada nos neurónios dopaminérgicos. Logo, nos

neurónios dopaminérgicos o MPP^+ interfere com o complexo I da cadeia respiratória, um componente do metabolismo mitocondrial, levando à morte celular e provocando a acumulação de radicais livres (Fujita *et al.*, 2009).

Por outro lado, o MPP^+ pode ligar-se ao transportador de monoaminas vesicular (VMAT), conduzindo o metabolito para o interior das vesículas sinaptossomais, ou pode, ainda, permanecer no citosol, interagindo com enzimas citosólicas. O sequestro vesicular de MPP^+ parece proteger as células da neurodegeneração induzida pelo MPTP e impedi-lo de aceder à mitocôndria, o local de acção mais provável (Dauer e Przedborski, 2003).

Além disso, a intoxicação por MPTP pode ser associada à diminuição da expressão da TH (enzima limitante da síntese de dopamina) nos neurónios dopaminérgicos da SN. O MPTP conduz a uma falha de energia e, posteriormente, à inibição da expressão da proteína. A redução da expressão da TH é considerada um bom marcador de perda de células dopaminérgicas (Liu *et al.*, 2004).

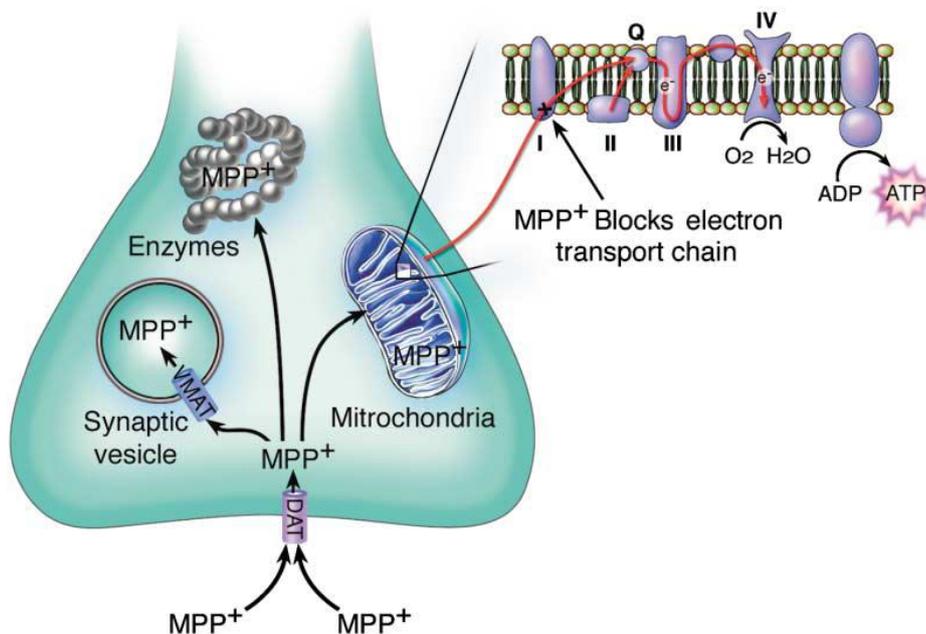


Figura 12 – Representação esquemática da via intracelular do MPP^+ (adaptado de Dauer e Przedborski, 2003).

Relativamente à administração do MPTP, esta pode ser feita de vários modos, utilizando diferentes regimes de dosagem. Foram, então, desenvolvidos vários modelos experimentais, de modo a caracterizar vários parâmetros ao nível dos comportamentos animal e bioquímico (Przedborski *et al.*, 2001). A maneira como estes modelos foram desenvolvidos baseia-se na noção de administração de MPTP, de forma a produzir danos bastante severos e estáveis na SNpc, mas com um mínimo de consequências indesejáveis, como sejam a morte, a desidratação ou a malnutrição (Przedborski *et al.*, 2001). Embora o MPTP possa ser injectado por diferentes vias, incluindo a via oral por gavagem e intracerebroventricular por estereotaxia, a administração sistémica (via subcutânea, intravenosa, intraperitoneal ou intramuscular) provou ser a via mais consensual para provocar uma lesão mais confiável e reproduzível (Przedborski *et al.*, 2001). No entanto, por vezes, injeções frequentes e de grandes doses são necessárias para produzir depleção significativa de DA em murganhos, o que está associado a uma taxa de mortalidade elevada, dado que produz morte celular em larga escala (Meredith *et al.*, 2008).

Relativamente à administração aguda (4x 20mg/kg, de duas em duas horas), usada neste estudo, esta pode induzir uma redução de cerca de 70% dos neurónios dopaminérgicos nigrais e de cerca de 90% de terminais nervosos, após 7 dias de administração. Após a administração do MPTP, os animais começam a morrer, nas primeiras 24h, devido a efeitos cardiovasculares e não devido a depleção dopaminérgica. Os murganhos injectados permanecem imobilizados, nas primeiras 24 horas, sendo que o nível de MPP⁺ aumenta e atinge um pico 3 horas após a última administração de MPTP (Fujita *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2009).

Espécies como os roedores e os macacos são susceptíveis à administração de MPTP. No entanto, o murganho tem sido a espécie mais utilizada, tanto por razões técnicas como financeiras. Porém, várias desvantagens precisam ser realçadas, na sua utilização: primeiro, os murganhos são pouco sensíveis ao MPTP (assim, são necessárias doses muito maiores para produzir danos significantes na SNpc, o que acaba por acarretar uma situação muito mais perigosa para o investigador); em segundo lugar, os murganhos tratados com MPTP não desenvolvem parkinsonismo. Por fim, a magnitude dos danos nigroestriatais depende da dose e da frequência da administração (Przedborski *et al.*, 2001).

Vários factores influenciam a reprodutibilidade da lesão em macacos, ratos e murganhos. O sexo, a idade e o peso corporal também são factores que modulam a sensibilidade do MPTP, bem como a reprodutibilidade da lesão. Sabe-se que os murganhos de sexo feminino são menos sensíveis e apresentam maior variabilidade na extensão dos danos do que os machos, o que acontece, invariavelmente, com murganhos de idade inferior a 8 semanas e com peso inferior a 25 g. Uma óptima reprodutibilidade na neurotoxicidade induzida pelo MPTP é obtida utilizando murganhos C57BL/6 jovens-adultos, de sexo masculino. Foi precisamente por estas razões mencionadas que se recorreu à utilização desta espécie neste estudo.

É importante referir que alguns murganhos morrem durante as 48h após a injeção do MPTP. Também são conhecidas as diferentes magnitudes de mortalidade aguda, variando de 5% para 90%, em função da proveniência dos animais de múltiplos fornecedores.

Por outro lado, o problema não estará relacionado com o efeito tóxico no sistema nervoso central e periférico, mas, antes, com o efeito no sistema cardiovascular. Embora esta possibilidade nunca tenha sido, formalmente, estudada, acredita-se que, após a administração aguda de MPTP, os murganhos desenvolvam alterações fatais, no que ao ritmo cardíaco e à pressão sanguínea diz respeito. Além disso, a intoxicação pelo MPTP provoca, igualmente, uma queda transitória da temperatura corporal, que não só pode modular a extensão da lesão dopaminérgica como também pode contribuir para a taxa de mortalidade. Esta taxa pode, pois, ser reduzida mantendo-se a temperatura corporal dos animais administrados (Przedborski *et al.*, 2001). Os murganhos injectados ainda podem sofrer uma redução do peso corporal (Ferro *et al.*, 2005).

Em termos de testes comportamentais, os diferentes protocolos de administração de MPTP têm sido decepcionantes. O teste do *rotarod* tem sido largamente utilizado, mas só é eficaz se for efectuado imediatamente após o tratamento, quando os animais ainda estão intoxicados pelo MPTP. Os murganhos testados mais tarde mostram, por vezes, hiperactividade e sem deficit no teste do *rotarod*. No entanto, existem testes mais sensíveis, tal como o *pole test*, que é capaz de ser sensível à depleção de DA. Infelizmente, a actividade locomotora não se encontra totalmente correlacionada com o

grau de perda neuronal de DA, com os níveis DA estriatais ou com a dose de MPTP usada (Meredith *et al.*, 2008).

4.2. Modelo da 6-OHDA

A neurotoxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) (Figura 13) é, estruturalmente, semelhante à DA e a noradrenalina, apresentando alta afinidade para os transportadores da membrana plasmática para estas catecolaminas (Meredith *et al.*, 2009).

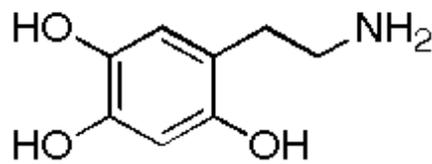


Figura 13 – Estrutura química da 6-hidroxi-dopamina.

A 6-OHDA, considerado o primeiro modelo animal da DP associada à morte neuronal dopaminérgica na *SNpc*, foi introduzida há mais de 30 anos. Apesar da patologia induzida pela 6-OHDA diferir da patologia da DP, ainda é bastante utilizada. A toxicidade induzida pela toxina, resultante da captação pelos transportadores de DA e de noradrenalina, é, relativamente, selectiva para os neurónios monoaminérgicos. Esta neurotoxina é, facilmente, oxidada e autodesaminada pela MAO (Fujita *et al.*, 2011), aumentando a produção de peróxido de hidrogénio (H_2O_2).

Na DP, existe, entre os grupos de neurónios dopaminérgicos no mesencéfalo ventral, uma gama de sensibilidade relativa à 6-OHDA: observa-se maior perda na *SNcp*, enquanto os neurónios tuberoinfundifulares apresentam grande resistência. Dentro dos neurónios, a 6-OHDA acumula-se no citosol, produzindo espécies reactivas de oxigénio (ROS) e a inactivação de macromoléculas biológicas, pela formação de quinonas e pelo ataque de grupos nucleofílicos. Uma vez que a 6-OHDA não apresenta capacidade para atravessar a BHE, esta neurotoxina deve ser administrada

por injeção estereotáxica local, na SN ou no estriado, a fim de atingir a via dopaminérgica (Meredith *et al.*, 2009; Fujita *et al.*, 2011; Dauer *et al.*, 2003).

Esta neurotoxina pode ser gerada dentro do cérebro pela reacção não enzimática da dopamina, do e do ferro livre. Os danos oxidativos, através da via do H₂O₂ e de derivados do radical hidroxilo (\bullet OH), estão associados aos mecanismos neurotóxicos induzidos pela 6-OHDA. (Fujita *et al.*, 2011).

Após a injeção da 6-OHDA na SN, a degeneração dos neurónios dopaminérgicos começa dentro de 24 horas, ocorrendo sem morfologias apoptóticas. No entanto, quando a 6-OHDA é injectada no estriado produz uma degeneração retrógrada mais intensa nos neurónios nigroestriatais, que dura 1 a 3 semanas (Dauer *et al.*, 2003).

Porém, nenhum dos modos de intoxicação pela 6-OHDA levou à formação de inclusões, como os CL. Para lesões estriatais, com estereotaxia, a 6-OHDA é injectada unilateralmente, utilizando o lado contralateral como controlo. Estas injeções produzem, nos animais, um comportamento assimétrico cuja magnitude depende do grau da lesão nigroestriatal. A lesão unilateral pode ser quantitativamente analisada; assim, a capacidade de avaliar as propriedades anti-parkinsonistas de novas drogas e os benefícios de terapias de transplante ou encontrar terapias génicas para reparar vias danificadas, apresentam-se como notáveis vantagens deste modelo. No entanto, não é clara a relação entre o mecanismo induzido pela 6-OHDA e a eliminação de neurónios dopaminérgicos (Dauer *et al.*, 2003).

4.3. Modelo do Paraquat

O herbicida *paraquat* (1-1-dimetil-4-4-bipiridinina) constitui um modelo neurotóxico da DP. O paraquat apresenta semelhança estrutural com o MPP⁺ (Figura 14).

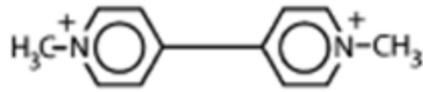


Figura 14 – Estrutura química do *paraquat*.

Este composto parece estar envolvido na patogénese da DP, tendo-se encontrado uma associação epidemiológica entre o seu uso na agricultura e a incidência da doença (Ossowska *et al.*, 2005). A exposição ao *paraquat* pode implicar um aumento do risco de DP: o *paraquat* atravessa, facilmente, a BHE (Dauer *et al.*, 2003), inibindo o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, levando à produção de ROS, principalmente H₂O₂ e radical •OH, e conduzindo a consequentes efeitos celulares deletérios (Meredith *et al.*, 2009). Esta toxicidade não só ocorre em tecidos periféricos, mas também no SNC (Ossowska *et al.*, 2005).

Esta toxicidade parece estar mediada pela formação de radicais superóxidos. A administração sistémica de *paraquat*, em murganhos, conduz à degeneração dos neurónios dopaminérgicos, na SNpc, bem como ao aumento de expressão e de agregação da α -sinucleína. Além disso, ainda não está comprovada a existência ou não de selectividade da toxicidade dopaminérgica (Dauer *et al.*, 2003; Meredith *et al.*, 2009).

O etilenobisditiocarbamato (manebe) é um fungicida que inibe o transporte de glutamato e que também dificulta a captação e a libertação de DA. É geralmente administrado concomitantemente com o *paraquat*, de modo a aumentar a toxicidade deste último. Em murganhos mais velhos, a combinação *paraquat*/manebe produz uma perda dopaminérgica mais progressiva. A perda de neurónios dopaminérgicos e as alterações motoras são encontradas tanto em murganhos jovens como em murganhos idosos, imitando os diferentes estadios clínicos da DP (Meredith *et al.*, 2009).

4.4. Modelo da Rotenona

Amplamente utilizado como insecticida e veneno para peixes, a rotenona (Figura 15) é o mais potente membro dos rotenóides, uma família de compostos citotóxicos naturais extraídos de plantas tropicais. É altamente lipofílico e tem rápido acesso a todos os órgãos (Dauer *et al.*, 2003).

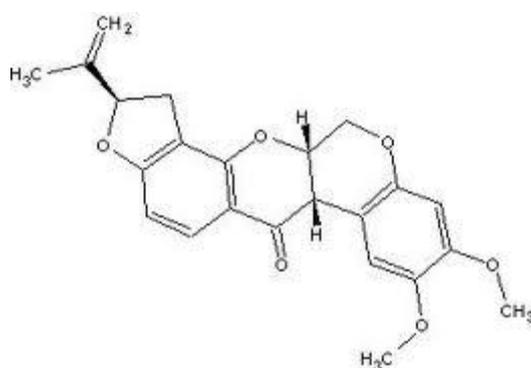


Figura 15 – Estrutura da rotenona.

A rotenona interfere com o complexo I da cadeia respiratória, levando à morte celular e provocando uma acumulação de radicais livres (Dauer e Przedborski, 2003).

Sabe-se que a exposição a pesticidas pode ser um factor de risco. A administração intravenosa de baixas doses de rotenona produz degeneração selectiva dos neurónios dopaminérgicos nigroestriatais, acompanhada pela presença de α -sinucleína positiva e CL. Acredita-se que os neurónios dopaminérgicos são, particularmente, sensíveis à inibição do complexo I, pois a rotenona é capaz de entrar livremente nas células. Animais intoxicados por esta neurotoxina desenvolvem postura anormal e diminuição de movimento (Dauer e Przedborski, 2003).

A falta de especificidade ao nível do sistema dopaminérgico e a baixa reprodutibilidade do modelo não fazem da rotenona uma boa ferramenta para o estudo experimental da DP (Ossowska *et al.*, 2005).

5. Possível estratégia farmacológica neuroprotectora para a DP: A Sitagliptina

5.1. A Sitagliptina

A sitagliptina (Figura 16) está indicada no tratamento de diabetes *mellitus* tipo 2. A diabetes *mellitus* ocorre quando o pâncreas não produz insulina em quantidade suficiente para controlar o nível de glicose no sangue ou, então, quando o organismo é incapaz de utilizar a insulina de forma eficaz (Dhillom, 2010).

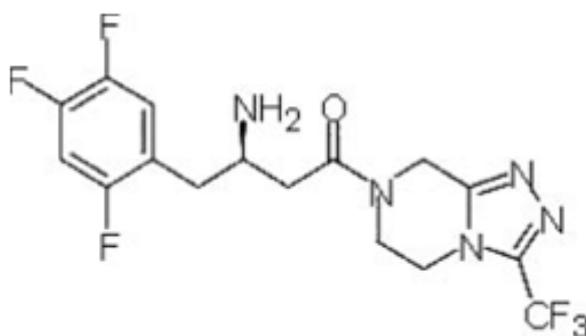


Figura 16 – Estrutura química da sitagliptina.

Uma das hormonas naturais responsáveis pela secreção de insulina é o GLP-1 (glucagon-like peptide-1). Esta é secretada pelas células L do intestino delgado e exerce vários efeitos como, por exemplo, estimulação da secreção de insulina pelas células β do pâncreas, a diminuição do apetite por acção no hipotálamo, a redução da secreção de glucagon pelas células α do pâncreas, a diminuição do esvaziamento gástrico. Foi demonstrado que a secreção de GLP-1 se apresenta diminuída nos diabéticos do tipo 2 em comparação com um sujeito saudável (Scheen., 2007). O GLP-1 é, rapidamente, metabolizado pela dipeptidilpeptidase-4 (DPP-4), tendo como desvantagem uma semi-vida curta (1-2 minutos), (Engel *et al.*, 2010). Assim, a administração deste fármaco inibidor da DPP-4 permite que o GLP-1, secretado fisiologicamente em resposta à refeição, seja degradado lentamente, podendo exercer o seu efeito de maneira mais marcada e mais prolongada. O aumento da insulino-secreção resultante permite um

melhor controlo da hiperglicemia, sendo este efeito fortalecido pela inibição da secreção de glucagon, conduzindo, deste modo, a uma diminuição de glicemia em jejum (Scheen e Van Gaal., 2010). No entanto, a sitagliptina apresenta os seguintes efeitos secundários como perturbações gastrointestinais, perda de peso, perda de apetite, dor abdominal, diarreia e sonolência.

5.2. Farmacocinética da sitagliptina

Após a administração oral de 100mg, em pessoas saudáveis, a sitagliptina é rapidamente absorvida, com um pico de concentração plasmática atingido entre 1h e 4h. A sua biodisponibilidade absoluta é de, aproximadamente, 87%. A eliminação deste composto dá-se, sobretudo, por excreção renal, principalmente por secreção tubular. A sitagliptina é um substrato para o sistema de transporte de aniões orgânicos humanos 3 (hOAT 3) e para a glicoproteína P, que pode, igualmente, estar implicada na sua eliminação renal, se bem que este efeito pareça menor. Depois de uma administração oral de 100mg, a semi-vida terminal da sitagliptina é de cerca de 12,4 horas, o que impõe uma única dose diária. A farmacocinética deste fármaco é, geralmente, similar em sujeitos saudáveis e em pacientes diabéticos do tipo 2. Nenhuma adaptação posológica é necessária em função do sexo, da idade e do índice de massa corporal (Scheen e Van Gaal, 2010).

5.3. Neuroprotecção dopaminérgica pela Sitagliptina

As actuais terapias da DP melhoram, significativamente, a qualidade de vida dos pacientes que sofrem desta doença neurodegenerativa. As referidas terapias são desenvolvidas, principalmente para o controlo sintomático da doença. As ferramentas clínicas disponíveis são limitadas no que concerne à capacidade de controlar a progressão da doença. Actualmente muito se sabe sobre a fisiopatologia da DP, e estas descobertas oferecem uma variedade de potenciais alvos para a terapia de protecção.

Alguns mecanismos envolvidos no processo da doença incluem o stresse oxidativo, a disfunção mitocondrial, a agregação de proteínas, a inflamação, a excitotoxicidade e a apoptose, constituindo alvos para a limitação na progressão da doença.

Yacoubian *et al.* definiram o termo “terapias neuroprotectoras” como aquelas que atrasam ou impedem a neurodegeneração dos neurónios envolvidos na DP, tanto em neurónios dopaminérgicos como não dopaminérgicos. A “neuroprotecção” não inclui as estratégias “neurorestaurativas”, que visam substituir elementos neuronais depois de perdidos. Hoje em dia, as descobertas de tratamentos neuroprotectores apresentam-se como um grande desafio na DP.

Actualmente, novas estratégias de protecção, em doenças neurodegenerativas, estão a ser desenvolvidas focando-se no péptido GLP-1, tanto pela estimulação directa através de administrações de análogos do GLP-1 (exenatide; ex-4) como por via indirecta, bloqueando a sua degradação com inibidores da DPP-4 (sitagliptina).

O GLP-1 também apresenta efeitos trópicos, incluindo a proliferação das células β pancreáticas, a neurogénesse, bem como a inibição da apoptose das células β . No entanto, a aplicação clínica do GLP-1 é limitada, devido à sua curta duração de acção, por causa da sua rápida degradação pela DPP-4. Esta enzima normalmente metaboliza em poucos minutos o GLP-1 em metabolitos inactivos, resultando uma semi-vida curta da hormona intacta (cerca de 2 minutos) e, como consequência, quantidades reduzidas de GLP-1 activas. Ao bloquear a actividade da enzima DPP-4, estabilizam-se os níveis da GLP-1 endógena (D’ Amico *et al.*, 2010).

Posto isto, este estudo baseou-se na análise e avaliação da sitagliptina, vista como uma possível estratégia de neuroprotecção na DP, primeiramente devido ao facto de este inibidor já ter sido estudado na doença de Alzheimer e terem-se encontrado resultados positivos na neuroprotecção desta doença. Assim sendo, D’Amico *et al.* mostraram que o tratamento, a longo prazo, com sitagliptina (20mg/kg), em murganhos transgénicos expressando a proteína precursora amilóide, apresenta efeitos benéficos na terapia associada a esta doença neurodegenerativa. O inibidor da DPP-4 tem capacidade de aumentar os níveis endógenos de GLP-1, bem como de reduzir os níveis do péptido amilóide (β A) e da sua proteína precursora (APP), tornando o GLP-1 interessante na

terapia de doenças neurodegenerativas. Os mesmos investigadores também demonstraram que a inibição da DPP-4, pela sitagliptina, está associada a redução de processos inflamatórios e de stresse oxidativo, em várias estruturas cerebrais. Isto corrobora várias evidências, de acordo com as quais o processo inflamatório, no SNC, se apresenta como um factor importante, conduzindo à morte celular, bem como ao aumento de citocinas pró-inflamatórias (como a interleucina-1 e 6) (D' Amico *et al.*, 2010).

Além disso, outros autores relataram que a estimulação dos receptores do GLP-1 (GLP-1r), pela administração de exenatide-4 (ex-4), preserva os neurónios dopaminérgicos, resguardando os níveis de DA, do mesmo modo que melhora a função motora num modelo agudo de MPTP (4x 20mg/kg) (Kim *et al.*, 2009).

Os GLP-1r encontram-se, mormente, no hipotálamo, no tálamo, no tronco cerebral, no estriado, no córtex, no hipocampo, no cerebelo. O GLP-1, tal como os seus análogos, ligam-se aos GLP-1r, activando a subunidade $G_{\alpha s}$, induzindo a activação da adenilciclase e provocando, por consequência, um aumento da produção de cAMP (adenosina monofosfato cíclica) intracelular. Vários estudos demonstraram que as vias mediadas pelo cAMP são fundamentais para as acções anti-apoptóticas do GLP-1 nas células β , e para os efeitos neuroprotectores. Outras vias, como a via PI3K e a MAPK, também estão envolvidas nos efeitos neuroprotectores mediados pelo GLP-1, em células neuronais. Estes resultados sugerem que a estimulação, no SNC, dos receptores do GLP-1 desempenha um papel importante na regulação da plasticidade neuronal e na sobrevivência celular. Sabe-se que a ex-4 pode atravessar a BHE e exercer efeitos centrais, incluindo acções neurotrópicas ou neuroprotectoras, assim como melhorias das funções cognitivas. A ex-4 previne, também, a activação da microglia, induzida pelo MPTP, na SNpc e no estriado, e a expressão da metaloproteinase-3. Além disso, a ex-4 tem a capacidade de induzir uma redução da expressão de moléculas pró-inflamatórias, de factores α de necrose tumoral (TNF- α) e da interleucina-1 β , induzidas pela MPTP. Assim, Kim *et al.* indicaram que a ex-4 age como um agente da sobrevivência dos neurónios dopaminérgicos, por funcionar como um factor de desactivação da microglia, e sugerem que o análogo do GLP-1 pode ser um agente terapêutico valioso para doenças neurodegenerativas, como a DP (Kim *et al.*, 2009).

A sitagliptina foi escolhida como possível estratégia de neuroprotecção, na DP, graças à sua capacidade de inibir a DPP-4, de modo a aumentar os níveis de GLP-1 endógenos e diminuir os processos de inflamação e de stresse oxidativo em várias estruturas cerebrais, como foi relatado no estudo de D' Amico *et al.* Por outro lado, outro estudo permitiu direccionar a sitagliptina como uma nova terapia para a DP, uma vez que a ligação da ex-4 aos GLP-1r preserva as células dopaminérgicas, como os níveis de DA, estando as vias mediadas pelo cAMP envolvidas nos efeitos neuroprotectores contra a DP. Desta forma, o cruzamento dos dados destes dois estudos permitiu pensar a sitagliptina como uma nova oportunidade terapêutica na DP (Kim *et al.*, 2009).

OBJECTIVOS

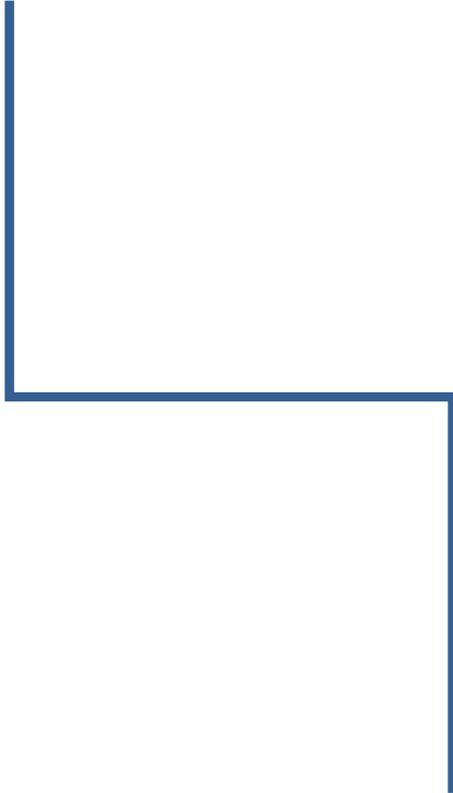
Este estudo pretendeu apurar um possível efeito neuroprotector sobre o sistema dopaminérgico nigroestriatal com o tratamento agudo e sub-crónico com sitagliptina (um inibidor selectivo da DPP-4), recorrendo-se, para o efeito, a um modelo da doença de Parkinson induzido com a administração aguda de MPTP, em murganhos C57BL/6.

No sentido de alcançar tal objectivo, foram efectuadas diferentes tarefas, especificamente:

- ✓ Avaliação da coordenação motora e do equilíbrio dos murganhos C57BL/6, associada aos efeitos produzidos pelo MPTP, através de um teste comportamental, o *Rotarod*.
- ✓ Averiguação da neurotoxicidade através da determinação da expressão da tirosina hidroxilase (TH; marcador da perda de neurónios dopaminérgicos) e da expressão de GFAP (marcador de astrócitos), por recurso ao método de “*Western Blotting*”.
- ✓ Determinação dos níveis da dopamina e da serotonina, bem como dos seus respectivos metabolitos, usando a técnica de HPLC (*high performance liquid chromatography*) com detecção electroquímica.

Tendo em conta o supracitado, este estudo tem como principal finalidade delinear uma estratégia de neuroprotecção contra a DP usando a sitagliptina.

CAPÍTULO II:



MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Neste estudo, foram utilizados 50 murganhos machos C57BL/6 (24-25g; 12 semanas; Charles-River, Barcelona, Espanha), divididos em 10 gaiolas e mantidos em condições ambientais controladas, no biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (Temperatura, 22 ± 1 °C; Humidade, $50 \pm 10\%$; Ciclo de luz, (12/12 horas). A ração e a água foram fornecidas *ad libitum*. Esta estirpe foi escolhida pelo facto de ser muito sensível ao MPTP (Meredith *et al.* 2009). Para além disso, foram utilizados animais jovens-adultos visto que a taxa de mortalidade no modelo do MPTP aumenta com o envelhecimento (Przedborski *et al.*, 2001). Todos os procedimentos experimentais obedeceram às regras impostas pelas Normas Técnicas de Protecção dos Animais Utilizados para Fins Experimentais e Outros Fins Científicos (Portaria nº 129/92 de 6 de Julho), bem como às normas da Convenção Europeia do Bem-estar Animal (Portaria nº 1005/92).

2. Fármacos utilizados

Neste trabalho utilizaram-se os seguintes fármacos: o **MPTP** (Sigma - Aldrich) e a **Sitagliptina** (SITA; Januvia® - MSD).

Note-se que, devido à alta neurotoxicidade do MPTP, foi necessário adoptar algumas regras de segurança recomendadas por Przedborski *et al.* (2001) no manuseamento do MPTP: Em primeiro lugar, foi colocado um aviso de alerta, advertindo para a manipulação e perigo da neurotoxina em todas as áreas expostas ao tóxico. Os investigadores utilizaram material de protecção adequado, especificamente bata impermeável com punhos elásticos, máscara e dois pares de luvas de látex. Estas condições de protecção foram mantidas durante o período de alto risco que corresponde aos cinco primeiros dias após a administração desta toxina.

O MPTP (2 mg/ml em solução salina) foi reconstituído directamente no frasco de origem e alíquotado (2 ml) numa câmara de fluxo, anulando-se, desta forma, os

riscos de inalação do pó. As alíquotas armazenadas a -80°C são estáveis durante 2 meses (Przedborski *et al.*, 2001). Por fim, todo o material que esteve em contacto com o MPTP foi tratado com lixívia 1%. Todas as administrações de MPTP foram realizadas sob um sistema de extracção de fumos. Foi ainda colocado por baixo dos murganhos um campo absorvente no momento de administração desta toxina para reter as fezes e a urina contaminadas.

A sitagliptina foi preparada dissolvendo um comprimido com a dosagem de 100 mg em solução salina [50 ml (administração crónica) ou 100 ml (administração aguda)], utilizando um *vórtex* e um pulso de ultra-sons.

3. Desenho experimental

Os murganhos foram administrados 4 vezes com MPTP (20mg/kg; i.p.) em intervalos de duas horas, tendo sido sacrificados ao sétimo (Kim *et al.*, 2009). O grupo controlo foi administrado com NaCl 0,9% (4x; i.p.).

A SITA foi administrada de forma aguda (1) e sub-crónica (2) como estratégia neuroprotectora e neuroprotectora e/ou curativa, respectivamente.

- 1) Administração aguda de sitagliptina** – A sitagliptina (10mg/kg; i.p.) foi injectada 30 minutos antes de cada administração de solução salina ou de MPTP. Esta estratégia pretende mimetizar aquela seguida por Kim *et al.* (2009) que utilizou um análogo da GLP-1 (exenatide). A escolha da dose de sitagliptina (10mg/kg) foi baseada na dose utilizada por D' Amico *et al.* (2010), uma vez que foi encontrado resultados positivos na neuroprotecção da doença de Alzheimer.

Os animais foram organizados de acordo com os seguintes grupos:

- ✓ Grupo **Controlo** (n=5): administrados com solução salina (SAL; NaCl 0,9%, i.p.);
- ✓ Grupo **MPTP** (n=8): administrados com MPTP (4x 20 mg/kg de duas em duas horas, i. p.);
- ✓ Grupo **Sitagliptina** (n=5): administrados com sitagliptina (SITA, Januvia®; 4x 10 mg/kg, i.p.);
- ✓ Grupo **Sitagliptina+MPTP** (n=7): administrados com sitagliptina (4x 10 mg/kg) e MPTP (4x 20 mg/kg, i.p).

2) Administração sub-crónica de sitagliptina – A sitagliptina (20mg/Kg; i.p) foi administrada durante 9 dias; o início do tratamento com este fármaco foi no dia anterior ao da injeção de MPTP ou de solução salina.

Os animais foram organizados de acordo com os seguintes grupos:

- ✓ **Grupo Controlo** (n=5): administrados com solução salina (SAL; NaCl 0,9%);
- ✓ **Grupo MPTP** (n=8): administrados com MPTP (4x 20 mg/kg, de duas em duas horas; i. p.);
- ✓ **Grupo Sitagliptina** (n=6): administrados com sitagliptina (SITA; Januvia®; 20 mg/kg; uma vez por dia, durante 9 dias consecutivos; i.p.);
- ✓ **Grupo Sitagliptina+MPTP** (n=7): administrados com sitagliptina (SITA; 20 mg/kg; uma vez por dia) durante 9 dias consecutivos, com início um dia antes da administração do MPTP (4x 20 mg/kg, de duas em duas horas; i.p.).

4. Teste de actividade locomotora - “Rotarod”

Utilizou-se o teste do *rotarod* (Modelo LE 8200, *Letica Scientific Instruments*, Barcelona, Espanha) para a avaliação do equilíbrio e da coordenação motora dos murganhos.

Neste teste, os animais são colocados em equilíbrio num cilindro giratório (velocidade constante ou crescente), com um diâmetro de cerca 3 centímetros e 15 centímetros de altura. Este cilindro está dividido em 5 pistas com 3 centímetros, permitindo a avaliação simultânea de 5 murganhos. Do murganho pretende-se que caminhe continuamente sobre o cilindro em rotação, de modo a evitar a queda (Figura 17).

Este teste comportamental foi efectuado em duas fases: fase de treino e fase de avaliação.

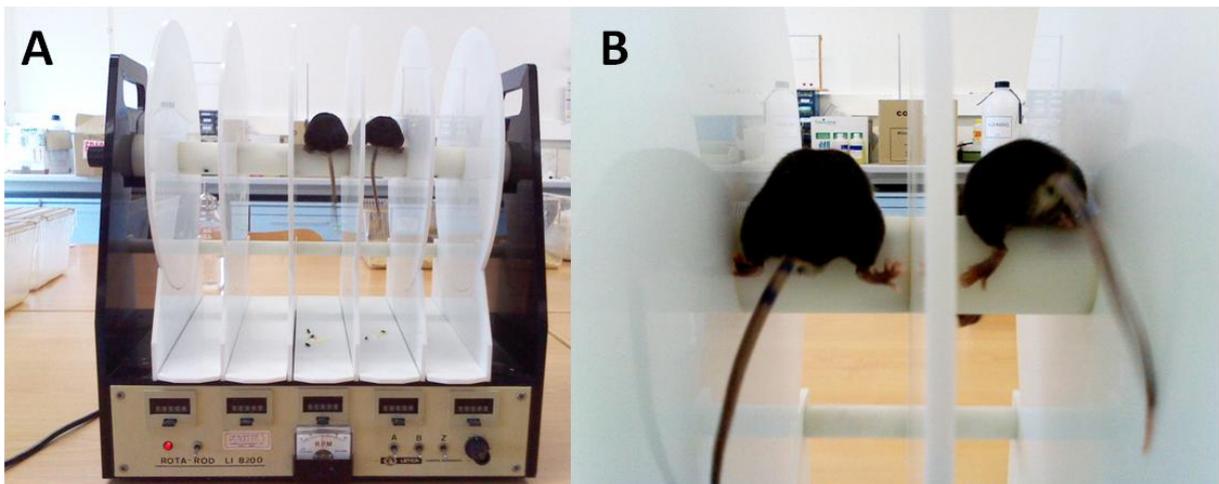


Figura 17 – (A) Avaliação do equilíbrio e da coordenação motora de dois murganhos *num RotaRod* de 5 pistas (B) Detalhe da separação entre dois murganhos em duas pistas diferentes (Fotografias obtidas no Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra).

A fase de treino realizou-se nos 3 dias anteriores ao tratamento dos animais com os fármacos em estudo, tendo os animais sido submetidos a um treino diário. Os animais foram transferidos para a sala onde se realizam os testes comportamentais (luz de baixa intensidade e ausência de ruído) 15 minutos antes do início do treino. Os animais foram de seguida colocados no eixo rotativo durante 200 segundos. A velocidade de rotação aumentou progressivamente de 10 a 22 rpm.

Os animais foram submetidos a uma avaliação ao terceiro (administração sub-crónica de sitagliptina) e sétimo dia (administração aguda de sitagliptina) após a injeção dos fármacos, tendo sido efectuados dois ensaios por murganho. Os murganhos

foram transferidos para a sala de teste comportamental 15 minutos antes do início do teste. Os animais foram de seguida colocados no eixo rotativo durante 300 segundos. A velocidade de rotação aumentou progressivamente de 10 a 22 rpm. As quedas e o tempo de permanência dos murganhos no cilindro rotativo foram registados: após a primeira queda, houve um intervalo de 5 segundos antes de o murganho voltar a ser reposicionado no cilindro giratório. Aumentou-se o intervalo de espera em 5 segundos após cada queda subsequente.

5. Sacrifício dos animais e isolamento do estriado

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e decapitados no sétimo dia, após a injeção do tóxico. Procedeu-se ao isolamento do estriado dos hemisférios esquerdo (expressão de GFAP e de TH por *Western Blotting*) e direito (doseamento das monoaminas, pelo método de HPLC). As amostras biológicas foram armazenadas a -80 °C.

6. Determinação dos níveis de monoaminas e dos seus metabolitos por HPLC

Para a quantificação dos níveis de dopamina (DA) e de serotonina (5-HT), bem como dos respectivos metabolitos (DOPAC e HVA, e 5-HIAA), utilizou-se um método de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) de fase reversa com detecção electroquímica (amperométrica) (Morgadinho *et al.*, 2004). O equipamento utilizado incluiu uma bomba Gilson (modelo 307), um auto-injector Gilson (modelo 234; *loop* 50 µl), um detector Gilson (modelo 142) e software UniPoint v5.11 (figura 18).



Figura 18 – Sistema de HPLC utilizado neste estudo para a quantificação de monoaminas (Fotografia tirada no Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra).

Sacrificados os animais e consumada a colheita da região cerebral, em estudo, as amostras cerebrais foram descongeladas, pesadas e homogeneizadas em ácido perclórico 0,1 M. Os foram centrifugados e filtrados e as amostras foram mantidas a 4 ° C até à análise pelo método de HPLC.

As amostras foram homogeneizadas em ácido perclórico 0,2 M. Os homogeneizados foram centrifugados (13.000 rpm durante 7 minutos, 4 °C) e filtrados com microfiltros 0,22 µm Nylon (Spin-X® Centrifuge Tube Filter, Costar) a 10.000 rpm, durante 10 minutos (4°C). Os pellets foram ressuspensos em NaOH 1 M e utilizados para a quantificação da proteína. Os sobrenadantes e os pellets foram armazenados a -80°C.

Para a separação e quantificação das diferentes monoaminas utilizou-se uma coluna ODS 2 Waters Spherisorb® (4.6 x 250 mm; tamanho das partícula: 5 µm). A fase móvel, desgaseificada e filtrada, foi constituída por acetato de sódio trihidratado (0,1 M), ácido cítrico monohidratado (0,1M), octilsulfato de sódio (0,5 mM), EDTA (0,15 mM), dibutilamina (1 mM) e metanol (10 %) (pH 3,8). O fluxo foi de 1 ml/minuto

e a sensibilidade foi mantida a 2nA/V. Os tempos de retenção obtidos estão apresentados na tabela 1. A concentração das monoaminas em cada amostra foi calculada tendo como referência curvas padrão de cada monoamina. Os resultados foram apresentados em ng/mg de proteína.

Tabela 1: Tempos de retenção (minutos) obtidos a partir da elaboração das curvas padrão de cada monoamina.

| Monoaminas | Tempo de retenção (minutos) |
|------------|-----------------------------|
| DOPAC | 7,2 |
| 5-HIAA | 12,5 |
| HVA | 14,5 |
| DA | 23,2 |
| 5-HT | 61,8 |

7. Quantificação da expressão de TH e de GFAP por *Western Blotting*

A administração de MPTP, em murganhos de tipo C57BL/6, induz degenerescência dopaminérgica estriatal e um processo de astrogliose, determinado pela depleção de dopamina, pela diminuição da expressão de tirosina hidroxilase (TH), e por um aumento da expressão de GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*) no estriado (Sriram *et al.*, 2006).

A diminuição da expressão da tirosina hidroxilase, enzima limitante da síntese de DA, é considerada um bom marcador, para a perda de neurónios dopaminérgicos (Liu *et al.* 2004). O GFAP pertence à classe III das proteínas de filamentos intermediários (IF) e é usado como marcador específico da activação de astrócitos (Middeldorp *et al.*, 2009).

O estriado foi homogeneizado em tampão de lise (Tris-HCl 50 mM pH 7,4/0,5% Triton X-100; 4°C) complementado com um cocktail de inibidores de proteases [fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1mM, ditioneitol (DTT) 1mM, 1µg/ml quimostatina, 1µg/ml leupeptina, 1 µg/ml antipaina; 5 µg/ml de pepstatina A]. O

cocktail de inibidores de proteases foi adicionado ao Tris-HCL/Triton X-100 imediatamente antes de usar. O tecido foi homogeneizado por ultra-sons (média de 3 pulsos). Seguidamente, os lisados foram centrifugados a 13000 rpm, durante 15 minutos, a 4°C (Simões *et al.*, 2007).

O sobrenadante (extracto total) foi recolhido e conservado a -80°C. A concentração de proteína foi determinada, usando o método de ácido bicinconínico (BCA) (Thermoscientific).

As proteínas foram desnaturadas por fervura a 95°C, durante 5 minutos, em solução desnaturante 6x (Tris-HCl 0,5M, pH 6,8; SDS (dodecil sulfato de sódio) 10 % (m/v); glicerol 30 % (v/v), DTT 0,6M, azul de bromofenol 0,01 % (m/v)) e separadas, por electroforese, em géis de poliacrilamida em condições desnaturantes, na presença de lauril sulfato de sódio (SDS) de acordo com Laemmli (1970). Os géis de separação foram preparados com 10 % de Bis acrilamida. Na electroforese usou-se um tampão com Tris base 25 mM, glicina 100 mM e SDS 0,150 % (m/v), pH 8,3. Seguidamente, as proteínas foram transferidas do gel de poliacrilamida para membranas de difluoreto de polivinildieno (PVDF) previamente activadas em metanol, por electrotransferência. A transferência ocorreu durante 90min a 110v, em gelo. A composição do tampão usado na electrotransferência foi a seguinte: CAPS 10mM, metanol 20 % (v/v), pH 11. Depois da transferência, as membranas foram bloqueadas com soluções 5 % (m/v) de leite magro em PBS-T [(Tween 20 0,5 % em tampão fosfato (NaCl 136,8mM, KCl 2,6mM, Na₂HPO₄.2H₂O 12,7mM e KH₂PO₄ 1,8mM; pH 7,4)] durante 1h, sob agitação à temperatura ambiente. As membranas foram posteriormente incubadas com os anticorpos primários (Tabela 2) preparados numa solução 5 % (m/v) de leite magro em PBS-T, durante a noite a 4°C.

Após incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas durante 50 minutos (5 vezes 10 minutos), com solução PBS-T sob agitação e incubadas à temperatura ambiente, durante uma hora, com o respectivo anticorpo secundário (Tabela 2) preparado em 5 % (m/v) de leite magro em PBS-T (5%). Depois de uma nova série de lavagens com 0,5% de PBS-T (30 minutos), as membranas foram reincubadas com anticorpos anti-β-actina ou anti-GAPDH para o controlo de *loading*.

As membranas foram reveladas no detector *Fluorescent Image Analyzer Typhoon FLA 900* (GE Healthcare Bio-sciences) na sequência da incubação com o reagente ECF (*Enhanced Chemifluorescence*).

Usou-se o software ImageQuant 5,0 (Molecular Dynamics) para a quantificação das bandas e os resultados foram expressos como percentagem de controlo e apresentados como média \pm EPM.

Tabela 2 – Descrição dos anticorpos utilizados no método de *Western Blotting*.

| Anticorpos | Peso Molecular (KDa) | Loading (μ L) | Diluição | Referência | Companhia |
|-----------------------------|----------------------|--------------------|----------|------------|---------------------|
| Mouse anti-GFAP | 50 | 10 | 1:5000 | Ab-1540 | Millipore |
| Mouse anti-TH | 62 | 10 | 1:5000 | MAB 318 | Millipore |
| Rabbit anti- β -actin | 46 | – | 1:5000 | A 5441 | Sigma life sciences |
| Mouse anti-GAPDH | 34 | – | 1:5000 | Ab-9484 | Abcam |
| Goat anti-mouse | – | – | 1:10000 | A 3562 | Sigma life sciences |
| Goat anti-rabbit | – | – | 1:10000 | 1317 | GE Healthcare |

8. Análise estatística

Os resultados estão expressos como média \pm EPM. O teste estatístico utilizado na comparação ente os diferentes grupos foi o ANOVA seguido do teste *Post-hoc Bonferroni multiple comparison*, em que * $p < 0,05$, ** , ## $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

RESULTADOS

1. Administração Aguda de Sitagliptina

1.1. Peso Corporal

Nenhum tratamento alterou significativamente o peso corporal dos murganhos comparativamente ao grupo controlo analisado no mesmo dia (Figura 19).

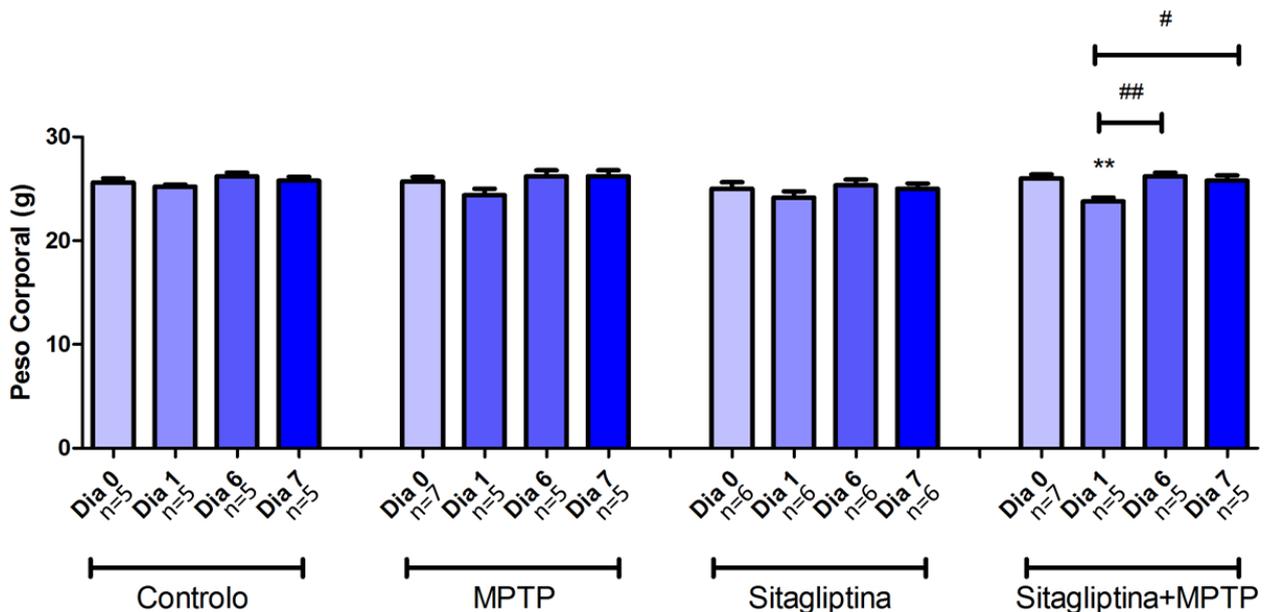


Figura 19 – Avaliação do peso corporal dos murganhos CL57B/6 nos dias 0, 1, 6 e 7 de tratamento com SAL, MPTP (4x 20mg/kg) e/ou sitagliptina (4x 10mg/kg). As seguintes comparações estatísticas foram efectuadas:

- o grupo Controlo com os restantes grupos, em cada um dos dias (Dia 0, 1, 6 e 7) de pesagem;
- o grupo MPTP com o grupo Sitagliptina+MPTP, em cada um dos dias de pesagem;
- o grupo Sitagliptina com o grupo Sitagliptina+MPTP, em cada um dos dias de pesagem;
- os 4 grupos Controlo, em cada dia de pesagem (Dia 0, 1, 6 e 7);
- os 4 grupos MPTP, em cada dia de pesagem;
- os 4 grupos Sitagliptina, em cada dia pesagem;
- os 4 grupos Sitagliptina+MPTP, em cada dia pesagem.

Para a comparação entre grupos utilizou-se o teste ANOVA, seguido do teste *Post-hoc Bonferroni Multiple Comparison*. Os valores correspondem à média \pm EPM (n=5-7), em que # $p<0,05$ (Sitagliptina+MPTP, Dia 7 vs Dia 1) e **, ## $p<0,01$ (Sitagliptina+MPTP, Dia 1 vs Dia 0; Dia 6 vs Dia 0, respectivamente).

Nenhum tratamento produziu alterações do peso corporal ao longo do tempo à excepção do grupo Sitagliptina+MPTP. Com efeito, verificou-se uma diminuição significativa do peso no dia 1 relativamente ao dia 0 com recuperação no dia 6 neste grupo.

1.2. Alterações comportamentais após a administração de MPTP

Observaram-se alterações comportamentais logo após as administrações de MPTP. Com efeito, os animais apresentavam o efeito de *Straub* (cauda erguida) e o pêlo eriçado. Adicionalmente, os animais já apresentavam um estado catatónico entre a terceira e a última injeção de MPTP. Alguns animais exibiram ainda convulsões. Reparou-se ainda que (29%) dos animais nos grupos MPTP e Sitagliptina+MPTP morreram nos dois primeiros dias após a última injeção de MPTP. No entanto, os murganhos que sobreviveram durante as primeiras 48 horas deixaram de apresentar alterações comportamentais em relação ao controlo, recuperando totalmente a função motora.

1.3. Teste comportamental – “Rotarod”

O equilíbrio e a coordenação motora dos murganhos foram avaliados ao sétimo dia após o protocolo de administração dos fármacos. O tempo de permanência no eixo rotatório dos vários grupos experimentais não é significamente diferente em relação ao grupo controlo (230 ± 54 segundos; Figura 20).

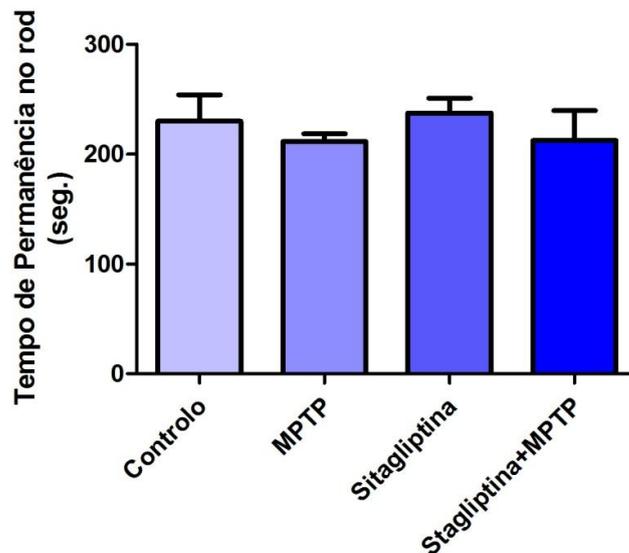


Figura 20 – Tempo de permanência no rod (segundos) no dia 7 após a administração de MPTP (4x 20mg/kg) e/ou sitagliptina (4x 10mg/kg). Os animais controlo foram administrados com NaCl 0,9%. Os valores correspondem à média \pm EPM. Para a comparação entre os grupos (n=5-6), utilizou-se o teste ANOVA, seguido do teste *Post-hoc* Bonferroni *Multiple Comparison*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

1.4. Níveis estriatais totais de DA e dos seus metabolitos (DOPAC e HVA)

Os níveis de DA, DOPAC e HVA foram analisados nas amostras de estriado nos 4 grupos de animais 7 dias após a administração com os fármacos em estudo.

O MPTP produziu uma depleção significativa de DA relativamente ao grupo controlo ($10,41 \pm 13,20$ vs $112,30 \pm 36,40$ ng/mg de proteína; $p < 0,001$). A Sitagliptina não alterou os níveis de DA nem preveniu a depleção produzida pelo MPTP (Sitagliptina+MPTP; $4,36 \pm 2,06$ ng/mg de proteína; $p < 0,001$). O teor em DA no grupo Sitagliptina+MPTP também é significativamente inferior ao obtido no grupo Sitagliptina ($4,36 \pm 2,06$ vs $104,09 \pm 31,22$ ng/mg de proteína; $p < 0,001$) (Figura 21A).

De forma similar, os níveis estriatais de DOPAC e de HVA nos grupos MPTP ($8,04 \pm 6,90$ e $6,14 \pm 2,69$ ng/mg de proteína, respectivamente) e Sitagliptina+MPTP

($4,12 \pm 1,05$ e $5,33 \pm 1,11$ ng/mg de proteína, respectivamente) também se encontram significativamente depletados relativamente ao grupo controlo ($33,02 \pm 11,94$ e $13,25 \pm 3,38$ ng/mg de proteína; $p < 0,001$ e $p < 0,01$ respectivamente). O grupo Sitagliptina+MPTP ($p < 0,001$) também apresenta uma diminuição dos níveis destes metabolitos em relação ao grupo Sitagliptina ($29,06 \pm 7,04$ e $13,44 \pm 1,11$ ng/mg de proteína; $p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente) (Figuras 21 B,C).

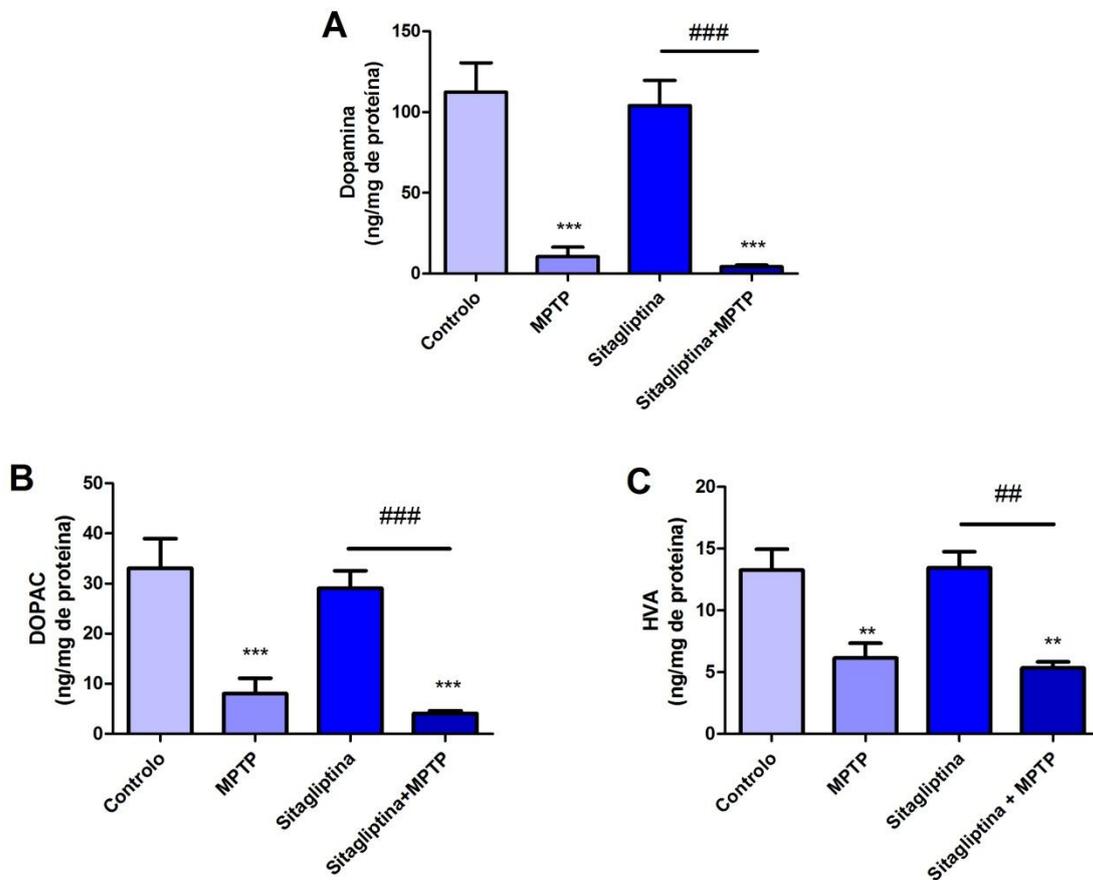


Figura 21 - Efeito da administração de MPTP (4x 20 mg/kg) e/ou sitagliptina (4x 10 mg/kg) nos níveis estriatais, totais de DA (A) e dos seus metabolitos, DOPAC (B) e HVA (C). Os animais controlo foram injectados com NaCl 0,9%. Os animais foram sacrificados sete dias após o tratamento com MPTP. Os valores são representados pela média \pm EPM ($n=4-5$). A comparação entre os grupos foi feita usando o teste ANOVA, seguido do teste *Post-hoc Bonferroni Multiple Comparison*. **, ## $p < 0,01$ e ***, ### $p < 0,001$.

1.4.1. *Turnover* total da DA (DOPAC+HVA/DA), pré-sináptico (DOPAC/DA) e sináptico (HVA/DA)

O *turnover* total da DA foi calculado para tentar caracterizar melhor o impacto da Sitagliptina no metabolismo da dopamina e consequentemente, na neurotoxicidade dopaminérgica induzida pelo MPTP.

Em relação ao *turnover* pré-sináptico, este é indicativa de síntese e metabolismo oxidativo intraneuronal da DA e o *turnover* sináptico pode ser utilizado como um indicador do metabolismo da DA extraneuronal (glial) e libertação de DA.

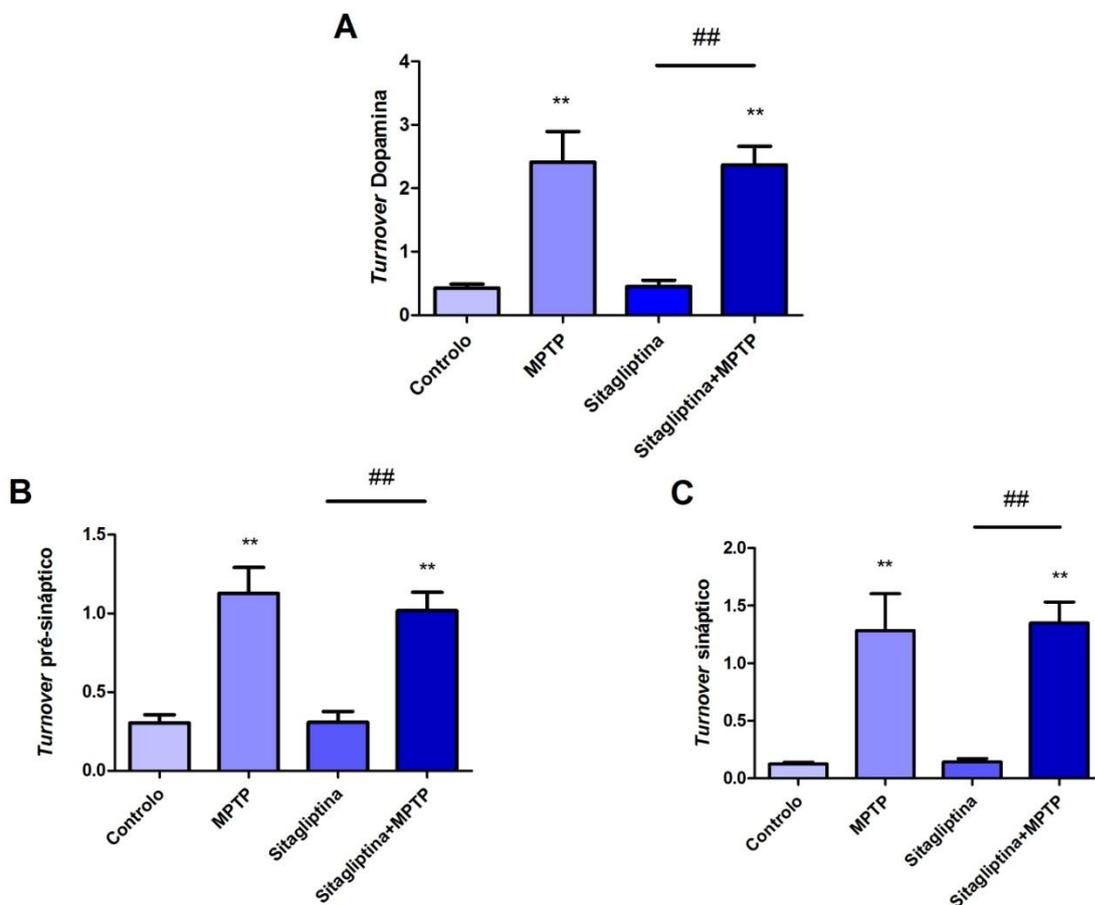


Figura 22 – Efeito da administração de MPTP (4x 20 mg/kg) e/ou sitagliptina (4x 10 mg/kg) no *turnover* da dopamina (DOPAC+HVA /DA) (A), no *turnover* pré-sináptico (DOPAC/ DA) (B) e no *turnover* sináptico HVA/DA (C). Os animais controlo foram injectados com NaCl 0,9%. Os valores correspondem à média \pm EPM. A comparação entre os grupos (n=4-5) foi feita usando o teste ANOVA, seguido do teste *Post-hoc Bonferroni Multiple Comparison*. **,## p<0,01.

Os grupos MPTP ($2,41 \pm 1,08$; $p < 0,01$) e Sitagliptina+MPTP ($2,37 \pm 0,66$; $p < 0,01$) apresentam um aumento significativo do *turnover* total da DA em relação ao grupo controlo ($0,43 \pm 0,12$) (Figura 22A). Ainda é possível notar-se que o grupo Sitagliptina+MPTP tem um aumento significativo do *turnover* total da DA relativamente ao grupo Sitagliptina ($0,45 \pm 0,20$; $p < 0,01$).

O *turnover* pré-sináptico (Figura 22B) também se encontra aumentado nos grupos MPTP ($1,13 \pm 0,37$ ng/mg; $p < 0,01$) e Sitagliptina+MPTP ($1,02 \pm 0,26$; $p < 0,01$) em comparação com o grupo controlo ($0,31 \pm 0,10$). O grupo Sitagliptina+MPTP também exibe um aumento deste *turnover* relativamente ao grupo Sitagliptina ($0,31 \pm 0,14$; $p < 0,01$).

Observou-se igualmente um aumento significativo no *turnover* sináptico (Figura 22C) nos grupos MPTP ($1,28 \pm 0,72$; $p < 0,01$) e Sitagliptina+MPTP ($1,35 \pm 0,40$; $p < 0,01$) em comparação com o grupo controlo ($0,12 \pm 0,03$). O grupo Sitagliptina+MPTP também exibe um aumento deste *turnover* relativamente ao grupo Sitagliptina ($0,14 \pm 0,06$; $p < 0,01$).

1.5. Níveis estriatais totais de 5-HT e do seu metabolito 5-HIAA

Fomos também determinar os níveis estriatais de 5-HT (Figura 23A e 23B) e de 5-HIAA (Figura 23C e 23D) por HPLC, visto ter sido descrito que há igualmente depleção desta amina no estriado na DP (Fox *et al.*, 2009).

Uma vez que os níveis de 5-HT e de 5-HIAA de algumas amostras ou ficaram abaixo do nível de quantificação ou não foram detectados pelo sistema de HPLC (ver cromatogramas na Figura 24), não foi possível elaborar a análise estatística para cada uma destas monoaminas citadas. No entanto, pode sugerir-se que estes níveis não parecem estar alterados com a administração de MPTP e/ou de sitagliptina.

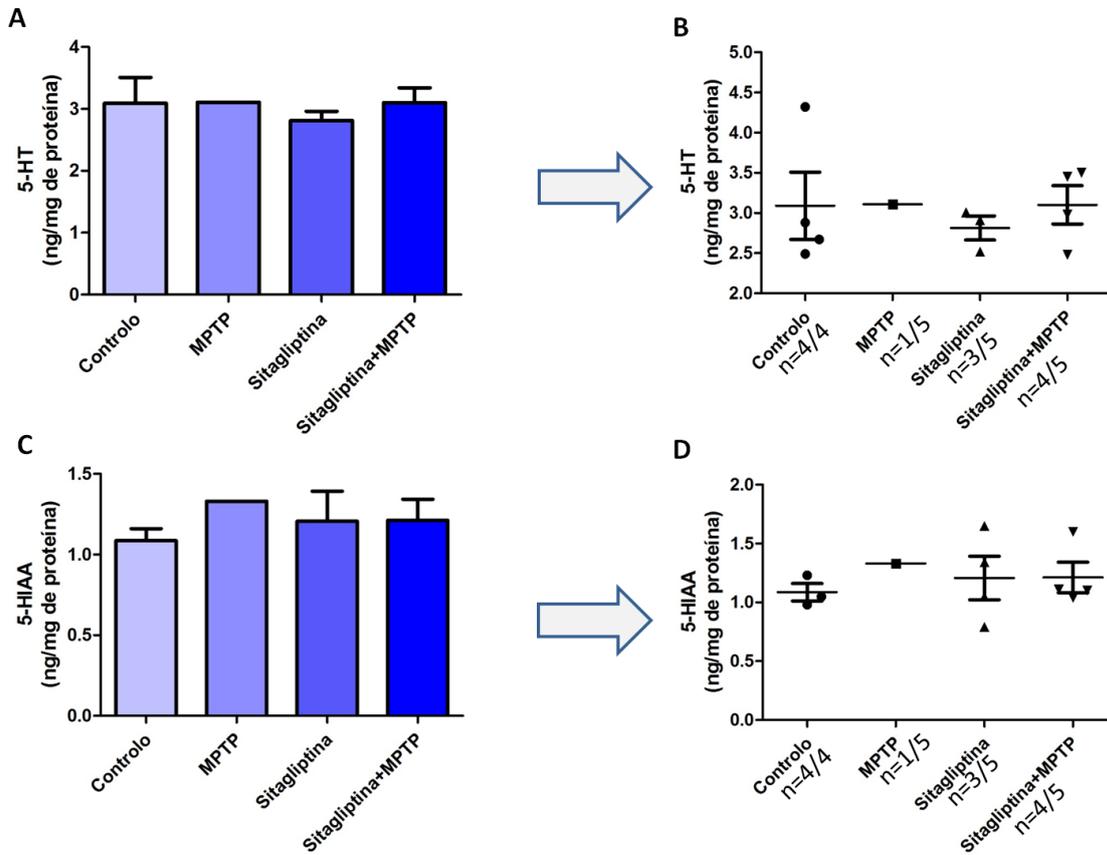


Figura 23 – Efeito da administração de MPTP (4x 20 mg/kg) e/ou Sitagliptina (4x 10 mg/kg) nos níveis estriatais, totais de 5-HT (A e B) e do seu metabolito 5-HIAA (C e D). Os animais controlo foram injectados com NaCl 0,9%. Os animais foram sacrificados ao sétimo dia após a administração dos fármacos. Os valores correspondem à média \pm EPM (n=1-4). Os gráficos (B) e (D) representam a versão *scatter plot* dos gráficos (A) e (C). A análise estatística não foi processada devido à falta de dados (monoaminas não detectadas).

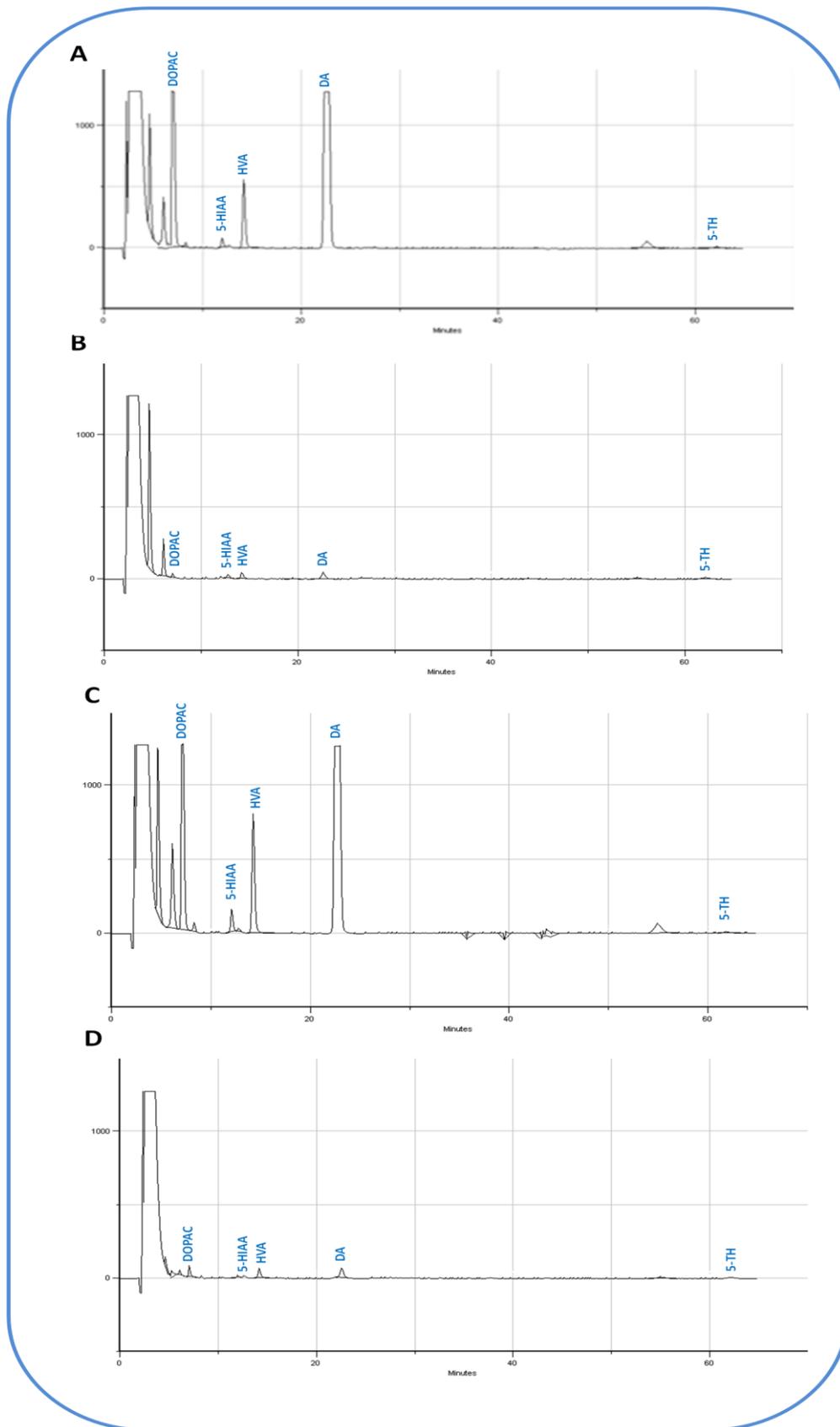


Figura 24 – Cromatogramas representativos para cada uma das condições experimentais em estudo: grupo Controlo (A), grupo MPTP (B), grupo Sitagliptina (C) e grupo Sitagliptina+MPTP (D).

1.6. Expressão da proteína TH

O MPTP produziu uma diminuição significativa dos níveis de TH estriatal relativamente ao grupo controlo. A Sitagliptina não alterou os níveis desta enzima nem preveniu o impacto do MPTP nos níveis TH. Os níveis desta enzima no grupo Sitagliptina+MPTP também são significativamente inferiores aos obtidos no grupo Sitagliptina (Figura 25).

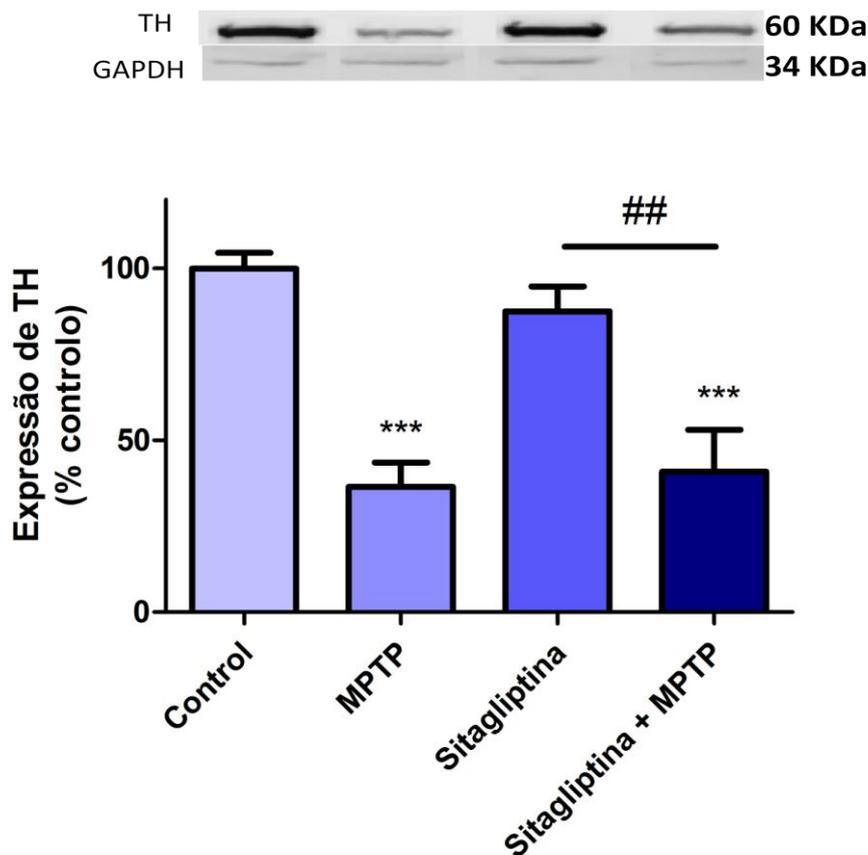


Figura 25 - A expressão de tirosina hidroxilase (TH) no estriado de murganhos C57BL/6J controlo e em murganhos administrados com MPTP (4x20 mg/kg, i.p.) e/ou Sitagliptina (4x10 mg/kg, i.p.). Os animais foram sacrificados ao sétimo dia após a administração dos fármacos. Os níveis de TH (60KDa) foram analisados por *Western Blot*. A GAPDH (34KDa) foi utilizada como controlo de *loading*. Os resultados são expressos em médias (% controlo) \pm EPM (n=4-6). A análise estatística foi feita pelo teste ANOVA, seguido do teste *Post-hoc* Bonferroni *multiple comparison*; ## p<0,01 e ***p<0,001.

1.7. Expressão da proteína GFAP

Os níveis estriatais da proteína GFAP (Figura 26) nos grupos MPTP e Sitagliptina+MPTP são significativamente maiores do que aqueles verificados no grupo controlo. Verificou-se, ainda, um aumento dos níveis desta proteína no grupo Sitagliptina+MPTP ($p < 0,01$) comparativamente ao grupo Sitagliptina.

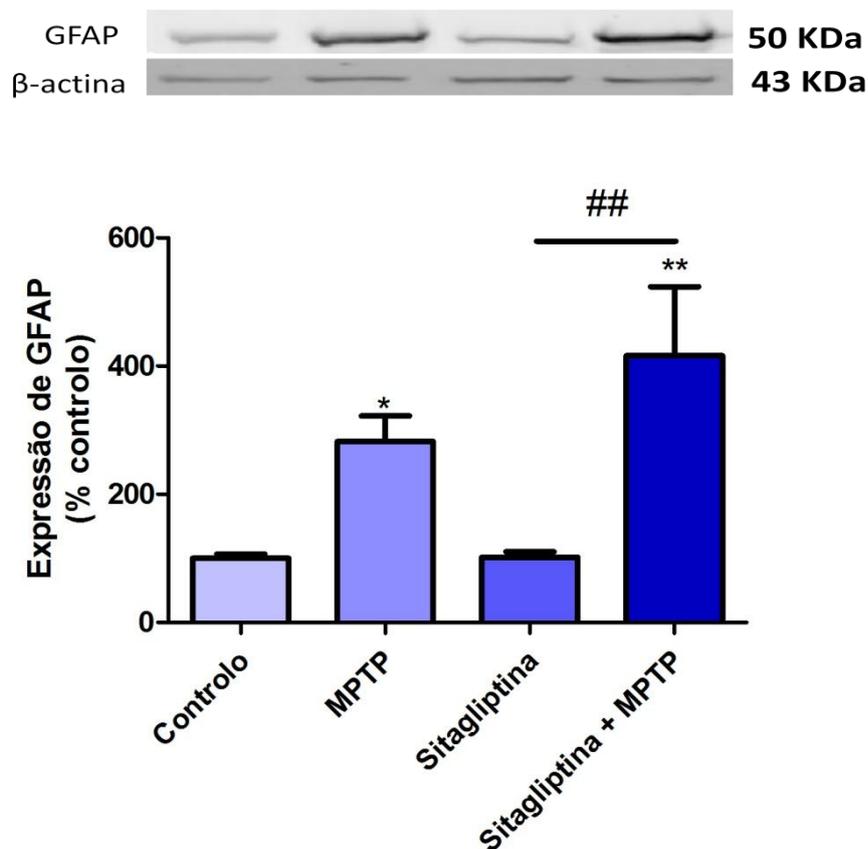


Figura 26 – A expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) no estriado de murganhos C57BL/6J controlo e de murganhos administrados com MPTP (4x20 mg/kg, i.p.) e/ou sitagliptina (4x10 mg/kg, i.p.). Os animais foram sacrificados ao sétimo dia após a administração dos fármacos. Os níveis de GFAP (50KDa) foram analisados por *Western Blot*. A β-actina (43KDa) foi utilizada como controlo de *loading*. Os resultados são expressos em médias (% controlo) ± EPM (n=4-6). A análise estatística foi feita pelo teste ANOVA, seguido do teste *Post-hoc* Bonferroni *multiple comparison*; * $p < 0,05$ e **,## $p < 0,01$.

2. Administração Sub-crónico de Sitagliptina

2.1 Peso Corporal

Apenas a administração conjunta de sitagliptina e MPTP alterou significativamente o peso corporal dos murganhos comparativamente ao grupo controlo ($22,6 \pm 1,3$ g) no terceiro dia (Figura 27). Adicionalmente o grupo Sitagliptina+MPTP é diferente do grupo Sitagliptina no dia já referido.

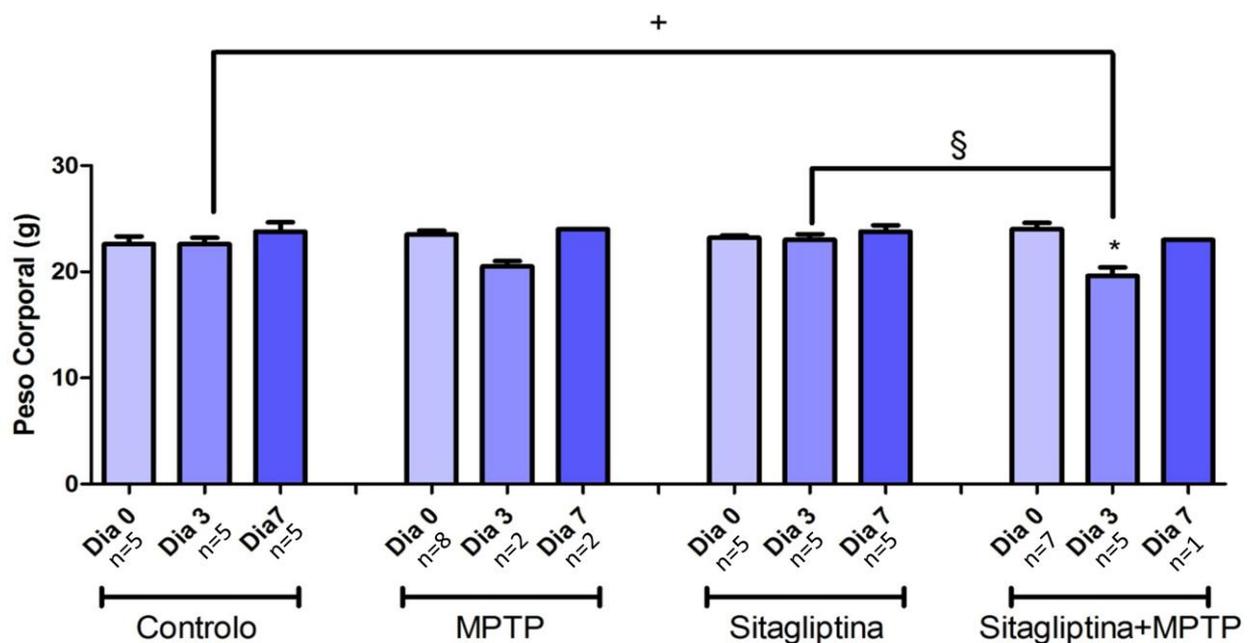


Figura 27 – Avaliação do peso corporal dos murganhos CL57B/6 nos dias 0, 3 e 7 de tratamento com SAL, MPTP (4x 20mg/kg) e/ou Sitagliptina (20 mg/kg, diariamente durante 9 dias). As seguintes comparações estatísticas foram efectuadas:

- o grupo controlo com os restantes grupos, em cada um dos dias (Dias 0, 3 e 7) (o dia 3 para o grupo MPTP e o dia 7 para os grupos MPTP e Sitagliptina+MPTP não foram considerados pela exiguidade de amostras);
- o grupo Sitagliptina com o grupo Sitagliptina+MPTP nos dias 0 e 3;
- os 3 grupos controlo em cada dia (Dias 0, 3 e 7);
- os 3 grupos Sitagliptina em cada dia;
- os 2 grupos Sitagliptina+MPTP em cada dia (Dias 0 e 3).

Para a comparação entre grupos utilizou-se o teste ANOVA, seguido do teste *Post-hoc Bonferroni Multiple Comparison*. Os valores correspondem à média \pm EPM (n=5-7), em que * $p < 0,05$ (Sitagliptina+MPTP, Dia 3 vs Dia 0) e +, § $p < 0,05$ (Sitagliptina+MPTP vs Sitagliptina e vs Controlo, respectivamente; Dia 3).

Os grupos MPTP do dia 3 e dia 7, estão apresentados por apenas por 2 animais, devido a mortalidade destes grupos ter sido elevada, portanto não se tornou possível incluir estes dois grupos na análise estatística. O mesmo acontece com o grupo Sitagliptina+MPTP do dia 7, representado por um único animal.

2.1.1. Alterações comportamentais após a administração de MPTP

Neste protocolo sub-crónico de sitagliptina foram observadas as mesmas alterações de comportamento citadas anteriormente no protocolo agudo de sitagliptina. No entanto, para além dessas alterações também se observou ao terceiro dia, que os animais administrados com sitagliptina+MPTP apresentavam sinais de hiperactividade (alteração não verificada no protocolo agudo). Verificou-se que os animais do grupo MPTP morreram nos dois primeiros dias, tal como no protocolo agudo de Sitagliptina. Contudo, o grupo Sitagliptina+MPTP apresentou um perfil diferente de mortalidade, uma vez que os murganhos morreram ao longo dos 7 dias após a injeção dos fármacos ao contrário do que tinha acontecido no protocolo agudo (a morte aconteceu nos dois primeiros dias). A taxa de mortalidade subiu consideravelmente em relação ao protocolo agudo de sitagliptina: 63%, no caso dos murganhos injectados com MPTP, e 86%, no caso dos murganhos administrados com sitagliptina+MPTP.

2.2. Teste Comportamental – “Rotarod”

O equilíbrio e a coordenação motora dos murganhos foram avaliados ao terceiro dia após o protocolo de administração do MPTP. Apesar de não se ter procedido a nenhuma análise estatística pela elevada mortalidade no grupo MPTP, parece não haver comprometimento locomotor (Figura 28).

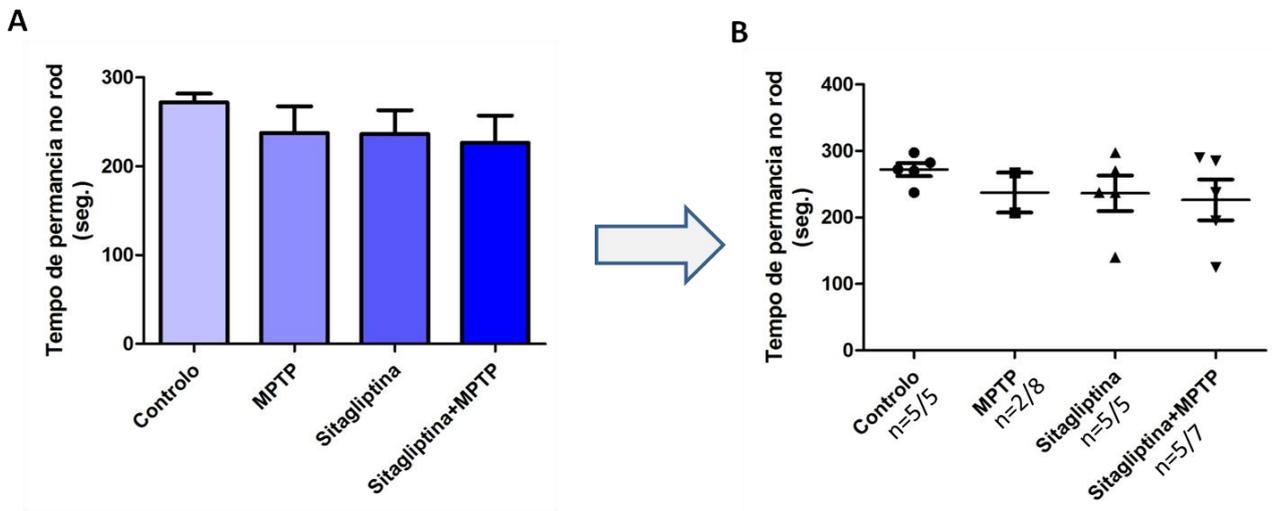


Figura 28 – Tempo de permanência no rod (segundos) no dia 3 após a administração de MPTP (4x20mg/kg) e/sitagliptina (20 mg/kg, diariamente durante 9 dias). Os valores correspondem à média \pm EPM (n=2-5). O gráfico (B) representa a versão *scatter plot* do gráfico (A). Não foi possível efectuar a análise estatística devida à elevada taxa de mortalidade no grupo MPTP.

2.3. Níveis estriatais totais de DA e dos seus metabolitos (DOPAC e HVA)

Uma vez que os animais não sobreviveram ao tratamento com MPTP +/- Sitagliptina, e conseqüentemente por não haver amostras da região cerebral em estudo, tornou-se impossível efectuar a quantificação dos níveis de catecolaminas. No entanto, é possível verificar-se algumas tendências.

Neste ensaio preliminar, é possível ver uma tendência para a diminuição dos valores estriatais da DA e dos seus metabolitos nos grupos MPTP e Sitagliptina+MPTP em relação ao controlo (138,4 \pm 50,8 ng/mg proteína). Também se verifica uma diminuição destes do grupo Sitagliptina+MPTP com o grupo Sitagliptina (Figuras 29A- 29F).

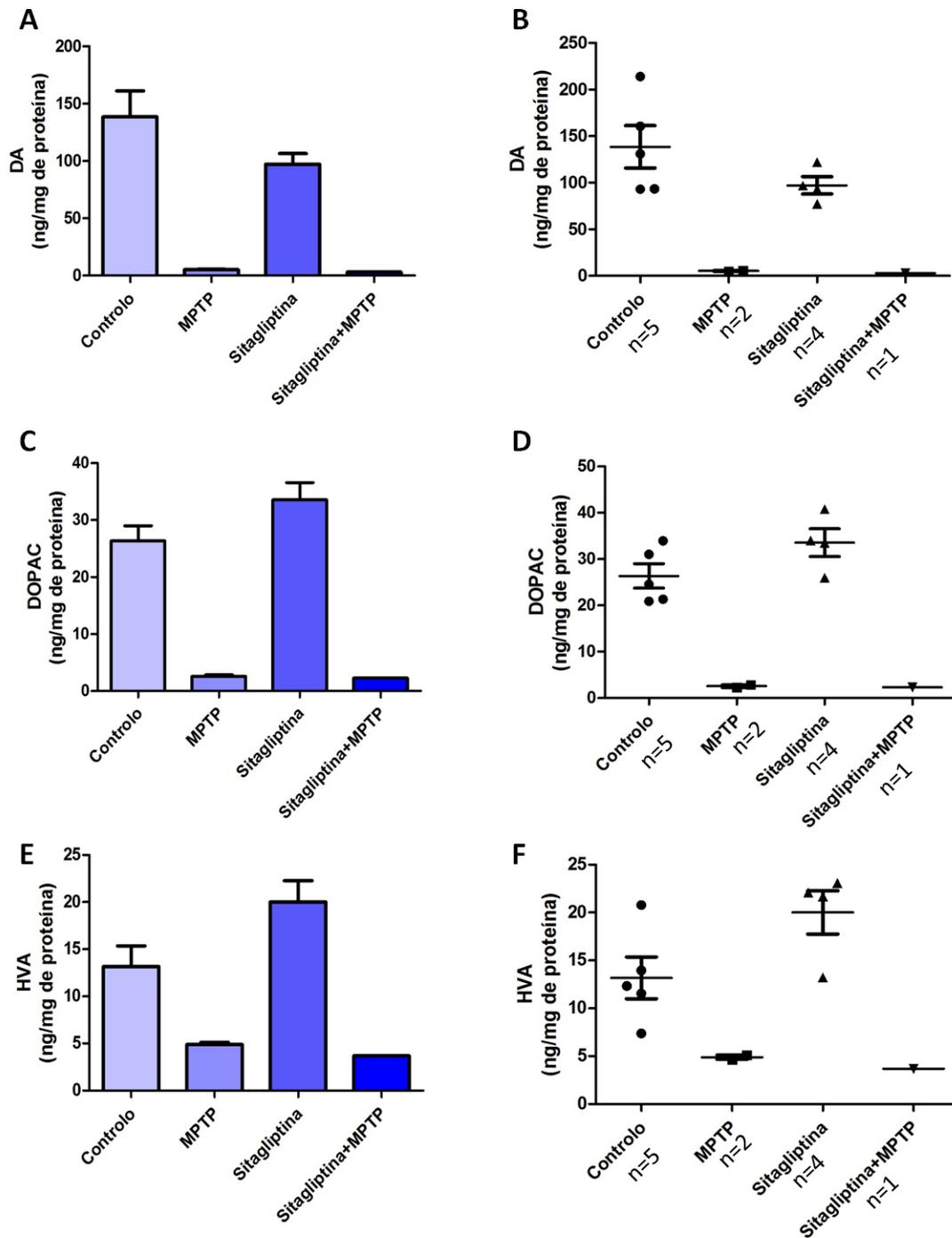


Figura 29 – Efeito da administração de MPTP (4x 20 mg/kg) e/ou de sitagliptina (20 mg/kg diariamente, durante 9 dias) nos níveis estriatais de DA (A e B) e dos seus metabolitos, DOPAC (C e D) e HVA (E e F). Os animais foram sacrificados 7 dias após a administração do MPTP. Os gráficos (B), (D) e (F) representam a versão *scatter plot* dos gráficos (A), (C) e (E). Não foi possível efectuar a análise estatística devida à elevada taxa de mortalidade nos grupos MPTP +/- sitagliptina.

2.4. Níveis estriatais totais de 5-HT e do seu metabolito 5-HIAA

A determinação dos níveis destas monoaminas não foi bem sucedida por duas razões: a primeira prende-se com a taxa de mortalidade dos animais administrados com MPTP +/- Sitagliptina ter sido elevada e não ter sido possível obter amostras suficientes para o estudo em questão. Por último, uma vez que as quantidades de 5-HT e 5-HIAA na região cerebral em estudo são bastante baixas, o sistema de HPLC não detectou estas aminas nas poucas amostras existentes. No entanto, pode sugerir-se que estes níveis não parecem estar alterados com os tratamentos com o MPTP +/- sitagliptina. Este antidiabético também parece não alterar estes valores (Figura 30).

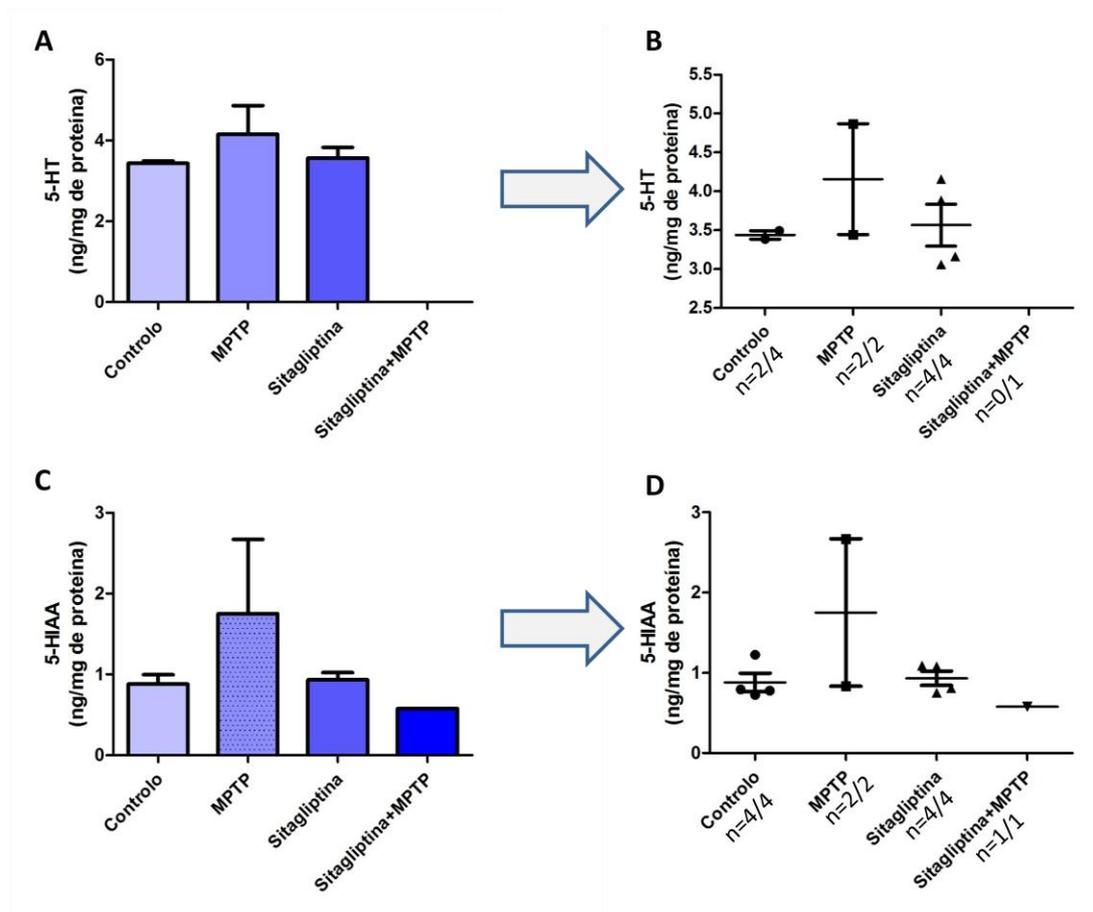
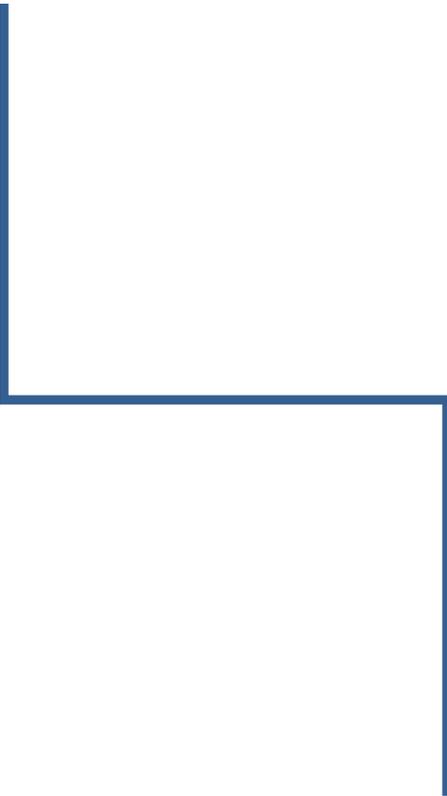


Figura 30 – Efeito da administração de MPTP (4x 20 mg/kg) e/ou de sitagliptina (20 mg/kg diariamente, durante 9 dias) nos níveis estriatais de 5-HT (A e B) e do seu metabolito 5-HIAA (C e D). Os animais foram sacrificados 7 dias após a administração do MPTP. Os gráficos (B) e (D) representam a versão *scatter plot* dos gráficos (A) e (C). Não foi possível efectuar a análise estatística devida à elevada taxa de mortalidade nos grupos MPTP +/- sitagliptina.

CAPÍTULO III:



DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

1. DISCUSSÃO

A DP é uma doença neurodegenerativa progressiva, caracterizada pela morte dos neurónios dopaminérgicos na SNpc com tradução na depleção de DA no estriado e pela presença de CL. Estas características neuropatológicas encontram-se associadas a sinais motores, como é o caso do tremor em repouso, da rigidez, da bradicinesia e da instabilidade postural. Os tratamentos farmacológicos actuais são sintomáticos e giram essencialmente em torno da DA (Obeso *et al.*, 2010). Visto que estes são ineficazes em travar a progressão da doença e condicionam efeitos adversos a demanda de novas estratégias farmacológicas é actual e pertinente. Recentemente foi proposto que a hormona incretínica GLP-1 tem potencial terapêutico na PD (Kim *et al.*, 2002). Também o antidiabético oral sitagliptina, um inibidor da enzima DPP-4 que degrada a GLP-1, foi proposto como estratégia neuroprotectora na doença de Alzheimer (D'Amico *et al.*, 2010)

O objectivo deste estudo foi avaliar o putativo efeito neuroprotector da sitagliptina no sistema dopaminérgico nigroestriatal num modelo da DP induzido em murganhos C57BL/6 pelo MPTP. Em particular, estudou-se o impacto da sitagliptina na homeostasia de dopamina (DA e seus metabolitos e expressão da TH), na astrogliose (expressão de GFAP) bem como no perfil locomotor induzido por MPTP. Foi também avaliado o sistema serotoninérgico (5-HT e o seu metabolito 5-HIAA).

Dos mais de 50 modelos de administração de MPTP já descritos (Sedeli *et al.*, 2001) escolhemos o modelo agudo que se baseia em 4 administração de 20 mg/kg MPTP, com duas horas de intervalo, por via intraperitoneal (Kim *et al.*, 2009). Este protocolo mimetiza o padrão de neurotoxicidade dopaminérgica estriatal que acontece na DP.

Com o intuito de averiguar o efeito neuroprotector da sitagliptina foram efectuados dois protocolos. O primeiro consistiu em 4 administrações de 10mg/kg sitagliptina meia hora antes da administração do MPTP. O segundo consistiu numa administração sub-crónica de sitagliptina: uma dose diária de 20mg/kg, durante nove dias consecutivos, com início 24h antes da administração de MPTP (4x20 mg/kg, intervalos de 2h). Com o primeiro protocolo pretendia-se uma estratégia preventiva enquanto com o segundo se pretendia uma estratégia preventiva e curativa.

A administração de MPTP provocou a depleção da DA e dos seus metabolitos (DOPAC e HVA) bem como uma diminuição dos valores da TH. Estes achados, sendo consistentes com o que outros autores descreveram (e.g. Duan *et al.*, 2002), sugerem que o paradigma utilizado no presente trabalho produziu neurodegenerescência dos terminais dopaminérgicos, constituindo um bom modelo da DP. Adicionalmente, a administração aguda de MPTP aumentou significativamente quer o *turnover* pré-sináptico (DOPAC/DA) quer o *turnover* sináptico (HVA/DA), sugerindo que este neurotóxico potenciou a síntese, o metabolismo pré-sináptico, a libertação da DA e o seu metabolismo glial no estriado. Estes achados sugerem que o MPTP põe em marcha uma estratégia compensatória na pequena fracção dos terminais dopaminérgicos que ainda permanecem funcionais para permitir que os níveis extracelulares de dopamina sejam normais ou quase normais (Song *et al.*, 2000). Um dos primeiros passos na toxicocinética do MPTP é a sua metabolização pelos astrócitos. Além disso, a astrogliose ocorre na sequência da degenerescência dos terminais dopaminérgicos na DP (Ookubo *et al.*, 2009). Assim, o aumento de GFAP estriatal observado no presente trabalho é consistente com estas premissas. É interessante ainda constatar que o aumento da razão HVA/DA é também sugestivo da reactividade dos astrócitos. Apesar da depleção de dopamina estriatal ter sido superior a 90% 7 dias após o insulto neurotóxico, a função locomotora não se apresentou afectada. Outros autores também não conseguiram observar qualquer alteração ao nível da função motora avaliada pelo teste de *rotarod* (Sedelis *et al.*, 2000). No entanto, Kim *et al.* (2009) mostraram claramente que os murganhos permaneceram menos tempo no cilindro rotativo 7 dias após a administração de MPTP. Esta falta de consistência na literatura relativamente ao equilíbrio e coordenação locomotora apontam para a existência de mecanismos compensatórios que visam preservar a integridade funcional motora e por outro lado para a pequena sensibilidade do teste de *rotarod* à depleção dopaminérgica (Luchtman *et al.*, 2009). Outros autores sugerem ainda que a utilização do *rotarod* para rato (com diâmetro e pistas mais largas) é mais sensível para detectar alterações funcionais em murganhos (Rozas *et al.*, 1998). Para além de testar os animais no *rotarod* em tempos mais precoces (48-72h), outros testes muito sensíveis à homeostasia dopaminérgica poderiam ser usados, nomeadamente o *pole test* que reflecte a bradicinesia.

Os nossos resultados sugerem que a sitagliptina não teve qualquer impacto na homeostasia da dopamina, na reactividade dos astrócitos nem no equilíbrio e coordenação locomotora dos murganhos.

O presente estudo sugere ainda que uma administração aguda de sitagliptina não foi capaz de prevenir a depleção de DA e metabolitos, nem de impedir a diminuição da expressão de TH. Este facto sugere que este modelo de administração de sitagliptina foi ineficaz na prevenção da neurotoxicidade dopaminérgica estriatal induzida pelo MPTP. Adicionalmente, a sitagliptina não conseguiu reverter a astrogliose produzida por esta neurotoxina.

Neste trabalho, no protocolo agudo de sitagliptina, a taxa de mortalidade dos murganhos submetidos a MPTP+/-sitagliptina foi de 29%, sendo que os murganhos morreram até às 48h após a administração do neurotóxico. Przedborski *et al.* (2001) sugeriram que a elevada toxicidade sobre o sistema cardiovascular (depleção de noradrenalina cardíaca, alterações do ritmo cardíaco e pressão arterial) seria responsável pela letalidade associada ao MPTP. Contudo, no protocolo sub-crónico de sitagliptina, a taxa de mortalidade subiu consideravelmente: 63%, no caso dos murganhos injectados com MPTP, e 86%, no caso dos murganhos administrados com sitagliptina+MPTP. Estas taxas de mortalidade, sendo consistentes com o que está descrito na literatura (Battaglia *et al.*, 2004), comprometeram, irremediavelmente, o estudo da putativa neuroprotecção pela sitagliptina. Todavia, é possível sugerir um conjunto de tendências apoiadas pelos resultados preliminares obtidos neste protocolo sub-crónico de sitagliptina:

- 1- Não houve alterações locomotoras 3 dias após a administração do MPTP;
- 2- A administração sub-crónica de sitagliptina não preveniu/reverteu a neurotoxicidade estriatal dopaminérgica induzida pelo MPTP;
- 3- A administração sub-crónica de sitagliptina parece confirmar a potenciação do impacto do MPTP na perda de peso corporal dos murganhos: no protocolo agudo, os animais tratados com sitagliptina+MPTP perderam peso 1 dia após a administração dos fármacos e os animais do grupo MPTP, diariamente administrados com sitagliptina, perderam peso 3 dias após a administração da neurotoxina.

Destacariamos ainda que esta administração diária de sitagliptina aparentemente alterou o perfil de letalidade do MPTP: uma administração diária de sitagliptina a

animais tratados com MPTP condicionou que os animais morressem até 7 dias após a administração desta neurotoxina.

Por razões metodológicas, não foi possível proceder à análise estatística dos dados da serotonina e do seu metabolito. Este problema poder-se-á resolver aumentando-se a sensibilidade de detecção do HPLC. Contudo, os nossos resultados sugerem que nem o MPTP nem a sitagliptina parecem alterar os níveis de 5-HT e de 5-HIAA. Os níveis não aparentam estar sob influência do tóxico nem da sitagliptina. Duan *et al.* (2002) também verificaram que a administração aguda de MPTP não tem qualquer efeito significativo sobre os níveis destas monoaminas.

Em conclusão, este estudo permite sugerir que a sitagliptina não apresenta qualquer tipo de efeito neuroprotector sobre o sistema dopaminérgico nigroestriatal, induzido pelo MPTP. Para confirmar que a ausência de efeito neuroprotector da sitagliptina não é explicável por questões farmacocinéticas, em particular pela sua biodisponibilidade no cérebro, está previsto a medição da actividade estriatal da enzima DPP-4.

2. CONCLUSÕES

Neste estudo foi possível validar a utilização do paradigma do MPTP (4x20 mg/kg, 2 h de intervalo) como um modelo da doença de Parkinson. Com efeito, a depleção estriatal de DA e dos seus metabolitos (DOPAC e HVA), da diminuição da expressão da proteína TH e do aumento da expressão da proteína GFAP em murganhos C57BL/6 injectados com MPTP sugerem a existência de degenerescência dopaminérgica nigroestriatal.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a administração parentérica de sitagliptina não preveniu nem a neurotoxicidade dopaminérgica estriatal nem a astroglíose induzidas por MPTP. Adicionalmente, é sugerido que este antidiabético não tem qualquer impacto nem na homeostasia da dopamina nem na reactividade dos astrócitos no estriado de murganhos.

Por outro lado, a sitagliptina não só potenciou a perda de peso causada pelo MPTP como alterou o seu perfil de letalidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe K., Saitoh T., Horiguchi Y., Utsunomiya I., Taguchi K. (2005), Synthesis and Neurotoxicity of Tetrahydroisoquinoline Derivatives for Studying Parkinson's Disease. *Biol. Pharm. Bull.* **Vol.** 28, 1355-1362;
- Andrade L. A. F., Ferraz H. B., (1997), Inibição Enzimática, Neuroprotecção e Tratamento da Doença de Parkinson. *Rev. Neurociências.* **Vol.**5, 27-33;
- Asanuma M., Miyazaki I., Diaz-Corrales F. J., Ogawa N., (2004), Quinone Formation as Dopaminergic Neuron-specific Oxidative Stress in the Pathogenesis of Sporadic Parkinson's Disease and Neurotoxin-induced Parkinsonism. *Acta Medica Okayama.* **Vol.**58, 221-233;
- Battaglia G., Busceti C. L., Molinaro G., Biagioni F., Storto M., Fornai F., Nicoletti F., Bruno V., (2004), Endogenous Activation of mGlu5 Metabotropic Glutamate Receptors Contributes to the Development of Nigro-Striatal Damage Induced by 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine in Mice. *J. Neurosci.* **Vol.**24, 828-835;
- Bekris L., Mata I., Zabetian C., (2010), The Genetics of Parkinson Disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* **Vol.**23, 228–242;
- Blum D., Torch S., Nissou M., Benabid A., Sadoul R., Verna J.M., (2001), Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* **Vol.**65, 135-172;
- D'Amico M., Filippo C. D., Marfella R., Abbatecola A. M., Ferraraccio F., Rossi F., Paolisso G., (2010), Long-term inhibition of dipeptidyl peptidase-4 in Alzheimer's prone mice. *Experimental Gerontology.* **Vol.**45, 202-207;

- Dauer W. and Przedborski S., (2003), Parkinson's Disease: Review Mechanisms and Models. *Neuron*, **Vol.39**, 889-909;
- Dhillom S., (2010), A Review of its Use in the Management of Type 2 Diabetes Mellitus. *Drugs*. **Vol.70**, 489-512;
- Duan W., Zhu X., Ladenheim., Yu Q.-S., Guo Z., Oyler J., Cutler R. G., Cadet J. L., Greig N. H., (2002), p53 Inhibitors Preserve Dopamine Neurons and Motor Function in Experimental Parkinsonism. *Ann Neurol*. **Vol.52**, 597-606;
- Engel S. S., Williams-Herman D. E. Golm G. T., Clay R. J., Machotka S. V., Kaufman K. D., (2010), Sitagliptin: review of preclinical and clinical data regarding incidence of pancreatitis. *Int J Clin Pract*. **Vol.64**, 984-990;
- Falsone S. F., Leitinger G., Karner A. Kungl A. J., Kosol S., Cappai R., Zangger K., (2011), The neurotransmitter serotonin interrupts α -synuclein amyloid maturation. *Biochim. Biophys. Acta*. **Vol.5**, 553-561;
- Ferro M. M., Bellissimo M.I., Anselmo-Franci J.A., Angelluci M. E., Canteras N.S., Da Cunha C., (2005), Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations. *J. Neurosci. Methods*. **Vol.148**, 78-87;
- Fox S. H., Chung R., Brotchie J. M., (2009), Serotonin and Parkinson's Disease: On Movement, Mood, and Madness. *Movement Disorders*. **Vol.24**, 1255-1266;
- Gandhi S. and Wood N. W., (2005), Molecular pathogenesis of Parkinson's disease. *Human Molecular Genetics*. **Vol.14**, 2749-2755;

- Hersch S. M., Yi H., Heilman C. J., Edwards R. H., Levey A., (1997), Subcellular Localization and Molecular Topology of the Dopamine Transporter in the Striatum and Substantia Nigra. *The journal of comparative neurology*. **Vol.388**; 211-227;
- Kim S., Moon M., Park S., (2009), Exendin-4 protects dopaminergic neurons by inhibition of microglial activation and matrix metalloproteinase-3 expression in an animal model of Parkinson's disease. *Journal of Endocrinology*. **Vol.202**, 431-439;
- Laemmli U. K., (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **Vol.227**, 680-685;
- Liu B., Xie J. X., Rowlands D. K., Gou Y. L., Leung C. C., Chung Y. W., Chan H. C., (2004), Neuroprotective Effects of Bak Foong Pill in 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-Induced Parkinson's Disease Model Mice. *Biol. Pharm. Bull.* **Vol. 27**, 1245-1250;
- Litteljohn D., Mangano E., Clarke M., Bobyn J., Moloney K., Hayley S., (2011), Inflammatory Mechanisms of Neurodegeneration in Toxin-Based Models of Parkinson's Disease. *SAGE-Hindawi Access to Research Parkinson's Disease*. **Vol.2011**, 18;
- Lopes I. A., Correia-Pinto J., Soares-Fortunato J., (2003), Desenvolvimentos dos mecanismos dopaminérgicos cerebrais: A influência da cocaína. *Revista Portuguesa de Psicossomática*. **Vol.5**; 65-73;
- Luchtman D. W., Shao D., Song C., (2009), Behavior, neurotransmitters and inflammation in three regimens of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Physiol Behav*. **Vol.98**, 130-138;
- Newhouse K., Hsuan S-L., Chang S. H., Cai B., Wang Y., Xia Z., (2004), Rotenone-Induced Apoptosis Is Mediated By p38 And JNK MAP Kinases In Human Dopaminergic SH-SY5Y Cells. *Toxicological sciences*. **Vol. 79**, 137–146;

- Mannisto P. T., Tuomainen P., Tuominen R. K., (1992), Different in vivo properties of three new inhibitors of catechol-O-methyltransferase in the rat. *Br. J. Pharmacol.* **Vol.105**; 569-574;
- Meredith G. E., Sonsalla P., Chesselet M-F., (2008), Animal Models of Parkinson's Disease Progression. *Acta Neuropathol.* **Vol.115**, 385-398;
- Middeldorp J., Vam den Berge S. A., Aronica E., Sjeijer D., Hol E. M., (2009), Specific Human Astrocyte Subtype Revealed by Affinity Purified GFAP⁺¹ Antibody: Unpurified Serum Cross-React with Neurofilament-L in Alzheimer. *PLoS ONE.* **Vol.4**, 1-7;
- Mizuno Y., Hattori N., Kubo S.-I., Sato S., Nishioka K., Hatano T., Tomiyama H., Funayama M., Mochizuki H., (2008), Progress in the pathogenesis and genetics of Parkinson's disease. *Phil. Trans. R. Soc. B.* **Vol.363**, 2215-2227;
- Mounsey R. B. and Teismann P., (2010), Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease: Pathogenesis and Neuroprotection. *SAGE-Hindawi Access to Research Parkinson's Disease*; **Vol.2010**, 18;
- Morgadinho M. T., Fontes C. R., Macedo T. R., (2004), Influence of the sample preparation method on the serotonin determination in plasma and platelets. *Biomed Chromatogr.* **Vol.9**, 739-744;
- Okuta K., Kotake Y. and Ohta, (2006), Parkinsonism-Preventing Activity of 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline Derivatives in C57BL Mouse *in Vivo.* *Biol. Pharm. Bull.* **Vol.29**, 1401-1403;
- Ookubo M., Yokoyama H., Kato H., Araki T., (2009), Gender differences on MPTP neurotoxicity in C57BL/6 mice. *Molecular and cellular endocrinology.* **Vol.311**, 62-68;
- Ossowska K., Wardas J., Kuter K., Nowak P., Dabroska J., Bortel A., Labus L., Kwieceński A., Krygowska-Wajs A., Wolfarth S., (2005), Influence of paraquat on

dopaminergic transporter in the rat brain. *Pharmacological Reports*. **Vol.57**, 330-335;

- Przedborski S., Jackson-Lewis V., Naini A. B., Jakowec M., Petzinger G., Miller R., Akram M, (2001), The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. *Journal of Neurochemistry*, **Vol.76**, 1265-1274;
- Petzinger G.M., Walsh J. P., Akopian G., Hogg E., Abernathy A., Arevalo P., Turnquist P., Vuckovic M., Fisher B. E., Togasaki D. M., Jakowec M. W., (2007), Effects of Treadmill Exercise on Dopaminergic Transmission in the 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-Lesioned Mouse Model of Basal Ganglia Injury. *The Journal of Neuroscience.*, **Vol.27**; 5291-5300;
- Purves D., Augustine G. J., Fitzpatrick D., Katz C.L., LaMantia A.-S., McNamara J., Williams S. M., (2001), Neuroscience – The Biogenic Amines. *Sinauer Associates*. 2nd edition;
- Rozas G., López-Martín E., Guerra M. J., Lanbandeira-García J. L., (1998), The overall rod performance test in the MPTP-treated-mouse model of Parkinsonism. *J. Neurosci Methods*. **Vol.83**, 165-175;
- Scheen A. J., (2007), Le glucagon-like peptide-1 (GLP-1), nouvelle cible dans le traitement du diabète de type 2. *Rev Med Liege*. **Vol.62**, 216-219;
- Scheen A. J., Van Gaal L.F., (2008), Sitagliptine (Januvia[®]): Incrétinopotentiateur indiqué comme insulino-sécrétagogue dans le traitement du diabète de type 2. *Rev Med Liege*. **Vol.63**, 105-109;

- Sedelis M., Hofele K., Auburger G. W., Morgan S., Huston J. P., Schwarting R. K., (2000), MPTP susceptibility in the mouse: behavioral, neurochemical, and histological analysis of gender and strain differences. *Behav Genet.* **Vol.30**, 171-182;
- Sedelis M., Schwarting R., Huston J., (2001), Behavioral phenotyping of the mouse model of Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research.* **Vol.125**, 109-122;
- Siegel G. J., Agranoff B. W., Albers R. W., Fisher S. K., Uhler M. D., (1999), Basic Neurochemistry – Molecular, Cellular and Medical Aspects, 6th edition;
- Silberman C. D., Laks J., Rodrigues C. S., Engelhardt E., (2004), Uma revisão sobre depressão como factor de risco na Doença de Parkinson e seu impacto na cognição. *R. Psiquiatr.* **Vol.26**, 52-60;
- Simões F., Silva A., (2007), Methamphetamine induces alterations on hippocampal NMDA and AMPA receptor subunit levels and impairs spatial working memory. *Neuroscience.* **Vol.150**; 433-441;
- Song D., Haber S., (2000), Striatal responses to partial dopaminergic lesion: evidence for compensatory sprouting. *The Journal of neuroscience.* **Vol.20**, 5102-5114;
- Sriram K., Matheson J. M., Benhokovic S. A., Miller D. B., Luster M. I., O'Callaghan J. P., (2006), Deficiency of TNF receptors suppresses microglial activation and alters the susceptibility of brain regions to MPTP-induced neurotoxicity: role of TNF- α . *The FASEB Journal.* **Vol.20**, 670-682;
- Vallone D., Picetti R., Borrelli E., (2000), Structure and function of dopamine receptors. *Neuroscience and Biobehavioral.* **Vol.24**, 125-132;
- Vautier S., Milane A., Fernandez C., Bourasset F., Chacun H., Lacomblez L., Farionotti R., (2009), Role of Two Efflux Proteins, ABCB1 and ABCG2, in Blood-Brain Barrier

Transport of Bromocriptine in a Murine Model of MPTP-Induced Dopaminergic Degeneration. *J Pharm Pharmaceut Sci.* **Vol.** 12, 199-208;

- Visser A. K. D., Waarde A., Willemsen A. T. M., Bosker F. J., Luiten P. G. M., Boer J. A., Kema I. P., Dierckx R. A. J. O., (2011), Measuring serotonin synthesis: from conventional methods to PET tracers and their (pre)clinical implications. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **Vol.**38, 576-591;
- Warden S. J., Robling A. G., Haney E. M., Turner C. H., Bliziotes M. M., (2010), The emerging role of serotonin (5-hydroxytryptamine) in the skeleton and its mediation of the skeletal effects of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5). *Bone.* **Vol.**46, 1-18;
- Weiner W. J., (2008), There Is No Parkinson Disease. *Arch Neurol;* **Vol.**65, 705-708;
- Yacoubian T. A., Standaert D., (2009), Targets for Neuroprotection in Parkinson's Disease. *Biochim Biophys Acta.* **Vol.**1792, 676-687;