



ESTUDO DO PAPEL DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2X NA EXTINÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS.

Bianca Nayara Clazer (IC- VOLUNTÁRIA- UNICENTRO), Weber Cláudio Francisco Nunes da Silva (orientador), e-mail: wwwclaudion@gmail.com.

Universidade Estadual do Centro-Oeste/Departamento de Farmácia
Guarapuava, PR.

Farmacologia – Neuropsicofarmacologia.

Palavras-chave: estereotáxico, doenças neurodegenerativas, hipocampo, memória.

Resumo

Com o passar dos anos, mais investimentos são feitos para que se possa ter maior conhecimento sobre doenças neurológicas. Utilizando animais, como ratos, e o aparelho estereotáxico para a para esse fim, é de grande valia, pois a partir desse procedimento é possível a implantação de fármacos no cérebro no animal para posterior avaliação da sua memória que é testada com a utilização de experimentos. O procedimento básico desta técnica consiste na implantação cirúrgica de cânulas-guia, nas quais inserem-se, posteriormente, cânulas de infusão, permitindo a aplicação tópica de drogas em animais acordados e movimentando-se livremente. A aplicabilidade desta é de grande valor em estudos envolvendo, por exemplo, investigações sobre a modulação de memória e aprendizagem em nível sináptico. O sistema neuromodulador alvo do prosseguimento do presente estudo será o sistema purinérgico P2X, cujos receptores participam da sinalização de membrana e subsequente regulação da atividade em neurônios da região CA1 hipocampal, importante para a consolidação e extinção de memórias.

Introdução

A palavra estereo é de origem grega (*stereos*) apresentando conotação de tridimensional. E *taxia* vem de *taxis*, que significa ordem, arranjo. Portanto, o termo estereotáxico significa ajustar a posição de algo no espaço. Com isso, é possível se verificar imagens de duas dimensões em coordenadas tridimensionais na metodologia neuroestereotáxica. Permitindo a localização e o acesso de um alvo no espaço encefálico com segurança e precisão (FRANK *et al.*, 2001).

A cirurgia estereotáxica tem sido uma ferramenta valiosa na neurociência de sistemas, aplicada em muitos experimentos para a implantação de cânulas e microinfusão de fármacos (CETIN, 2007).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças neurológicas e neuropsiquiátricas constituem 15 a 20% do total de mortes globalmente. Ainda, devido ao curso crônico da maioria dessas doenças, o fardo econômico é exorbitante (WHO, Neurological Disorders, 2006).

A utilização da cirurgia neuroestereotáxica em animais de laboratório, especialmente em ratos e camundongos, tem sido largamente utilizada (FORNARI *et. al.* 2012; DEL CAMPO *et. al.*, 2009, VAN DYCKE *et. al.*, 2010, ABDELWAHAB *et. al.*, 2011).

Após a sedação do animal, sua cabeça é fixada de forma rígida ao aparelho estereotáxico, utilizando barras auriculares e a presilha nasal. Para se localizar as coordenadas de referência *Bregma* e *Lâmbda*, crânio é exposto. Estas referências nos permite realiza uma relação entre as coordenadas contidas nos mapas extereotáxico e o encéfalo do animal em questão.

Como sujeito experimental, há muitas razões pelas quais o rato é o mais comumente selecionado para pesquisa em neurociência. Os ratos são do tamanho certo: nem muito pequeno para a exata localização estereotáxica de áreas distintas do cérebro nem muito grande para a gestão de laboratórios de baixo custo e são geralmente resistentes a infecções (PAXINOS & WATSON, 1985).

Sendo assim, a neurocirurgia estereotáxica pretende atingir uma determinada área encefálica, previamente definida pelas suas coordenadas espaciais, por meio de um equipamento estereotáxico que possibilita direcionar, com precisão, algum instrumento ao alvo visado.

Materiais e métodos

1. Animais a serem utilizados

Para a realização dos estudos, foram utilizados ratos Wistar machos adultos, pesando entre 225 e 350 gramas, provenientes do Biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Os animais foram mantidos em caixas apropriadas com capacidade para 5 animais, forradas com maravalha.

Receberam água e comida à vontade, e foram submetidos a ciclos de claro-escuro de 12 horas (luz a partir das 7:00 h e escuro a partir das 19:00 h), a uma temperatura ambiente mantida em torno de 22° C. As caixas foram trocadas a cada 3 dias, num sistema de rodízio entre as alunas. O máximo de precaução foi deliberado com o intuito de minimizar o sofrimento dos animais e de reduzir o número de animais utilizados. Todos os experimentos estavam de acordo com as normas do CEUA/UNICENTRO e dos “*Principles of laboratory animal care*” (NIH publication N° 85-23, revised 1996).

2. Procedimento Cirúrgico

Durante o período 2013-2014, os ratos utilizados nas cirurgias, foram divididos entre as alunas, em média 30 ratos para cada uma.

As caixas com os ratos eram levadas até o laboratório onde as cirurgias eram realizadas. Os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilasina, nas proporções adequadas de acordo com o peso do animal, e colocados de forma correta no estereotáxico para se realizar a cirurgia. As coordenadas utilizadas para colocar as cânulas-guia na cirurgia estereotáxica foram adaptadas do Atlas Anatômico de Paxinos e Watson, sendo elas as seguintes: Antero Posterior (AP) = - 4,2 mm; Médio Lateral (MD) = \pm 3,0 mm; Dorso Ventral (DV) = - 1,3 mm; Inclinação Latero-lateral (INCL LL) = 0°.

No final de cada cirurgia os ratos eram colocados em outra gaiola, limpa forrada com maravalha, com comida e água a vontade, para haver a separação de ratos operados e não-operados. Em seguida, eram levados novamente para o biotério do Cedeteg.

3. Verificação da localização das cânulas-guias, infusão de metileno e análise histológica

Depois de mais ou menos 3 dias pós-operatórios, foi realizada a verificação anatômica do posicionamento das cânulas implantadas e do local atingido pela infusão será realizada post-mortem (sacrifício por decaptação). Para isso, depois dos procedimentos comportamentais aos quais os animais seriam submetidos, estes receberam 1,0 μ l de uma solução de azul de metileno 0,1% através das cânulas. Quinze minutos depois disto foram sacrificados e seus cérebros removidos e colocados em uma solução de formol 4% por um período de 4 a 7 dias. Após isto procedeu-se com a análise histológica. Somente animais onde a localização da mancha de azul de metileno encontrar-se dentro de um raio de 2 mm do local desejado foram considerados na análise estatística dos dados.

As cânulas-guias deveriam ser posicionadas 1,0 mm acima da região alvo, neste caso a camada piramidal da região CA1 do hipocampo dorsal.

Resultados e Discussão

Não foram obtidos resultados em relação ao estudo do papel dos receptores purinérgicos P2X na extinção de memórias aversivas, nem à neuroinflamação, uma vez que não foi possível a obtenção dos fármacos necessários para estes fins.

Durante o tempo de Iniciação Científica 2013-2014, apenas as cirurgias foram realizadas e avaliadas de acordo com sua localização correta das cânulas-guias no cérebro. Onde foram operados 30 ratos, mas apenas 10 ratos permaneceram com a cânulas-guias até o dia do sacrifício. Com isso, foi possível adquirir experiência com o aparelho estereotáxico, o que irá auxiliar no próximo passo da Iniciação, que será realizada entre 2014-2015, onde pretende-se conseguir os resultados que não foram obtidos em 2013-2014.

Conclusões

É necessária a avaliação da memória e o que pode alterá-la, para que se possa prevenir e, possivelmente, reverter uma situação não desejada. Para isso, utilizam-se os ratos, para que nos auxiliem no diagnóstico de doenças e demais situações adversas que possam acontecer.

A estereotaxia deve ser utilizada, sempre que necessário e possível para se ter maior visão histológica da mudança recorrente no cérebro. É uma técnica importante, que precisa ter uma certa habilidade e experiência, para que sempre que possível, ser realizada com sucesso e com menos utilização de animais. Novos fármacos, devem também, ser testados, para melhorar cada vez mais a saúde da população.

Agradecimentos

Agradeço às minhas colegas de iniciação Científica, Ana Júlia Penteadó e Emilaynne Rafaela Bensberg, e ao meu orientador Weber Cláudio Francisco Nunes da Silva por esse um ano de aprendizado.

Referências

CETIN, A., *et al.*, Stereotaxic gene delivery in the rodent brain., *Nature Publishing Grou.* 2006, 1, 3166.

JOEL, L. F., *et al.*, Patent US 6298262 B1, 2001. Gusmão, S. Sebastião., *et al.*, Estereotáxia: evolução, princípios, técnicas e indicações., *J. Brasileiro de Neurociências.* 1998

MARTIN, J. H., 1991. Autoradiographic estimation of the extent of the reversible inactivation produced by microinjection of lidocaine and muscimol in the rat. *Neuroscience Lett.*, 127, 160-164.

PAXINOS, G.; WATSON, C.R.R.; EMSON, P.C. Ache-Stained Horizontal Sections of the Rat-Brain in Stereotaxic Coordinates. *J Neurosci Meth*, 1985.

SILVA, W.C.; BONINI, J.S.; BEVILAQUA, L.R.M.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Histamine enhances inhibitory avoidance memory consolidation through a H₂ receptor-dependent mechanism. *Elsevier*, 2006.

XAVIER, G.F. Técnicas par o Estudo o Sistema Nervoso. Ed.:Plêiade. São Paulo, 1999.