



## **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](mailto: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  $\mu$ 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 H<sub>2</sub> receptor-dependent mechanism. *Elsevier*, 2006.

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