

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E**  
**BIOLOGIA CELULAR**

**DANIELA ROSA GARCEZ**

**ANÁLISE COMPORTAMENTAL E HISTOLÓGICA DE UM MODELO**  
**ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON EM CAMUNDONGOS SUÍÇOS**

**BELÉM/PARÁ**  
**2011**

**DANIELA ROSA GARCEZ**

**ANÁLISE COMPORTAMENTAL E HISTOLÓGICA DE UM MODELO  
ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON EM CAMUNDONGOS SUÍÇOS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Elizabeth Sumi Yamada

**BELÉM/PARÁ  
2011**

Dados Internacionais da Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Biblioteca de Pós-Graduação do ICB-UFPA – Belém (PA)

---

Garcez, Daniela Rosa

Análise comportamental e histológica de um modelo animal da doença de Parkinson em camundongos suíços / Daniela Rosa Garcez; orientadora, Elizabeth Sumi Yamada – 2011.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2011.

Parkinson, Doença de. 2. Sistema nervoso – Degeneração. 3. Neurônios. 4. Camundongo como animal de laboratório. I. Título.

CDD – 22. ed. 616.833

---

**DANIELA ROSA GARCEZ**

**ANÁLISE COMPORTAMENTAL E HISTOLÓGICA DE UM MODELO ANIMAL DA  
DOENÇA DE PARKINSON EM CAMUNDONGOS SUÍÇOS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Elizabeth Sumi Yamada  
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

**Comissão Examinadora:**

Prof<sup>o</sup> Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira  
da Silva  
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Prof<sup>a</sup> Dra. Dulcidéia da Conceição Palheta  
Universidade Federal Rural da Amazônia, UFRA

**BELÉM/PARÁ  
2011**

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, por manter-me calma e esperançosa frente a todas as adversidades no ano de 2011.

Aos meus pais e irmãs, por terem me ensinado a nunca desistir e por todo o amor e confiança neste ano.

Ao meu querido João por nunca ter perdido a paciência nos meus períodos de ausência e por ter criado sempre o melhor ambiente para nós neste ano. Muito obrigada, o seu sorriso certamente sempre me fez continuar.

À Profª Elizabeth Yamada, pela confiança, paciência, dedicação, sutileza e amizade. Muito obrigada, serei eternamente grata.

Aos colegas de mestrado, em especial, Gabriela e a Solimar por toda a ajuda. Obrigada.

À minha querida amiga Carla por toda a compreensão, cobertura e amizade nos meus períodos de ausência na FSCMPA. Muito obrigada.

À Sofia e Beatriz, por todo o amor recebido nos momentos de desânimo.

## RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é uma das doenças neurodegenerativas mais comuns relacionadas com a idade, e apresenta sintomatologia com alterações motoras clássicas que estão relacionadas com a degeneração dos neurônios dopaminérgicos da SNpc e a diminuição de dopamina no estriado. Modelos animais da DP são instrumentos importantes utilizados por pesquisadores para uma maior compreensão de mecanismos patológicos envolvidos na doença e para a avaliação de possíveis intervenções terapêuticas. Tais modelos devem mimetizar algum aspecto da doença, como a degeneração dos neurônios dopaminérgicos nigrais. Neste contexto, o modelo da DP induzido pela injeção da neurotoxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) já se encontra bem estabelecido em ratos, mas necessita ainda de melhor caracterização das alterações comportamentais e lesões no sistema nigro-estriatal em camundongos de diferentes linhagens a fim de que haja interpretações confiáveis quando o modelo for usado em testes terapêuticos. O presente estudo teve como objetivo melhorar a caracterização do modelo unilateral da DP com 6-OHDA em camundongos suíços, avaliando alterações comportamentais e o efeito sobre os neurônios dopaminérgicos da SNpc. Nesta investigação utilizou-se uma única injeção intraestriatal unilateral de 6-OHDA, em duas diferentes concentrações da toxina: 5µg/µl e 10µg/µl. Os nossos resultados mostraram que ambas as concentrações utilizadas causaram perda severa de neurônios dopaminérgicos na SNpc, com uma média de 74,5% e 89,5% de perda, respectivamente. Esta perda apresentou uma correlação alta com o comportamento rotatório induzido por apomorfina e uma correlação baixa com a ambulação no teste do campo aberto. Desta forma, injeções intraestriatais de 5µg/µl ou 10µg/µl de 6-OHDA, em camundongos suíços, reproduzem de forma efetiva o modelo animal unilateral da DP com 6-OHDA, podendo ser utilizadas de forma confiável em experimentos que visem a investigação de terapias farmacológicas, celulares e/ou de neuroproteção para a DP.

**Palavras chaves:** Doença de Parkinson, 6-hidroxi-dopamina, neurodegeneração

## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is one of the most common aging-related neurodegenerative diseases, having a clinical presentation featuring classic motor symptoms related to the degeneration of dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta (SNpc) and dopamine decrease in the striatum. Animal models of PD are important tools employed by researcher aiming a better understading of pathophysiologic disease mechanisms and for evaluation of potential therapeutic interventions. Such models must mimic some aspect of the disease as for instances, the degeneration of nigral dopaminergic neurons. In this context, the PD model induced by the injection of the neurotoxina 6-hydroxydopamine (6-OHDA) has been widely established in rats but a better characterization in diferent mice strain is lacking, concerning both behavioral changes and the lesion in nigrostriatal system. Such characterization is important so that this model can be reliably used for investigations of therapeutic interventions. The goal of the present study was to improve the characterization of the unilateral 6-OHDA PD model using Swiss mice, through the evaluation of behavioral changes and the effects on the SNpc dopaminergic neurons. In this investigation we have used a single unilateral intraestriatal injection of 6-OHDA, in two different toxin concentrations: 10 µg/2µl e 20 µg/2 µl. Our results have demonstrated that both 6-OHDA concentrations used provoked severe loss of nigral dopaminergic neurons, amounting to 74,5% e 89,5% respectively. This neuronal loss was highly correlated to the apomorphine-induced rotational behavior but not to the ambulation assessed in the open field test. Therefore, intraestriatal injection of 10 µg/2µl or 20 µg/2µl of 6-OHDA, using Swiss mice, reproduce an effective unilateral 6-OHDA PD model that can be reliably employed in experiments aiming to investigate neuroprotective, cellular and/or pharmacological therapies for PD.

**Key words:** Parkinson's disease, 6-hydroxydopamine, neurodegeneration

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fixação da cabeça do animal no aparelho estereotáxico.....	16
Figura 2	Exposição da superfície craniana, com a ponta da seta indicando o lâmbida.....	17
Figura 3	Visão superior da arena usada no teste do campo aberto ilustrando o assoalho do aparato.....	18
Figura 4	Aparato usado no teste de rotação induzida por apomorfina, visão superior.....	19
Figura 5	Aparato utilizado no teste de rotação induzida por apomorfina, visão lateral.....	19
Figura 6	Comparação da média de neurônios TH+ na SNpc 28 dias após a injeção de 10 µg/2µl de 6-OHDA no estriado esquerdo.....	25
Figura 7	Comparação da média de neurônios TH+ na SNpc 28 dias após a injeção de 20 µg/2µl de 6-OHDA no estriado esquerdo.....	26
Figura 8	Comparação da média de neurônios TH+ na SNpc 28 dias após a injeção de 10 ou 20 µg/2µl de 6-OHDA no estriado esquerdo.....	27
Figura 9	Comparação do percentual médio de perda de neurônios TH+ na SNpc do lado injetado em relação ao lado não injetado, 28 dias após a injeção de 10 ou 20 µg/2µl de 6-OH-DA no estriado esquerdo.....	27
Figura 10	Imagens de secções representativas do núcleo estriado de animais injetados com 6-OHDA no estriado esquerdo em comparação com o lado direito (lado controle) de animais com 10 µg e 20 µg da toxina.....	28



Figura 11	Imagens de secções representativas da SN de animais injetados com 10 $\mu\text{g}$ e 20 $\mu\text{g}$ de 6-OHDA no estriado esquerdo e de animais não injetados...	29
Figura 12	Comparação da média de giros contralaterais induzidos por apomorfina 14 e 28 dias após a injeção de 10 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ de 6-OHDA no estriado esquerdo.....	30
Figura 13	Comparação da média de giros contralaterais induzidos por apomorfina 14 e 28 dias após a injeção de 20 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ de 6-OHDA no estriado esquerdo.....	30
Figura 14	Comparação da média de giros contralaterais induzidos por apomorfina entre o Grupo 1 (10 $\mu\text{g}$ ) e o Grupo 2 (20 $\mu\text{g}$ ) nos testes realizados no 14 <sup>o</sup> dia após a injeção de 6-OHDA no estriado esquerdo.....	31
Figura 15	Comparação da média de giros contralaterais induzidos por apomorfina entre o Grupo 1 (10 $\mu\text{g}$ ) e o Grupo 2 (20 $\mu\text{g}$ ) nos testes realizados no 28 <sup>o</sup> dia após a injeção de 6-OHDA no estriado esquerdo.....	31
Figura 16	Comparação do percentual médio de aumento nos giros contralaterais induzidos por apomorfina entre o 14 <sup>o</sup> e o 28 <sup>o</sup> dia após a injeção de 6-OHDA no estriado esquerdo no Grupo 1 (10 $\mu\text{g}$ ) e no Grupo 2 (20 $\mu\text{g}$ ).....	32
Figura 17	Comparação do número de linhas cruzadas antes e após a injeção de 10 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ de 6-OHDA no estriado esquerdo.....	33
Figura 18	Comparação do número de linhas cruzadas antes e após a injeção de 20 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ de 6-OHDA no estriado esquerdo.....	34
Figura 19	Comparação do número de linhas cruzadas do grupo controle em período similar ao grupo injetado com 6-OHDA.....	35

Figura 20	Comparação do número de linhas cruzadas entre os animais do Grupo Controle (triângulos vazados), Grupo 1 (10 µg, círculos vazados) e Grupo 2 (20 µg, quadrados vazados) em cada dia do teste.....	35
Figura 21	Análise de correlação entre a perda neuronal na SNpc e parâmetros comportamentais no 28 <sup>o</sup> dia pós-cirúrgico.....	36
Figura 22	Análise de correlação entre a perda neuronal na SNpc e parâmetros comportamentais nos 14 <sup>o</sup> e 28 <sup>o</sup> dia pós-cirúrgico.....	37

## SUMÁRIO

### 1. INTRODUÇÃO

1.1. A DOENÇA DE PARKINSON.....	1
1.2. NÚCLEOS DA BASE E A DOENÇA DE PARKINSON.....	2
1.3. MODELOS ANIMAIS DA DOENÇA DE PARKINSON.....	4
1.4. MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON COM 6-OHDA.....	7

### 2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL.....	14
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS.....	15
3.2. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA PARA INJEÇÃO DE 6-OHDA NO ESTRIADO...	15
3.3. AVALIAÇÃO DA AMBULAÇÃO NO TESTE DO CAMPO ABERTO.....	17
3.4. AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO ROTATÓRIO INDUZIDO POR APOMORFINA.....	18
3.5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	19
3.6. PERFUSÃO E OBTENÇÃO DAS SECÇÕES HISTOLÓGICAS.....	20
3.7. IMUNO HISTOQUÍMICA.....	20
3.8. ESTEREOLOGIA.....	21
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22

### 4. RESULTADOS

4.1. ANIMAIS.....	24
4.2. ANÁLISE QUANTITATIVA DA PERDA NEURONAL DOPAMINÉRGICA APÓS INJEÇÃO UNILATERAL DE 6-OHDA NO ESTRIADO: NÚMERO DE NEURÔNIOS	

IMUNORREATIVOS PARA TH (TH+) NA SUBSTÂNCIA NEGRA PARTE COMPACTA.....	24
4.3. CARACTERIZAÇÃO DO CURSO TEMPORAL DO COMPORTAMENTO ROTATÓRIO INDUZIDO POR APOMORFINA.....	29
4.4. CARACTERIZAÇÃO DO CURSO TEMPORAL DA AMBULAÇÃO NO TESTE DO CAMPO ABERTO.....	33
4.5. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE A PERDA DE NEURÔNIOS TH+ NA SNpc E AS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS.....	36
<b>5. DISCUSSÃO</b>	
5.1. DIMINUIÇÃO DE NEURÔNIOS TH+ NA VIA NIGRO-ESTRIATAL.....	38
5.2. COMPORTAMENTO ROTATÓRIO INDUZIDO POR APOMORFINA.....	39
5.3. CARACTERIZAÇÃO DO CURSO TEMPORAL DA AMBULAÇÃO NO TESTE DO CAMPO ABERTO.....	41
5.4. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE A PERDA DE NEURÔNIOS TH+ NA SNpc E AS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS.....	42
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	44
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b> .....	45

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A DOENÇA DE PARKINSON

A Doença de Parkinson (DP) é uma das doenças neurodegenerativas mais comuns relacionadas com a idade, perdendo somente para o mal de Alzheimer. Esta apresenta uma prevalência de aproximadamente 0,25% a 4,5% na população mundial com idade acima de 65 anos, elevando sua incidência com o aumento da idade (MAYEUX, 2003; DE LAU & BRETELER, 2006).

A DP é uma doença neurodegenerativa, crônica e progressiva caracterizada classicamente pela degeneração de neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* (SNpc), cujas projeções estriatais ocasionam a diminuição de dopamina (DA) no estriado (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003). A SNpc e o estriado são partes componentes dos núcleos da base (SHEPERED, 1998).

Pesquisas apontam que a exposição a toxinas ambientais, o processo de envelhecimento e as alterações genéticas predisponentes são fatores de risco determinantes isolados ou combinados para o desenvolvimento da DP (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003; GORELL *et al.*, 2004; HUNG *et al.*, 2010). Entretanto, as causas da DP ainda não estão bem estabelecidas.

A DP apresenta uma sintomatologia com alterações motoras clássicas – acinesia, bradicinesia, tremor de repouso, rigidez muscular e instabilidade postural – alterações cognitivas, autonômicas, sensoriais e neuropsiquiátricas (LIM *et al.*, 2009). Entretanto, a variedade dos sintomas encontrados na DP ocorre devido um acometimento neural que vai além do sistema nigro-estriatal e do neurotransmissor DA. Evidências científicas crescentes indicam que os sintomas encontrados na DP não estão associados somente à degeneração de neurônios dopaminérgicos da SNpc mas também ao acometimento de outras estruturas do encéfalo e outros neurotransmissores como: a degeneração de neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral, neurônios noradrenérgicos do *locus ceruleus*, neurônios seretonérgicos dos núcleos da rafe, componentes do sistema olfatório, entre outras estruturas (BRAAK *et al.*, 2006; BRAAK & DEL TREDICI, 2008; LIM *et al.*, 2009).

Os sintomas motores estão tipicamente relacionados com a degeneração dos neurônios dopaminérgicos da SNpc e a consequente diminuição de DA no estriado, quando já ocorre um perda de 50% de corpos celulares na SNpc e de 80% dos terminais no estriado (KRAVITZ *et al.*, 2010; HUNG *et al.*, 2010).

## 1.2. NÚCLEOS DA BASE E A DOENÇA DE PARKINSON

Os núcleos da base são um conjunto de núcleos situados em diferentes regiões do sistema nervoso central que apresentam, entre as suas funções, a participação no controle dos movimentos (SHEPERED, 1998). Os maiores núcleos da base são: o putâmen, o núcleo caudado, o globo pálido externo e interno, o núcleo subtalâmico e a substância negra *pars compacta* e *pars reticulada* (SNpr) (SHEPERED, 1998).

O corpo estriado é um conjunto de núcleos da base constituído pelos núcleos putâmen, acumbens, caudado e tubérculo olfatório. Este é dividido em duas regiões: dorsal e ventral. O estriado dorsal ou neostriado é formado pela maior parte dos núcleos caudado e putâmen, ao qual recebem, entre outras conexões, os axônios dos neurônios dopaminérgicos da SNpc, formando a via nigro-estriatal. Neurônios do neostriado que realizam conexões sinápticas com neurônios dopaminérgicos da SNpc apresentam importantes funções motoras (JOEL & WEINER, 2000).

Os principais neurônios do estriado são denominados de neurônios de projeção estriatal ou neurônios espinhosos médios. No estriado de roedores, estes neurônios correspondem a mais de 95% da população de neurônios da região, com outros 3 - 4% sendo representado por grupos de interneurônios estriatais (SHEPHERD, 1998). Entre as importantes aferências para esses neurônios, as oriundas dos axônios dopaminérgicos da SNpc resultam em sinapses excitatórias ou inibitórias. Neurônios de projeção do neostriado apresentam receptores dopaminérgicos D1 e D2 em suas membranas. A DA ao ligar-se ao receptor D1 ou D2 resulta em uma sinapse excitatória ou inibitória, respectivamente (SHEPHERD, 1998).

Em resposta a convergência das diferentes aferências nos neurônios de projeção do neostriado, oriundas de diferentes regiões do encéfalo como a SNpc, os mesmos emitem maiores ou menores informações inibitórias para outros núcleos da base que são importantes para o controle dos movimentos. Estas informações são processadas através de circuitos intrínsecos complexos de via direta e indireta, as quais finalizam no globo pálido interno e SNpr. Do globo pálido (segmento interno) emergem maiores ou menores sinais eferentes inibitórios para o tálamo, gerando inibição ou excitação do tálamo e posterior diminuição ou aumento da estimulação ao córtex motor, respectivamente (SHEPHERD, 1998; WISHAN & KOLB, 2002; KRAVITZ *et al.*, 2010).

Em condições normais, a DA formada dentro dos neurônios dopaminérgicos da SNpc é liberada no estriado através de seus terminais e é captada pelos receptores D1 e D2 dos neurônios espinhosos médios. A influência de dopamina sobre os neurônios espinhosos médios do estriado da via direta e indireta, diminui o efluxo de sinais inibitórios do globo pálido interno ao tálamo, aumentando a excitabilidade do tálamo e dos neurônios motores superiores (WICHMANN & DE LONG, 1996; KRAVITZ *et al.*, 2010).

Na DP sugere-se que, ao ocorrer a perda de neurônios dopaminérgicos da SNpc e a conseqüente diminuição de DA no estriado, os neurônios espinhosos médios, gabaérgicos e inibitórios, geram um maior efluxo de sinais inibitórios do globo pálido interno ao tálamo, e desta forma, diminuem a excitabilidade do tálamo e dos neurônios motores superiores. Essas alterações funcionais estão relacionadas com as dificuldades de iniciação e controle dos movimentos voluntários encontrados na DP, como o congelamento dos movimentos, bradicinesia e iniciação da locomoção (WICHMANN & DE LONG, 1996; KRAVITZ *et al.*, 2010)

É importante ressaltar que dentro das importantes características histopatológicas na DP além da perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc, destacam-se também a presença de corpos de Lewy. Corpos de Lewy são inclusões filamentosas de agregados protéicos intracelulares, compostos predominantemente da proteína alfa-sinucleína, encontrados no citoplasma de neurônios sobreviventes ou em processo de degeneração da substancia negra *pars compacta* e em todas as regiões acometidas na DP (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003; BRAAK *et al.*, 2006; BRAAK & DEL TREDICI, 2008).

### 1.3. MODELOS ANIMAIS DA DOENÇA DE PARKINSON

Os modelos animais da DP são instrumentos importantes para se elucidar os mecanismos fisiopatogênicos da doença e também para a investigação de terapias para a doença. Estes modelos devem necessariamente mimetizar alguma característica patológica e/ou comportamental encontrada na doença, entre elas, cita-se: a neurodegeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos nigro-estriatais associada ou não a neurodegeneração de neurônios dopaminérgicos e não dopaminérgicos em outras áreas do SNC implicadas na DP, a presença de corpos de Lewy em neurônios dopaminérgicos, alterações comportamentais não motoras e prejuízos no comportamento motor responsivo à terapia dopaminérgica ou para agonistas dopaminérgicos (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003; UVERSKY, 2004; CICCHETTI *et al.*, 2009; CANNON & GREENAMYRE, 2010).

Entre os modelos mais estudados da DP induzidos por neurotoxinas se encontram os que utilizam as toxinas 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) e 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) e os modelos induzidos pelos pesticidas rotenona, paraquat e maneb (PRZEDBORSKI, 2003; UVERSKY, 2004). Os modelos experimentais induzidos por pesticidas reproduzem o fator de risco ambiental da DP (CICCHETTI *et al.*, 2009).

A rotenona é um composto citotóxico natural, da família dos rotenóides, extraído de plantas *Leguminosa*, e foi amplamente usada no mundo como veneno de peixe e inseticida na agricultura e em jardins domiciliares (PRZEDBORSKI, 2003; UVERSKY, 2004; CANNON & GREENAMYRE, 2010), sendo cancelado seu uso na União Européia e nos Estados Unidos da América desde 2007 (TANNER *et al.*, 2011).

A rotenona, quando administrada em animais experimentais, atravessa com facilidade a barreira hematoencefálica e ultrapassa livremente as membranas celulares dos neurônios, estabelecendo-se rapidamente no encéfalo e dentro das mitocôndrias dos neurônios. Estudos experimentais com a substância indicam que vários fatores estão envolvidos na sua neurotoxicidade: inibição do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial (com diminuição na síntese de ATP intracelular), aumento da atividade microglial, estresse oxidativo, indução de morte por apoptose, inibição da atividade do proteossoma e interação direta com a proteína



alfa-sinucleína (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003; BETABERT *et al.*, 2003; UVERSKY, 2004; CICCHETTI *et al.*, 2009).

O modelo animal da DP induzido por rotenona apresenta como características principais a neurodegeneração não seletiva dos neurônios dopaminérgicos, a presença de corpos de Lewy na SN e a presença de algumas alterações motoras encontrados na doença (BETARBET *et al.*, 2000). Entretanto diversos autores ressaltam limitações do modelo, como: a inespecificidade ao sistema nervoso, com efeitos sistêmicos adversos, incluindo problemas no sistema cardíaco e digestivo, preconizando a este modelo alta mortalidade dos animais; a inespecificidade das alterações comportamentais motoras com a degeneração dos neurônios dopaminérgicos no sistema nigroestriatal; o desconhecimento se as alterações motoras encontradas no modelo melhoram com a administração do L-DOPA; a inespecificidade dentro do SNC, visto que foram documentadas lesões de neurônios não dopaminérgicos em áreas não relacionadas com a DP; a ausência de comportamentos não motores e a sua reprodutibilidade baixa em laboratórios (HÖGLINGER *et al.*, 2003; UVERSKY, 2004; ZHU *et al.*, 2004; HÖGLINGER *et al.*, 2006; CICCHETTI *et al.*, 2009). Baseados nestes achados, pesquisadores sugeriram que a rotenona reproduz melhor a fisiopatologia do parkinsonismo atípico do que a DP (HÖGLINGER *et al.*, 2003; HÖGLINGER *et al.*, 2006).

Outro modelo animal da DP induzido por pesticida é o modelo que utiliza o pesticida paraquat. Esse pesticida foi um dos herbicidas mais usados no mundo. Sua inalação pode causar em humanos uma toxicidade pulmonar severa e até fatal. Este produto químico agrícola pode ser manipulado individualmente ou em conjunto com o fungicida maneb para a reprodução do modelo animal da DP. A combinação destas substâncias em modelos animais da DP sinaliza a importância de possíveis combinações de toxinas ambientais como fatores de risco para o desenvolvimento da DP e quando administrados conjuntamente, interagem sinergicamente, potencializando o efeito neurotóxico (CICCHETTI *et al.*, 2009; CANNON & GREENAMYRE, 2010).

Os animais (ratos e camundongos) expostos ao paraquat ou à mistura paraquat/maneb apresentam neurodegeneração importante dos neurônios dopaminérgicos da SN que se correlaciona com prejuízos comportamentais motores encontrados no modelo. Estas alterações motoras são responsivas à terapia dopaminérgica. Entre as desvantagens do

modelo, cita-se: a ausência de corpos de Lewy, ausência de comportamentos não motores e a presença de efeitos periféricos não específicos nos pulmões dos animais (CICCHETTI *et al.*, 2009; CANNON & GREENAMYRE, 2010).

O modelo animal da DP induzido por MPTP foi desenvolvido após o relato de que a substância MPTP causou parkinsonismo em jovens viciados após administração acidental intravenosa de heroína sintética contaminada por MPTP; em 1979.

O MPTP, por ser um substrato lipofílico, consegue ultrapassar a barreira hematoencefálica sem dificuldade. Dentro do encéfalo, mais especificamente dentro das células gliais e dos neurônios seretonérgicos, é metabolizado e convertido em um substrato tóxico ativo, o íon MPP<sup>+</sup> (1-metil-4-fenilpiridinium). O MPP<sup>+</sup>, ao sair do espaço intracelular destas células para o espaço extracelular, é transportado para dentro dos neurônios dopaminérgicos, com subsequente neurodegeneração dopaminérgica, mimetizando a doença de Parkinson (UVERSKY, 2004).

Estudos prévios com a neurotoxina indicam que a sua neurotoxicidade seja causada por diferentes mecanismos de ação, tais como: inibição do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, estresse oxidativo, indução de morte por apoptose e agregação anormal e fibrilação de proteína alfa-sinucleína (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003).

O modelo animal da DP induzido por MPTP é importante por reproduzir: a degeneração seletiva dos neurônios dopaminérgicos no sistema nigro-estriatal, os comportamentos motores e alguns não motores da doença, as alterações motoras tratadas com L-DOPA e a presença de agregados da proteína alfa-sinucleína na SNpc (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003; UVERSKY, 2004; FERRO *et al.*, 2005). Contudo, entre as desvantagens do modelo, cita-se: suscetibilidades diferentes entre roedores, degeneração de neurônios dopaminérgicos dependente da linhagem dos camundongos, recuperação espontânea dos comportamentos motores e reprodução do modelo de forma extremamente cuidadosa, com importantes regras de segurança ao manipular a toxina e animais tratados com a toxina, visto que o MPTP é um agente extremamente perigoso, entrando no corpo humano através da inalação, absorção e ingestão da toxina (GIOVANNI *et al.*, 1991; SEDELIS *et al.*, 2000; DAUER & PRZEDBORSKI, 2003; UVERSKY, 2004; FERRO *et al.*, 2005).

#### 1.4. MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON COM 6-OHDA

O efeito biológico da neurotoxina 6-OHDA foi primeiramente descrito em 1963, após causar denervação de fibras noradrenérgicas cardíacas em camundongos. Posteriormente, em 1968, foi demonstrado que a neurotoxina também causava a degeneração dos neurônios catecolaminérgicos encefálicos de ratos, incluindo o sistema nigro-estriatal. A partir desse estudo pioneiro, originou-se o modelo animal da DP induzido por 6-OHDA (CANNON & GREENAMYRE, 2010).

O modelo animal da DP induzido por 6-OHDA foi o primeiro modelo que reproduziu a perda de neurônios dopaminérgicos da SNpc, existindo há mais de quarenta anos. Este modelo de parkinsonismo é o mais usado para avaliar o potencial de terapias farmacológicas, neuroprotetoras, e de reposição celular (NISHIMURA *et al.*, 2003; DAUER & PRZEDBORSKI, 2003; SCHOBER, 2004; BOVÉ *et al.*, 2005). Além disso, o modelo, tradicionalmente usado em ratos, passou a ser empregado também em camundongos, devido a maior facilidade de manipulá-los geneticamente em laboratório, demonstrando ser um modelo valioso para o estudo da fisiopatologia e de terapias da doença (UVERSKY, 2004; ALVAREZ-FISHER *et al.*, 2008).

A 6-OHDA é encontrada em encéfalos humanos como resultado da auto-oxidação da dopamina e tem sido identificada em grandes quantidades na urina de pacientes com a DP (ANDREW *et al.*, 1993). É um composto hidroxilado com estrutura química análoga aos neurotransmissores catecolaminérgicos, tendo afinidade pelo transportador de catecolaminas, o que causa toxicidade seletiva aos neurônios catecolaminérgicos. Esta toxina não ultrapassa a barreira hematoencefálica e por isso sua administração deve ser realizada por injeção estereotáxica intraencefálica. Dentro do encéfalo, ela é transportada para dentro dos neurônios catecolaminérgicos via transportador de DA e noradrenalina, acumulando-se no citoplasma e na mitocôndria dos neurônios e assim, reproduzindo efeitos neurotóxicos intracelulares que culminam com a perda dos neurônios por necrose ou apoptose (DAUER & PRZEDBORSKY, 2003; SCHOBER, 2004).

A ação neurotóxica da 6-OHDA tem sido associada à sua capacidade de provocar disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e reação inflamatória focal (HE *et al.*, 2001;

CICCHETTI *et al.*, 2002; DAUER & PRZEDBORSKY, 2003; SCHOBER, 2004; PRZEDBORSKY *et al.*, 2008).

A disfunção mitocondrial ocorre pela inibição do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, gerando alterações no transporte de elétrons da cadeia respiratória, com consequente aumento da produção de radicais livres, de espécies reativas de oxigênio (EROS), e diminuição de produção de ATP para o neurônio (DAUER & PRZEDBORSKY, 2003; SCHOBER, 2004).

O estresse oxidativo intracelular é gerado tanto pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) no citoplasma como pela ação sobre a função mitocondrial citada no parágrafo acima. No citoplasma, a 6-OHDA rapidamente oxida, produzindo compostos citotóxicos, como as espécies reativas de oxigênio (EROS) que danificam as proteínas, a membrana fosfolipídica e o DNA da célula. (PRZEDBORSKY *et al.*, 2008).

As reações inflamatórias secundárias à perda dos neurônios acometidos pela 6-OHDA ocorrem no local da lesão podendo atingir neurônios vizinhos. Em especial, o aumento da atividade microglial local, a qual promove a liberação de citocinas deletérias ao meio e o aumento da produção de EROS no espaço extracelular, o que pode exarcebar a perda dos neurônios dopaminérgicos e gerar prejuízos aos neurônios vizinhos. Estes achados têm sido propostos como fatores contribuintes à progressão dos processos neurodegenerativos nas áreas acometidas na DP, visto que o aumento da atividade microglial tem sido identificado em áreas afetadas pela doença (HE *et al.*, 2001; CICCHETTI *et al.*, 2002; PRZEDBORSKI *et al.*, 2008).

O modelo animal da DP com 6-OHDA mimetiza algumas das importantes características celulares encontradas na doença, ou seja, a perda de neurônios catecolaminérgicos, em especial, os neurônios dopaminérgicos da SNpc e a diminuição de DA no estriado. Além disso, alguns prejuízos comportamentais motores e não-motores encontrados na DP são observados no modelo. Estes prejuízos comportamentais motores estão relacionados com a perda dos neurônios dopaminérgicos do sistema nigro-estriatal e são responsivos à terapia com L-DOPA e agonistas dopaminérgicos. Contudo, os corpos de Lewy não são visualizados em neurônios afetados pela neurotoxina, sendo este fator uma

desvantagem importante encontrada no modelo (DAUER & PRZEDBORSKY, 2003; UVERSKY, 2004; KRAVITZ *et al.*, 2010).

Nos modelos animais de parkinsonismo com 6-OHDA, o nível de lesão no sistema nigro-estriatal depende especialmente da concentração de 6-OHDA utilizada nos animais e do tempo de sobrevivência após a injeção de 6-OHDA aos quais os animais são submetidos (PRZEDBORSKY *et al.*, 1995; CARDOSO, 2008). Przedborsky *et al.* (1995), ao injetarem a concentração de 0,65 , 1,25 , 2,5 e 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de 6-OHDA (em um volume total de 3,5  $\mu\text{l}$  para cada grupo) no estriado esquerdo de ratos da linhagem Sprague-Dawley , demonstraram uma crescente diminuição dos neurônios dopaminérgicos da SNpc de acordo com o aumento das concentrações utilizadas no estudo, com uma significativa redução dos neurônios dopaminérgicos já dentro das primeiras duas semanas das doze semanas de sobrevivência dos animais, sugerindo que uma mensuração no sistema nigro-estriatal após três semanas da lesão com 6-OHDA no estriado reproduz eficazmente os prejuízos nos neurônios nigrais ao longo do tempo neste modelo animal da DP.

Em relação à localização da injeção de 6-OHDA, a neurotoxina pode ser injetada na SNpc, no feixe prosencefálico medial ou no estriado. Quando é injetada diretamente no feixe prosencefálico medial ou na SNpc ocasiona morte neuronal dopaminérgica mais rápida (aguda) quando comparada à injeção na região do estriado, que apresenta uma perda neuronal retrógrada, mais lenta e progressiva (DAUER & PRZEDBORSKY, 2003; SCHOBER, 2004; BOVÉ *et al.*, 2005; CARDOSO, 2008).

Martí *et al.* (2002) injetaram 20  $\mu\text{g}/4\mu\text{l}$  de 6-OHDA no estriado esquerdo de ratos da linhagem Sprague-Dawley e demonstraram uma perda progressiva de neurônios TH+ da SNpc esquerda, com uma redução significativa já no quinto dia ( $-\leq 32\%$ ) , progredindo para  $-\leq 53\%$  no décimo quinto dia após a 6-OHDA.

Estudos com injeções bilaterais e unilaterais da 6-OHDA têm sido descritos na literatura. Injeções bilaterais de 6-OHDA no estriado mimetizam algumas características neuroquímicas iniciais da patologia e alguns sintomas não motores da DP, como as alterações neuropsiquiátricas e cognitivas (TADAIESKY *et al.*, 2008; BRANCHI *et al.*, 2010; CANNON & GREENAMYRE, 2010). Já as injeções unilaterais reproduzem alterações

comportamentais motoras que estão associadas a perdas efetivas no sistema nigro-estriatal, perda de neurônios dopaminérgicos da SNpc e diminuição de DA estriatal igual ou acima de 70% (BOVÉ *et al.*, 2005; ALVAREZ-FISHER *et al.*, 2008; CARDOSO, 2008).

As alterações comportamentais motoras do modelo unilateral de 6-OHDA podem ser avaliadas através da manifestação de comportamento motores rotatórios induzidos farmacologicamente por apomorfina ou anfetamina e por testes comportamentais motores espontâneos. Testes comportamentais motores podem ser meios adicionais de caracterizar o nível da lesão e de avaliar os efeitos de terapias neuroprotetoras (IANCU *et al.*, 2005; BOVÉ *et al.*, 2005; BROOKS & DUNNETT, 2009).

A droga apomorfina é um agonista de receptores dopaminérgicos administrada sistemicamente em roedores à observação de típicas respostas comportamentais motoras rotatórias assimétricas contralaterais à lesão estriatal, dados que se correlacionam com a dose de apomorfina utilizada e com a presença e com o nível de lesão no sistema nigro-estriatal unilateral no modelo unilateral de 6-OHDA (SCHAWARTING & HUSTON, 1996 a; BROOKS & DUNNETT; 2009).

As rotações motoras contralaterais à lesão estriatal após administração de apomorfina são atribuídas à maior ativação e/ou expressão dos receptores dopaminérgicos pós-sinápticos (D1 e D2) estriatais no lado do estriado injetado com 6-OHDA, em consequência da diminuição dos neurônios dopaminérgicos da SNpc e dos terminais axonais estriatais. Desta forma, a ação agonista da apomorfina causará maior ativação dos neurônios estriatais no lado lesado, com consequente aumento da excitação cortical ipsilateral à lesão estriatal, o que resultará em maior ativação muscular no lado contralateral da lesão devido à decussação das vias motoras descendentes. Alguns estudos demonstraram que a variação no número de receptores dopaminérgicos pós-sinápticos (D1 e D2) estriatais ipsilaterais à lesão com 6-OHDA está correlacionada com o tempo e o nível de lesão no sistema nigro-estriatal (SCHAWARTING & HUSTON, 1996 b; CARDOSO, 2008; BROOKS & DUNNETT, 2009).

No teste comportamental motor rotatório induzido por apomorfina também podem ocorrer respostas motoras atípicas como a ausência de rotação do animal e a presença de rotações ipsilaterais à lesão estriatal. Essas respostas atípicas podem estar relacionadas com a

dose de apomorfina utilizada no teste, com a densidade de lesão no sistema nigro-estriatal, com um aumento no número de receptores dopaminérgicos (D2) pós-sinápticos estriatais ipsilateral à lesão e com a presença de movimentos estereotipados durante o teste. Desta forma, a lesão no sistema nigro-estriatal é confirmada apenas após avaliação histológica (SCHAWARTING & HUSTON, 1996 a; IANCU *et al.*, 2005).

É importante ressaltar que estudos encontrados na literatura utilizando o modelo da DP com 6-OHDA propiciaram importantes avanços em relação aos mecanismos de perda celular dos neurônios dopaminérgicos no sistema nigro-estriatal, aos déficits comportamentais e ações terapêuticas relacionados a esta perda principalmente em ratos, encontrando-se bem caracterizado e validado nestes roedores. Em contraste, em camundongos, os estudos aumentaram somente nos últimos anos, necessitando de um quantitativo maior de pesquisas nesta espécie em diferentes linhagens.

Estudos prévios identificaram suscetibilidades diferentes ao MPTP entre as diferentes linhagens de camundongos, confirmando que a toxicidade do MPTP é dependente da raça dos camundongos (GIOVANNI *et al.*, 1991; SEDELIS *et al.*, 2000). Camundongos da linhagem *Swiss Webster* apresentaram baixa sensibilidade ao MPTP, com baixo efeito neurotóxico da toxina no sistema nigro-estriatal destes animais (GIOVANNI *et al.*, 1991). Seguindo essa tradição, a linhagem endo-cruzada C57BL/6 também é a mais usada em pesquisas relacionadas com o modelo animal da DP com 6-OHDA (CARDOSO, 2008; ALVAREZ-FISHER *et al.*, 2008; PRASAD & RICHFIELD, 2008; BAQUET *et al.*, 2009; BRANCHI *et al.*, 2010).

Alvarez-Fisher *et al.* (2008) e Cardoso (2008) avaliaram o curso temporal de perda celular de neurônios dopaminérgicos da SNpc de camundongos C57BL/6 no modelo unilateral de 6-OHDA no estriado esquerdo e demonstraram que uma perda efetiva (igual ou acima de 70%) fica estabelecida no 28º dia da injeção da toxina. Cardoso (2008) injetou 10 µg/2µl no estriado esquerdo de camundongos C57BL/6 e encontrou um aumento gradual no número de rotações contralaterais à lesão com o aumento no tempo de sobrevivência dos animais, dados que se correlacionaram com o aumento gradual da perda celular de neurônios dopaminérgicos da SNpc no estudo. Nesta pesquisa os diferentes tempos de sobrevivência dos animais 1, 3, 7, 14 e 28 dias pós-toxina foram analisados.

Cunningham e Su (2002) administraram a injeção de 16 µg/2µl de 6-OHDA no estriado direito de camundongos C57BL/6 e, após 14 dias pós-toxina, encontraram uma perda de 86% de células TH+ na SNpc. E Silva *et al.* (2005), ao injetarem 20 µg/2µl de 6-OHDA no estriado de camundongos C57BL/6 com sobrevivência de 28 dias, observaram uma perda de 79% dos neurônios dopaminérgicos da SNpc. Nestes estudos, os autores não avaliaram comportamentos motores dos animais.

O estudo de Alvarez-Fisher *et al.* (2008) avaliou a toxicidade da 6-OHDA em diferentes linhagens de camundongos. Neste estudo, os autores encontraram que o efeito neurotóxico da 6-OHDA nos camundongos C57BL/6, Suíços (*Swiss*) e SV129 não é dependente da linhagem, não apresentando diferenças estatisticamente significativas na perda de neurônios dopaminérgicos da SNpc e da DA no estriado. Entretanto, os autores não utilizaram o teste de rotação induzido farmacologicamente e os camundongos da linhagem suíços foram avaliados histologicamente apenas no tempo de sobrevivência de 7 dias após a injeção de 6-OHDA.

Os camundongos da linhagem suíços, diferentemente dos camundongos C57BL/6, são resultado de cruzamento ao acaso (*outbred*) e são heterogênicos. Essa linhagem, originária de um estoque na Suíça, foi levada aos Estados Unidos da América, onde foi inicialmente reproduzida, em 1984, no *Institute for Cancer Research* na Filadélfia, e por isso, é algumas vezes referida como linhagem ICR.

He *et al.* (2001) descreveram a perda progressiva de neurônios dopaminérgicos na SNpc e a reação microglial em camundongos ICR após à injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA. A análise foi feita em vários tempos de sobrevivência, que variou de poucas horas (6 e 12 horas) a dias (1, 3, 7 e 14 dias). Eles relataram diminuição de neurônios dopaminérgicos em 34% no sétimo dia e 42% no décimo quarto dia pós-toxina. Entretanto, eles não avaliaram tempos de sobrevivência maiores que 14 dias, e também não realizaram nenhuma análise comportamental no estudo.

Da Conceição *et al.* (2010) injetaram 10 µg/2µl de 6-OHDA no estriado esquerdo de camundongos suíços e verificaram o comportamento motor rotatório induzido por apomorfina semanalmente, durante 4 semanas, encontrando giros contralaterais à lesão já na primeira



semana de sobrevivência dos animais e giros contralaterais à lesão estriatal ao final de 30 dias pós-toxina. Entretanto, esses autores não apresentaram nenhuma descrição histológica da lesão nigro-estriatal.

Na literatura científica, apesar de existirem alguns estudos utilizando a 6-OHDA em camundongos suíços para testes de terapias neuroprotetoras, faz-se ainda necessário uma maior caracterização do modelo que utiliza a injeção intraestriatal de 6-OHDA a fim de que sejam melhor avaliados e estabelecidos os efeitos comportamentais e histológicos em diferentes concentrações da toxina.

Desta forma, esta pesquisa tem como objetivo avaliar os níveis de lesões na via nigro-estriatal e as alterações comportamentais motoras associadas em camundongos suíços, após lesão unilateral estriatal com 6-OHDA, em duas diferentes concentrações da toxina.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Descrever as alterações comportamentais e histológicas em camundongos suíços após injeção intraestriatal unilateral de 6-OHDA, em duas diferentes concentrações da toxina: 5 e 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o curso temporal da ambulação no teste do campo aberto 14 e 28 dias após injeção intraestriatal unilateral de 6-OHDA;
- Caracterizar o comportamento rotatório induzido por apomorfina 14 dias e 28 dias após injeção intraestriatal unilateral de 6-OHDA;
- Quantificar a perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc 28 dias após injeção de 6-OHDA;
- Determinar o grau de correlação entre a perda de neurônios dopaminérgicos da SNpc e as alterações comportamentais.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. ANIMAIS

Nesta pesquisa foram utilizados 27 camundongos machos, adultos, com idade entre 11 e 13 semanas, da linhagem suíço albino, pesando entre 38-47g, provenientes do biotério do Instituto Evandro Chagas. Antes e até o final dos experimentos os animais foram mantidos em cabines no biotério do Laboratório de Neuropatologia Experimental, com temperatura e umidade relativa do ar controladas ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ; 60%), em ciclo claro/escuro de 12/12h, alojados em gaiolas com no máximo 5 animais por gaiola, com a água e ração disponíveis *ad libitum*.

Todos os procedimentos utilizados nesta pesquisa foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (CEPAE-UFPA) sob o parecer No. BIO015-11 de 17 de setembro de 2010.

#### 3.2. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA PARA INJEÇÃO DE 6-OHDA NO ESTRIADO

Os animais foram anestesiados com 0,1 ml/10g de peso por via intraperitoneal com uma mistura de cloridrato de cetamina (Vetanarcol, 50 mg/ml) e cloridrato de xilazina (Kensol, 20 mg/ml) diluídos em solução de cloreto de sódio a 0,9%, sendo a dose final de 75 mg/kg de cetamina e 20 mg/kg de xilazina. Após a anestesia e certificação de que o animal não apresentava reflexos dolorosos, fixou-se a cabeça do camundongo no aparelho estereotáxico (INSIGHT, Ribeirão Preto) através de duas barras intra-auriculares inseridas no meato auditivo externo do animal e uma barra de fixação nos incisivos (Figura 1). Em seguida, realizou-se a tricotomia e assepsia da região superior da cabeça. Após incisão na pele com bisturi, foi feita remoção do tecido subcutâneo e do periósteo, desta forma expondo a superfície craniana entre o bregma e o lâmbida (Figura 2). Após a marcação das coordenadas ântero-posterior (A-P) e médio-lateral (M-L), realizou-se um orifício unilateral no lado esquerdo do crânio com broca elétrica. Através deste orifício, injetou-se solução de 6-OHDA (Sigma-Aldrich) através da seringa de Hamilton de 10  $\mu\text{l}$ . Ao final, a ferida cirúrgica foi

saturada com linha cirúrgica de propileno. Nos animais do grupo controle e no lado controle dos animais tratados com 6-OHDA não houve injeção.

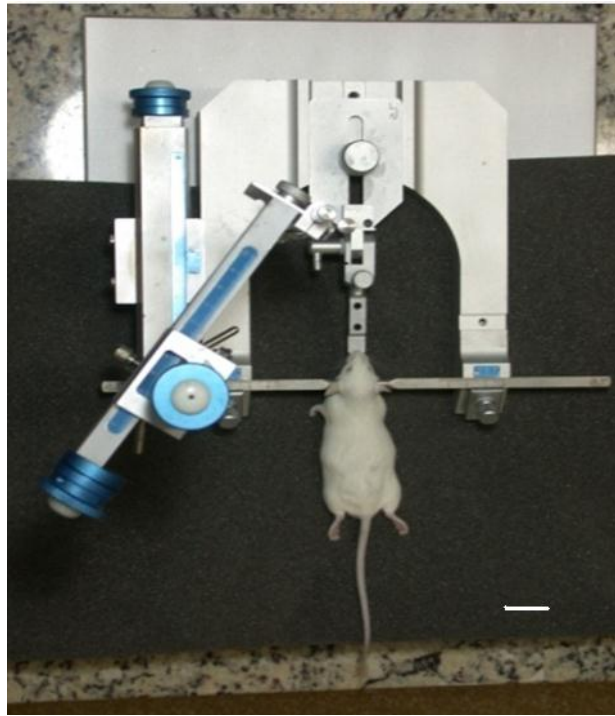


Figura 1 - Fixação da cabeça do animal no aparelho estereotáxico.

Escala da barra - 1 cm. Fonte: da autora.

A injeção de 6-OHDA foi realizada de forma manual através de uma única injeção unilateral no estriado esquerdo. A massa total utilizada neste estudo foi de 10  $\mu\text{g}$  (Grupo 1) ou 20  $\mu\text{g}$  (Grupo 2) de 6-OHDA dissolvida em 2  $\mu\text{l}$  de cloreto de sódio a 0,9% e ácido ascórbico (Sigma-Aldrich) a 0,02% , ou seja, uma concentração de 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Grupo 1) e 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Grupo 2). Durante o procedimento cirúrgico o volume total injetado da solução de 6-OHDA foi realizado através de microsseringa de Hamilton de 10  $\mu\text{l}$ , fixada no aparelho esterotáxico, em um tempo total de 5 minutos. A taxa de infusão foi de aproximadamente 0,4  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Após cada injeção da solução de 6-OHDA no estriado do animal, a seringa de Hamilton permaneceu no local por mais 3 minutos para a difusão adequada da neurotoxina. As coordenadas usadas foram: 1) Ântero-posterior (A-P) 0,8mm a partir de bregma; 2) Médio-lateral (M-L) 1,5 mm a partir da linha média; 3) Dorso-ventral (D-V) 3,0 mm a partir da

calota craniana, baseadas no Atlas de Estereotaxia para camundongos de Paxinos e Franklin (2004) e no trabalho de Cardoso (2008).



Figura 2 - Exposição da superfície craniana, com a ponta da seta indicando o lãmbida.

Escala da barra - 1 cm. Fonte: da autora.

### 3.3. AVALIAÇÃO DA AMBULAÇÃO NO TESTE DO CAMPO ABERTO

Todos os animais desta pesquisa realizaram o teste do campo aberto com objetivo de se avaliar o desempenho motor através do comportamento ambulatorio 24 horas antes da cirurgia, nos 14<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> dia pós-cirúrgicos. A ambulação de cada animal foi avaliada pelo número de vezes que o animal cruzava as linhas traçadas no assoalho do aparato de acrílico. A ambulação dos camundongos antes da cirurgia foi utilizada como linha de base para os resultados dos testes realizados após a cirurgia para injeção de 6-OHDA.

Para o teste, o animal foi colocado no centro de uma arena retangular de acrílico transparente, medindo 21 cm de largura por 30 cm de comprimento e 20 cm de altura. O assoalho do aparato estava dividido em 9 campos de 10 cm x 7 cm (Figura 3). O comportamento de ambulação dos animais foi registrado durante 5 minutos.



Figura 3 - Visão superior da arena usada no teste do campo aberto ilustrando o assoalho do aparato. Escala da barra - 10 cm. Fonte: da autora.

#### 3.4. AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO ROTATÓRIO INDUZIDO POR APOMORFINA

Animais do grupo controle e os tratados com 6-OHDA receberam a injeção de apomorfina (Sigma-Aldrich) na dose de 0,6 mg/kg dissolvida em solução salina a 0,9% (CARDOSO, 2008; IANCU *et al.*, 2005; PRZEDBORSKY *et al.*, 1995) por via subcutânea no 14<sup>o</sup> dia e no 28<sup>o</sup> dia após a injeção de 6-OHDA. Imediatamente após a injeção de apomorfina, camundongos foram colocados em aparato circular medindo 25,30 cm de diâmetro e 10,5 cm de altura (Figuras 4 e 5). As rotações foram registradas após serem completados giros de 360°, tanto para o lado contralateral quanto para o lado ipsilateral à injeção de 6-OHDA no estriado. Os giros só foram considerados quando ocorriam em torno do próprio eixo do animal, com contração. A resposta comportamental motora foi registrada por 20 minutos. Animais que no 28<sup>o</sup> dia pós-injeção de 6-OHDA apresentaram rotações contralaterais à lesão acima de 5 rpm (rotações por minuto) foram inseridos no estudo e animais que apresentaram rotações contralaterais à lesão abaixo de 5 rpm e respostas motoras atípicas foram excluídos da análise.

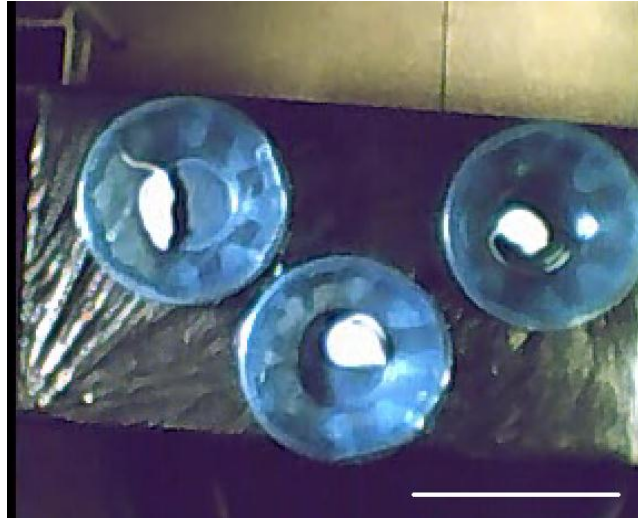


Figura 4 - Aparato usado no teste de rotação induzida por apomorfina, visão superior  
Escala da barra - 25 cm. Fonte: da autora.



Figura 5 - Aparato utilizado no teste de rotação induzida por apomorfina, visão lateral.  
Escala da barra - 10 cm. Fonte: da autora.

### 3.5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Nesta pesquisa, dois grupos de animais foram injetados com 6-OHDA através de cirurgia estereotáxica de forma unilateral no estriado esquerdo, em concentrações únicas de 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Grupo 1) e 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Grupo 2). Dos grupos tratados com 6-OHDA, cada animal serviu

de seu próprio controle, ou seja, para cada animal observado, o lado direito, cujo estriado não sofreu injeção, foi utilizado para comparação com o lado esquerdo, o lado injetado com 6-OHDA. Um terceiro grupo, não tratado com 6-OHDA, compôs o grupo controle. Este foi formado por 5 animais. Todos os grupos realizaram o teste do campo aberto um dia antes da cirurgia e no 14<sup>o</sup> dia e no 28<sup>o</sup> dia pós-cirúrgico para avaliação do comportamento deambulação. Ainda, como descrito anteriormente, no 14<sup>o</sup> dia e 28<sup>o</sup> dia pós-cirúrgico foi realizado o teste comportamental de rotações induzidas por apomorfina.

### 3.6. PERFUSÃO E OBTENÇÃO DAS SECÇÕES HISTOLÓGICAS

No 28<sup>o</sup> dia pós-cirúrgico os animais foram sacrificados com dose letal de cetamina/xilazina (375 mg/kg e 100 mg/kg, respectivamente) por via intraperitoneal e em seguida foram perfundidos, primeiramente com tampão fosfato salina (TFS) 0,1 M durante 4 minutos com pH entre 7,2-7,4, seguido de solução fixadora de paraformaldeído (PFA) a 4% em TFS 0,1 M, com pH entre 7,2-7,4, durante 6 minutos. Terminada a perfusão, foi realizada a craniotomia e o encéfalo foi removido e pós-fixado em PFA a 2% em TFS 0,1 M por 48 horas e, posteriormente, imerso em solução crioprotetora composta de sacarose a 30% em TFS 0,1 M por 72 horas. Após a crioproteção, os encéfalos foram congelados e, posteriormente, foram seccionados. Secções histológicas encefálicas coronais com espessura de 40 µm foram obtidas utilizando-se um aparelho de criostato (LEICA). As secções foram coletadas em 6 séries alternadas e armazenadas a 4-8°C em PFA a 2% até o momento da coloração imuno-histoquímica.

### 3.7. IMUNO HISTOQUÍMICA

Uma série, das seis séries alternadas coletadas de cada camundongo, foi marcada com imuno-histoquímica para TH (tirosina hidroxilase, enzima limitante da síntese de dopamina) no mesencéfalo e no estriado dos animais para identificar os neurônios dopaminérgicos da SNpc e suas projeções para o estriado. As colorações TH+ no estriado foram utilizadas para uma análise qualitativa dos terminais axônicos dos neurônios dopaminérgicos nigrais e na SNpc foram usadas para uma avaliação quantitativa dos corpos dos neurônios supracitados.



Foi utilizado anticorpo primário específico anti-TH feito em coelho na concentração de 1:1000 (Chemicon) e o anticorpo secundário anti-coelho na concentração de 1:200 (Jackson Immuno Research). Os complexos antígeno-anticorpo foram localizados através de uma reação da enzima peroxidase com kit ABC (complexo avidina-biotina, VECTOR) na concentração de 1:200 e visualizados com o cromógeno SG ( Vector/SK-4700).

O procedimento iniciou com algumas etapas visando a recuperação antigênica e inativação da peroxidase endógena na secções: imersão em tampão borato 0,2M, por 30 minutos, a aproximadamente 60°C; incubação em solução TF 0,1M e triton a 5% , por 20 minutos; incubação em solução com TF 0,1M contendo 10% de metanol e 10% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% , por 15 minutos (para inativação da peroxidase endógena).

Em seguida, incubação em TF 0,1M com soro normal de jumento (SNJ) a 5%, por 1 hora (para diminuir as ligações inespecíficas), incubação em solução contendo anticorpo primário descrito acima por 24 horas; incubação em solução contendo anticorpo secundário por 2 horas; incubação em TF 0,1M com ABC, por 1 hora, e visualização do complexo antígeno-anticorpo formado por SG. Após cada fase da imuno-histoquímica, as secções foram lavadas três vezes por 5 minutos com solução de TF 0,1M, com pH 7,2-7,4, até a etapa de incubação no anticorpo secundário.

Após a reação, as secções histológicas do estriado e mesencéfalo foram montadas em lâminas gelatinizadas e, em seguida, foram analisadas através da microscopia óptica. Na análise, o lado ipsilateral à lesão com 6-OHDA foi comparado com o lado contralateral à lesão.

### 3.8. ESTEREOLOGIA

A quantificação dos neurônios dopaminérgicos da SNpc foi feita através da estereologia, com o método do fracionador óptico, ou seja, o número total de neurônios dopaminérgicos da SNpc foi aferido a partir de uma amostra aleatória e sistemática de uma fração desta população que multiplicada por recíprocas frações chega-se ao valor total. O método do fracionador óptico é expresso pela seguinte fórmula:

$$N = \Sigma Q \times 1/ssf \times 1/asf \times 1/tsf$$

onde, N é a estimativa do total de células encontradas na estrutura estudada,  $\Sigma Q$  é a soma do total de células contadas com o fracionador, o ssf (“section slamping fraction”) é a razão entre o número de secções amostradas pelo número total de secções que abrange a estrutura, o asf (“area sampling fraction”) é a razão da área total de contagem sobre a área de contorno da estrutura e o tsf (“thickness slamping fraction”) é a razão entre a espessura analisada (eixo Z) pela espessura real da secção.

De cada animal foram contadas 6 secções em sentido rostro-caudal da SNpc de uma única série das seis séries alternadas coletadas, totalizando ao final 36 secções abrangendo a totalidade da SN. As secções coletadas inicialmente com espessura de 40  $\mu\text{m}$  mediram no momento da análise estereológica uma espessura média final de 15 a 20  $\mu\text{m}$ . O programa utilizado para a contagem dos neurônios foi o Stereologer versão 2.0 (SRC, Maryland, EUA) instalado em microcomputador com processador Pentium dual-core 2 GHz. O programa recebe informações de uma câmera CCD colorida de alta resolução (Toshiba IK-C44MD) e de uma platina motorizada nos eixos XYZ (Prior Scientific OptiScan) acopladas a um microscópio trinocular (Nikon Labophot-2). Para o desenho do contorno da SN utilizou-se objetiva de 2x e para as contagens, objetiva de 40x. A SNpc foi delimitada nas secções amostradas em sentido rostro-caudal através do atlas de estereotaxia para camundongos (Paxinos e Franklin, 2004). Para a identificação e inclusão dos neurônios na contagem foram considerados somente os pericários marcados com TH cujos núcleos eram visíveis.

### 3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados do teste comportamental de rotação induzida por apomorfina no 14<sup>o</sup> dia e no 28<sup>o</sup> dia pós-cirúrgico foram comparados através de teste t pareado nas comparações intragrupo (14<sup>o</sup> dia x 28<sup>o</sup> dia), e não pareado nas comparações intergrupo (10  $\mu\text{g}$  x 20  $\mu\text{g}$ ). Os resultados do teste comportamental de ambulação no campo aberto antes e após a cirurgia foram comparados pela análise de variância (ANOVA) de um critério e teste a posteriori de Bonferroni; as comparações intergrupo, pela análise de variância (ANOVA) de um critério .

Para análise da perda neuronal, comparou-se o número total de neurônios TH+ na SNpc do lado injetado e do lado não injetado através de teste t pareado; na comparação intergrupo utilizou-se teste t não pareado. A correlação de Pearson foi realizada para avaliar o grau de correlação entre perda neuronal, número de rotações induzidas por apomorfina, e ambulação. Análise de regressão linear foi usada para a definição da melhor reta ajustada aos dados. Os resultados foram expressos pela média aritmética  $\pm$  erro padrão de valores absolutos ou percentuais. A significância estatística foi definida como  $p < 0.05$ . A análise estatística e a confecção dos gráficos foram realizados utilizando-se o programa Prism versão 5.04 para Windows (GraphPad).

## 4. RESULTADOS

Nesta pesquisa avaliou-se o curso temporal de alterações motoras e o nível de perda de neurônios TH+ na via nigro-estriatal em camundongos da linhagem suíços após injeção intraestriatal unilateral de 6-OHDA, em duas massas diferentes da toxina: 10 e 20 µg.

### 4.1. ANIMAIS

Os animais tiveram acesso *ad libitum* à ração e água durante todas as etapas da pesquisa, sem perda de peso significativa. O índice de mortalidade dos animais foi de aproximadamente 0,3%, (apenas 1 animal) estando abaixo de índices de mortalidade relatados em experimentos prévios em camundongos (ALVAREZ-FISHER *et al.*, 2008; CARDOSO, 2008). Vinte e seis animais chegaram ao final do experimento de injeção de 6-OHDA, sendo 15 no Grupo 1 (10 µg de 6-OHDA) e 11 no Grupo 2 (20 µg de 6-OHDA). Ao todo, dos animais tratados com 6-OHDA, 8 animais foram excluídos da análise final a partir de critérios comportamentais: 5 animais não rodaram no teste de apomorfina após 28 dias, 2 animais rodaram ipsilateralmente à injeção de toxina no estriado, e 1 animal rodou menos do que 50 vezes no 28<sup>o</sup> dia. Um (nono) animal foi totalmente excluído da análise, devido à perda de material durante o processamento histológico. Ao final, foram analisados 9 animais no Grupo 1, e 8 animais no Grupo 2. Como as injeções de 6-OHDA foram unilaterais, o lado não injetado serviu de controle em relação ao lado injetado na análise histológica. Também fizeram parte da análise, 5 animais não injetados com 6-OHDA, que constituíram um grupo controle.

### 4.2. ANÁLISE QUANTITATIVA DA PERDA NEURONAL DOPAMINÉRGICA APÓS INJEÇÃO UNILATERAL DE 6-OHDA NO ESTRIADO: NÚMERO DE NEURÔNIOS IMUNORREATIVOS PARA TH (TH+) NA SUBSTÂNCIA NEGRA PARTE COMPACTA

Todos os animais dos Grupos 1 e 2 foram analisados. Empregando-se a metodologia estereológica, efetuou-se contagens sistemáticas de neurônios TH+ ao longo da substância

negra parte compacta (SNpc) tanto no lado injetado como do lado não injetado. O número total de neurônios TH+ de cada lado foi estimado através do método do fracionador óptico.

Os resultados encontrados mostraram uma diminuição significativa de neurônios TH+ na SNpc e de suas fibras de projeção no estriado esquerdo após injeção unilateral de 6-OHDA no estriado esquerdo de camundongos suíços, quando comparado ao lado contralateral à lesão, nas duas concentrações da toxina usadas no estudo.

Na análise quantitativa do Grupo 1 (10 µg), houve diminuição média de 74% de neurônios TH+ na SNpc esquerda em relação à direita, com valores de  $12.347 \pm 345$  (média  $\pm$  erro padrão) no lado direito (não injetado) e de  $3.222 \pm 434,8$  no lado esquerdo (injetado) (Figura 6).

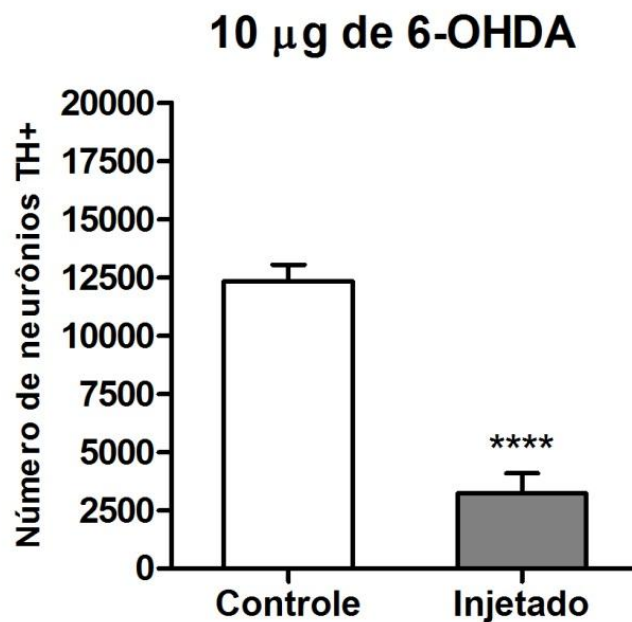


Figura 6 – Comparação da média de neurônios TH+ na SNpc 28 dias após a injeção de 10 µg/2µl de 6-OHDA no estriado esquerdo. A diferença foi significativa estatisticamente após teste t pareado ( $< 0,0001$ , \*\*\*\*), N=9.

No Grupo 2, no qual injetou-se 20  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$  de 6-OHDA, a redução média de neurônios TH+ na SNpc do lado injetado foi de 89,7%, com valores absolutos de  $11.244 \pm 350$  no lado controle (direito, não injetado) e de  $1.163 \pm 122$  no lado injetado (Figura 7).

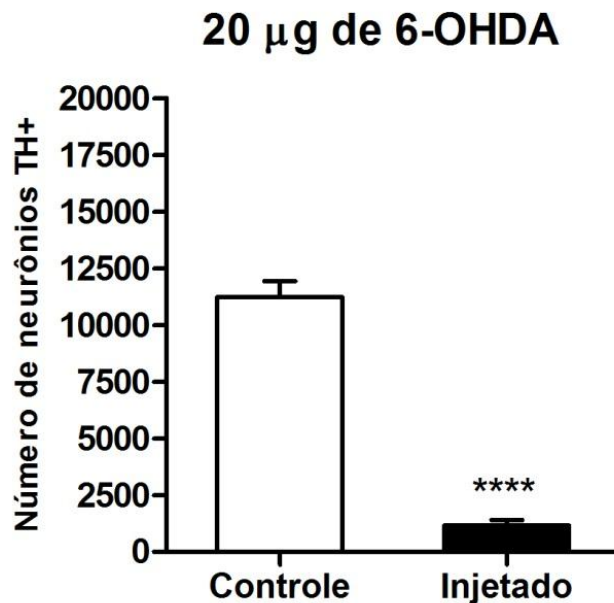


Figura 7 – Comparação da média de neurônios TH+ na SNpc 28 dias após a injeção de 20  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$  de 6-OHDA no estriado esquerdo. A diferença foi significativa estatisticamente após teste t pareado ( $< 0,0001$ , \*\*\*\*), N=8.

Em análise comparativa entre os grupos (1 e 2), não foi encontrada diferença estatisticamente significativa no número de neurônios TH+ na SNpc do lado não injetado. Entretanto, na comparação do lado esquerdo da SNpc entre os grupos injetados com 6-OHDA, foi verificado um número de neurônios TH+ significativamente menor no Grupo 2 (20  $\mu\text{g}$ ) quando comparado com o Grupo 1 (10  $\mu\text{g}$ ), indicando que a perda neuronal observada foi dependente da concentração de 6-OHDA (Figura 8). Em termos percentuais, a perda neuronal estimada também foi significativamente maior no Grupo 2 ( $89,46 \pm 2,013$ , N=8) em comparação com o Grupo 1 ( $75,50 \pm 5,524$ , N=9) (Figura 9).

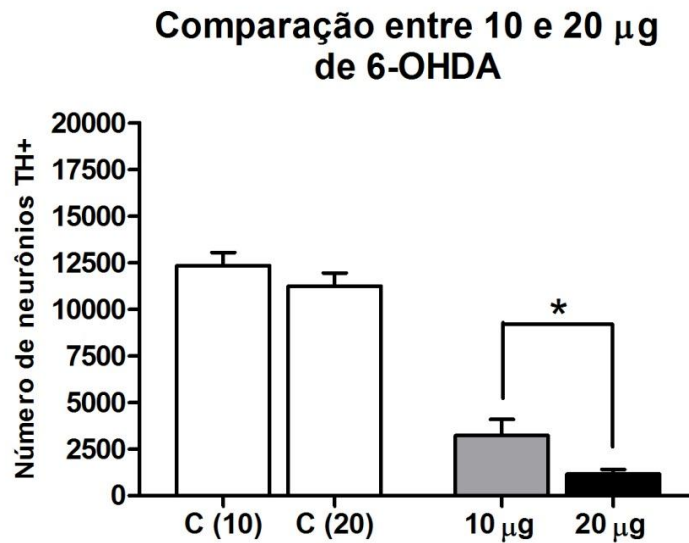


Figura 8 – Comparação da média de neurônios TH+ na SNpc 28 dias após a injeção de 10 ou 20  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$  de 6-OHDA no estriado esquerdo. Não houve diferença entre os lados não injetados (controles C-10 e C-20, barras brancas) após teste t não pareado ( $p>0,05$ ). Houve diferença significativa estatisticamente entre os lados injetados (barras cinza e preta) após teste t não pareado ( $< 0,05$ , \*), N=9 e N=8.

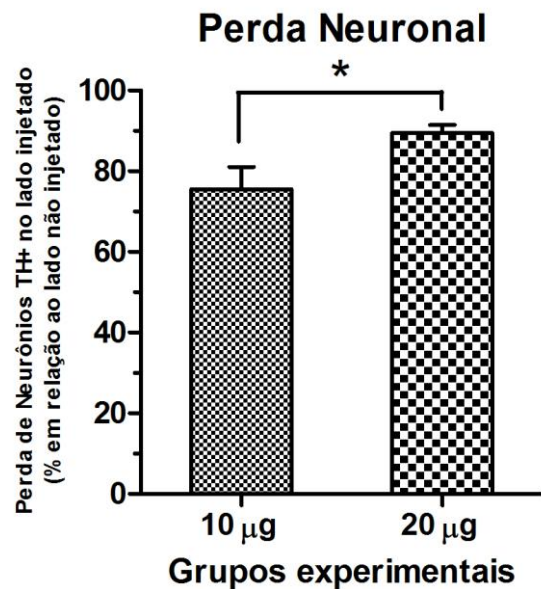


Figura 9 – Comparação do percentual médio de perda de neurônios TH+ na SNpc do lado injetado em relação ao lado não injetado, 28 dias após a injeção de 10 ou 20  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$  de 6-OHDA no estriado esquerdo. A perda neuronal média foi significativamente maior no Grupo 2 (20  $\mu\text{g}$ ) em relação à perda no Grupo 1 (10  $\mu\text{g}$ ) após teste t não pareado ( $< 0,05$ , \*), N=9 e N=8.

Em uma análise qualitativa no estriado ipsilateral à injeção foi observada perda expressiva da imunorreatividade para TH nas fibras dopaminérgicas 28 dias depois da injeção de 6-OHDA, independente de sua concentração. No estriado e SNpc ao lado direito não foram observadas alterações para TH+, em ambos os grupos avaliados (Figuras 10 e 11).

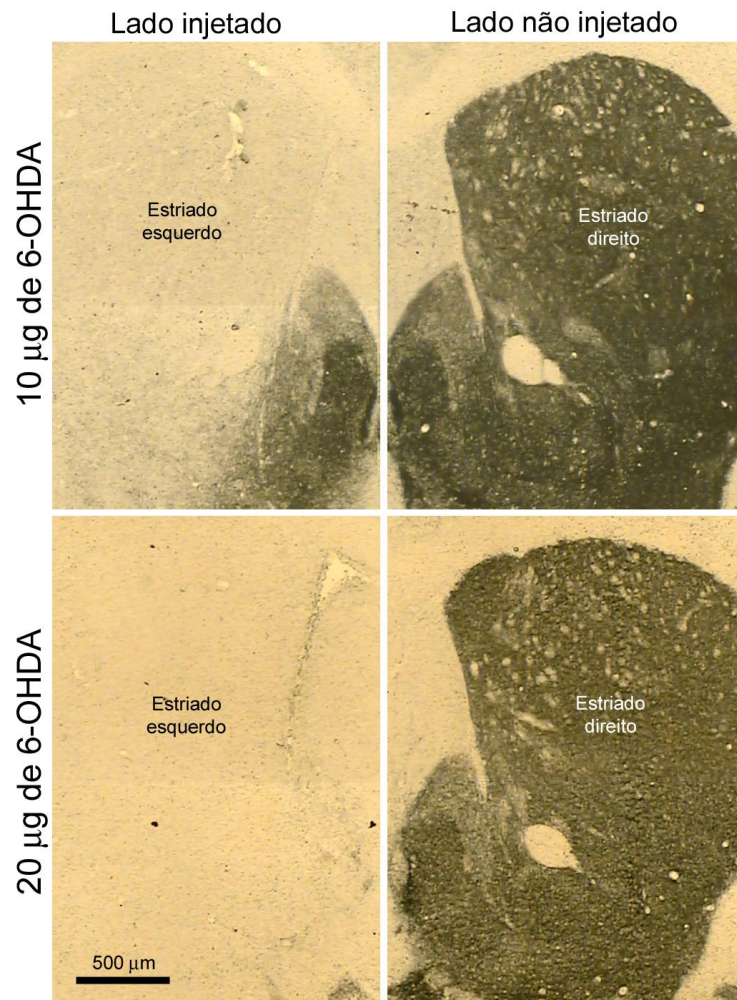


Figura 10- Imagens de secções representativas do núcleo estriado de animais injetados com 6-OHDA no estriado esquerdo em comparação com o lado direito (lado controle) de animais com 10 µg e 20 µg da toxina. As secções foram coradas para TH. Observa-se uma perda incompleta de TH+ em 10 µg e uma perda total de TH+ em 20 µg de 6-OHDA.



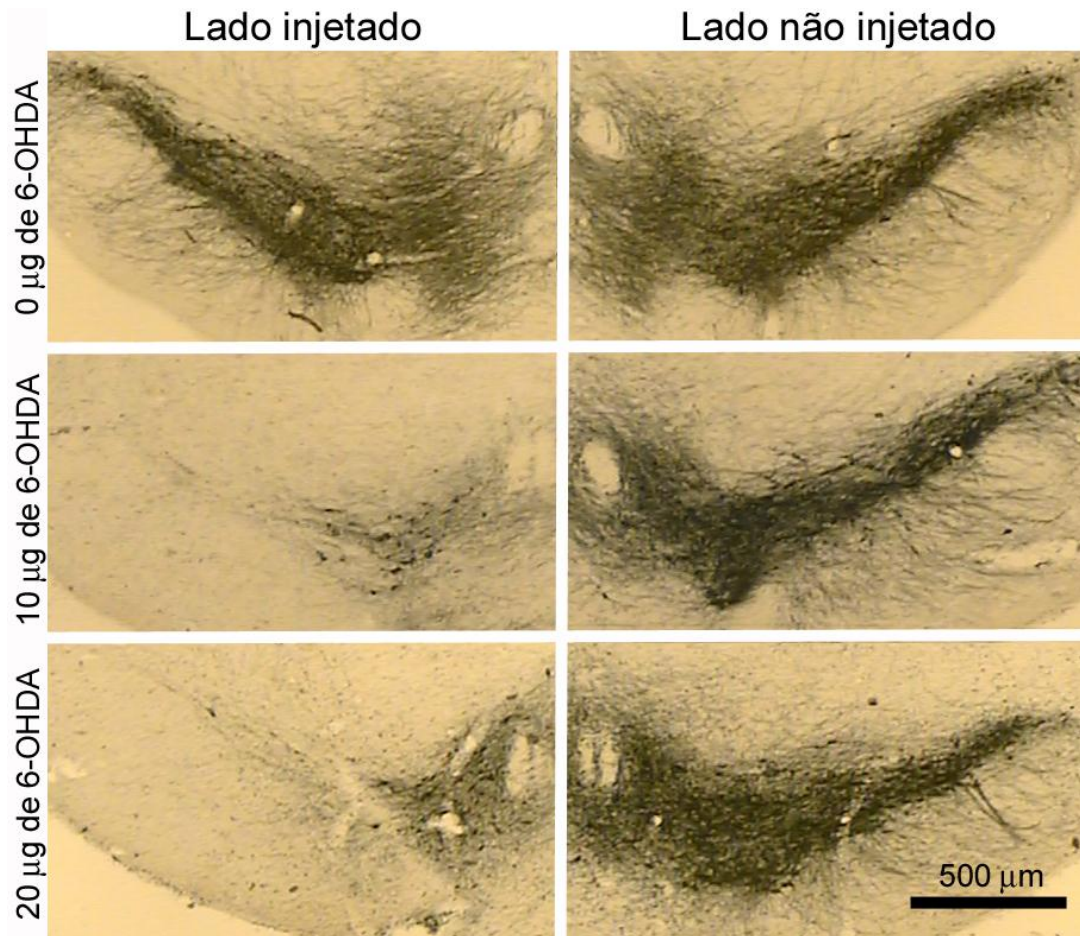


Figura 11- Imagens de secções representativas da SN de animais injetados com 10 µg e 20 µg de 6-OHDA no estriado esquerdo e de animais não injetados. As secções foram coradas para TH. Observa-se uma perda importante de TH+ em 10 µg e 20 µg no estriado de camundongos injetados com 6-OHDA.

#### 4.3. CARACTERIZAÇÃO DO CURSO TEMPORAL DO COMPORTAMENTO ROTATÓRIO INDUZIDO POR APOMORFINA

Camundongos suíços foram injetados com 10 µg/2µl ou 20 µg/2µl de 6-OHDA de forma unilateral no estriado esquerdo e seu comportamento rotatório induzido farmacologicamente foi avaliado no 14<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> dia após a cirurgia. O Grupo 1 (10 µg) apresentou uma média de rotações contralaterais de 169±15,2 (média ± erro padrão) no 14<sup>o</sup> dia e de 220±15,3 no 28<sup>o</sup> dia. As médias de rotações contralaterais nos dois dias foram diferentes estatisticamente como mostra a figura 12 ( $p < 0,05$ ).

### Teste da Apomorfina Grupo 10 $\mu\text{g}$ de 6-OHDA

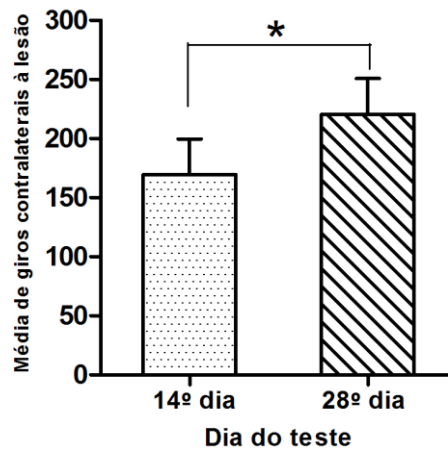


Figura 12 – Comparação da média de giros contralaterais induzidos por apomorfina 14 e 28 dias após a injeção de 10  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$  de 6-OHDA no estriado esquerdo. A diferença foi significativa estatisticamente após teste t pareado ( $p<0,05$ , \*),  $N=9$ .

O Grupo 2 (20  $\mu\text{g}$ ) apresentou uma média de rotações contralaterais de  $132\pm 10,3$  no 14º dia e de  $212\pm 8$  no 28º dia, verificando-se, como no Grupo 1, um aumento na média de rotações contralaterais nos animais entre os dois testes. A diferença foi significativa estatisticamente (Figura 13,  $p<0,01$ ).

### Teste da Apomorfina Grupo 20 $\mu\text{g}$ de 6-OHDA

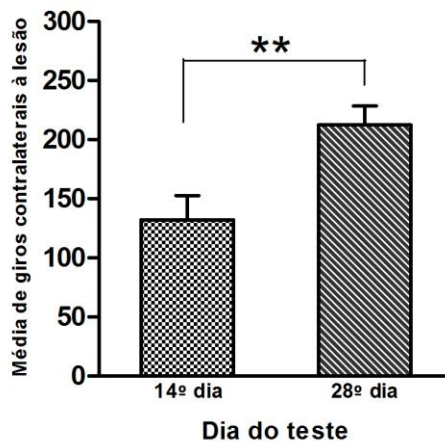


Figura 13 – Comparação da média de giros contralaterais induzidos por apomorfina 14 e 28 dias após a injeção de 20  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$  de 6-OHDA no estriado esquerdo. A diferença foi significativa estatisticamente após teste t pareado ( $p<0,01$ , \*\*),  $N=8$ .

Comparando-se as médias de rotações contralaterais entre os dois grupos, não houve diferença significativa nem no teste do 14<sup>o</sup> (Figura 14) e nem do 28<sup>o</sup> dia (Figura 15).

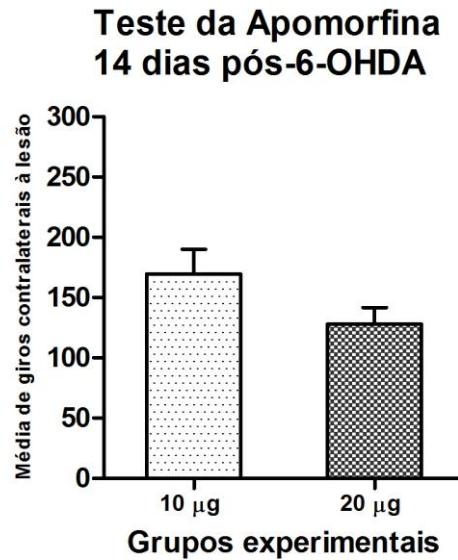


Figura 14 – Comparação da média de giros contralaterais induzidos por apomorfina entre o Grupo 1 (10 µg) e o Grupo 2 (20 µg) nos testes realizados no 14<sup>o</sup> dia após a injeção de 6-OHDA no estriado esquerdo. A diferença não foi significativa estatisticamente após teste t não pareado ( $p > 0,05$ ),  $N=9$  e  $N=8$ .

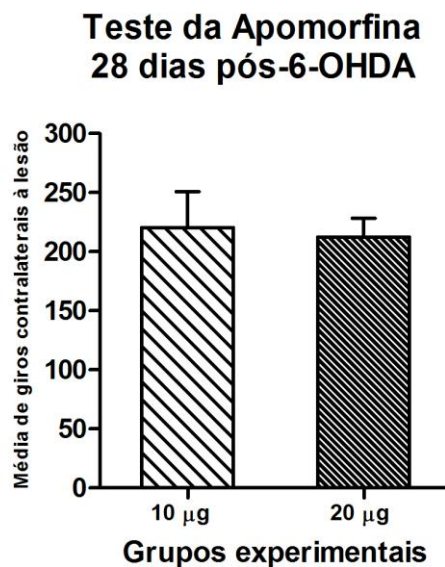


Figura 15 – Comparação da média de giros contralaterais induzidos por apomorfina entre o Grupo 1 (10 µg) e o Grupo 2 (20 µg) nos testes realizados no 28<sup>o</sup> dia após a injeção de 6-OHDA no estriado esquerdo. A diferença não foi significativa estatisticamente após teste t não pareado ( $p > 0,05$ ),  $N=9$  e  $N=8$ .

Analisando-se o percentual de aumento de rotações contralaterais entre o 14<sup>o</sup> e o 28<sup>o</sup> nos dois grupos, não houve diferença estatisticamente significativa, indicando que, na média, os dois grupos apresentaram uma evolução comportamental equivalente. O Grupo 1 teve um aumento percentual médio de  $24,8 \pm 8,3$  enquanto que o Grupo 2 esse aumento foi de  $37,9 \pm 7,9$  (Figura 16).

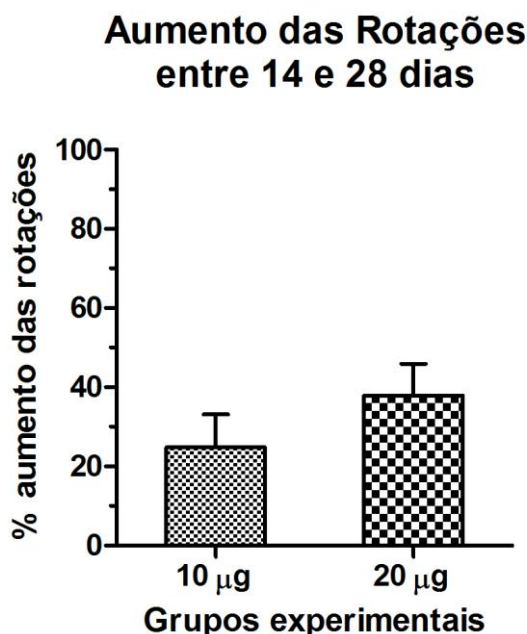


Figura 16 – Comparação do percentual médio de aumento nos giros contralaterais induzidos por apomorfina entre o 14<sup>o</sup> e o 28<sup>o</sup> dia após a injeção de 6-OHDA no estriado esquerdo no Grupo 1 (10 µg) e no Grupo 2 (20 µg). Para o cálculo do percentual, considerou-se como 100% o número de rotações no 28<sup>o</sup> dia. A diferença não foi significativa estatisticamente após teste t não pareado ( $p > 0,05$ ),  $N=9$  e  $N=8$ .

Camundongos não injetados com 6-OHDA não apresentaram nenhuma rotação após injeção com apomorfina (não ilustrado).

Durante o teste comportamental induzido por apomorfina foram observados em alguns camundongos a presença de algumas estereotipias, como farejar-se e roer-se, porém tais comportamentos não foram aferidos neste estudo, sendo, contudo, observados em alguns animais. Na literatura, a presença destas estereotipias durante o teste de apomorfina tem indicado uma diminuição no comportamento rotatório dos animais (SCHAWARTING & HUSTON, 1996 a; IANCU *et al.*, 2005).

#### 4.4. CARACTERIZAÇÃO DO CURSO TEMPORAL DA AMBULAÇÃO NO TESTE DO CAMPO ABERTO

Para a caracterização do curso temporal da ambulação no teste do campo aberto foram comparadas as médias do número de vezes em que o animal cruzava as linhas no assoalho do aparato. As avaliações foram feitas 24 h antes da cirurgia de injeção de 6-OHDA, 14 e 28 dias após a injeção. Nos camundongos injetados com 10 $\mu$ g de 6-OHDA foram encontradas as seguintes médias do número de linhas cruzadas: 88,5 $\pm$ 3,28 antes da cirurgia, 40,6 $\pm$ 2,25 no 14<sup>o</sup> dia e 59,67 $\pm$ 7 no 28<sup>o</sup> dia após a cirurgia. A comparação das médias demonstrou uma redução importante na ambulação nos camundongos após a 6-OHDA, com redução de quase 50% aos 14 dias e de 33% aos 28 dias em relação à linha de base (antes) (Figura 17).

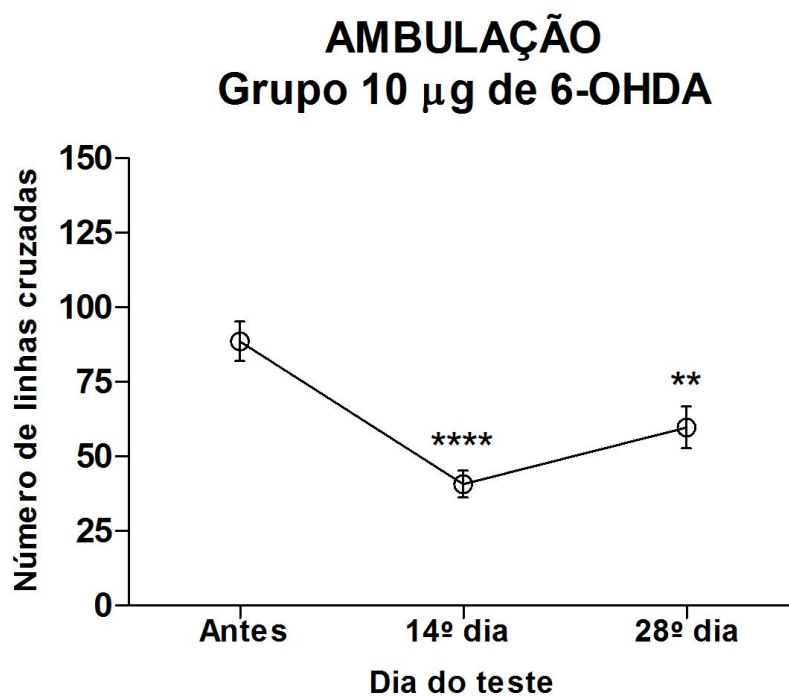


Figura 17 – Comparação do número de linhas cruzadas antes e após a injeção de 10  $\mu$ g/2 $\mu$ l de 6-OHDA no estriado esquerdo. Houve diferença significativa entre as médias obtidas (ANOVA de 1 critério,  $p < 0,0001$ ). O teste post-hoc de Bonferroni demonstrou diminuição significativa no 14<sup>o</sup> e no 28<sup>o</sup> dia após a injeção de 6-OHDA em relação à linha de base, mas não detectou diferença significativa entre as médias aos 14 e 28 dias, N=9.

No grupo 2, injetado com 20  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$  de 6-OHDA, a média de linhas cruzadas antes da cirurgia foi de  $85,38\pm 5,2$  e após a cirurgia foi de  $45,50\pm 4$  no 14<sup>o</sup> e de  $63,25\pm 3$  no 28<sup>o</sup> dia, respectivamente. Em relação a comparação antes e após a 6-OHDA, houve, estatisticamente, uma redução expressiva na média de linhas cruzadas apenas no 14<sup>o</sup> dia com 49% de redução em relação à linha de base. Não houve diferença significativa entre a média do 28<sup>o</sup> dia e a linha de base (Figura 18).

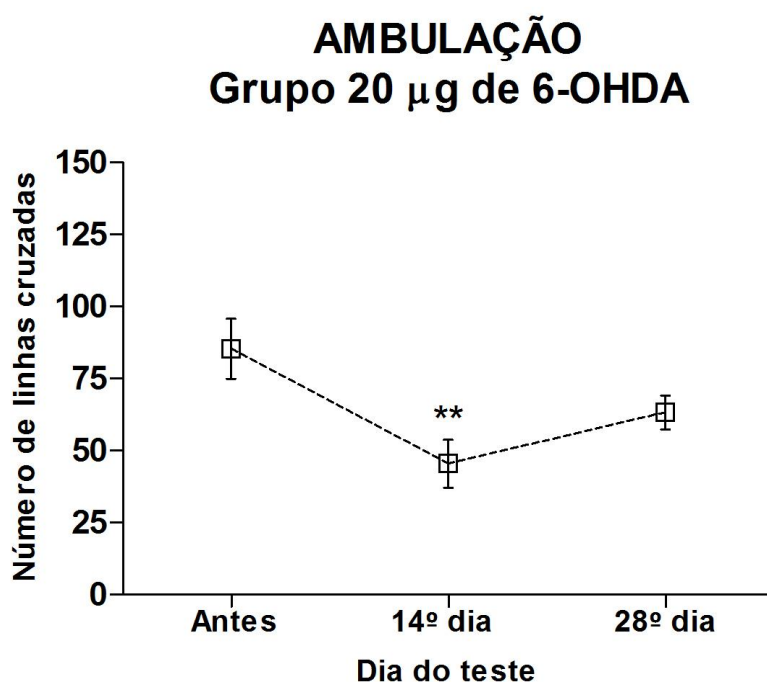


Figura 18 – Comparação do número de linhas cruzadas antes e após a injeção de 20  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$  de 6-OHDA no estriado esquerdo. Houve diferença significativa entre as médias obtidas (ANOVA de 1 critério,  $p < 0,05$ ). O teste post-hoc de Bonferroni demonstrou diminuição significativa apenas no 14<sup>o</sup> após a injeção de 6-OHDA em relação à linha de base, mas não detectou diferença significativa entre as médias aos 14 e 28 dias, e nem entre 28 dias e a linha de base,  $N=8$ .

No grupo controle, não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias (ANOVA de 1 critério,  $p > 0,05$ ). Também não foi detectado diferenças significativas entre as médias de ambulação comparando-se os 3 grupos (ANOVA de 1 critério,  $p > 0,05$ ). Esses resultados estão ilustrados de forma gráfica nas figuras 19 e 20.

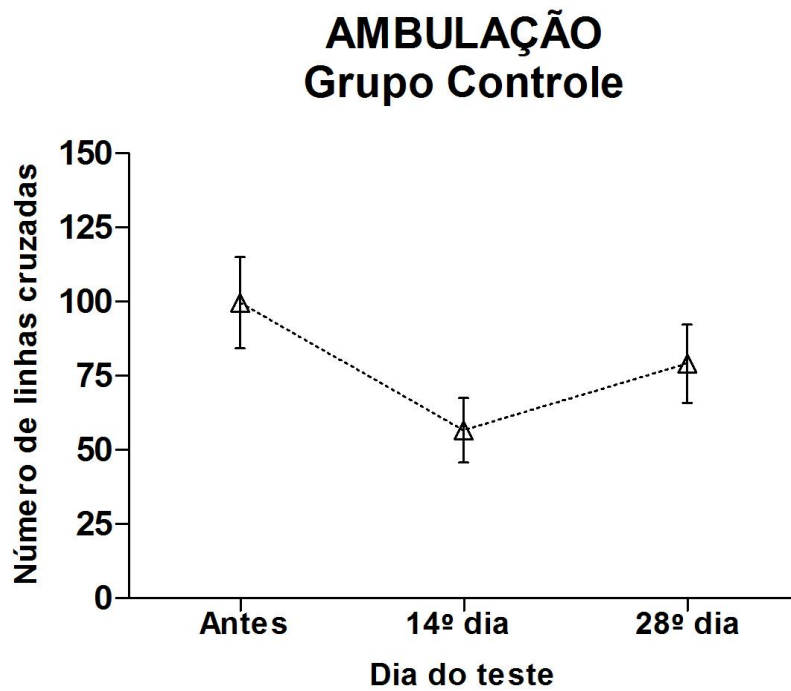


Figura 19 – Comparação do número de linhas cruzadas do grupo controle em período similar ao grupo injetado com 6-OHDA. Não houve diferença significativa entre as médias obtidas (ANOVA de 1 critério,  $p < 0,05$ ),  $N=5$ .

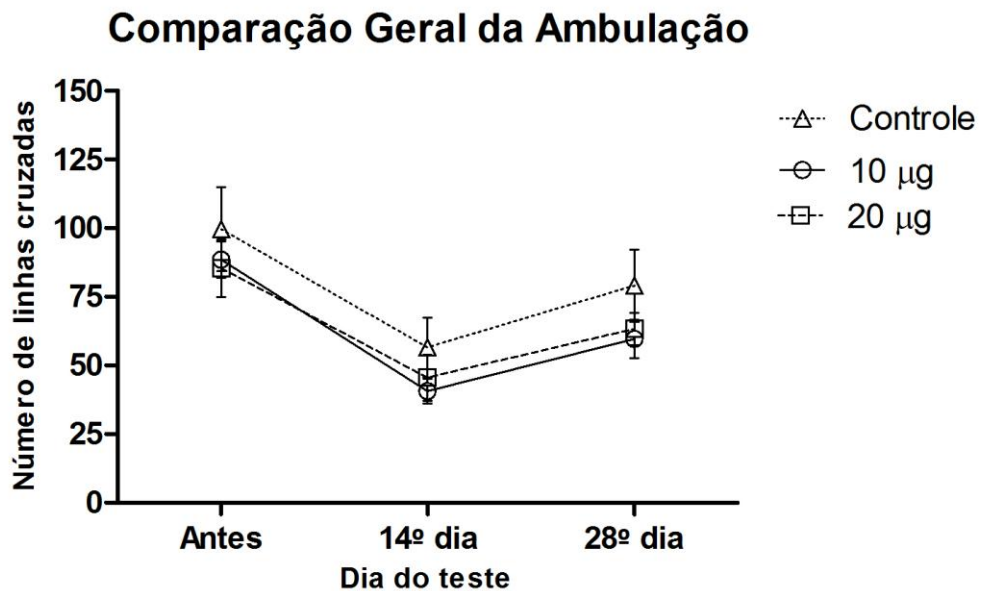


Figura 20 – Comparação do número de linhas cruzadas entre os animais do Grupo Controle (triângulos vazados), Grupo 1 (10 µg, círculos vazados) e Grupo 2 (20 µg, quadrados vazados) em cada dia do teste. Não houve diferença significativa entre os grupos na comparação das médias em cada dia de teste (ANOVA de 1 critério,  $p < 0,05$ ).  $N=5$  (controle),  $N=9$  (10 µg) e  $N=8$  (20 µg).

#### 4.5. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE A PERDA DE NEURÔNIOS TH+ NA SNpc E AS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS

A fim de serem verificadas correlações entre os parâmetros comportamentais analisados e a perda neuronal, realizou-se uma análise de correlação. Os resultados mostraram que a perda neuronal na SNpc possuiu boa correlação positiva com o número de rotações induzidas por apomorfina analisada após 28 dias (Pearson,  $p < 0,0001$ ,  $r^2=0,68$ ). Já em relação à ambulação analisada no 28º dia, não houve uma boa correlação com a perda neuronal (Pearson,  $p > 0,05$ ,  $r^2=0,12$ ) (Figura 21). Para efetuar tal análise, considerou-se a perda neuronal em valores percentuais de perda no lado injetado em relação ao lado não injetado. Além dos dados dos grupos injetados com 6-OHDA, foram incluídos os dados das variáveis comportamentais (ambulação e rotações) avaliados no grupo controle (N=5), e assumiu-se que a perda neuronal neste grupo foi nula.

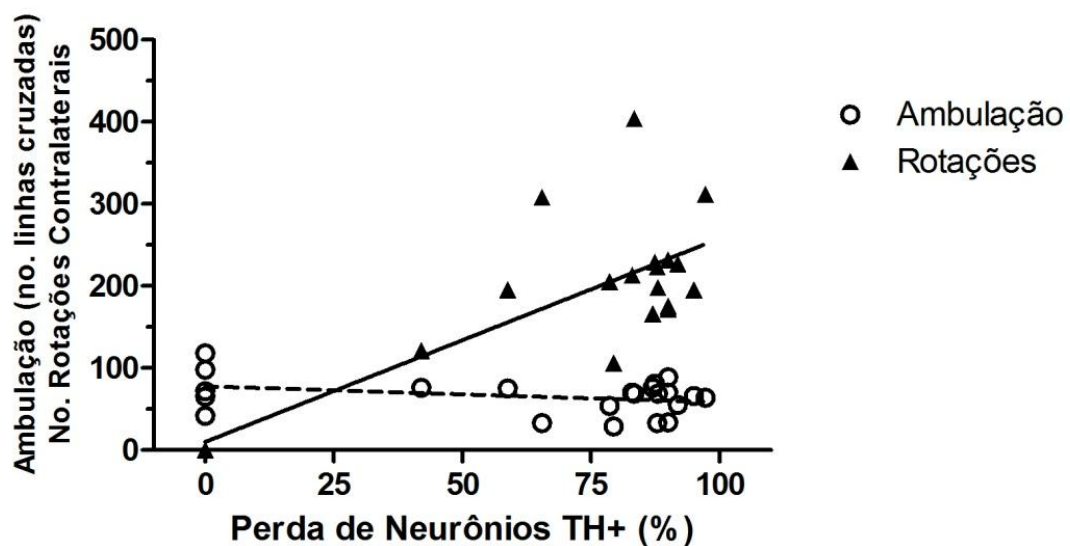


Figura 21 – Análise de correlação entre a perda neuronal na SNpc e parâmetros comportamentais no 28º dia pós-cirúrgico. Houve correlação positiva da perda neuronal com o número de rotações induzidas por apomorfina (triângulos cheios, linha contínua) no 28º dia pós-6-OHDA (Pearson,  $p < 0,0001$ ,  $r^2=0,68$ ). Já em relação à ambulação analisada no 28º dia (círculos vazados, linha tracejada), não houve correlação com a perda neuronal (Pearson,  $p > 0,05$ ,  $r^2=0,12$ ). As retas foram traçadas por regressão linear e suas inclinações mostraram-se muito diferentes estatisticamente ( $p < 0,0001$ ),  $N=22$ .



Também foi realizada análise de correlação a fim de verificar se os parâmetros comportamentais analisados na metade do período de sobrevivência (14 dias) guardavam alguma correlação com a perda neuronal aferida ao final do experimento (28 dias). Os resultados são mostrados na Figura 22. Como na análise anterior, apenas o número de rotações aferidos aos 14 dias, mas não a ambulação, apresentou boa correlação com a perda neuronal ao final de 28 dias pós-injeção de 6-OHDA.

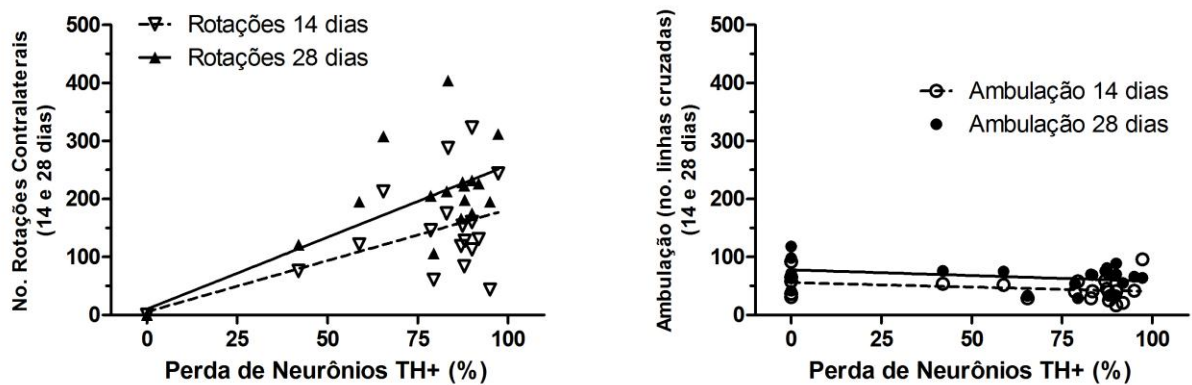


Figura 22 – Análise de correlação entre a perda neuronal na SNpc e parâmetros comportamentais nos 14<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> dia pós-cirúrgico. Assim como as rotações aferidas no 28<sup>o</sup> dia (triângulos cheios, linha contínua), houve boa correlação positiva da perda neuronal com o número de rotações induzidas por apomorfina aferido no 14<sup>o</sup> dia pós-cirúrgico (triângulos vazados, linha tracejada) (Pearson,  $p < 0,001$ ,  $r^2 = 0,49$ ). Já em relação à ambulação analisada no 14<sup>o</sup> dia (círculos vazados, linha tracejada), não houve uma boa correlação com a perda neuronal (Pearson,  $p > 0,05$ ,  $r^2 = 0,08$ ). As retas foram traçadas por regressão linear. Na comparação das inclinações entre 14 e 28 dias, não houve diferença significativa estatisticamente nem para o número de rotações e nem para a ambulação ( $p > 0,05$ ),  $N = 22$ .

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. DIMINUIÇÃO DE NEURÔNIOS TH+ NA VIA NIGRO-ESTRIATAL

A análise quantitativa demonstrou uma diminuição estatisticamente significativa no número de neurônios dopaminérgicos TH+ da SNpc no lado ipsilateral à injeção estriatal de 6-OHDA, em ambas as concentrações utilizadas. Nossos resultados mostraram que a diminuição dos neurônios TH+ após 28 dias foi dependente da concentração de 6-OHDA, ou seja, foi significativamente mais elevada com a maior massa usada no estudo (20 µg). Resultados equivalentes foram relatados por Przedborsky *et al.* (1995) em ratos Sprague-Dawley, após injetar 0,65, 1,25, 2,5 ou 5 µg de 6-OHDA no estriado esquerdo, demonstrando uma diminuição crescente dos neurônios dopaminérgicos na SNpc dependente da concentração da toxina.

Alguns estudos prévios do modelo de injeção intraestriatal unilateral de 6-OHDA em camundongos relataram as perdas neuronais no sistema nigro-estriatal. Alvarez-Fisher *et al.* (2008) utilizaram injeções intraestriatais de 2 ou 4 µg de 6-OHDA e relataram uma perda de neurônios TH+ na SN de 75% após 28 dias. CARDOSO (2008) relatou uma perda de 70% nos neurônios dopaminérgicos da SNpc 28 dias após injeção de 10 µg no estriado. Cunningham e Su (2002) injetaram 16 µg e observaram perda celular de 86% na SN 14 dias após a administração da toxina. Silva *et al.* (2005) administraram 20 µg da toxina no estriado e registraram perda de 79% de neurônios TH+ na SNpc após 28 dias. Todos os estudos citados foram realizados em camundongos da linhagem C57BL6 e demonstraram, em sua grande maioria, que em um tempo de sobrevivência de 28 dias pós-toxina, com injeção de massas baixas e altas de 6-OHDA, ocorre uma perda igual ou superior a 70% dos neurônios dopaminérgicos da SNpc.

Em nosso estudo, foi avaliada a toxicidade da 6-OHDA em camundongos da linhagem suíços, em um tempo de sobrevivência de 28 dias após a injeção de 10 ou 20 µg da toxina. Nossos resultados demonstraram uma perda de 75,5% dos neurônios dopaminérgicos da SNpc no Grupo 1 (de 10 µg de 6-OHDA) e de 89,5% no Grupo 2 (de 20 µg). Alvarez-Fisher *et al.* (2008) também utilizaram camundongos suíços, porém o estudo nessa linhagem foi realizado apenas nos tempos de sobrevivência de 3 e 7 dias, sendo observado perda de 28,4% e de 51%,

respectivamente, de neurônios TH+ na SNpc. Nossos resultados contribuem para a literatura científica dos modelos animais da DP, confirmando que a toxicidade da 6-OHDA não é dependente da raça de camundongos, fato que não ocorre no modelo animal da DP induzido por MPTP.

As causas da perda neuronal mais expressiva no grupo de animais que recebeu 20 µg não foram avaliadas nesta pesquisa, contudo acredita-se que com a maior quantidade de 6-OHDA circulante no espaço intersticial do estriado, ocorra maior captação da neurotoxina pelos terminais axônicos dopaminérgicos, gerando um efeito potencial neurotóxico maior dentro da célula, culminado com sua degeneração. Desta forma, nossos resultados mostraram que camundongos suíços apresentaram perdas neuronais severas no sistema nigro-estriatal nas duas concentrações de 6-OHDA utilizadas no estudo, sendo o efeito dependente de concentração.

## 5.2. COMPORTAMENTO ROTATÓRIO INDUZIDO POR APOMORFINA

O comportamento rotatório induzido por apomorfina é encontrado na literatura como preditivo do grau de lesão unilateral no sistema nigro-estriatal (SCHAWARTING & HUSTON, 1996 b; IANCU *et al.*, 2005; CARDOSO, 2008; BROOKS & DUNNETT, 2009). Rotações contralaterais e/ou ipsilaterais à lesão estriatal são comportamentos motores que podem ser observados durante o teste. Estas respostas antagônicas estão associadas ao nível de lesão no sistema nigro-estriatal e à presença de alterações morfológicas e funcionais nos neurônios espinhosos médios do estriado (INGHAM *et al.*, 1993; PRZEDBORSKY *et al.*, 1995; SCHAWARTING & HUSTON, 1996 b; INGHAM *et al.*, 1998; IANCU *et al.*, 2005; CARDOSO, 2008). Rotações assimétricas contralaterais à lesão estriatal só ocorrem quando animais já apresentam lesão avançada no sistema nigro-estriatal, sendo por este motivo mais fidedignas como indicador comportamental da presença de degeneração unilateral de neurônios dopaminérgicos da SNpc. Na literatura, relata-se que a intensidade dos giros contralaterais à lesão estriatal estão correlacionados com a extensão da lesão no sistema nigro-estriatal dos animais (PRZEDBORSKY *et al.*, 1995; SCHAWARTING & HUSTON, 1996 b; CARDOSO, 2008)

Neste estudo, comparou-se o comportamento rotatório de dois grupos de animais que receberam 10 ou 20 µg de 6-OHDA no estriado. Fizeram parte da análise, apenas animais que apresentaram rotações contralaterais acima de 100 vezes no teste do 28<sup>o</sup> dia. Em ambos os grupos foi observado o aumento das rotações contralaterais à lesão estriatal com o tempo, ou seja, entre o 14<sup>o</sup> e o 28<sup>o</sup> dia pós-toxina. Estes resultados são similares com os achados por Cardoso (2008) e Da Conceição *et al.* (2010).

Cardoso (2008), que avaliou o curso temporal das rotações induzidas por apomorfina em camundongos da linhagem C57BL6 após 10 µg de 6-OHDA no estriado esquerdo, também encontrou um aumento do número de giros contralaterais à lesão estriatal em 28 dias quando comparados com 14 dias. Se for considerado que este comportamento rotatório se correlacionou com a intensidade da lesão nigro-estriatal, então a diferença comportamental entre o 14<sup>o</sup> e o 28<sup>o</sup> dia pós-toxina indicou que a degeneração ainda não se estabilizou no 14<sup>o</sup> dia, e que ainda progrediu após este dia.

Da Conceição *et al.* (2010) injetaram 10 µg de 6-OHDA no estriado esquerdo de camundongos suíços e também verificaram que o comportamento motor rotatório contralateral à lesão induzido por apomorfina ficou mais efetivo ao final de 30 dias pós-toxina quando comparado com 7 dias. Este resultado é semelhante aos nossos achados por demonstrar o aumento progressivo dos giros contralaterais à lesão com o aumento no tempo de sobrevivência dos animais pós-toxina e por ter estabelecido um período final do teste muito próximo dos 28 dias usados em nossa pesquisa. Além disso, os autores demonstraram 95% de lesão bem sucedida quando foram considerados giros contralaterais à lesão acima de 7 rpm (rotações por minuto) após injeção de apomorfina. Em nosso estudo foi encontrado que este comportamento motor com pontuação já acima de 5 rpm indicou a presença de lesão no sistema nigro-estriatal, independente da concentração usada.

Comparando-se a média de rotações entre os grupos injetados com 10 µg ou 20 µg inseridos na pesquisa, não se observou diferenças nem em valores absolutos de rotações no 14<sup>o</sup> ou no 28<sup>o</sup> dia pós-toxina, e nem no percentual de aumento entre esses dois testes. Tais resultados sugerem uma evolução comportamental equivalente entre os animais dos diferentes grupos, independente da concentração de 6-OHDA injetada. Contudo, ao serem considerados

os animais excluídos da pesquisa, observou-se uma frequência de insucesso das rotações contralaterais no 28<sup>o</sup> dia pós-toxina em 40% no grupo 1 e 20% no grupo 2.

### 5.3. CARACTERIZAÇÃO DO CURSO TEMPORAL DA AMBULAÇÃO NO TESTE DO CAMPO ABERTO

Nesta pesquisa camundongos suíços injetados com 10 µg de 6-OHDA apresentaram uma redução estatisticamente significativa na média de linhas cruzadas após a cirurgia em comparação com a linha de base (antes da cirurgia), tanto em 14 dias como em 28 dias, com uma maior redução em 14 dias (50%). Por outro lado, o grupo injetado com 20 µg da toxina apresentou diminuição da ambulação após a cirurgia, detectada apenas no teste realizado no 14<sup>o</sup> dia, com uma redução de 49%. Estes resultados mostraram que a alteração comportamental na ambulação não era progressiva com o tempo de sobrevivência do animal, como foi encontrado no teste de apomorfina.

Ao ser avaliada a ambulação em animais controle, não foram observadas diferenças significativas nas médias de ambulação em relação à linha de base. E na comparação entre o grupo controle e os dois grupos injetados, não houve diferenças estatisticamente significativas no comportamento ambulatorio em nenhum dos testes, indicando que houve uma evolução comportamental equivalente, independente, portanto, da injeção de 6-OHDA.

Uma diminuição na ambulação após a cirurgia foi observada por Cardoso (2008) tanto em animais injetados com 6-OHDA como em animais controles, sendo que tal redução foi mais acentuada logo após à cirurgia (24h), indicando um efeito relacionado ao procedimento cirúrgico. A diminuição da ambulação observada mais tardiamente, 14 ou 28 dias após a cirurgia, tem sido relacionada à habituação dos animais ao teste, sendo que Cardoso (2008) relatou uma diminuição mais acentuada em animais injetados com 6-OHDA. A diminuição na ambulação também poderia ter ocorrido pela diminuição da motricidade espontânea no lado contralateral à lesão estriatal consequente à depleção do neurotransmissor dopamina no estriado lesado.

#### 5.4. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE A PERDA DE NEURÔNIOS TH+ NA SNpc E AS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS

Avaliando-se todos os animais da pesquisa, foi observada uma boa correlação ( $r^2=0,68$ ) entre a perda neuronal após 28 dias de sobrevida dos animais e o comportamento rotatório contralateral à lesão estriatal tanto aos 14 dias, como aos 28 dias pós-6-OHDA. Este achado demonstra que as duas variáveis aumentam ou diminuem conjuntamente, ou seja, quando ocorre uma maior perda de neurônios dopaminérgicos da SNpc haverá um maior número de rotações contralaterais à lesão estriatal e vice-versa.

Por outro lado, comparando-se o número de rotações entre os grupos injetados com 10 ou 20 µg de 6-OHDA, não se observou uma diferença significativa nem no 14<sup>o</sup> e nem no 28<sup>o</sup> dia pós-cirúrgico, apesar da perda neuronal TH+ ter sido significativamente maior no grupo de 20 µg. Isto indica que o teste de rotações induzidas por apomorfina foi um bom indicador de lesões severas no sistema nigro-estriatal, mas não teve sensibilidade para distinguir as lesões obtidas com as duas concentrações utilizadas no estudo. Estes resultados ocorreram ou porque elas causaram uma lesão severa demais, ou porque tiveram conseqüências distintas sobre os receptores dopaminérgicos pós-sinápticos e/ou sobre os neurônios espinhosos médios. Futuros estudos, em camundongos suíços, são necessários para elucidar essas hipóteses.

Przedborsky *et al.* (1995) injetaram diferentes concentrações de 6-OHDA (0,65, 1,25, 2,5 e 5 µg/µl, em um volume total de 3,5 µl para cada grupo) no estriado esquerdo de ratos da linhagem Sprague-Dawley e mostraram uma diminuição dos neurônios dopaminérgicos da SNpc dependente de concentração. Entretanto ao compararem os resultados obtidos nas duas concentrações mais altas (2,5 e 5 µg/µl), observaram que não houve um aumento no número de giros contralaterais à lesão estriatal dependente de concentração. Esses resultados foram explicados por um aumento mais acentuado de receptores dopaminérgicos D2 pós-sinápticos, uma maior diminuição de receptores de DA nos terminais axônicos nigrais e por uma perda de 15% da área estriatal nos animais que receberam 5 µg/µl.

Mecanismos compensatórios envolvendo receptores dopaminérgicos pós-sinápticos D1 e D2, como um aumento em ambos os receptores, ou um aumento no número de

receptores dopaminérgicos (D2) pós-sinápticos estriatais ipsilateral à lesão de 6-OHDA já foram descritos na literatura (SCHAWARTING & HUSTON, 1996 a; SCHAWARTING & HUSTON, 1996 b). Um aumento dos receptores D2 dopaminérgicos pós-sinápticos tem sido associado em lesões severas do sistema nigro-estriatal, em altas concentrações de 6-OHDA, como descrito na concentração de 5 µg/µl na pesquisa de Przedborsky *et al.* (1995). A apomorfina, agonista dopaminérgico, agiria nos receptores D2 pós-sinápticos sensibilizados e em maior número inibindo a saída de sinais excitatórios do tálamo ao córtex, diminuindo assim a atividade motora no hemisfério contralateral dos camundongos (KRAVITZ *et al.*, 2010). Isto explicaria a ausência de progressão significativa no comportamento rotatório contralateral à lesão estriatal nos animais injetados com 20 µg, comparados aos animais do Grupo de 10 µg de 6-OHDA, assim como a variabilidade de respostas no teste de apomorfina durante a consolidação da lesão no grupo G2, onde alguns animais apresentaram número elevado de rotações contralaterais à lesão estriatal já após 14 dias, sem grande evolução até o 28<sup>o</sup> dia. Estudos mais detalhados visando a avaliação dos receptores dopaminérgicos no estriado e dos efeitos sobre os neurônios intrínsecos estriatais, em concentrações altas de 6-OHDA em camundongos, são necessários para confirmar essas possibilidades.

Considerando todos os animais da pesquisa, houve uma correlação fraca entre a perda de neurônios TH+ aos 28 dias de sobrevivência e o comportamento de ambulação no teste do campo aberto. Por conseguinte, o teste de ambulação no campo aberto não pode ser considerado como um teste preditivo adequado para a degeneração no sistema nigro-estriatal após injeção de 6-OHDA.

Finalmente, nosso estudo sugere que, em camundongos suíços, o modelo animal da DP com injeção unilateral de 6-OHDA no estriado, utilizando-se 10 ou 20 µg de massa da toxina, mimetiza eficazmente as perdas avançadas de neurônios dopaminérgicos da SNpc, e essa perda neuronal se correlaciona com a presença de comportamento rotatório induzido por apomorfina, podendo esta linhagem de camundongos ser utilizada de forma confiável em experimentos para investigação de terapias celulares e de neuroproteção para a doença de Parkinson.

## 6. CONCLUSÕES

6.1. A injeção intraestriatal de 10  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$  ou 20  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$  de 6-OHDA em camundongos Suíços produziu diminuição significativa, dependente de concentração, de neurônios dopaminérgicos TH+ na SNpc ipsilateral 28 dias após à injeção.

6.2. O comportamento rotatório induzido por apomorfina aumentou com o tempo de sobrevida após injeção unilateral intraestriatal de 10  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$  ou 20  $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$  de 6-OHDA.

6.3. O comportamento rotatório induzido por apomorfina correlacionou-se com a perda unilateral de neurônios TH+ na SNpc.

6.4. O comportamento ambulatório não se correlacionou com a perda unilateral de neurônios TH+ na SNpc.



## 7. BIBLIOGRAFIA

ALVAREZ-FISHER, D.; HENZE, C.; STRENZE, C.; WESTRICH, J.; FERGER, B.; HOGLINGER, GU.; OERTEL, W. H.; HARTMANN, A. Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and - synuclein-deleted mice. **Experimental Neurology**, v. 210, p. 182-193, 2008.

ANDREW, R.; WATSON, D. G.; BEST, S. A.; MIDGLEY, J. M.; WENLONG, H.; PETTY, R. The determination of hydroxydopamine and other trace amines in the urine of Parkinsonian patients and normal controls. **Neurochemical Research**, v.18, n. 11, p. 1175-1177, 1993.

BAQUET, Z. C., et al. A comparasion of Model-based (2D) and Desing-Based(3D) stereological methods for estimanting cell number in the substantia nigra pars compacta (SNpc) of the C57BL/6J mouse. **Neuroscience**, v.161, p.1082-1090, 2009.

BETARBET, Ranjita, et al. Selective microglial activation in the rat rotenone model of Parkinson's disease. **Neuroscience Letters**, v. 341, p. 87-90, 2003.

BETARBET, Ranjita, et al. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. **Nature Neuroscience**, v. 3, n. 12, p. 1301-1306, 2000.

BOVÉ, J.; PROU, D.; PERIER, C.; PRZEDBORSKI, S. Toxin-Induced Models of Parkinson's Disease. **NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental Neuro Therapeutics**, v. 2, p. 484-494, 2005.

BRAAK, Heiko, et al. Stanley Fahn Lecture 2005: The Staging Procedure for the Inclusion Body Pathology Associated with Sporadic Parkinson's Disease Reconsidered. **Moviment Disorders**, v. 21, n. 12, p. 2042-2051, 2006.

BRAAK, Heiko; DEL TREDICI, Kelly. Nervous System pathology in sporadic Parkinson's Disease. **Neurology**, v. 70, p. 1916-1925, 2008.

BRANCHI, I.; D'ANDREA, I.; ARMIDA, M.; CARNEVALE, D.; AJMONE-CAT, M. A.; PÈZZOLA, A.; POTENZA, R. L.; MORGESE, M. G.; CASSANO, T.; MINGHETTI, L.; POPOLI, P.; ALLEVA, E. Striatal 6-OHDA lesion in mice: Investigating early neurochemical changes underlying Parkinson's disease. **Behavioral Brain Research**, Rome, v. 208, p. 137-143, 2010.

BROOKS, S. P.; DUNNET, S. B. Tests to asses motor phenotype in mice: a user's guide. **Nature Neuroscience**, v. 10, p. 519-529, 2009.

CALABRESI, P.; PICCONI, B.; TOZZI, A.; DI FILIPPO, M. Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. **Trends in Neuroscience**, v. 30, n. 5, p. 211-219, 2007.

CANNON, Jason. R.; GREENAMYRE, J. Timothy. Neurotoxic *in vivo* models of Parkinson's disease: recent advances. **Progress in Brain Research**, v. 184, p. 17-27, 2010.

CARDOSO, V. S. L. **Modelo de Doença de Parkinson em camundongos baseado na injeção unilateral de 6-OHDA no estriado: caracterização do curso temporal e das alterações comportamentais e da degeneração nigroestriatal**. 2008. 67 f.. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia Celular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.

CICCHETTI, A., et al. Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging. **European Journal of Neuroscience**, v. 15, p. 991-998, 2002.

CICCHETTI, Francesca; DROUIN-QUELLET, Janelle; GROSS, Robert E. Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, n. 9, p. 475-483, 2009.

DA CONCEIÇÃO, F. S. L., et al. Murine Model for Parkinson's Disease: from 6-OH Dopamine Lesion to Behavioral Test. **JoVE**, v. 35, 2010. <http://www.jove.com/index/Details.stp?>>

CUNNINGHAM, L. A.; SU, C. Astrocyte delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor in a mouse model of Parkinson's Disease. **Experimental Neurology**, v. 174, p. 230-242, 2002.

DAUER, W.; PRZDEDBORSKI, S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. **Neuroscience**, v. 39, p. 889-909, 2003.

DE LAU, L. M. L.; BRETELER, M. M. B. Epidemiology of Parkinson's Disease. **The Lancet Neurology**; v.5, p. 525-535, 2006.

FERRO, M. M., et al. 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. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 148, p. 78-87, 2005.

GIOVANNI, A., et al. Correlation between the neostriatal content of the 1-methyl-4-phenylpyridinium species and dopaminergic neurotoxicity following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration to several strains of mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 257, p. 691–697, 1991.

GORELL, J. M., et al. Multiple Risk Factors for Parkinson's Disease. **Journal Neurology Science**, v. 271, p. 169-174, 2004.

HE, Yi; APPEL, Stanley; LE, Weidong. Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6- hydroxydopamine injection into mouse striatum. **Brain Research**, v. 909, p. 187-193, 2001.

HÖGLINGER, G. U., et al. Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 84, p. 491-502, 2003.

HÖGLINGER, G. U.; OERTEL, W. H.; HIRSCH, E. C. The Rotenone model of Parkinsonism – the five years inspection. **Journal Neural Transm- Suppl**, v. 70, p. 1- 4, 2006.

HUNG, C-W., et al. Ageing and neurodegenerative diseases. **Ageing Research Reviews**, v. 95, p. S36-S46, 2010.

IANCU, R., et al. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA- lesion model of Parkinson's disease in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 162, p. 1-10, 2005.

INGHAM, C. A.; HOOD, S. H.; TAGGART, P.; ARBUTHNOTT, G. W. Plasticity of Synapses in the Rat Neostriatum after Unilateral Lesion of the Nigrostriatal Dopaminergic Pathway. **The Journal of Neuroscience**, v.18, n. 12, p. 4732-4743, 1998.

INGHAM, C. A.; HOOD, S. H.; MALDEGEN, B.; WEENINK, A.; ARBUTHNOTT, G. Morphological changes in the rat neostriatum after unilateral 6- hydroxydopamine injections into the nigrostriatal pathway. **Experimental Brain Research**, v. 93, n. 1, p. 17-27, 1993.

JOEL, D.; WEINER, I. The connections of the dopaminergic system with the striatum in rats and primates: an analysis with respect to the functional and compartmental organization of the striatum. **Neuroscience**, vol. 96, n.3, p. 451-474, 2000.

KRAVITZ, A.; FREEZE, B.; PARKER, P.; KAY, K.; THWIN, M.; DEISSEROTH, K.; KREITZER, A. Regulation of Parkinsonian motor behaviour by optogenetic control of basal ganglia circuitry. **Nature Letters**, v. 466, p. 622-630, 2010.

LIM, S. Y.; FOX, S. H.; LANG, A. E. Overview of the Extranigral Aspects of Parkinson Disease. **Archive Neurol.** v. 66, n. 2, p. 167-172, 2009.

MARTÍ, Maria J., et al. Striatal 6- hydroxydopamine induces apoptosis of nigral neurons in the adult rat. **Brain Research**, v. 958, p. 185-191, 2002

MAYEUX, R. Epidemiology of neurodegeneration. **Annual Review Neuroscience**, v. 26, p. 81-104, 2003.

NISHIMURA, F., et al. Potencial use of Embryonic Stem Cells for the Treatment of Mouse Parkinson Models: Improved Behavior by Transplantation of In Vitro Differentiated Dopaminergic Neurons from Embryonic Stem Cells. **Stem Cells**, v. 21 , p. 171-180, 2003.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. J. **The Mouse Brain in stereotaxia coordedimates**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004.

PRZEDBORSKI, S.; ZHOU, C.; HUANG, Y. Oxidative Stress in Pakinson's Disease: A Mechanism of Pathogenic and Therapeutic Significance. **Ann NY Acad Science**, v. 1147, p. 93- 104, 2008.

PRZEDBORSKI, S., et al. Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. **Neuroscience**, v. 67, p. 631-647, 1995.

PRASAD, K; RICHFIELD, E. K. Sporadic midbrain dopamine neuron abnormalities in laboratory mice. **Neurobiology of Disease**, v.32, p.262-272, 2008.

SEDELIS, M., et al. MPTP Susceptibility in the Mouse: Behavioral, Neurochemical, and Histological Analysis of Gender and Strain Differences. **Behavior Genetics**, v. 30, n 3, p.171-182, 2000.

SILVA, R. M., et al. CHOP/GADD153 is a mediator of apoptotic death in substantia nigra dopamine neurons in an *in vivo* neurotoxin model of parkinsonism. **Journal Neurochem**, v. 95, p. 974-986, 2005.

SCHWARTING, R.; HUSTON J. The Unilateral 6-Hydroxydoamine Lesions Model in Behavioral Brain Research. Analysis of Functional Deficts, Recovery And Treatments. **Progress in Neurobiology**, v. 50, p. 275-331, 1996 (a).

SCHWARTING, R.; HUSTON J. Unilateral 6-Hydroxydoamine Lesions of Meso-Striatal Dopamine Neurons And Their Physiological Sequelae. **Progress in Neurobiology**, v. 49, p. 215-266, 1996 (b).

SHEPHERD, G. M. The Synaptic Organization of the Brain. 4. ed. New York: Oxford University Press, 1998.

SCHOBBER, A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's Disease: 6-OHDA and MPTP. **Cell Tissue Research**, v. 318, p. 215-224, 2004.

TADAIESKY, M. T., et al. Emotional, Cognitive And Neurochemical Alterations In A Premotor Stage Model Of Parkinson's Disease. **Neuroscience**, v. 156, p. 830-840, 2008.

TANNER, C. M., et al. Rotenone, Paraquat, and Parkinson's Disease. **Environmental Health Perspectives**, v. 119, p. 866-872, 2011.

UVERSKY, V. N. Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. **Cell Tissue Research**, v. 318, p. 225-241, 2004.

WICHMANN, T.; DELONG, M. R. Functional and pathophysiological models of the basal ganglia. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 6, p. 751-758, 1996.

WHISHAW, I. Q.; KOLB, B. **Neurociência do Comportamento**. 1. ed. São Paulo: Manole, 2002.

ZHU, Chunni, et al. Behavioral and immunohistochemical effects of chronic intravenous and subcutaneous infusions of varying doses of rotenone. **Experimental Neurology**, v. 187, p. 418-429, 2004.