



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

**MODELO DE DOENÇA DE PARKINSON EM CAMUNDONGOS
BASEADO NA INJEÇÃO UNILATERAL 6-HIDROXIDOPAMINA NO
ESTRIADO: CARACTERIZAÇÃO DO CURSO TEMPORAL E DAS
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E DA DEGENERAÇÃO
NIGROESTRIATAL**

**BELÉM/PARÁ
2008**

VÁLDINA SOLIMAR LOPES CARDOSO

**MODELO DE DOENÇA DE PARKINSON EM CAMUNDONGOS
BASEADO NA INJEÇÃO UNILATERAL 6-HIDROXIDOPAMINA NO
ESTRIADO: CARACTERIZAÇÃO DO CURSO TEMPORAL E DAS
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E DA DEGENERAÇÃO
NIGROESTRIATAL**

Dissertação apresentado 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: Dra. Elizabeth Sumi Yamada

BELÉM/PARÁ

Julho/2008

VÁLDINA SOLIMAR LOPES CARDOSO

**MODELO DE DOENÇA DE PARKINSON EM CAMUNDONGOS BASEADO NA
INJEÇÃO UNILATERAL 6-HIDROXIDOPAMINA NO ESTRIADO:
CARACTERIZAÇÃO DO CURSO TEMPORAL DAS ALTERAÇÕES
COMPORTAMENTAIS E DA DEGENERAÇÃO NIGROESTRIATAL**

Dissertação apresentado 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^a Dr^a Elizabeth Sumi Yamada

Instituto de Ciências Biológica, UFPA

Comissão Examinadora

Prof^o Dr. Jofre Jacob da Silva Freitas

Centro de Ciências Biológica, UEPA

Prof^o Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma

Núcleo de Medicina Tropical, UFPA

Prof^a Dr^a Márcia Consentino Kronka Sosthenes

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

**BELÉM/PARÁ
Julho/2008**

“O verdadeiro cientista nunca perde a capacidade de se encantar. Esta é a essência do seu ser”

J. Robert Oppenheimer (1904-1967)

Aos meus pais, Domingos Reis Cardoso e Waldomira Lopes Cardoso, meus maiores companheiros na jornada da vida. Com eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a DEUS pela presença, força e esperança nos momentos de desânimo e desespero. Meu Deus, muito obrigada!

Aos meus pais, Domingos e Waldomira, e aos meus irmãos, pelo amor e apoio incondicional, em todos os momentos. Muito obrigada, eu também amo vocês incondicionalmente!

A Professora Elizabeth Yamada, orientadora deste trabalho, pela paciência, confiança, dedicação, incentivo e amizade. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos e pela compreensão nos momentos difíceis! Muito obrigada!!

Ao meu amor, Jorge Costa, pela força, paciência, amor e confiança. Obrigada por cuidar de mim! Esta vitória é nossa! Eu amo você...

Aos meus amigos João Paulo Coimbra, Natália Pontes, Kátia Kietzer, Jean Michel por suas valiosas contribuições durante a execução deste trabalho. Obrigada pela presteza, pelo companheirismo e por proporcionarem um ambiente de trabalho muito agradável. Muito obrigada, companheiros!

Aos colegas mestrado em Neurociências e do Laboratório de Neuropatologia Experimental, HUUJBB/UFPA pelos momentos que passamos juntos nesta difícil, porém gratificante jornada. Obrigada!

As companheiras da Casa de Estudante: Rafaela Ribeiro, Carol Caires, Camila Oliveira, Fabiana Silva, Daniele, Drik Carvalho, Marisol, Leila, Tatiana e Leidy Silva, pelo companheirismo, principalmente nos momentos difíceis, pelos inesquecíveis momentos de descontração e pela troca de conhecimento (reflexão) essencial para as nossas vidas. Vocês ficarão guardadas na minha memória... Valeu companheiras!!

A CAPES, pelo auxílio financeiro.

Resumo

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa comum, que afeta principalmente pessoas idosas. Caracteriza-se pela morte progressiva de neurônios dopaminérgicos do sistema nigroestriatal, levando ao aparecimento de sintomas que caracterizam a tétrede clássica da doença: tremor em repouso, rigidez muscular, bradicinesia e instabilidade postural. Há evidências de que tanto fatores genéticos como ambientais contribuam para o desenvolvimento da doença. A fim de se melhor entender os mecanismos subjacentes à doença vários modelos animais foram desenvolvidos que mimetizam algum aspecto da degeneração dopaminérgica envolvida na DP. A injeção intracerebral de 6-OHDA é um dos modelos mais utilizados. Esta toxina é preferencialmente injetada no estriado ou na substância negra, onde promove destruição seletiva de neurônios catecolaminérgicos da via nigroestriatal. Quando a injeção é unilateral, os animais apresentam um comportamento rotatório estereotipado após indução farmacológica e tal comportamento tem sido muito usado pra medir o grau de degeneração nigroestriatal. Este modelo está bem caracterizado em ratos e tem sido uma ferramenta útil para testar terapias celulares ou farmacológicas com potencial neuroprotetor. Camundongos, assim como ratos, também são largamente utilizados em diversos estudos relacionados à DP. O presente trabalho teve como objetivo melhorar a caracterização do modelo de hemiparkinsonismo baseado em uma injeção única intraestriatal unilateral de 6-OHDA em camundongos C57BL6, visando avaliar o curso temporal da degeneração dos neurônios dopaminérgicos na substância negra e o grau de correlação entre a degeneração neuronal e alterações comportamentais. Os nossos resultados mostraram que, após uma única injeção de 10 µg de 6-OHDA no estriado, ocorre degeneração progressiva dos neurônios nigrais em função do tempo de sobrevivência, e que existe uma correlação alta entre a taxa de degeneração e o comportamento rotatório induzido por apomorfina. Comportamentos motores espontâneos de ambulação e bipedestação tiveram correlação menor com a degeneração. Portanto, sugerimos que o comportamento rotatório induzido por apomorfina é um bom indicativo do grau de assimetria na via nigroestriatal de camundongos com hemiparkinsonismo induzidos por 6-OHDA e que pode ser uma ferramenta muito útil em experimentos que visem testar terapias com potencial neuroprotetor para a doença de Parkinson.

Palavras chaves: Doença de Parkinson, 6-hidroxidopamina, neurodegeneração.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a common neurodegenerative disease that affects mainly elderly people. It is characterized by the progressive cell death of dopaminergic neurons in the nigrostriatal system, which causes the development of the classic tetrad of symptoms: resting tremor, muscular rigidity, bradykinesia and postural instability. There is evidence that both genetic and environmental factors play a role in the development of the disease. In order to better understand the mechanisms underlying this disease, several animal models have been used to mimic some aspect of the dopaminergic degeneration. The intracerebral injection of 6-OHDA has been one of the most used PD model. This toxin is preferentially injected into the striatum or in the substantia nigra to provoke a selective degeneration of dopaminergic neurons from the nigrostriatal pathway. When a unilateral injection is used, the animals display a stereotypical rotational behavior after pharmacological induction, and such behavior has been largely used as a measure of the degree of nigrostriatal degeneration. This model is well characterized in rats and has been an useful tool to test neuroprotective therapies. Mice, as much as rats, are also largely used in studies of DP, but the 6-OHDA model has not been well described. The objective of the present work was to improve the characterization of the hemiparkinsonism model based on a single unilateral intraestriatal injection of 6-OHDA in C57BL6 mice, to provide a more detailed evaluation of the temporal course of the neuronal dopaminergic degeneration in the substantia nigra and to establish the degree of correlation between the degeneration and behavioral changes. Our results showed that a single injection of 10 μg of 6-OHDA into the striatum causes progressive degeneration of nigral dopaminergic neurons dependent of survival time, and that there is a high correlation between the rate of degeneration and the rotational behavior induced by apomorphine. Spontaneous motor behaviors such as ambulation and rearing had a lower correlation with the degeneration. Therefore, we suggest that the rotational behavior induced by apomorphine provides a good measure of the degree of asymmetry in the nigrostriatal pathway of mice with 6-OHDA-induced hemiparkinsonism and that it can indeed be an useful tool in experiments to test therapies with neuroprotective potential for Parkinson's disease.

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

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Representação dos grupos utilizados no presente trabalho. Os quadrados pretos representam os animais tratados e os quadrados brancos representam os animais controles. Os algarismos arábicos representam a janela temporal de cada grupo..... 18
- Figura 2** (A) Representação esquemática do modelo de campo aberto com paredes de acrílico transparente e assoalho dividido em 9 retângulos medindo 7x10cm. Modelo amplamente utilizado para avaliar atividade motora espontânea e atividade exploratória de roedores. (B) Fotografia de um camundongo C57BL6 avaliado no teste de campo aberto, ilustrado o parâmetro de Bipedestação..... 20
- Figura 3** (A) Ilustração de um camundongo C57BL6 devidamente anestesiado e fixado no aparelho estereotáxico. (B) Ampliação da região cefálica após remoção do tecido subcutâneo e periósteo, visualização da sutura sagital e do bregma..... 23
- Figura 4** Fotomicrografias de secções representativas do núcleo estriado de animais injetados com salina (esquerda) e 6-OHDA (direita) no estriado esquerdo, e sacrificados em tempos de sobrevivência diferentes. As secções foram coradas com imunohistoquímica para tirosina-hidroxilase (TH). Observa-se perda gradual de coloração apenas no lado e nos animais injetados com 6-OHDA. 27
- Figura 5** Fotomicrografias de secções representativas da SN de animais injetados com salina (esquerda) ou 6-OHDA (direita) no estriado esquerdo, e sacrificados após tempos de sobrevivência diferentes. As secções também foram coradas com imunohistoquímica para tirosina-hidroxilase (TH), observando-se perda gradual na coloração apenas no lado e nos animais injetados com 6-OHDA.

O mesmo não acontece com animais injetados com salina..... 28

Figura 6 Células TH-positivas na substância negra de animais injetados com solução de 10 µg de 6-OHDA no estriado esquerdo ou com solução salina (controle). Os valores estão expressos em percentual em relação ao valor médio absoluto do lado não injetado. Na figura está representado apenas um grupo controle, pois não houve diferença no percentual de células entre eles. As barras brancas representam o lado não-injetado com a toxina ou solução salina (lado controle), enquanto que as barras pretas representam o lado injetado. Observa-se diminuição progressiva do percentual de células do lado injetado em relação ao lado não-injetado. Essa diminuição de neurônios reativos a TH pode ser observada também comparando-se o lado injetado com salina (controle) com o lado injetado com 6-OHDA nos grupos de 1, 3, 7, 14 e 28 dias de sobrevivência. A morte de células na SN inicia-se 24h após a administração da toxina e se estende até 28 dias. (teste *t*, $p^* < 0,05$), N=5 para cada o grupo controle, e N=5 para cada grupo injetado com 6-OHDA..... 29

Figura 7 Células TH-positivas na substância negra de camundongos injetados com solução de 10µg de 6-OHDA no estriado esquerdo. Os valores estão expressos em percentual em relação ao valor médio absoluto do lado não injetado. Na figura estão representados apenas o lado injetado dos grupos de 1, 3, 7, 14 e 28 dias de sobrevivência. Observa-se diminuição progressiva do percentual de neurônios reativos a TH na SN e as diferenças são estatisticamente significativas entre os grupos de 1, 7, 14 e 28 dias de sobrevivência. (teste *t*, $p^* < 0,05$), N=5 para cada o grupo controle, e N=5 para cada grupo injetado com 6-OHDA..... 30

Figura 8 Comportamento rotatório induzido por apomorfina de animais injetados unilateralmente com solução de 10 µg de 6-OHDA no estriado esquerdo. Na figura estão representados os valores médios de rotação observadas após 1, 3, 7, 14 e 28 dias de

sobrevida. Os animais do grupo de 1 dia rodaram na direção ipsilateral ao lado injetado, enquanto que os animais de 7, 14 e 28 dias a rotação foi para o lado contralateral a injeção da toxina. O grupo de 3 dias apresentou variação neste comportamento, sendo que três animais tiveram comportamento ipsiversivo, três não rodaram e um animal apresentou comportamento contraversivo. Observa-se um aumento gradual no número de rotações com o aumento no tempo de sobrevida após a injeção, significando que a degeneração continua até 28 dias, que foi o maior tempo de sobrevida observado. Não houve rotações induzidas por apomorfina nos grupos controles injetados com salina (no gráfico está representado apenas um grupo controle). N=5 por grupo controle, N=5-7 por grupo injetado com 6-OHDA..... 32

Figura 9 Comportamento rotatório induzido por apomorfina de animais injetados unilateralmente com solução de 10 µg de 6-OHDA no estriado esquerdo. Na figura estão representados os valores médios de rotação contralateral observadas após 3, 7, 14 e 28 dias de sobrevida. Observa-se aumento gradual no comportamento contraversivo induzido por agonista dopaminérgico com o aumento no tempo de sobrevida. Comparando-se com a figura 6, observa-se correlação entre o aumento da degeneração dopaminérgica no lado injetado com o aumento de rotações para o lado contralateral a lesão (vide figura 6). Não observamos diminuição significativa no percentual de células TH-positiva, nem comportamentos rotatórios induzidas por apomorfina nos grupos controles (dados não representados no gráfico). N=5 por grupo controle, N=5-7 por grupo injetado com 6-OHDA. Teste *t*, * ou # $p < 0,05$ 33

Figura 10 Comportamento rotatório induzido por apomorfina de animais injetados unilateralmente com solução de 10 µg de 6-OHDA no estriado esquerdo. Na figura estão representados os valores

médios de rotação observada nos grupos de 14 e 28 dias de sobrevida, sendo que os animais do grupo de 14 dias foram submetidos 2x ao teste e o grupo de 28 dias foi submetido 4x ao teste. As barras brancas representam a média de rotações no grupo de 14 dias, enquanto que as barras pretas a média de rotações no grupo de 28 dias de sobrevida. Observa-se aumento progressivo na média de rotações com aumento da sobrevida. Não houve diferença significativa entre os grupos de 14 e 28 dias comparando-se os testes realizados no 7º e no 14º dia N=7 para cada o grupo de 14 dias de sobrevida, e N=6 para cada grupo o grupo de 28 dias de sobrevida. Teste *t*, $p^* < 0,05$).... 34

Figura 11 Comportamento ambulatorio de animais injetados com 6-OHDA ou com solução salina (controles) antes e depois da injeção. Os valores são expressos em percentual em relação ao valor médio absoluto do grupo controle correspondente. Em A–E, mostramos os resultados para os grupos com sobrevida 1, 3, 7, 14 e 28 dias. As barras brancas representam os grupos injetados com solução salina, enquanto que as barras pretas os grupos injetados com 6-OHDA. Pelo comportamento dos grupos controles (barras brancas), observa-se que ocorre algum grau de habituação ao teste com diminuição do número de cruzamentos com a repetição do teste, que pode ser constatado nos grupos de 14 e 28 dias de sobrevida (3 vezes para o grupo de 14 dias e 5 vezes para o grupo de 28 dias), gráficos D e E respectivamente. Apesar desta habituação, os resultados mostram que a injeção de 6-OHDA provoca diminuição mais acentuada na ambulação, e isso pode observado em todos os grupos e tempos de sobrevida (teste *t*, $p < 0,05$), exceto no último teste do grupo de 28 dias (gráfico E). N=5 para cada grupo controle, e N=5-7 para cada grupo injetado com 6-OHDA..... 37

Figura 12 Ambulação de animais de 28 dias injetados com 6-OHDA ou com solução salina (controles) antes e depois da cirurgia de

estereotaxia. Os valores estão expressos em percentual em relação ao valor médio absoluto do grupo controle. As barras brancas representam os grupos injetados com solução salina, enquanto que as barras pretas os grupos injetados com 6-OHDA. Pelo comportamento dos grupos controles (barras brancas), observa-se que ocorre algum grau de habituação ao teste com diminuição do número de cruzamentos com a repetição do teste (5 vezes). Apesar desta habituação, os resultados mostram que a injeção de 6-OHDA provoca diminuição mais acentuada na ambulação, seguida de crescente recuperação da atividade motora espontânea nos animais injetados com a toxina. Teste *t*, $p^* < 0,05$. N=5 para cada grupo controle, e N=6 para cada grupo injetado com 6-OHDA..... 38

Figura 13 Comportamento de bipedestação de animais injetados com 6-OHDA ou com solução salina fisiológica (controles) antes e após à injeção. Os valores estão expressos em percentual em relação ao valor médio absoluto do grupo controle correspondente. Em A-E, mostramos os resultados para os grupos com sobrevivência de 1, 3, 7, 14 e 28 dias. As barras brancas representam os grupos injetados com solução salina, enquanto que as barras pretas representam os grupos injetados com 6-OHDA. Os resultados foram equivalentes àqueles obtidos na avaliação da ambulação (Figura 10). Também se observa algum grau de habituação com a repetição do teste (vide grupo de 14 e 28 dias de sobrevivência, D e E respectivamente). Mas apesar dessa habituação, os resultados mostram que a injeção de 6-OHDA provoca diminuição mais acentuada no número de bipedestação, sendo isso observado principalmente nos grupos de 1, 3 e 7 e 14 dias de sobrevivência..... 40

Figura 14 Bipedestação de animais injetados com 6-OHDA ou com solução salina fisiológica (controles) antes e depois da cirurgia de estereotaxia. Os valores estão expressos em percentual em

relação ao valor médio absoluto do grupo controle correspondente. Em A mostramos os resultados para os grupos controle e tratado de sobrevida de 14 dias, e em B mostramos os resultados para os grupos controle e tratado 28 dias de sobrevida. As barras brancas representam os grupos controles, enquanto que as barras pretas representam os grupos injetados com a toxina. Observa-se diferenças significativas entre tratado e controle nos testes de 7 e 14 dias, tanto no grupo de 14 dias, quanto no grupo de 28 dias. Concomitantemente, observa-se diminuição gradual deste parâmetro nos grupos controles de 14 e 28 dias. Notavelmente, ocorre algum grau de habituação com a repetição do teste. N=5 para cada grupo controle, e N=7 para o grupo injetado de 14 dias de sobrevida e N=6 para o grupo injetado de 28 dias de sobrevida. Teste *t*, $p^* < 0,05$ 42

Figura 15 Correlação entre degeneração dopaminérgica ipsilateral e testes comportamentais em animais injetados com 6-OHDA. A perda neuronal na SN do lado injetado com a toxina está expresso em valores percentuais em relação ao valor médio absoluto do lado não injetado. Os valores de números de rotações foram normalizados considerando-se o maior valor (do grupo de 28 dias) como igual a 100% parâmetros. Os outros dois parâmetros comportamentais, ambulação e bipedestação, estão representados por valores percentuais em relação aos grupos controles respectivos..... 44

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A DOENÇA DE PARKINSON	1
1.2. MECANISMOS DE MORTE CELULAR NA DOENÇA DE PARKINSON..	4
1.3 MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE PARKINSON QUE UTILIZA A TOXINA 6-HIDROXIDOPAMINA	7
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. OBJETIVO GERAL.....	16
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1. ANIMAIS.....	17
3.2. DROGAS.....	17
3.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	18
3.4. AVALIAÇÃO MOTORA.....	19
3.4.1. Campo Aberto.....	19
3.4.2. Rotações induzidas por apomorfina.....	20
3.5. INJEÇÃO DE 6-OHDA.....	21

3.6. A CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.....	21
3.7. PERFUSÃO.....	21
3.8. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	24
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
4. RESULTADOS.....	26
4.1. INJEÇÃO UNILATERAL DE 6-HIDROXIDOPAMINA INDUZ DIMINUIÇÃO DE CÉLULAS TH-POSITIVAS NA VIA NIGROESTRIATAL.....	26
4.1.1. Estriado.....	26
4.1.2. Substancia Negra.....	28
4.2. A LESÃO NIGROESTRIATAL INDUZIDA POR 6-HIDROXIDOPAMINA PROVOCA AUMENTO DAS ROTAÇÕES NOS TESTES COM A POMORFINA.....	31
4.3. A LESÃO INDUZIDA POR 6-HIDROXIDOPAMINA ALTERA A ATIVIDADE MOTORA NO TESTE DE CAMPO ABERTO.....	34
4.3.1. Ambulação.....	35
4.3.2. Bipedestação.....	38
4.4. CORRELAÇÃO ENTRE DEGENERAÇÃO NIGRAL E ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS.....	43
5. DISCUSSÃO.....	45
5.1. A DOSE DE 6-OHDA.....	45
5.2. O CURSO TEMPORAL DA DEGENERAÇÃO DOPAMINÉRGICA NA VIA NIGRO-ESTRIATAL.....	48
5.3. ADMINISTRAÇÃO ESTRIATAL DE 6-OHDA INDUZ ALTERAÇÕES MOTORAS EM CAMUNDONGOS.....	50

5.3.1. Avaliação no Campo Aberto.....	50
5.3.2. Teste das rotações induzidas por apomorfina.....	53
6. CONCLUSÕES.....	56
6. BIBLIOGRAFIA.....	58

1. INTRODUÇÃO

1.1 - A DOENÇA DE PARKINSON

As doenças neurodegenerativas afetam grande parte da população mundial. A Doença de Parkinson (DP) afeta cerca de 1 a 2% da população com idade acima de 65 anos e é o segundo distúrbio de curso progressivo e crônico de ocorrência mais comum, perdendo em número de vítimas apenas para o mal de Alzheimer (MAYEUX, 2003). O diagnóstico da DP é realizado com base nas seguintes manifestações clínicas: tremor em repouso, geralmente unilateral no início da doença, aumento do tônus muscular, bradicinesia e instabilidade postural (BLUM *et al.*, 2001; FAHN, 2003; DEBEIR *et al.*, 2005). Outros sintomas como: redução da mímica facial, marcha arrastada com passos curtos, alterações no sono e sistema nervoso autônomo também estão presentes nos portadores da DP. (FAHN, 2003; FLINT, 2001).

Os distúrbios motores e as alterações anatomopatológicas estão associados à degeneração de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal, cujos corpos celulares estão localizados na substância negra pars compacta (SNpc) e seus axônios projetam-se para o corpo estriado - caudado e putamem (LENT, 2001). O estriado, o globo pálido (GP), o núcleo subtalâmico e a substância negra são os principais componentes dos núcleos ou gânglios da base. A SN está localizada no mesencéfalo e recebe este nome devido a presença de neuromelanina, pigmento escuro presente em neurônios dopaminérgicos desta

região. Junto com o cerebelo, os núcleos da base constituem um sistema de controle motor que funciona em íntima associação com o córtex cerebral e sistema motor córtico-espinhal, para o controle adequado dos movimentos (BEAR *et al.*, 2002).

É importante lembrar que no sistema nervoso central (SNC) existem três grupos de neurônios dopaminérgicos: o grupo A8, presente na formação reticular lateral; o grupo A9, presente na SNpc e o grupo A10, presente no tegmento médio e dorsal. Os neurônios do grupo A9 enviam projeções para o caudado e putamen que influenciam na via dos gânglios da base (LENT, 2001).

A principal alteração bioquímica na DP é a diminuição dos níveis do neurotransmissor dopamina no corpo estriado, devido à degeneração progressiva dos neurônios pigmentados da SNpc. Histopatologicamente ocorre formação de agregados protéicos intracelulares conhecidos como corpos de Lewy (ORR *et al.* 2002; DAUER, 2003). Estes corpos são constituídos de densa camada granular cercada por halo filamentosos (FAHN, 2003). Na SNpc os corpos de Lewy são importantes marcadores anatomopatológicos, mas não são exclusivos desta região, pois são também encontrados em outras áreas do SNC e sistema nervoso periférico (SNP) dos portadores da DP (BLUM *et al.*, 2001).

Não obstante, aos avanços científicos a etiologia da DP permanece desconhecida. Atribui-se o desenvolvimento da doença a múltiplos fatores, tendo como os mais prováveis fatores de risco: as alterações genéticas, exposição a fatores ambientais como herbicidas, pesticidas e químicos industriais (GORELL *et*

al., 2004; ALAM e SCHMIDT, 2004). Hodiernamente, acredita-se que o desenvolvimento da DP decorre da susceptibilidade genética associada a exposição a fatores ambientais de risco (GORELL *et al.*, 2004).

Na última década a identificação de mutações genéticas em casos raros da DP promoveu avanços importantes no conhecimento sobre a patogênese da doença. Cerca de 5 a 10% dos pacientes com DP têm a forma familiar. Esta forma da doença tem sido associada a mutações nos genes para α -sinucleína, parkina, e hidrolase tipo 1 C-terminal da ubiquitina (UCH-L1) e DJ-1. A forma monogênica de parkinsonismo também está associada a mutações nos *locus* de PARK3, PARK4, PARK6, PARK8 e PARK10. (OLANOW e TATTON, 1999; LEE, 2001; DAWSON e DAWSON, 2003; HARDY *et al.*, 2003).

A α -sinucleína é uma proteína hidrofílica que está presente nos botões sinápticos, mas ainda não é conhecido o mecanismo pelo qual esta proteína mutada associa-se a neurofilamentos, nem como ela contribui para a formação de corpos de Lewy (HALBACH E KRIEGLSTEIN, 2004). A parkina e UCH-L1 também têm sido identificadas nos neurônios dopaminérgicos em degeneração da via nigroestriatal. O funcionamento alterado da UCH-L1 pode prejudicar a eficiência da degradação de proteínas pelo proteassomo, alterando cascatas bioquímicas vitais para a célula. (CHUNG *et al.*, 2004). O sistema do proteassomo atua na degradação de proteínas anormais oriundas de mutações, erros biossintéticos e de danos causados por agentes físicos ou químicos (CHUNG *et al.*, 2004).

1.2. MECANISMOS DE MORTE CELULAR NA DOENÇA DE PARKINSON

A célula é capaz de manter demandas fisiológicas normais, que garantem a homeostasia celular e orgânica. Considera-se que células normais são limitadas dentro de uma faixa estreita de funcionamento, mantida por programas genéticos de metabolismo e especialização. Defere-se que a morte celular é o evento mais crucial em patologia, e o resultado final de lesão celular. Segundo Cotran *et al.*(2000), agentes físicos, químicos e infecciosos, hipóxia, reações imunológicas, anormalidades genéticas e desequilíbrio nutricional podem ser consideradas as causas mais genéricas de morte celular.

Atualmente, necrose e apoptose são dois padrões distintos e importantes de morte celular. Sendo a necrose o tipo mais comum que ocorre após estímulos exógenos como a isquemia e lesões químicas. Do ponto de vista, histológico e morfológico, caracteriza-se pelo aumento e ruptura da membrana celular, desnaturação e coagulação de proteínas citoplasmáticas e degradação das organelas celulares (COTRAN *et al.*, 2000).

Enquanto que, apoptose acontece através da ativação de uma série coordenada e programada de eventos executados por um conjunto exclusivo de produto gênico (COTRAN *et al.*, 2000). As principais características morfológicas observadas neste tipo de morte celular são: retração celular, com organelas mais compactadas; condensação da cromatina, que agrega-se na periferia sob a membrana nuclear em formas e tamanhos diversos; e formação de bolhas citoplasmáticas e corpúsculos apoptóticos.

Na apoptose, a lesão na membrana é induzida por radicais livres, sobretudo espécies reativas de oxigênio (EROS). Estes radicais podem reagir com vários componentes celulares e sua ação pode alterar de modo significativo o potencial de membrana celular e promover peroxidação lipídica e protéica. Algumas vezes, o oxigênio pode aceitar elétrons para formar derivados instáveis, conhecidas como EROs, que incluem: radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^\cdot). Por isso, nos sistemas celulares considerados normais a formação de EROs é mantida em quantidades mínimas por mecanismos antioxidantes, que são substâncias que inibem a reação de moléculas com radicais oxigênio (MOTTA, 2002; COTRAN *et al.*, 2000).

Estudos em modelos animais da DP e exames *post mortem* têm demonstrado participação do excesso de EROs no processo neurodegenerativo. Os níveis elevados de EROs nos neurônios está associado também à disfunção mitocondrial que promove o estresse oxidativo e excitotoxicidade (OLANOW e TATTON, 1999; HALBACH e KRIEGLSTEIN, 2004). No entanto, o agente responsável pelo início da toxicidade dopaminérgica na SNpc é desconhecido.

A geração de energia pela mitocôndria é regulada por 5 complexos que constitui a cadeia mitocondrial transportadora de elétrons (CTE). A cadeia consiste em uma série de transportadores de elétrons que operam seqüencialmente, formados por proteínas integrais de membrana que são capazes de aceitar ou doar elétrons (VIEIRA *et al.*, 1991). A medida que os elétrons são transferidos ao longo da cadeia ocorre liberação de energia para sintetizar ATP por meio da

fosforilação oxidativa (VIEIRA *et al.*, 1991).

Os transportadores de elétrons funcionam em complexos multienzimáticos conhecidos como: complexo I (NADH – coenzima Q oxidorreductase), complexo II (succinato - coenzima Q oxidorreductase), complexo III (coenzima Q citocromo c oxidorreductase), complexo IV (citocromo c oxidase) e complexo V (ATP sintase) (MOTTA, 2002). Defeitos no complexo I inibem a fosforilação oxidativa causando déficit na síntese de ATP. A fosforilação oxidativa possui íntima relação com a geração de EROs, os quais estão associados com o aumento do estresse oxidativo que, por sua vez, contribui para a disfunção mitocondrial (HALBACH e KRIEGLSTEIN, 2004; BLANDINI *et al.*, 1998).

Cerca de 95% do oxigênio molecular é metabolizado na mitocôndria e a produção neuronal de ATP depende exclusivamente da respiração celular. Portanto a síntese elevada de ATP nos neurônios é essencial para a regulação da homeostase celular. Danos no complexo I da CTE podem deixar os neurônios mais vulneráveis a alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial, que podem ser deletérios na DP (SHERER *et al.*, 2002a; GAO *et al.*, 2003). Outros estudos indicam ainda que danos no complexo I podem contribuir significativamente para o aumento do estresse oxidativo em encéfalos de pacientes e em modelos animais de DP.

Estudos *post mortem* em portadores da DP têm demonstrado indícios de que o estresse oxidativo contribui para as lesões no sistema nigral (HALD e LOTHARIUS, 2005). Sinais de estresse oxidativo incluem peroxidação lipídica das

membranas e modificações oxidativas em proteínas, carboidratos e DNA e subsequente rompimento das membranas biológicas. Em muitos processos patológicos, os efeitos induzidos pelo estresse oxidativo dependem do equilíbrio final entre a formação e a remoção de EROs, a qual é realizada por uma série de enzimas que atuam como sistemas removedores de radicais livres. É possível que o aumento exacerbado de EROs pela ineficiência nos sistemas que os removem esteja associado à disfunção mitocondrial presente nos processos neurodegenerativos e na DP.

1.3. MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE PARKINSON QUE UTILIZA A TOXINA 6-HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA)

Considerando-se os fatores de risco associados ao desenvolvimento da DP e a dificuldade na integração dos mecanismos envolvidos no processo foram desenvolvidos modelos animais. Estes modelos são utilizados como ferramenta adicional para compreender os mecanismos que desencadeiam a morte celular na SN de humanos. Os modelos utilizam toxinas que mimetizam alguns eventos patológicos e comportamentais da degeneração dopaminérgica na DP. As neurotoxinas mais estudadas e cujo mecanismo de ação envolve a destruição seletiva do sistema catecolaminérgico são: 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) e 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). A injeção intracerebral de 6-OHDA tem sido o modelo mais utilizado para se avaliar o potencial de terapias

neuroprotetoras. Esta toxina é utilizada tanto em experimentos *in vivo* quanto *in vitro* (BLUM, *et al.*, 2001).

A 6-OHDA é um análogo do neurotransmissor dopamina. Esta toxina não é capaz de passar pela barreira hematoencefálica, sendo necessário a administração intracerebral para observar seus efeitos tóxicos (BLUM *et al.*, 2001). É transportada aos neurônios catecolaminérgicos via transportador de dopamina e noradrenalina (HODAIE *et al.*, 2007). Em modelos animais, a 6-OHDA é preferencialmente injetada no estriado ou na SNpc, onde promove a destruição seletiva de neurônios catecolaminérgicos, com morte de neurônios na SNpc e diminuição dos níveis de DA no estriado. Este dano reproduz características imuno-histopatológicas responsáveis pelo prejuízo motor na DP (BETARBET *et al.*, 2002; SHIMOHAMA *et al.*, 2003; UNGERSTEDT, 1968).

É importante ressaltar que a 6-OHDA pode ser encontrada em encéfalos humanos como resultado da auto-oxidação da dopamina e tem sido proposta como fator neurotóxico na DP (RANG *et al.*, 2003). O aumento do metabolismo da dopamina gera produtos que podem induzir toxicidade através da inibição mitocondrial e modificações deletérias em biomoléculas que contribuem para morte celular. Os neurônios que estão morrendo podem ativar microglias que contribuem ainda mais para o aumento da produção de EROs e citocinas. O aumento da produção de radicais livres e citocinas desencadeia ciclo vicioso que aumenta a toxicidade dopaminérgica na SNpc (HALD e LOTHARIUS, 2005).

Vários estudos em modelos animais da DP demonstraram aumento do estresse oxidativo na via nigroestriatal de ratos após a administração intraestriatal de 6-OHDA. Esta neurotoxina pode atuar inibindo o complexo I da CTE e alterar o potencial de membrana mitocondrial, assim como elevar a produção de EROs que promovem a quebra e mutações no DNA e desorganização do citoesqueleto. (BLUM *et al.*, 2001; BETARBET *et al.*, 2002). Os produtos da oxidação desta toxina são responsáveis por danos irreversíveis causados aos neurônios catecolaminérgicos. Embora a 6-OHDA seja utilizada como toxina seletiva para neurônios da via nigroestriatal, ela pode causar lesões em qualquer área encefálica que contém células catecolaminérgicas (KONDOH *et al.*, 2005).

Animais lesados bilateralmente com 6-OHDA mimetizam sintomas motores parkinsonianos, entretanto, a administração bilateral é um modelo pouco utilizado. A injeção unilateral desta toxina é o modelo mais utilizado em estudos relacionados a DP. Os estudos realizados por Ungerstedt (1968) foram pioneiros em relatar que ratos com lesão unilateral induzida por 6-OHDA realizam movimentos rotatórios espontâneos para o lado ipsilateral a lesão. Este comportamento motor assimétrico foi observado durante quatro semanas após a injeção da neurotoxina.

A degeneração nigroestriatal após injeção unilateral de 2x 2µg de 6-OHDA na SN de ratos da linhagem Sprague-Dawley foi descrita por Perese *et al.* (1989) utilizando a imuno-histoquímica para tirosina-hidroxilase (TH), enzima limitante para a síntese de dopamina. Eles demonstraram que na 16ª semana após a

injeção da toxina ocorre diminuição do número de células na SNpc e da reatividade para TH nas fibras dopaminérgicas do estriado injetado. Demonstraram ainda, por meio de teste comportamental, a rotação para o lado contralateral induzida por apomorfina, um agonista dopaminérgico. Estes dados demonstram que o hemiparkinsonismo em ratos induzidos por 6-OHDA constitui um bom modelo experimental para estudos relacionados à DP.

O comportamento rotatório induzido por apomorfina em ratos com lesão unilateral no sistema estriatal pode ser explicado pelo aumento da expressão dos receptores dopaminérgicos na porção lesada do estriado, ou seja, agonistas dopaminérgicos têm seu efeito potencializado pela hipersensibilização dos receptores de dopamina nos neurônios pós-sinápticos estriatais do lado injetado. A administração sistêmica desses agonistas promove desequilíbrio fisiológico entre o lado lesado e não-lesado (BETARBET *et al.*, 2002), e o comportamento motor assimétrico realizado pelo animal para o lado contralateral a lesão é devido decussação das vias motoras descendentes (SCHWARTING e HUSTON, 1996), desta forma havendo maior estimulação motora no lado contralateral ao estriado injetado (e sensibilizado). A apomorfina é uma droga lipofílica administrada sistemicamente e é utilizada em teste padrão de estimulação de receptores dopaminérgicos em modelo de rotação induzida.

Os estudos de Przedborski *et al.* (1995) foram realizados na tentativa de otimizar as condições do modelo experimental de hemiparkinsonismo. Eles injetaram unilateralmente as seguintes doses de 6-OHDA: 0,652µg/ul, 1,25µg/ul,

2,5µg/ul e 5µg/ul no estriado esquerdo de ratos da linhagem Sprague-Dawley, resultando em lesões no sistema dopaminérgico nigroestriatal ipsilateral em todos os grupos tratados com a toxina. Esta lesão foi associada ao comportamento rotacional induzido por apomorfina. Os resultados deste estudo sugerem que a 6-OHDA pode causar morte neuronal retrógrada, cujo processo envolve primeiramente perda dos terminais nervosos no estriado e depois dos corpos celulares na SNpc.

Jeon *et al.* (1995) descreveram o curso temporal da degeneração nigroestriatal após injeção de 8 µg/4 µl de 6-OHDA na região dorsal à SN de ratos da linhagem Sprague-Dawley. Eles observaram perda neuronal no sítio injetado após 12h da administração da toxina, no entanto, sem sinais de degeneração no estriado. Após 7 dias a morte celular continua na SNpc, mas agora acompanhada de degeneração nos terminais localizados no estriado. A degeneração nigral continua por 31 dias, mas não acompanhada de diminuição dos terminais estriatais. Estes dados sugerem que, nesse caso, o efeito neurotóxico da 6-OHDA atua diretamente sobre os corpos celulares e que a morte inicia nos pericários e depois atinge o estriado.

Em outro estudo, injetou-se 24 µg de 6-OHDA em quatro sítios distintos no estriado de ratos da linhagem Sprague-Dawley, sendo que cada local foi injetado 6 µg da toxina. Neste experimento o transporte de dopamina na via nigroestriatal foi observado *in vivo* através de tomografia por emissão de pósitrons (PET). Em análise imuno-histoquímica, observou-se a degeneração progressiva dos

neurônios dopaminérgicos e intensa resposta inflamatória caracterizada pela maciça ativação microglial após a injeção da toxina. Neste trabalho foi observada degeneração neuronal lenta, progressiva e retrógrada mimetizando vários aspectos relacionados a patogênese da DP idiopática (CICCHETTI *et al.*, 2002).

Marti *et al.* (2002), caracterizaram a morte celular induzida por administração unilateral de 20µg/4µl de 6-OHDA no estriado de ratos da linhagem Sprague-Dawley. A injeção da neurotoxina induziu diminuição progressiva dos neurônios TH positivos na SNpc ipsilateral. A impregnação por prata dos neurônios nigrais ipsilateral revelou perfil morfológico característico de apoptose. A morte celular por apoptose foi confirmada por análise microscópica ultraestrutural. Nesta análise observou-se cromatina condensada e formação de corpos apoptóticos com a preservação das membranas biológicas. O núcleo apoptótico foi primeiramente visto no 6º dia e alcançou um número máximo entre o 7º e o 10º dia após a lesão.

Camundongos da linhagem C57BL6 são largamente utilizados em diversos estudos relacionados a DP, e são especialmente valiosos em estudos para a investigação de terapias farmacológicas ou celulares. Camundongos desta linhagem foram submetidos à técnicas análogas previamente estabelecidas para ratos com o objetivo de melhor caracterização desse modelo animal de DP nessa linhagem.

Bensadoun *et al.*, (1998) injetaram 30µg/2µl de 6-OHDA i.c.v. (intracerebroventricular) em camundongos da linhagem C57BL6. Após 24h, a

injeção da toxina induziu diminuição de 34,2% dos níveis de dopamina no estriado; e morte celular de 52,4% na SN, 3 dias após o tratamento. O modelo de injeção unilateral estriatal foi utilizado no trabalho desenvolvido por Cunningham e Su (2002). A dose de 16µg/2µl foi administrada no estriado direito de camundongos C57BL6 sendo observada a ocorrência de 86% de morte celular na SN duas semanas após a administração da toxina.

Já Lundblad *et al.* (2004) injetaram no feixe prosencefálico medial (MFB) de camundongos C57BL6, 2 injeções de 6µg/2µl de 6-OHDA unilateralmente. A toxina promoveu diminuição de 70% da recaptação de dopamina no estriado. Esta alteração foi observada em imunohistoquímica para TH 32 dias após a administração. No entanto, o curso temporal e a progressão da lesão não foram descritos.

Camundongos da linhagem C57BL6 foram utilizados em outros estudos também importantes e relacionados com a patofisiologia da DP. Destarte, Silva *et al.* (2005) utilizou 6-OHDA na dose 20µg/4µl no estriado de animais com sobrevivência de 28 dias e registraram perda de 79% de células TH-positiva na SNpc. Os autores não avaliaram a perda neuronal no mesencéfalo com alterações motoras.

Os trabalhos desenvolvidos por Alvarez-Fischer *et al.* (2007) avaliaram a perda de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal, a concentração de dopamina e metabólitos no estriado, e comportamento motor no bastão giratório (rotarod). A avaliação foi realizada após injeção de 4µg/2µl de 6-OHDA no estriado esquerdo de camundongos C57BL6 em 3, 7, 14, 28 e 56 dias de sobrevivência. Os

autores relataram que a maior parte da perda dos neurônios dopaminérgicos na SN ocorre nos primeiros 7 dias, com pouco incremento da perda entre 7 e 56 dias. No teste no bastão giratório, o déficit motor ocorreu já após 3 dias de sobrevivência, com recuperação progressiva após 14 dias.

Em modelos animais que utilizam a injeção de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial ou na SNpc ocorre morte neuronal dopaminérgica rápida, enquanto que, quando injetada no estriado, induz morte neuronal retrógrada, lenta e progressiva, mimetizando melhor a morte celular progressiva da DP. Uma característica interessante desse modelo é a alteração comportamental rotatória estereotipada que ele é capaz de gerar nos animais lesados. Por isso, o modelo da 6-OHDA tem sido bastante utilizado para se testar o potencial neuroprotetor de certas drogas ou terapias celulares (PERESE *et al.*, 1989; NISHIMURA *et al.*, 2003). Em muitos casos, os estudos utilizam apenas o parâmetro comportamental para concluir se a terapia testada funcionou ou não. O problema que encontramos é que embora o modelo tenha sido bem caracterizado em ratos, os trabalhos em camundongos são escassos e incompletos. Mesmo o trabalho recente e mais completo em camundongos de Alvarez-Fischer *et al.* (2007), que teve como objetivo a caracterização do modelo, não testou, por exemplo, o comportamento rotatório induzido farmacologicamente, que parece ser o parâmetro comportamental que mais se correlacionaria com a degeneração nigroestriatal.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo melhorar a

caracterização do modelo de injeção intraestriatal unilateral de 6-OHDA em camundongos C57BL6, visando avaliar o grau de correlação entre a degeneração da via nigroestriatal e as alterações comportamentais no teste do campo aberto e no comportamento rotatório induzido por apomorfina.

2. OBJETIVOS:

2.1. OBJETIVO GERAL

- Caracterizar o curso temporal da degeneração nigroestriatal e alterações comportamentais em camundongos da linhagem C57BL6 expostos a uma única injeção intraestriatal de 6-OHDA unilateralmente.

2.2. ESPECÍFICOS

- a. Caracterizar o curso temporal da degeneração dopaminérgica no sistema nigroestriatal 1, 3, 7, 14 e 28 dias após a injeção de 6-OHDA;
- b. Caracterizar o curso temporal de alterações comportamentais mais genéricas utilizando-se o teste do campo aberto, para avaliação da ambulação e bipedestação, nos tempos de sobrevivência já mencionados;
- c. Caracterizar o curso temporal de alterações comportamentais mais específicas utilizando-se o teste das rotações induzidas por apomorfina;
- d. Determinar o grau de correlação entre degeneração nigral e parâmetros comportamentais avaliados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

No presente trabalho foram utilizados 60 camundongos machos, adultos (60 dias) da linhagem C57BL6, pesando 26-30g por ocasião da cirurgia, provenientes dos biotérios do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Pará (UFPA) e do Instituto Evandro Chagas. Até o início dos procedimentos experimentais, os animais foram mantidos no biotério do laboratório de Neuropatologia Experimental com temperatura controlada a $24^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, em ciclo claro/escuro de 12/12h e alojados em gaiolas individuais antes e depois da cirurgia com água e comida *ad libitum*.

Todos os procedimentos utilizados estão de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal Pará.

3.2. DROGAS

Foram utilizados em nossos experimentos:

- 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Sigma-Aldrich) foi dissolvida em solução salina (cloreto de sódio a 0,9%) contendo ácido ascórbico a 0,02% (Sigma-

Aldrich). A solução foi preparada minutos antes da cirurgia estereotáxica e armazenada em recipientes protegidos da luz até o seu uso.

- Apomorfina (Sigma-Aldrich) foi dissolvida em solução salina fisiológica. Foi preparada minutos antes do teste comportamental e armazenada em recipientes protegidos da luz até o seu uso.

3.3 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais dos grupos tratados receberam dose única de 2 μ l contendo 10 μ g de 6-OHDA, no estriado esquerdo, e os animais controles receberam solução salina fisiológica com ácido ascórbico no sítio de injeção correspondente ao grupo tratado. Os sessenta camundongos usados no presente trabalho foram randomicamente divididos em 5 grupos controles e 5 grupos tratados que, após receberem a injeção, foram sacrificados em tempos de sobrevivência distintos: 1, 3, 7, 14 e 28 dias. Cada grupo controle foi composto por 5 animais, enquanto que cada grupo injetado como 6-OHDA foram compostos por 7 animais.

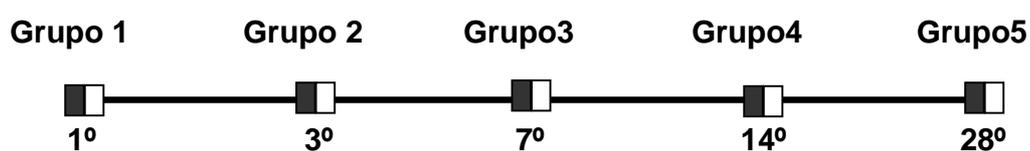


Figura 01: Representa os grupos utilizados no presente trabalho. Os quadrados pretos representam os animais tratados e os brancos representam os animais controles. Os algarismos arábicos representam o período de sobrevivência de cada grupo.

3.4. AVALIAÇÃO MOTORA

3.4.1 – Campo Aberto

Os animais foram submetidos ao teste de campo aberto com o objetivo de se avaliar a atividade exploratória e o desempenho motor antes e depois da administração de 6-OHDA ou veículo. Ambulação, bipedestação (levantar com apoio na parede), micção e defecação foram os parâmetros avaliados neste teste. Os camundongos foram expostos ao aparato experimental 24h antes da cirurgia estereotáxica e os dados gerados neste teste foram usados como linha de base para os testes realizados após a sobrevida estabelecida para cada grupo e de acordo com a tabela abaixo.

Grupos por sobrevida	Testes no Campo aberto					
	Antes	1 dia	3 dias	7 dias	14 dias	28 dias
NaCl ou 6-OHDA – 1 dia	X	X				
NaCl ou 6-OHDA – 3 dias	X		X			
NaCl ou 6-OHDA – 7 dias	X			X		

Antes = 1 dia antes da cirurgia para injeção de salina ou 6-OHDA no estriado.

O animal foi colocado no centro de uma arena retangular, medindo 21 cm de largura x 30 cm de comprimento x 20cm de altura, com paredes de acrílico transparente e piso branco. A base do aparato foi dividido em 9 campos de 10cm x 7cm. Os animais foram colocados no centro do campo aberto e o comportamento foi registrado por 5 minutos (**Figura 2**). A limpeza da arena após a saída de cada animal foi feita com etanol a 5%.

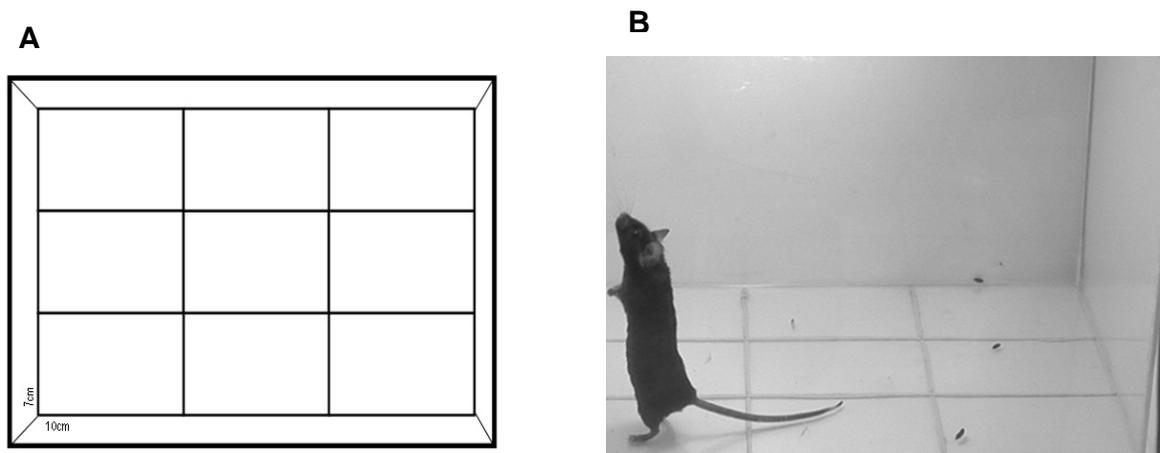


Figura 2 – (A) Representação esquemática do modelo de campo aberto com paredes de acrílico transparente e assoalho dividido em 9 retângulos medindo 7x10cm. Modelo amplamente utilizado para avaliar atividade motora espontânea e atividade exploratória de roedores. (B) Fotografia de um camundongo C57BL6 avaliado no teste de campo aberto, ilustrado o parâmetro de bipedestação.

3.4.2 – Rotação induzida por apomorfina

Após o período de sobrevivência estabelecido para cada grupo, foi administrada injeção de apomorfina na dose de 0,6 mg/kg por via subcutânea (s.c.). Imediatamente após a injeção os camundongos foram colocados em aparato circular medindo 28 cm de diâmetro e 20 cm de altura. As rotações foram registradas quando eram completados giros de 360° tanto para o lado contralateral, quanto para o lado ipsilateral à injeção. A resposta comportamental foi registrada por 20 min. Os testes foram realizados conforme indicado na tabela a seguir:

Grupos por sobrevivida	Teste - Apomorfina				
	1 dia	3 dias	7 dias	14 dias	28 dias
NaCl ou 6-OHDA – 1 dia	X				
NaCl ou 6-OHDA – 3 dias		X			
NaCl ou 6-OHDA – 7 dias			X		

3.5 – A INJEÇÃO DE 6-OHDA

A administração de 6-OHDA foi realizada manualmente. A dose utilizada neste estudo foi de 5 ug/ul no estriado esquerdo. Durante o procedimento cirúrgico o volume total injetado foi de 2 ul, por um período de 10 min \pm 1, usando-se seringa de Hamilton de 10 ul. A taxa de infusão foi de aproximadamente 0,2ul/min. Imediatamente após a cirurgia os sujeitos experimentais foram colocados em suas gaiolas individuais que continham água e ração *ad libitum*.

3.6 – A CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais foram anestesiados com cloreto de cetamina (Vertanacol) na dose de 75 mg/kg misturado com cloreto de xilazina (Rompum) na dose de 10 mg/kg, por via intraperitoneal (i.p.). A cirurgia foi realizada após a fixação dos sujeitos experimentais no aparelho estereotáxico onde tiveram suas cabeças imobilizadas com o auxílio de duas barras intra-auriculares e uma barra de fixação dos incisivos, tendo como o ponto correto para a inserção das barras auriculares o

meato auditivo externo. Logo em seguida foi realizada tricotomia da região da cabeça, e subsequente assepsia da área tricotomizada com álcool iodado. Em seguida, o tecido subcutâneo e o periósteo foram removidos expondo-se a superfície craniana entre o bregma e o lâmbda.

Foi feito um orifício unilateral no lado esquerdo do crânio, com o auxílio de uma broca elétrica, nas seguintes coordenadas: antero-posterior (A-P): 0,8 mm a partir do bregma; médio-lateral (M-L): 1,5 mm a partir da linha média; e dorso-ventral (D-V): 3,0 mm a partir da calota craniana (**figura 3**), baseadas no Atlas de Estereotaxia para camundongos de Paxinos e Franklin (2004). Por meio deste orifício foi administrada a solução contendo 6-OHDA ou apenas veículo. Em seguida, a área exposta da superfície craniana foi protegida com cimento de acrílico. Após a cirurgia os animais receberam injeção profilática de pentabiótico 60.000 u.i (0,02 ml) por via intramuscular.

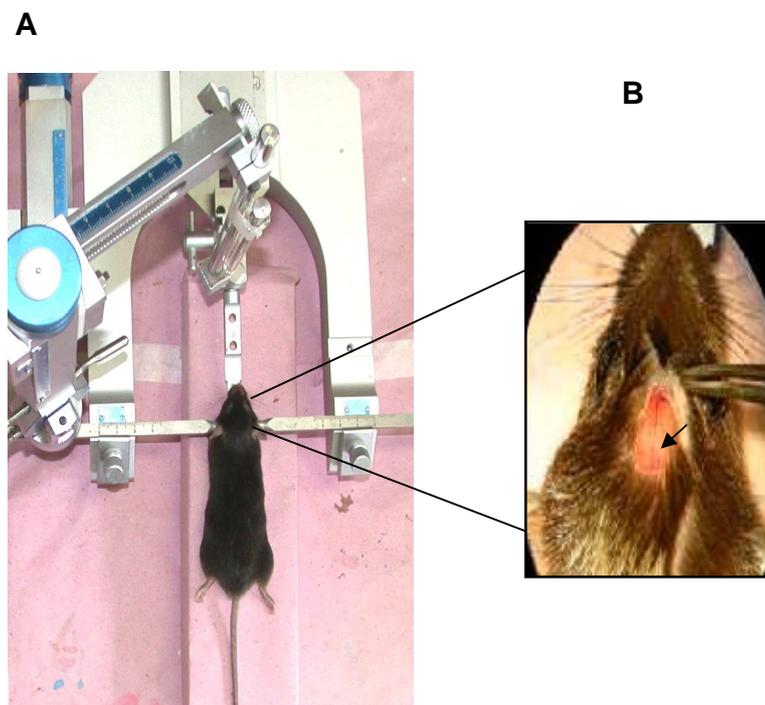


Figura 3 – (A) Ilustração de um camundongo C57BL6 devidamente anestesiado e fixado no aparelho estereotáxico. (B) Ampliação da região cefálica após remoção do tecido subcutâneo e periosteio, visualização da sutura sagital e do bregma. A cabeça da seta indica o encontro da sutura sagital e lâmbida.

3.7 - PERFUSÃO

Após o período de sobrevivência, os animais foram anestesiados com 75 mg/kg de cloreto de cetamina, misturado com 10 mg/kg de cloreto de xilazina na via i.p. e em seguida foi realizada a perfusão. Cada camundongo foi perfundido com 100 ml de tampão fosfato salina (TFS) 0,1 M durante 10 minutos com pH entre 7,2 - 7,4, seguido de 250 ml de solução fixadora de paraformaldeído (PFA) a 4% em TFS a 0,1 M, com pH entre 7,2 - 7,4 durante um período entre 10 - 15 minutos. Terminada a perfusão foi realizada craniotomia e o encéfalo pós-fixado em PFA

2% em TFS a 0,1 M por 10 - 12h, depois de pós-fixado o encéfalo foi posteriormente transferido para solução crioprotetora de sacarose a 30% em TFS a 0,1 M, onde permaneceu por 72 h.

3.8 - PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Os encéfalos foram retirados da solução crioprotetora e em seguida com auxílio de um criostato foram obtidas secções encefálicas de 40 µm de espessura, no eixo rostro-caudal. As secções foram coletadas em 8 séries alternadas, e mantidas em PFA 2% até à reação imunohistoquímica.

As séries 1 e 5 foram marcadas com imuno-histoquímica para TH, utilizando-se anticorpo primário policlonal anti- tirosina hidroxilase (Chemicon), com o objetivo de identificar os neurônios dopaminérgicos na substância negra e suas projeção para o estriado. O procedimento de imunohistoquímica foi realizado na seguinte ordem: i) incubação para inativar a peroxidase endógena, feita em solução contendo 10% de metanol e 10% de H₂O₂ a 30% por 15 minutos; ii) incubação em soro normal de jumento (SNJ) a 5% por 1h, com objetivo de diminuir ligações inespecíficas e otimizar a ligação antígeno anticorpo; iii) incubação em anticorpo primário anti-TH na titulação de 1:1000 durante 24 h; iv) incubação em anticorpo secundário biotinilado (Jackson Immuno Research), 1:500, por 2 h; e v) o complexo antígeno-anticorpo foi localizado com ABC (complexo avidina-biotina), na titulação de 1:500 durante 1h. O SG (Vector/SK-4700) foi o substrato utilizado para visualização do complexo formado. Após cada

etapa as secções foram lavadas três vezes por 5 minutos. As soluções preparada e as lavagens foram feitas com TFS 0,1 M com pH 7,2 - 7,4.

Após a reação, as secções foram montadas em lâminas previamente gelatinizadas e em seguida as análises foram feitas utilizando microscopia óptica dotada por um sistema de captura de imagem utilizando a objetiva de 20x. De cada sujeito foram analisadas 5 secções do mesencéfalo que correspondem as figuras 55, 57, 59, 61 e 63 do atlas de estereotaxia para camundongos (Paxinos e Franklin, 2004). A identificação do núcleo foi o critério utilizado para determinar neurônios TH-positivo na SN. No presente estudo analisou-se a imunorreatividade das fibras dopaminérgicas no estriado e o número de neurônios TH-positivos na SN, comparando-se o lado injetado com 6-OHDA e o lado contralateral não injetado. A análise também foi realizada comparando-se o tempo de sobrevivência de cada grupo.

3.9 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados do teste de campo aberto e a perda de neurônios TH-positivo na SNpc foram representados em valores percentuais, média \pm erro padrão. Os resultados do teste de rotação induzida por apomorfina foram representados pela média aritmética \pm erro padrão. Ambos os testes foram analisados através da análise de variância (ANOVA) de uma via. Para observar diferenças entre os grupos foi utilizado o teste *t* de *Student* com nível de significância adotado de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

No presente trabalho, nós estudamos em camundongos o modelo de doença de Parkinson baseado na injeção unilateral de 6-OHDA no estriado, onde avaliamos as alterações comportamentais e o curso temporal da degeneração dos neurônios dopaminérgicos na substância negra. A mortalidade de animais injetados no nosso estudo foi de aproximadamente 5%. Na literatura, relata-se que a mortalidade para estudos em camundongos é de 10% (ALVAREZ-FISHER, 2007).

4.1. INJEÇÃO UNILATERAL DE 6-HIDROXIDOPAMINA INDUZ DIMINUIÇÃO DE CÉLULAS TH-POSITIVAS NA VIA NIGROESTRIATAL

4.1.1. Estriado

A administração de uma única dose de 10µg/2µl no estriado esquerdo provocou lesão no sistema nigroestriatal de camundongos C57BL6. Foi observada perda da reatividade das fibras dopaminérgicas no estriado esquerdo 24h após a administração da droga. No entanto, perda pronunciada foi registrada partir do 3º dia de sobrevivência e continuou até 7 dias após a injeção da toxina. Imunorreatividade semelhante à observada nos animais de 7 dias foi identificada em todas as secções do estriado esquerdo dos grupos de sobrevivência de 14 e 28 dias. As análises qualitativas das projeções TH-positivas foram realizadas

comparando-se o lado esquerdo do núcleo estriado com o lado direito, não injetado com 6-OHDA. Nos animais controles não foram observadas alterações na imunorreatividade para TH em nenhum dos grupos analisados. **(Figura 4)**.

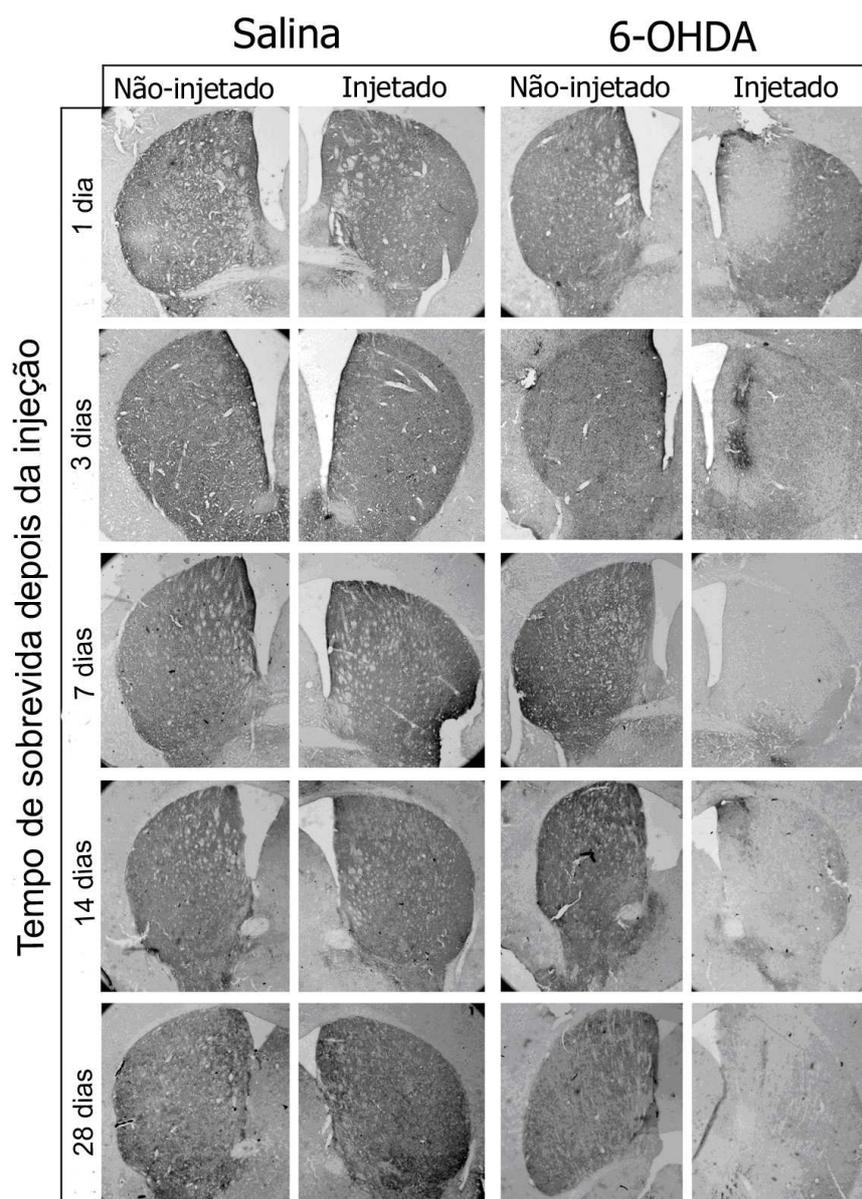


Figura 4 – Fotomicrografias de secções representativas do núcleo estriado de animais injetados com salina (esquerda) e 6-OHDA (direita) no estriado esquerdo, e sacrificados em tempos de sobrevivida diferentes. As secções foram coradas com imuno-histoquímica para tirosina-hidroxilase (TH). Observa-se perda gradual de coloração apenas no lado e nos animais injetados com 6-OHDA.

4.1.2. Substância Negra

Após injeção de 6-OHDA no estriado esquerdo, observamos diminuição progressiva no número de neurônios TH-positivos na SN ipsilateral à injeção intraestriatal de 6-OHDA nos diferentes grupos analisados. As alterações observadas na reatividade para TH foram mais acentuadas quanto maior o período de sobrevivência, e não houve diferença de reatividade entre o lado direito e esquerdo dos respectivos grupos controles (**Figura 5**).

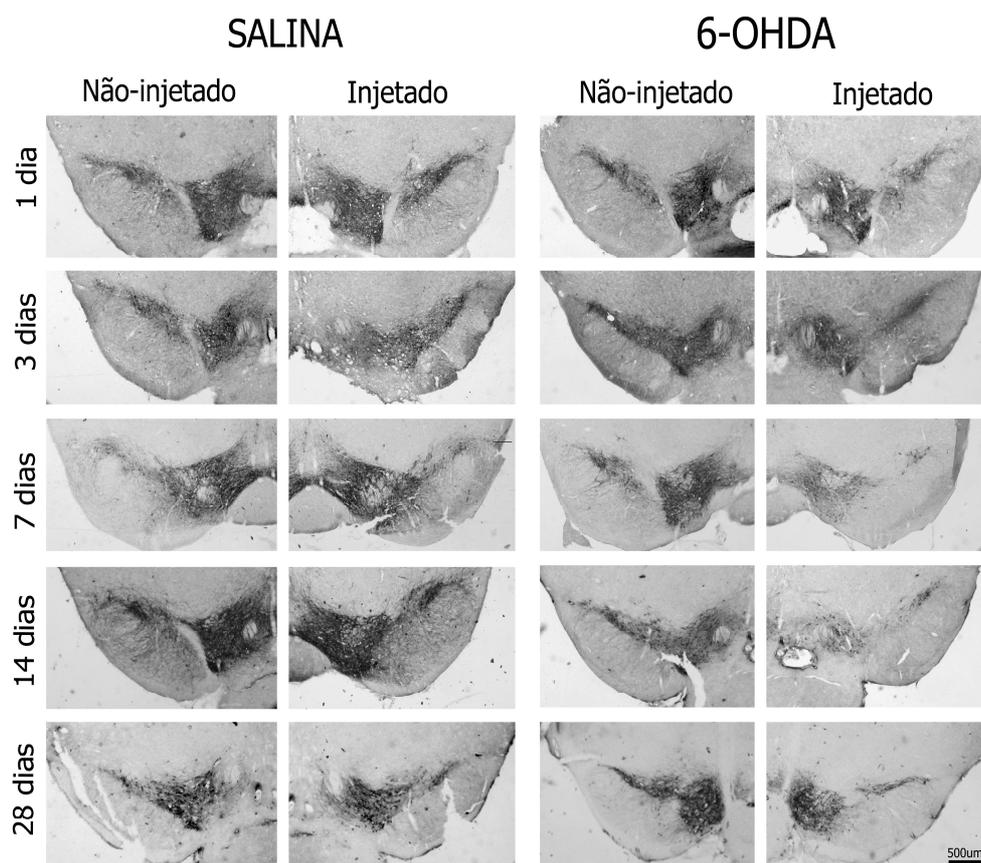


Figura 5 - Fotomicrografias de secções representativas da SN de animais injetados com salina (esquerda) ou 6-OHDA (direita) no estriado esquerdo, e sacrificados após tempos de sobrevivência diferentes. As secções também foram coradas com imunohistoquímica para tirosina-hidroxilase (TH), observando-se perda gradual na coloração apenas no lado e nos animais injetados com 6-OHDA. O mesmo não acontece com animais injetados com salina.

Os neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal foram quantificados e o declínio mais significativo de células TH-positivas foi registrado 28 dias após a injeção da toxina. A perda de neurônios TH-positivos na SN foi primeiramente observada no grupo de 24h de sobrevivência, onde o percentual de células remanescentes no lado ipsilateral foi de $91,3 \pm 4,4\%$ ($*p < 0,05$) comparado com o lado não injetado, essa diferença aumentou proporcionalmente com o aumento da sobrevivência. Neste sentido, o percentual de neurônios sobreviventes diminuiu para $77,8 \pm 18\%$ após 3 dias, $73 \pm 5,1\%$ após 7 dias, $41,3 \pm 5,2\%$ após 14 dias e $29,7 \pm 3,4$ após 28 dias ($*p < 0,05$) da injeção de 6-OHDA. (**Figura 6**).

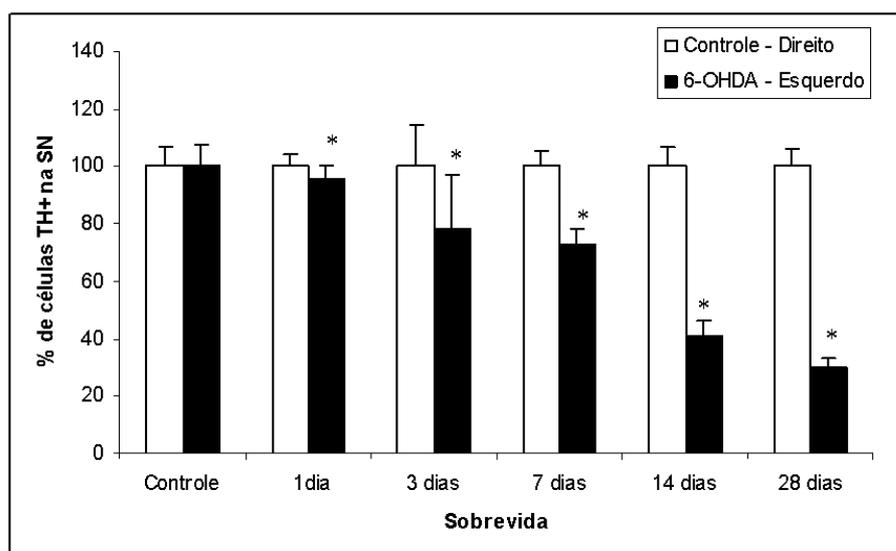


Figura 6: Células TH-positivas na substância negra de animais injetados com solução de $10 \mu\text{g}$ de 6-OHDA no estriado esquerdo ou com solução salina (controle). Os valores estão expressos em percentual em relação ao valor médio absoluto do lado não injetado. Na figura está representado apenas um grupo controle, pois não houve diferença no percentual de células entre eles. As barras brancas representam o lado não-injetado com a toxina ou solução salina (lado controle), enquanto que as barras pretas representam o lado injetado com a toxina. Observa-se diminuição progressiva do percentual de células do lado injetado em relação ao lado não-injetado. Essa diminuição de neurônios reativos a TH pode ser observada também comparando-se o lado injetado com salina (controle) com o lado injetado com 6-OHDA nos grupos de 1, 3, 7, 14 e 28 dias de sobrevivência. A morte de células na SN inicia-se 24h após a administração da toxina e se estende até 28 dias. (teste *t*, $p^* < 0,05$), $N=5$ para cada o grupo controle, e $N=5$ para cada grupo injetado com 6-OHDA.

Considerando-se apenas os animais tratados, não foi observada diferença significativa no percentual de células no lado intacto da SN. No entanto, no lado injetado com a toxina a diferença no percentual de células alcança índices altamente significativos ($*p<0,05$) (**Figura 7**). Comparou-se ainda o percentual de células dopaminérgicas da SN do lado não injetado e o percentual de células do lado não injetado entre os diferentes grupos controles, não encontrando-se diferenças entre eles.

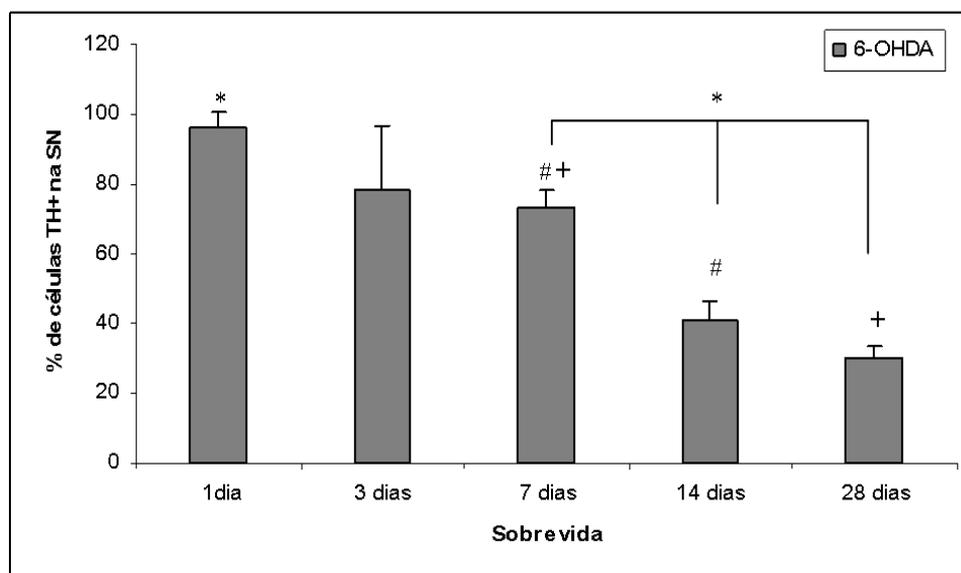


Figura 7- Células TH-positivas na substancia negra de camundongos injetados com solução de 10ug de 6-OHDA no estriado esquerdo. Os valores estão expressos em percentual em relação ao valor médio absoluto do lado não injetado. Na figura estão representados apenas o lado injetado dos grupos de 1, 3, 7, 14 e 28 dias de sobrevivência. Observa-se diminuição progressiva do percentual de neurônios reativos a TH na SN e as diferenças são estatisticamente significativas entre os grupos de 1, 7, 14 e 28 dias de sobrevivência. (teste t , $p^*<0,05$), $N=5$ para cada o grupo controle, e $N=5$ para cada grupo injetado com 6-OHDA.

4.2. A LESÃO NIGROESTRIATAL INDUZIDA POR 6-HIDROXIDOPAMINA PROVOCA AUMENTO DAS ROTAÇÕES NOS TESTES COM APOMORFINA

Os camundongos com lesão unilateral na via nigroestriatal apresentaram comportamento ipsiversivo e contraversivo após estimulação por apomorfina. O grupo de 24h de sobrevida rodou ipsilateralmente à lesão; e a média de rotações em 20 minutos foi de $18 \pm 4,1$ ($*p < 0,05$) comparado com o seu respectivo grupo controle, onde nenhum animal apresentou comportamento rotatório. O grupo de 3 dias de sobrevida apresentou variação inter-individual nesse comportamento, sendo que no universo de 7 animais, 3 rodaram para o lado contralateral, 3 não rodaram e 1 sujeito rodou para o lado ipsilateral a lesão. Nem o comportamento ipsiversivo, nem o contraversivo foram significativamente diferentes em relação ao grupo controle.

Todos os animais dos grupos de 7, 14 e 28 dias apresentaram comportamento contraversivo. Observou-se aumento gradual no número de rotações com aumento no tempo de sobrevida, sendo que a média de rotações foi de 64 ± 13 no grupo de 7 dias, $96 \pm 21,8$ no grupo de 14 dias e $153 \pm 17,8$ no grupo de 28 dias ($*p < 0,05$). Todos os grupos foram comparados com animais submetidos às mesmas condições de tratamento, mas que receberam 2 μ l de solução salina no estriado esquerdo (**Figura 8**).

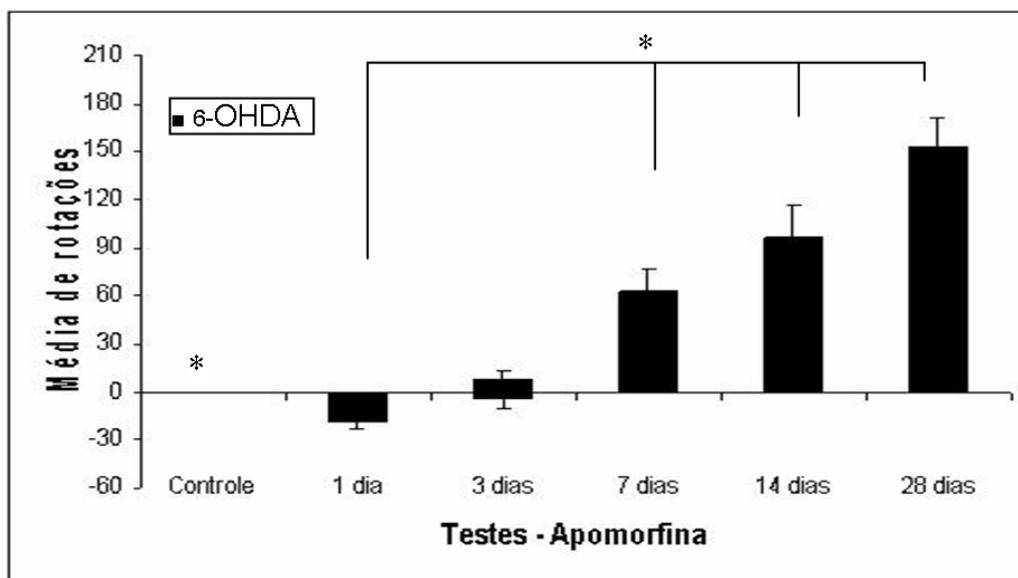


Figura 8 – Comportamento rotatório induzido por apomorfina de animais injetados unilateralmente com solução de 10 µg de 6-OHDA no estriado esquerdo. Na figura estão representados os valores médios de rotação observadas após 1, 3, 7, 14 e 28 dias de sobrevivência. Os animais do grupo de 1 dia rodaram na direção ipsilateral ao lado injetado, enquanto que os animais de 7, 14 e 28 dias a rotação foi para o lado contralateral a injeção da toxina. O grupo de 3 dias apresentou variação neste comportamento, sendo que três animais tiveram comportamento ipsiversivo, três não rodaram e um animal apresentou comportamento contraversivo. Observa-se um aumento gradual no número de rotações com o aumento no tempo de sobrevivência após a injeção, significando que a degeneração continua até 28 dias, que foi o maior tempo de sobrevivência observado. Não houve rotações induzidas por apomorfina nos grupos controles injetados com salina (no gráfico está representado apenas um grupo controle). N=5 por grupo controle, N=5-7 por grupo injetado com 6-OHDA.

Os grupos submetidos ao teste com apomorfina que apresentaram comportamento rotacional para o lado contralateral a lesão foram comparados entre si, e diferenças estatisticamente significativas foram encontradas entre todos os grupos avaliados (**Figura 9**). Os grupos de 1 e 3 dias de sobrevivência, que apresentaram comportamento ipsiversivo também foram avaliados, mas não alcançaram diferenças significativas comparados entre si.

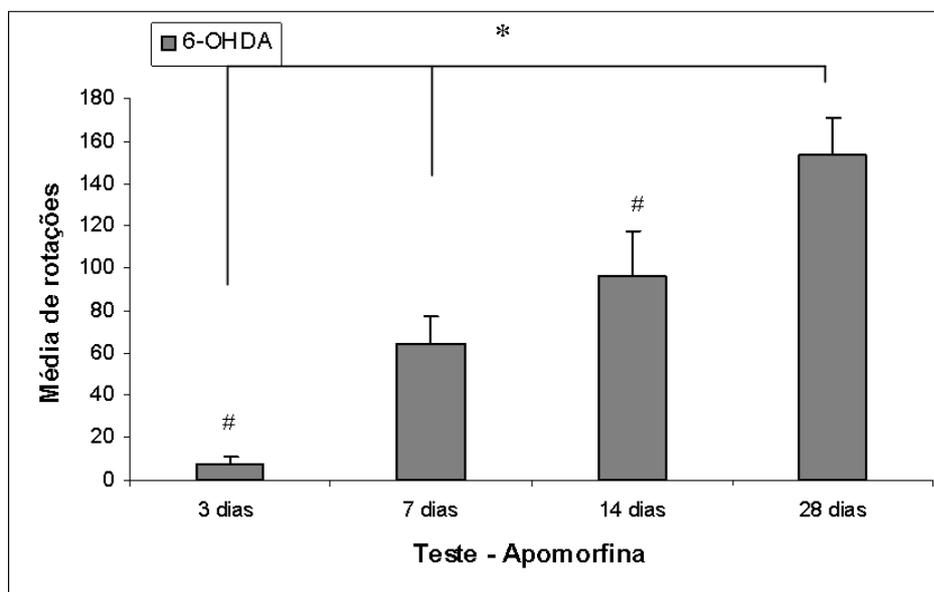


Figura 9 – Comportamento rotatório induzido por apomorfina de animais injetados unilateralmente com solução de 10 µg de 6-OHDA no estriado esquerdo. Na figura estão representados os valores médios de rotação contralateral observadas após 3, 7, 14 e 28 dias de sobrevivência. Observa-se aumento gradual no comportamento contraversivo induzido por agonista dopaminérgico com o aumento no tempo de sobrevivência. Comparando-se com a figura 6, observa-se correlação entre o aumento da degeneração dopaminérgica no lado injetado com o aumento de rotações para o lado contralateral a lesão (vide figura 6). Não observamos diminuição significativa no percentual de células TH-positiva, nem comportamentos rotatórios induzidos por apomorfina nos grupos controles (dados não representados no gráfico). N=5 por grupo controle, N=5-7 por grupo injetado com 6-OHDA. Teste *t*, * ou # $p < 0,05$.

Os grupos de 14 e 28 dias foram submetidos a testes com apomorfina a cada 7 dias, com o objetivo de acompanhar a progressão do número de rotações no mesmo grupo. O grupo de 14 dias foi submetido duas vezes ao teste com apomorfina e o grupo de 28 dias foi avaliado quatro vezes. Foi registrado aumento gradual no número de rotações com aumento no tempo de sobrevivência, corroborando com os resultados anteriores (**Figura 10**).

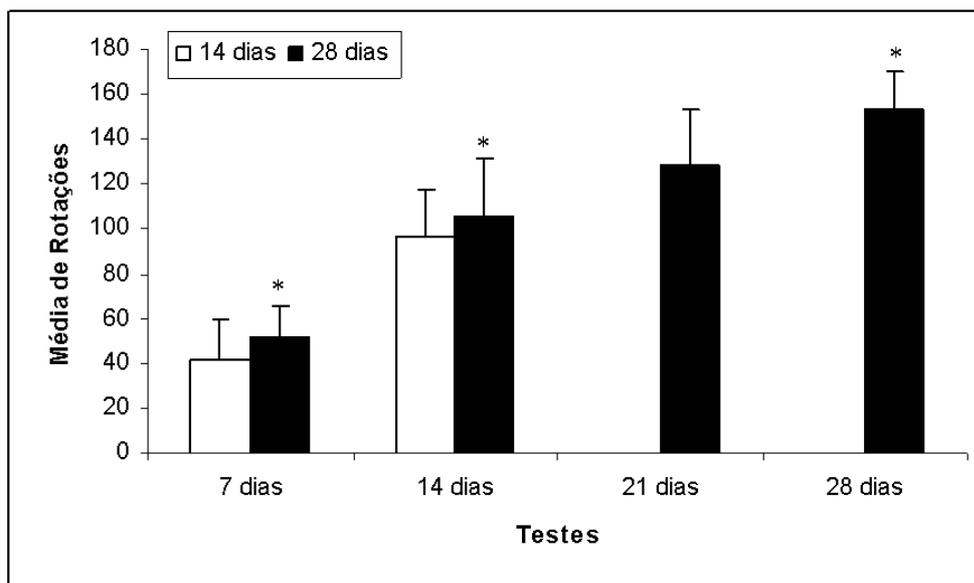


Figura 10 – Comportamento rotatório induzido por apomorfina de animais injetados unilateralmente com solução de 10 µg de 6-OHDA no estriado esquerdo. Na figura estão representados os valores médios de rotação observada nos grupos de 14 e 28 dias de sobrevivência, sendo que os animais do grupo de 14 dias foram submetidos 2x ao teste e o grupo de 28 dias foi submetido 4x ao teste. As barras brancas representam a média de rotações no grupo de 14 dias, enquanto que as barras pretas a média de rotações no grupo de 28 dias de sobrevivência. Observa-se aumento progressivo na média de rotações com aumento da sobrevivência. Não houve diferença significativa entre os grupos de 14 e 28 dias comparando-se os testes realizados no 7º e no 14º dia (N=7 para cada o grupo de 14 dias de sobrevivência, e N=6 para cada grupo o grupo de 28 dias de sobrevivência. Teste *t*, $p^* < 0,05$)

4.3. A LESÃO INDUZIDA POR 6-HIDROXIDOPAMINA ALTERA A ATIVIDADE MOTORA NO TESTE DE CAMPO ABERTO

No campo aberto, atividade exploratória e o comportamento motor espontâneo dos animais injetados com 6-OHDA ou solução salina foram avaliados antes e depois da cirurgia. A atividade motora antes da cirurgia foi utilizada como linha de base para comparações subsequentes, de acordo com a sobrevivência de

cada grupo. Nos grupos injetados com 6-OHDA, os parâmetros de ambulação e bipedestação foram significativamente reduzidos em relação aos respectivos grupos controle e esta diferença também foi observada em relação à linha de base dos grupos tratados. Os valores foram expressos em percentual em relação ao valor médio absoluto do grupo controle correspondente. A descrição detalhada dessas observações vêm a seguir.

4.3.1. Ambulação

A média de ambulação antes da cirurgia, utilizada como linha de base, foi registrada como 100% em todos os grupos controles e tratados. Com o objetivo de acompanhar a atividade exploratória no mesmo grupo, os animais de 14 e 28 dias de sobrevida foram avaliados a cada 7 dias no campo aberto e considerado apenas o último dia de teste na comparação entre os grupos.

Em relação à linha de base, a ambulação foi significativamente reduzida em todos os grupos tratados, apresentando apenas $15\pm 5,6\%$ em 1 dia, $21\pm 7,3\%$ em 3 dias, $22\pm 7,4\%$ em 7 dias, $33\pm 5,0\%$ em 14 dias e $46\pm 6,7\%$ em 28 dias (* $p < 0,05$) após a injeção de 6-OHDA. A diferença também alcançou índices significativos quando comparados com seus respectivos controles depois da cirurgia, exceto no grupo de 28 dias.

Não houve diferença na média de ambulação antes e depois da cirurgia nos grupos controles de 1, 3 e 7 dias de sobrevida, no entanto, a atividade motora espontânea foi estatisticamente reduzida nos grupos controles de 14 e 28 dias **(Figura 11)**. Embora a diferença entre dos grupos tratados em relação aos controles seja significativa após a cirurgia, exceto no grupo de 28 dias, é notória a diminuição da diferença com o aumento da sobrevida.

É importante ressaltar que o grupo de 14 dias de sobrevida foi avaliado, incluindo-se o teste que antecedeu a cirurgia (linha de base), três vezes no campo aberto e o grupo de 28 dias foi submetido à avaliação motora cinco vezes. A diferença encontrada nos grupos controles antes e depois da cirurgia nos animais de 14 e 28 dias de sobrevida pode ser o reflexo da habituação destes animais no aparato experimental.

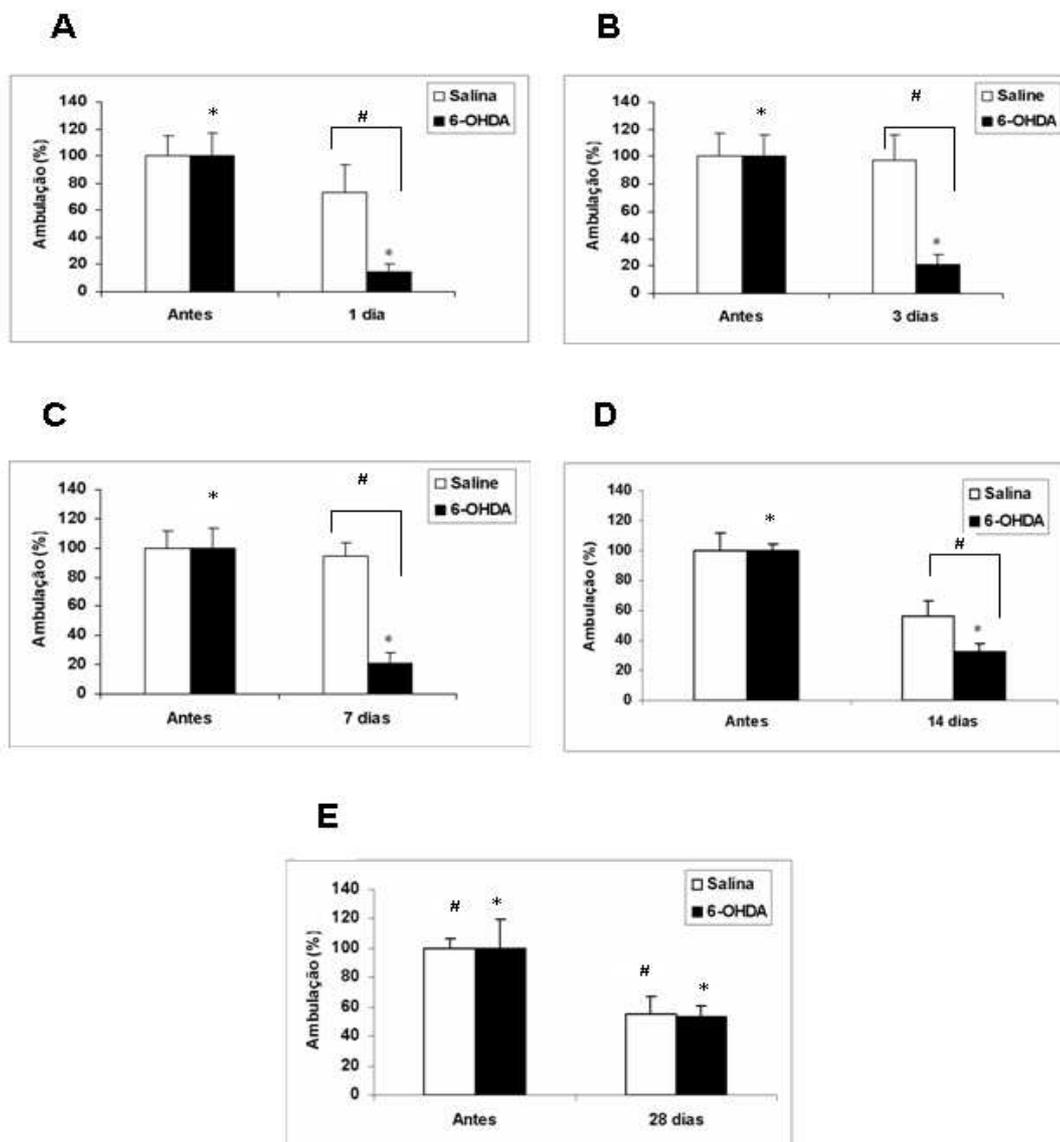


Figura 11 – Comportamento ambulatorio de animais injetados com 6-OHDA ou com solução salina (controles) antes e depois da injeção. Os valores são expressos em percentual em relação ao valor médio absoluto do grupo controle correspondente. Em A–E, mostramos os resultados para os grupos com sobrevivência 1, 3, 7, 14 e 28 dias. As barras brancas representam os grupos injetados com solução salina, enquanto que as barras pretas os grupos injetados com 6-OHDA. Pelo comportamento dos grupos controles (barras brancas), observa-se que ocorre algum grau de habituação ao teste com diminuição do número de cruzamentos com a repetição do teste, que pode ser constatado nos grupos de 14 e 28 dias de sobrevivência (3 vezes para o grupo de 14 dias e 5 vezes para o grupo de 28 dias), gráficos D e E respectivamente. Apesar desta habituação, os resultados mostram que a injeção de 6-OHDA provoca diminuição mais acentuada na ambulação, e isso pode ser observado em todos os grupos e tempos de sobrevivência (teste *t*, $p < 0,05$), exceto no último teste do grupo de 28 dias (gráfico E). $N=5$ para cada grupo controle, e $N=5-7$ para cada grupo injetado com 6-OHDA.

A atividade motora espontânea dos grupos de 14 e 28 dias foi registrada a cada 7 dias. O aumento da atividade exploratória dos tratados em relação ao grupo controle foi aumentando gradativamente com o aumento da sobrevivência, corroborando com os resultados anteriores. Na **Figura 12** está representado apenas o grupo de 28 dias de sobrevivência.

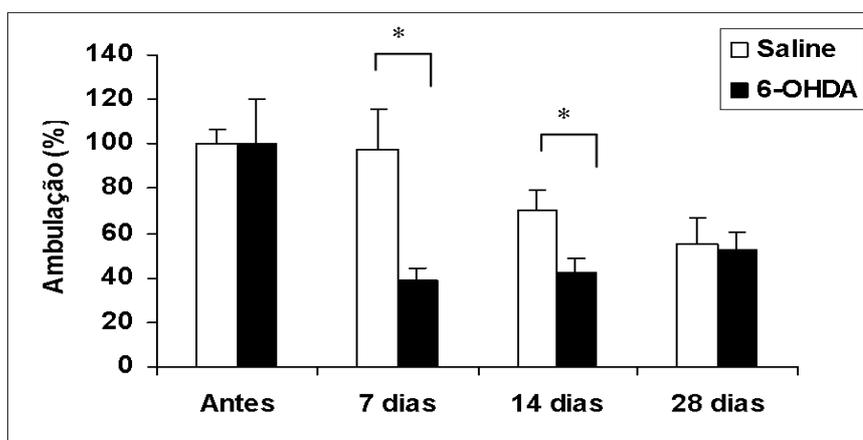


Figura 12 - Ambulação de animais de 28 dias injetados com 6-OHDA ou com solução salina (controles) antes e depois da cirurgia de estereotaxia. Os valores estão expressos em percentual em relação ao valor médio absoluto do grupo controle. As barras brancas representam os grupos injetados com solução salina, enquanto que as barras pretas os grupos injetados com 6-OHDA. Pelo comportamento dos grupos controles (barras brancas), observa-se que ocorre algum grau de habituação ao teste com diminuição do número de cruzamentos com a repetição do teste (5 vezes). Apesar desta habituação, os resultados mostram que a injeção de 6-OHDA provoca diminuição mais acentuada na ambulação, seguida de crescente recuperação da atividade motora espontânea nos animais injetados com a toxina. Teste *t*, $p^* < 0,05$. $N=5$ para cada grupo controle, e $N=6$ para cada grupo injetado com 6-OHDA.

4.3.2. Bipedestação

Assim como na avaliação da ambulação (acima), a média de bipedestação antes da cirurgia foi utilizada como linha de base e foi registrada como 100% em todos os grupos controles e tratados. Em relação à linha de base, a bipedestação

foi significativamente reduzida em todos os grupos tratados, apresentando apenas $7\pm 5,0\%$ em 1 dia, $4\pm 2,7\%$ em 3 dias, $4\pm 2,6\%$ em 7 dias, $29\pm 11,3\%$ em 14 dias e $38\pm 12,2\%$ em 28 dias de sobrevida ($*p<0,05$). Todos os grupos tratados comparados com seus respectivos controles também alcançaram índices significativos, exceto no grupo de 28 dias. E assim como no comportamento ambulatório, nota-se uma pequena recuperação no número de bipedestações nos tempos de sobrevida maiores de 14 e 28 dias (**Figura 13**).

Não houve diferença na média de bipedestações antes e depois da cirurgia nos grupos controles de 3 e 7 dias de sobrevida, no entanto, este parâmetro foi estatisticamente reduzido nos grupos de 1, 14 e 28 dias.

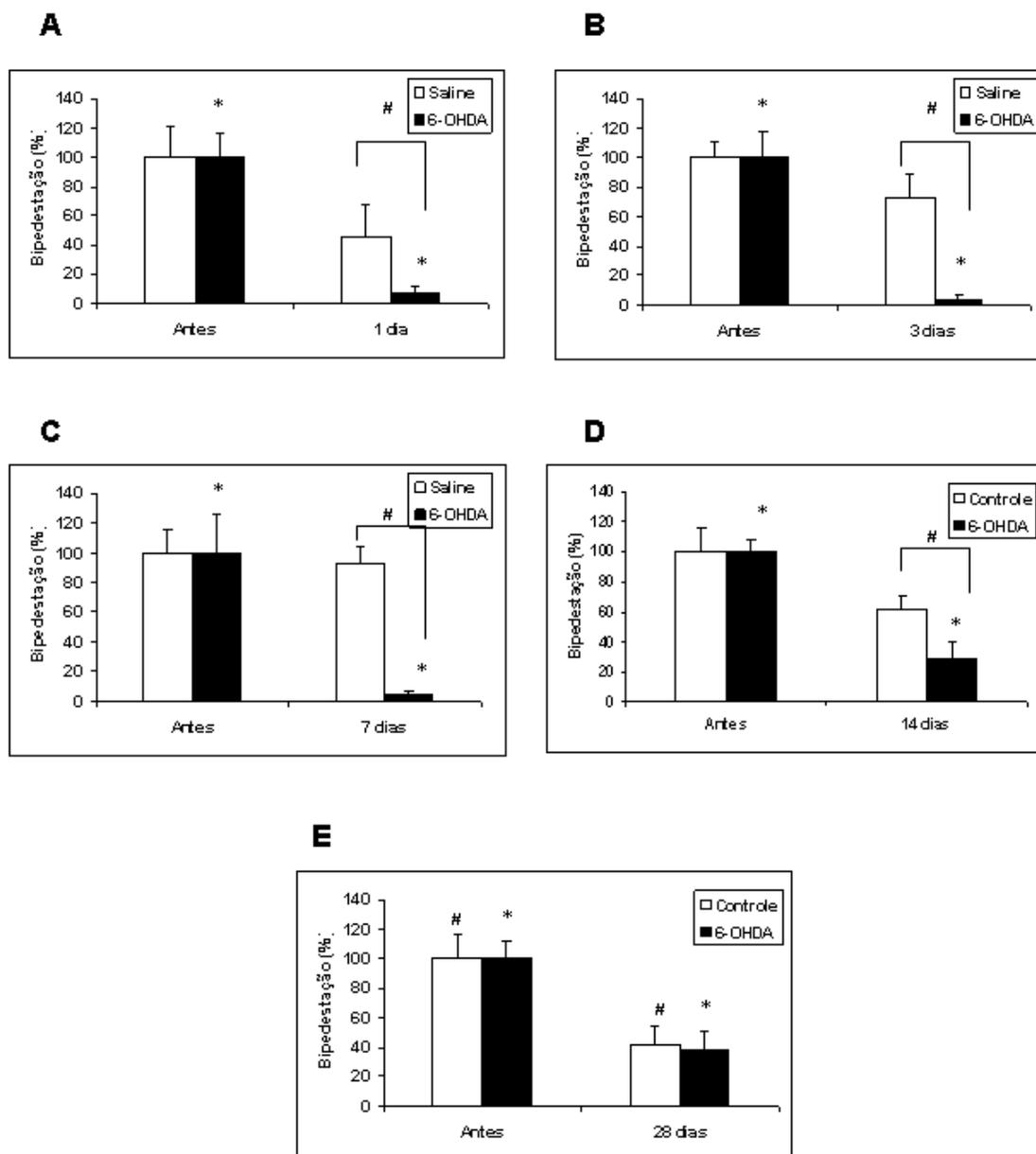
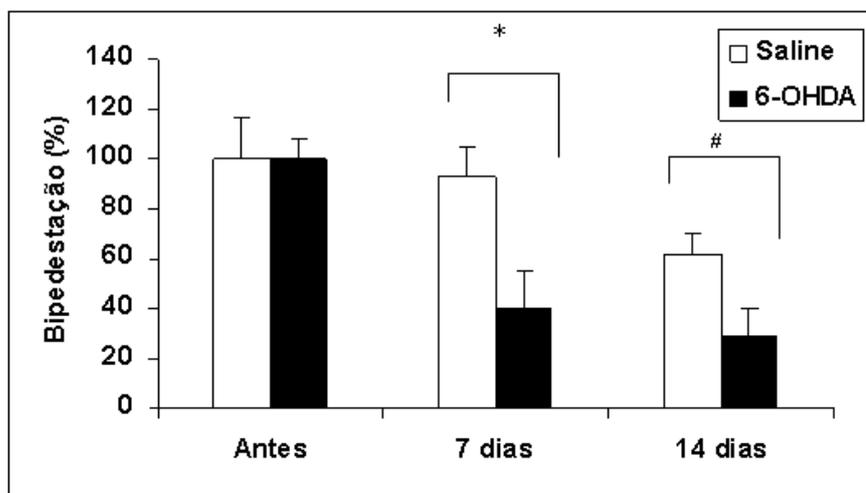


Figura 13 - Comportamento de bipedestação de animais injetados com 6-OHDA ou com solução salina fisiológica (controles) antes e após à injeção. Os valores estão expressos em percentual em relação ao valor médio absoluto do grupo controle correspondente. Em A-E, mostramos os resultados para os grupos com sobrevivência de 1, 3, 7, 14 e 28 dias. As barras brancas representam os grupos injetados com solução salina, enquanto que as barras pretas representam os grupos injetados com 6-OHDA. Os resultados foram equivalentes àqueles obtidos na avaliação da ambulação (Figura 10). Também se observa algum grau de habituação com a repetição do teste (vide grupo de 14 e 28 dias de sobrevivência, D e E respectivamente). Mas apesar dessa habituação, os resultados mostram que a injeção de 6-OHDA provoca diminuição mais acentuada no número de bipedestação, sendo isso observado principalmente nos grupos de 1, 3 e 7 e 14 dias de sobrevivência.

É importante ressaltar que os grupos controle (salina) e 6-OHDA de 14 dias de sobrevida foram avaliados, incluindo-se a linha de base, três vezes no campo aberto e os grupos de 28 dias foram submetidos à avaliação motora cinco vezes. A diferença encontrada nos controles antes e depois da cirurgia nos grupos de 14 e 28 dias explica-se pela habituação destes animais no aparato experimental, . Enquanto que a diferença encontrada no grupo de 24h pode ser apenas reflexo do curto período de recuperação da cirurgia.

A atividade exploratória no campo aberto dos grupos de 14 e 28 dias foi registrada a cada 7 dias. Nos grupos tratados, observou-se diminuição significativa no percentual de bipedestação em relação aos controles, semelhante às diferenças encontradas quando comparou-se grupos experimentais distintos com sobrevidas equivalentes. Houve variação para este comportamento somente no grupo tratado de 7 dias de sobrevida em relação ao primeiro teste após 7 dias no grupo tratado de 28 dias (**Figura 13 C e figura 14**). Embora a diferença nos testes, do grupo tratado em relação ao controle seja significativa, exceto no grupo de 28 dias, o percentual de bipedestação nos grupos tratados se mantém na mesma faixa em todos os testes (**Figura 14**).

A



B

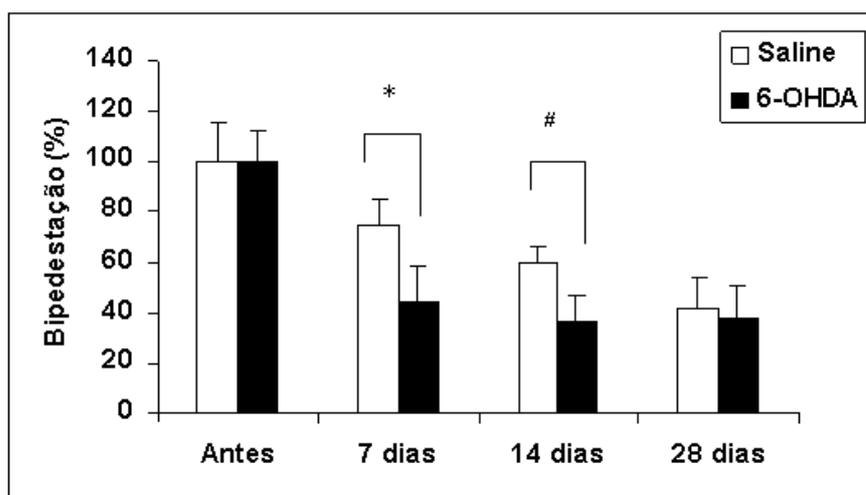


Figura 14 – Bipedestação de animais injetados com 6-OHDA ou com solução salina fisiológica (controles) antes e depois da cirurgia de estereotaxia. Os valores estão expressos em percentual em relação ao valor médio absoluto do grupo controle correspondente. Em A mostramos os resultados para os grupos controle e tratado de sobrevida de 14 dias, e em B mostramos os resultados para os grupos controle e tratado 28 dias de sobrevida. As barras brancas representam os grupos controles, enquanto que as barras pretas representam os grupos injetados com a toxina. Observa-se diferenças significativas entre tratado e controle nos testes de 7 e 14 dias, tanto no grupo de 14 dias, quanto no grupo de 28 dias. Concomitantemente, observa-se diminuição gradual deste parâmetro nos grupos controles de 14 e 28 dias. Notavelmente, ocorre algum grau de habituação com a repetição do teste. N=5 para cada grupo controle, e N=7 para o grupo injetado de 14 dias de sobrevida e N=6 para o grupo injetado de 28 dias de sobrevida. Teste *t*, $p^* < 0,05$.

4.4. CORRELAÇÃO ENTRE DEGENERAÇÃO NIGRAL E ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS

O modelo de injeção intracerebral de 6-OHDA é considerado um modelo clássico de DP. No presente estudo injetou-se 10 µg de 6-OHDA no núcleo estriado esquerdo de camundongos e avaliou-se a magnitude da lesão no estriado e a perda de neurônios dopaminérgicos na SN após 1, 3, 7, 14 e 28 dias. Avaliou-se ainda, o comportamento rotatório após estimulação com apomorfina e o desempenho motor espontâneo (ambulação e bipedestação) no teste de campo aberto. O grau de correlação entre essas quatro variáveis foi estimado e os coeficientes encontram-se na tabela abaixo.

	Perda Neuronal na SN	Rotações	Ambulação	Bipedestação
Perda Neuronal na SN	1.00			
Rotações	0.96	1.00		
Ambulação	0.76	0.76	1.00	
Bipedestação	0.80	0.78	0.95	1.00

Observa-se o alto grau de correlação entre a perda neuronal na SN e o número de rotações induzida por apomorfina (0,96), enquanto que uma correlação menor é observada com os parâmetros ambulação (0,76) ou bipedestação (0,8). Por outro lado, há um alto grau de correlação entre ambulação e bipedestação (0,95).

Na figura 15 podemos observar o perfil de variação das quatro variáveis testadas em função do tempo de sobrevida. Os dados foram normalizados e expressos em valores percentuais para melhor comparação.

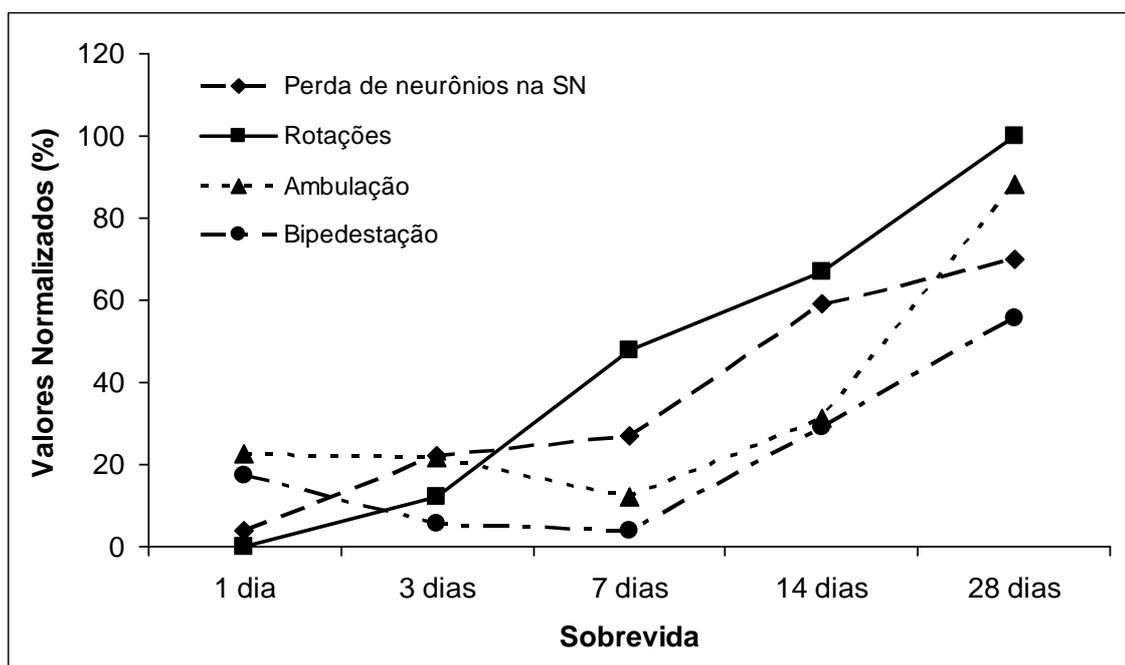


Figura 15 - Correlação entre degeneração dopaminérgica ipsilateral e testes comportamentais em animais injetados com 6-OHDA. A perda neuronal na SN do lado injetado com a toxina está expresso em valores percentuais em relação ao valor médio absoluto do lado não injetado. Os valores de números de rotações foram normalizados considerando-se o maior valor (do grupo de 28 dias) como igual a 100% parâmetros. Os outros dois parâmetros comportamentais, ambulação e bipedestação, estão representados por valores percentuais em relação aos grupos controles respectivos.

5. DISCUSSÃO

5.1 – A DOSE DE 6-OHDA

O modelo de injeção intracerebral de 6-OHDA é considerado um modelo clássico de DP e tem sido utilizado em experimentos que visam testar o potencial neuroprotetor de certas drogas e terapias celulares. Enquanto o modelo já encontra-se bem caracterizado em ratos (BETARBET *et al.*, 2002; SHIMOHAMA *et al.*, 2003; PRZDEDBORSKI *et al.*, 1995), uma descrição mais detalhada ainda carece em camundongos, apesar do mesmo ser utilizado com frequência para estudos investigativos de terapias potenciais para a DP (NISHIMURA *et al.*, 2003; CUNNINGHAM e SU, 2002).

Na literatura, encontra-se grande variação nas doses de 6-OHDA administradas no encéfalo de camundongos: 4 µg (ALVAREZ-FISCHER *et al.*, 2007; NISHIMURA *et al.*, 2003); 16 µg (CUNNINGHAM e SU *et al.*, 2002); 20 µg (SILVA *et al.*, 2005); 30 µg (BENSADOUN *et al.*, 1998). Nos estudos apresentados, o volume injetado também variou de 2 µl nos trabalhos de ALVAREZ-FISCHER *et al.* (2007), NISHIMURA *et al.* (2003), CUNNINGHAM e SU *et al.* (2002) e BENSADOUN *et al.* (1998); para 4µl nos trabalhos de SILVA *et al.* (2005).

NISHIMURA *et al.*, (2003) injetaram 4 μ g/2 μ l de 6-OHDA no lado direito do núcleo estriado de camundongos adultos da linhagem 129/SvJ e registraram o comportamento rotacional induzido por apomorfina em 2, 4, 6, 8, 10 e 12 semanas de sobrevivência. Os pesquisadores avaliaram o potencial neuroprotetor de enxerto no estriado de neurônios dopaminérgicos diferenciados *in vitro* a partir de células tronco embrionárias. Eles demonstraram que o comportamento rotacional induzido por agonista dopaminérgico diminuiu significativamente após o transplante, que ocorreu na 4 semana após a injeção da toxina. No entanto, os autores relatam que a eficácia da terapia depende da concentração de células tronco transplantadas.

Camundongos da linhagem C57BL6 foram utilizados em outros estudos relacionados com a patofisiologia da DP. O modelo de hemiparkinsonismo induzido por 6-OHDA utilizando camundongos desta linhagem foi utilizado no trabalho desenvolvido por Cunningham e Su (2002). Eles injetaram uma dose de 16 μ g/2 μ l no estriado direito e utilizando-se de métodos de imunohistoquímica observaram perda celular de 86% na SN duas semanas após a administração da toxina. Outro trabalho também relacionado ao hemiparkinsonismo induzido por 6-OHDA em camundongos C57BL6 foi realizado por Silva *et al.* (2005). Estes pesquisadores administraram 4 μ l contendo 20 μ g da toxina no estriado e registraram perda de 79% de células reativa a TH na SNpc. Os autores não discutiram a perda neuronal na via nigroestriatal com alterações motoras.

Bensadoun *et al.*, (1998) injetaram 30µg/2µl de 6-OHDA i.c.v. (intraventricular) em camundongos da linhagem C57BL6. Após 24h, a injeção da toxina induziu diminuição de 34% dos níveis de dopamina no estriado e morte celular de 52% na SN, 7 dias após o tratamento. Já Lundblad *et al.* (2004) injetaram no feixe prosencefálico medial (MFB) de camundongos C57BL6, 2 injeções de 6µg/2µl de 6-OHDA unilateralmente. Os autores registraram diminuição de 70% da recaptção de dopamina no estriado. Esta alteração foi observada em imuno-histoquímica para TH 32 dias após a administração. No entanto, o curso temporal e a progressão da lesão não foram descritos.

Os trabalhos desenvolvidos por Alvarez-Fischer *et al.* (2007) avaliaram a perda de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal, a concentração de dopamina e metabólitos no estriado, e comportamento motor no bastão giratório (rotarod). A avaliação foi realizada após injeção de 4µg/2µl de 6-OHDA no estriado esquerdo de camundongos C57BL6 em 3, 7, 14, 28 e 56 dias de sobrevida. Os autores relataram que a maior parte da perda dos neurônios dopaminérgicos na SN ocorre nos primeiros 7 dias, com pouco incremento da perda entre 7 e 56 dias. No teste no bastão giratório, o déficit motor ocorreu já após 3 dias de sobrevida, com recuperação progressiva após 14 dias.

Em comparação aos trabalhos de ALVAREZ-FISCHER *et al.*, 2007, nós injetamos dose maior, 10 µg de 6-OHDA em volume equivalente (2 µl), no estriado e na mesma linhagem de camundongo utilizados nos trabalhos desses pesquisadores. Verificamos a ocorrência de degeneração progressiva no sistema

dopaminérgico nigroestriatal, prejuízo motor no teste de campo aberto com crescente recuperação até 28 dias, e aumento progressivo do número de rotações contralaterais após indução com apomorfina.

5.2 – O CURSO TEMPORAL DA DEGENERAÇÃO DOPAMINÉRGICA NA VIA NIGRO-ESTRIATAL

Seguindo a injeção de 6-OHDA, nós observamos que em 24h de sobrevida já ocorre perda da reatividade das fibras dopaminérgicas no estriado. Observamos também diminuição progressiva de células TH-positivas na SN ipsilateral, com perda celular de aproximadamente 30% após 3 dias de sobrevida e continuação da degeneração na SN até 28 dias. ALVAREZ-FISCHER *et al.*, 2007 relataram que a maior parte da perda de neurônios dopaminérgicos na SN ocorre nos primeiros 7 dias, com pouco incremento da degeneração entre 7 e 56 dias e asseguram que o curso temporal da degeneração na via nigroestriatal em camundongos é mais curto comparado com curso temporal da degeneração em ratos.

A explicação para a diferença do curso temporal da via nigroestriatal entre as espécies segundo ALVAREZ-FISCHER *et al.*, 2007, consiste primeiramente na distância entre o local da injeção e os corpos celulares na SN, seguido da relação entre o volume injetado e a estrutura lesada, que em camundongos são menores quando comparados com ratos. Estas diferenças anatômicas podem contribuir para que a lesão crônica na via nigroestriatal de camundongos seja mais rápida do que em ratos.

ALVAREZ-FISCHER *et al.*, (2007), avaliaram a morte de neurônios dopaminérgicos na SN, concentração de dopamina no estriado e desempenho motor no teste do rotômetro após 3, 7, 14, 28 e 56 dias de sobrevida. Consoante a avaliação motora, os autores observaram déficit após 3 dias de sobrevida com recuperação progressiva a partir da segunda semana. Entretanto, o teste do rotômetro avalia apenas se há ou não um déficit motor, que não guarda necessariamente uma correlação com a degeneração nigroestriatal. E pelos resultados relatados, tal parâmetro comportamental, de fato, não correlaciona-se diretamente com a degeneração, visto que esta progride com o tempo de sobrevida, enquanto que o comportamento avaliado no rotômetro primeiro piora e depois melhora.

O teste comportamental mais adequado é o que avalia as rotações induzidas farmacologicamente com apomorfina ou com anfetaminas, pois ele podem dar uma leitura mais direta sobre o estágio ou grau de degeneração no sistema nigroestriatal. Esse teste tem sido usado nos trabalhos de neuroproteção com a premissa de que de fato essa correlação exista, embora nenhum estudo tenha demonstrado isso claramente. O nosso trabalho, portanto, tenta preencher essa lacuna, e avalia o grau de correlação entre a degeneração dopaminérgica nigroestriatal com o teste das rotações induzidas por apomorfina em camundongos com hemiparkinsonismo induzido por 6-OHDA a fim de discutir a viabilidade do uso desse teste como parâmetro final que indique se uma determinada terapia testada foi bem sucedida ou não.

5.3 – ADMINISTRAÇÃO ESTRIATAL DE 6-OHDA INDUZ ALTERAÇÕES MOTORAS EM CAMUNDONGOS

No presente estudo, os animais foram avaliados em 1, 3, 7, 14 e 28 dias após a administração de 6-OHDA, nos teste com apomorfina e campo aberto. Nossos resultados mostram que o teste com agonista dopaminérgico é o mais adequado para inferir sobre o grau de assimetria na via nigroestriatal. Pois, tanto a degeneração ipsilateral quanto o comportamento rotatório induzido por apomorfina aumentaram progressivamente com o aumento da sobrevida. Enquanto que no teste de campo aberto não houve registro de correlação entre a lesão unilateral na via nigroestriatal e permanência da hipolocomoção neste teste.

5.3.1 – Avaliação no Campo Aberto

O teste de campo aberto é amplamente utilizado para registrar o desempenho motor espontâneo e atividade exploratória de diversas espécies de animais (ANDRIGA, *et al.*, 2000). No presente trabalho, camundongos da linhagem C57BL6 foram avaliados no teste de campo aberto, antes e depois da cirurgia. A atividade motora e exploratória antes da cirurgia foi utilizada como linha

de base para comparações subseqüentes, de acordo com a sobrevivência de cada grupo.

No modelo de parkinsonismo induzido por 6-OHDA em camundongos verificamos que houve redução da atividade motora espontânea e atividade exploratória dos animais de todos os grupos de sobrevivência em relação à linha de base (teste antes da injeção) após a infusão estriatal desta neurotoxina. A hipolocomoção foi mais acentuada 24h após a cirurgia e diminuiu com o aumento do tempo de sobrevivência. No último dia de teste do grupo de 28 dias, os parâmetros de ambulação e bipedestação não foram significativos em relação aos animais controle. Os animais do grupo controle de 24h tiveram diminuição na bipedestação em relação à linha de base (Figura 12), o que reforça que parte do efeito observado nos animais injetados com 6-OHDA do grupo de 24h se deve a influências inespecíficas do procedimento cirúrgico.

O grupo controle de 24h também apresentou tendência à diminuição da ambulação, mas a diferença em relação à linha de base não atingiu significância estatística. Nos grupos controles de 3 e 7 dias de sobrevivência, os parâmetros comportamentais de ambulação e bipedestação tendem a aumentar, para depois diminuir nos grupos de 14 e 28 dias de sobrevivência. Esse comportamento é compatível com uma recuperação dos possíveis efeitos da cirurgia seguida de habituação ao teste. Esses resultados são corroborados pelos estudos de Lundblad *et al.*, (2004), que também registraram hipolocomoção logo após a

cirurgia de estereotaxia seguida de recuperação motora espontânea no testes de campo aberto.

Entretanto, independente da influência da cirurgia sobre os parâmetros analisados, os grupos injetados com 6-OHDA ainda assim apresentam uma redução adicional na taxa de ambulação e bipedestação realizadas, e esse efeito atribuímos ao tratamento com a toxina e a degeneração nigroestriatal dela resultante. A recuperação progressiva da atividade motora horizontal e vertical dos camundongos no teste de campo aberto parece ocorrer devido à manutenção da integridade do lado não injetado da via nigroestriatal, concomitante a mecanismos compensatórios associados com o lado lesado. Esses mecanismos compensatórios podem estar relacionados com o aumento da síntese de receptores dopaminérgicos pós-sinápticos que contribuem para melhorar a modulação dopaminérgica do lado lesado.

Nossos resultados mostram, portanto, que não há correlação entre a perda unilateral de neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal e diminuição da atividade motora espontânea e diminuição da atividade exploratória no teste de campo aberto. Observamos diminuição acentuada na ambulação e bipedestação 24h após a injeção da toxina e crescente recuperação da atividade motora espontânea nos testes realizados. Portanto, esses parâmetros avaliados no modelo de campo aberto não podem ser considerados adequados para medidas diretas da degeneração nigroestriatal induzida pela injeção de 6-OHDA.

5.3.2 – Teste das Rotações Induzidas por Apomorfina

O teste com apomorfina, um agonista dopaminérgico, está associado ao comportamento rotatório em ratos com lesão unilateral na via nigroestriatal (PERESE *et al.*, 1989; PRZDEDBORSKI *et al.*, 1995; LUNDBLAD, *et al.*, 2002). No presente trabalho, observamos comportamento ipsiversivo em todos os camundongos do grupo de 24h de sobrevivência. O grupo avaliado no terceiro dia apresentou variação da resposta motora neste teste, sendo que três sujeitos rodaram para o lado contralateral e um rodou para o lado ipsilateral à lesão. Todos os animais dos grupos de 7, 14 e 28 dias apresentaram comportamento contraversivo. Registramos aumento no número de rotações com aumento da sobrevivência, sendo que a média de rotações foi de 64 ± 13 no grupo de 7 dias, $96 \pm 21,8$ no grupo de 14 dias e $153 \pm 17,8$ no grupo de 28 dias (* $p < 0,05$).

A literatura relata que tamanhos diferentes de lesão na via nigroestriatal de ratos pode influenciar na intensidade e no sentido das rotações. Comportamento ipsiversivo está associado a animais que tiveram perda de até 50% de neurônios dopaminérgicos nigrais (SCHWARTING e HUSTON, 1996). A explicação clássica para o comportamento ipsiversivo em ratos com lesão unilateral consiste num desequilíbrio dopaminérgico entre lado lesado e o íntegro. Este desequilíbrio é mediado por ativação dopaminérgica menos intensa do lado lesado em relação ao

lado não-lesado. Pois, o lado que recebeu a toxina possui menos dopamina endógena do que no lado contralateral. Assim, a apomorfina administrada sistemicamente tem o efeito somado com a dopamina endógena e o resultado é a maior estimulação do lado íntegro e rotação para o lado ipsilateral à lesão pela decussação das vias motoras descendentes (SCHWARTING e HUSTON, 1996).

Por outro lado, é reportado na literatura que comportamentos contraversivos induzidos por apomorfina ocorrem devido à estimulação de receptores dopaminérgicos pós-sinápticos supersensibilizados no estriado lesado. Rotações contralaterais ocorreriam somente quando houvesse lesão unilateral extensa com diminuição crônica de dopamina no estriado e perda de 90% de neurônios na SNpc (SCHWARTING e HUSTON, 1996). No entanto, nossos resultados mostram que em camundongos com perda de aproximadamente 26% dos neurônios nigrais já é possível observar comportamentos contraversivos. Rotações contralaterais à lesão foram observadas a partir do 3º dia de sobrevida e aumentou progressivamente com o aumento da degeneração.

Com os resultados dos nossos experimentos nós sugerimos que o comportamento ipversivo observado com 24h de sobrevida se deve à disfunção nigroestriatal do lado injetado (sem ainda grande percentual de degeneração) sem a ocorrência de up-regulation ou supersensibilização dos receptores pós-sinápticos. Com isso, como explicado acima, a apomorfina teria efeito estimulatório maior sobre as vias do lado contralateral à lesão. Por isso, e devido à decussação das vias motoras, o animal roda para o lado ipsilateral à injeção.

Como o grau de degeneração ou disfunção é baixo (devido ao curto tempo de sobrevivência), o número absoluto de rotações é proporcionalmente baixo. Com o aumento do tempo de sobrevivência, a degeneração nigroestriatal no lado injetado vai se instalando progressivamente, assim como a up-regulation ou supersensibilização dos receptores nos neurônios estriatais pós-sinápticos aos terminais dopaminérgicos. Esse quadro ainda ocorreria em baixa intensidade e de forma variável após 3 dias de sobrevivência, resultando aí na grande variabilidade do comportamento rotatório no grupo. Com tempos de sobrevivência maiores (7, 14 e 28 dias), tanto a degeneração quanto à sensibilização dos receptores aumentaria de forma progressiva e explicaria o aumento gradual no comportamento rotatório contraversivo.

Finalmente, o comportamento rotatório induzido por apomorfina em camundongos da linhagem C57BL6 parece ser mais sensível à perda unilateral de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal que linhagens de ratos submetidos ao mesmo teste. Pois, apesar das rotações induzidas por apomorfina aumentarem com a magnitude da lesão, o comportamento contraversivo já é o observado mesmo com uma perda relativamente pequena de neurônios em comparação com a descrição em ratos. O nosso estudo sugere, portanto, que o comportamento rotatório induzido por apomorfina é um bom indicativo do grau de assimetria na via nigroestriatal de camundongos com hemiparkinsonismo induzidos por 6-OHDA e que pode ser uma ferramenta muito útil em experimentos que visem testar terapias com potencial neuroprotetor para a doença de Parkinson.

5 – CONCLUSÕES

5.1 – Análises histopatológicas de secções do estriado e da SN marcadas com imunohistoquímica para tirosina-hidroxilase demonstrou que a administração de uma única dose de 10µg/2µl no lado esquerdo do núcleo estriado de camundongos C57BL6 provocou diminuição da reatividade dos neurônios nigroestriatais ipsilaterais à injeção 24h após a administração da toxina, com perda pronunciada a partir do 3º dia de sobrevivência e continuando até 28 dias, último tempo de sobrevivência observado neste estudo.

5.2 – Camundongos com lesão unilateral na via nigroestriatal apresentam comportamento ipsiversivo e contraversivo após estimulação por apomorfina. As rotações ipsilaterais aconteceram nos tempos de sobrevivência mais curtos (24h e 3 dias), sugerindo que ainda não houve hipersensibilização dos receptores pós-sinápticos. As rotações contralaterais aconteceram consistentemente a partir de 7 dias de sobrevivência, indicando que a hipersensibilização pós-sináptica já está instalada.

5.3 - O comportamento rotatório induzido por apomorfina aumenta progressivamente com a degeneração dopaminérgica unilateral da via nigroestriatal indicando que este parâmetro comportamental é um indicador excelente do grau de assimetria na via nigroestriatal de camundongos com hemiparkinsonismo induzidos por 6-OHDA e que pode ser uma ferramenta muito útil em experimentos que visem testar terapias com potencial neuroprotetor para a DP.

5.4 – Houve menor correlação entre a perda unilateral de neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal e as alterações da atividade motora espontânea de ambulação e bipedestação. Portanto, esses parâmetros avaliados no modelo de campo aberto não são adequados para medidas diretas da degeneração nigroestriatal assimétrica induzida pela injeção unilateral de 6-OHDA.

7. BIBLIOGRAFIA

ALVAREZ-FISCHER et.al. Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and α -synuclein-deleted mice. **Experimental Neurology**. 2007. volume 10.

ANDRIGA, G., VAN OOSTEN, R. V., UNGER. W., HAFMANS, T. G. M., VEENING, J., STOOFF, J. C., AND COOLS, A. R. Systemic administration of the propargylamine CGP 3466B preventes behavioural and morphological deficits in rat with 6-hydroxydopamine-inducid lesion in the substantia nigra. **European Journal of Neuroscience**. 2000. 12:3033-3043.

ALAM, M. AND SCHMIDT, W. J. L-DOPA reverses the hypokinetic behaviour and rigidity in rotenone-treated rat. **Behavioral Brain Research**. 2004. 153:439-446.

BEAR, M., CONNORS, B. W. AND PARADISO, M. A. Controle Encefálico do Movimento In: **Neurociências. Desvendando o Sistema Nervoso**. Porto Alegre. 2ª edição. Editora ArtMed. 2002. p. 465-493.

BENSADOUN, J. C., MIROCHNITCHENKO, O., INOUYE, M., AEBISCHER, P. AND ZUN, A. D. Attenuation of 6-OHDA-induced neurotoxicity in glutathione peroxidase transgenic mice. **European neuroscience association**. 1998. 10: 3231-3236.

BETARBET, R. SHERER, T.B. AND GREENAMYRE, J. T. Animal models of Parkinson's disease. **Bioessays**. 2002. 4:308-318.

BLANDINI, F.; NAPPI, G.; TASSORELLI, C.; MARTIGNONI, E. Functional changes of basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 62, p. 63-88, 2000.

BLUM, D., TORCH, S., LAMBENG, N., NISSOU, M-F., BENABID, A-L., SADOUL, R. AND VERNA, J-M. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology** 2001. 65:135-172.

BURKE, R. Programmed cell death and new discoveries in the genetics of Parkinsonism. **Journal of Neurochemistry**. 2008. 104:875-890.

CICCHETTI, A., BROWNELL, A. L., WILLIAMS, K., CHEN, Y. I., LEVNI, E. AND ISACSON, O. Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging. **European Journal of Neuroscience** 2002. 15:991-998.

COTRAN, R. S., KUMAR, V. AND COLLINS, T. Patologia Celular I: Lesão e Morte da Celula. In: **Patologia Estrutural e Funcional**. Rio de Janeiro. 6ª edição. Editora Guanabara Koogan. 2000. p. 1-26.

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

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

DAWSON, T. M AND DAWSON, V. L. Molecular pathway of neurodegeneration in Parkinson's Disease. **Science** 2003. 302:819-822.

DEBEIR, T., GINESTET, L., FRANÇOIS, C., LAURENS, S., MARTEL, J-C., CHOPIN, P., MARIEN, M., COLPAERT, F. AND ROISMAN-VOZARI, R. Effect of intrastriatal 6-OHDA lesion on dopaminergic innervation of the rat cortex and globus pallidus. **Experimental Neurology** 2005. 193:444-454.

FAHN, S. Description of Parkinson's Disease as a Clinical Syndrome. **Annals of the New York Academy of Science** 2003. 991:1-14.

FLEURY, C., MIGNOTTE, B. AND VAYSSIÈRE, J-L. Mitochondrial reactive species in cell death signaling. **Biochimie** 2002. 84:131-141.

FLINT, M. B. Experimental models of Parkinson's disease. **Nature reviews**. v.2, p.325-332, 2001.

FRIEDLANDER, R. M. Apoptosis and Caspases in Neurodegenerative Diseases. **New England Journal of Medicine** 2003. 348:1365-1375.

GAO, H-M., LIU, B., ZHANG, W. AND HONG, J-S. Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. **Trends in Pharmacological Science** 2003. 24:396.

GORELL, J. M., PETERSON, E. L., RYBICKI, B.A. AND JOHNSON, C. C. Multiple Risk Factors for Parkinson's Disease. **Journal Neurology Science**, 2004. 271:169-174.

HALBACH, O. V. B., SCHOBER, A. AND KRIEGLSTEIN, K. Genes, proteins and neurotoxins involved in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology** 2004. 73:151-177.

HALD, A.; LOTHARIUS, J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: Is there a causal link? **Experimental Neurology**, v. 193(2), p. 279-290, 2005.

[HARDY, J.](#) [COOKSON, M. R.](#) AND [SINGLETON, A.](#) Genes and Parkinsonism. [Lancet Neurology](#) 2003. 4:221-8.

HARTMANN, A., HUNOT, S., MICHEL, P. P., MURIEL, M-P., VYAS, S., FAUCHEUX, B. A., MOUATT-PRIGENT, A., TURMEL, H., SRINIVASAN, A., RUBERG, M., EVAN, G. I., AGID, Y. AND HIRSCH, E. C. Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. **Neurobiology** 2000. 97:2875-2880.

HODAIE. M., NEIMAT, J. S., LOZANO A. M. The dopaminergic nigrostriatal system and Parkinson's disease: Molecular events in development, disease, and cell death, and new therapeutic strategies. **Neurosurgery**. 2007. 60:17-30.

JEON, B. S., JACKSON-LEWIS, V., AND BURKE, R. E. 6-Hydroxydopamine Lesion of the Rat Substantia Nigra: Time Course and Morphology of Cell Death. **Neurodegeneration** 1995. 4:131-137.

KONDOH, T.; BANNAI, M.; NISHINO, H.; TORII, K. 6-Hydroxydopamine-induced lesions in a rat model of hemi-Parkinson's disease monitored by magnetic resonance imaging. **Experimental Neurology**. v.192, p.194-202, 2005.

LEE, M. K. AND PRICE, D. L. Advances in genetic models of Parkinson's disease. **Clinical Neuroscience Research** 2001. 1:456-466.

LENT, R. O Alto Commando Motor. Estrutura e Função dos Sistemas Supramedulares de Comando e Controle da Motricidade. In: **Cem Bilhões de Neurônios: Conceitos Fundamentais de Neurociências**. São Paulo. Editora Atheneu, 2001. p. 375-418.

LEV, N., MELAMED, E. AND OFFEN, D. Apoptosis and Parkinson's disease. **Progress In Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** 2003. 27:245-250.

LUNDBLAND, M., PICCONI, B. AND CENCI, M.A. A model of L-DOPA-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned mice: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. **Neurobiology of Disease** 2004; 16:110-123.

MARTÍ, M. J., SAURA, J., BURKE, R. E., JACKSON-LEWIS, V., JIMÉNEZ, A., BONASTRE, M., AND TOLOSA, E. Striatal 6-hydroxydopamine induces apoptosis of nigral neurons in the adult rat. **Brain Research** 2002; 958:185-191.

[MAYEUX R.](#) Epidemiology of neurodegeneration. **Annual Review Neuroscience**. 2003. 26:81-104.

MOTTA, V. T. Fosforilação Oxidativa. In: **Bioquímica Básica**. São Paulo. Editora: Atheneu, 2002. p. 209-235.

NISHIMURA, F., YOSHIKAWA, M., KANDA, S., NONAKA, M., YOKOTA, H., SHIROI, A., NAKASE, H., HIRABAYASHI, H., OUJI, Y., BIRUMACHI, J-I., ISHIZAKA, S. AND SAKAKI, T. Potential Use of Embryonic Stem Cells for the Treatment of Mouse Parkinsonian Models: Improved Behavior by Transplantation of In Vitro Differentiated Dopaminergic Neurons from Embryonic Stem Cells. **Stem Cells** 2003; 21:171-180.

OLANOW, C. W. AND TATTON, W. G. Etiology and Pathogenesis of Parkinson's Disease. **Annual Review Neuroscience** 1999. 22:123-144.

ORR, C. F., ROWE, D.B AND HALLIDAY, G.M. An inflammatory review of Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology** 2002. 68:325-340.

ORTH, M. AND SCHAPIRA, A. H. V. Mitochondrial involvement in Parkinson's disease. **Neurochemistry International** 2002. 40:533-541.

PAXINOS, G. AND FRANKLIN, K. B.J. The Mouse Brain in stereotaxia coordinates. San Diego. Elsevier Academic Press. 2004.

PERESE, D. A., ULMAM, J., VIOLA, J., EWING, S. E. AND BANKIEWICZ, K. S. A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model. **Brain Research** 1989. 494: 285-293.

PRZDEDBORSKI, S., LEVIVIER, M., JIANG, H., FERREIRA, M., JACKSON-LEWIS, V., DONALDSON, D., AND TOGASAKI, D. M. Dose-dependent lesion of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-

hydroxydopamine. **Neuroscience** 1995. 67:631-647.

RAIVICH, G., BOHATSCHEK, M., KLOSS, C.U.A., WERNER, A., JONES, L. L. AND KREUTZBERG, G. W. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. **Brain Research Reviews**, 1999. 30: 77–105

SCHULZ, J. B. AND GERHARDT. Apoptosis: its relevance to Parkinson's disease. **Clinical Neuroscience Research**, 2001. 1: 427-433.

SCHWARTING, R. K. W. AND HUSTON, J. P. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. **Progress in Neurobiology** 1996. 50:275-331.

SHERER, T. B., BETARBET, R. AND GREENAMYRE, J. T. Environment, Mitochondria and Parkinson's Disease. **Neuroscientist**, 2002a. 8:192-197.

SHIMOHAMA, S., SAWADA, H., KITAMURA, Y. AND TANIGUCHI, T. Disease model: Parkinson's disease. **Trends in Molecular Medicine** 2003. 9:360-365.

UNGERSTEDT, U. 6-Hydroxydopamine induced degeneration of central

monoamine neurons. **Europe Jounal Pharmacology**, 1968 5:107-110.

VIEIRA, E. G., GAZZINELLI, G. E MARES-GUIA, M. Oxidações Biológicas. **In: Bioquímica Celular e Biologia Molecular**. São Paulo. 2ª Edição. Editora Atheneu, 1991. p.151-178.