

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

GABRIELA SANTOS ALVAREZ SAMPAIO

**SINTOMAS NÃO MOTORES NA DOENÇA DE PARKINSON:
MODELO DE LESÃO INTRAESTRIATAL POR 6-OHDA EM
CAMUNDONGOS**

Belém

2014

GABRIELA SANTOS ALVAREZ SAMPAIO

**SINTOMAS NÃO MOTORES NA DOENÇA DE PARKINSON:
MODELO DE LESÃO INTRAESTRIATAL POR 6-OHDA EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientador: Dr. José Luiz Martins do Nascimento

Coorientadora: Dr^a. Elizabeth Sumi Yamada

Belém

2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Sampaio, Gabriela Santos Alvarez, 1987-
Sintomas não motores na doença de Parkinson:
modelo de lesão intraestriatal por 6-OHDA em
camundongos / Gabriela Santos Alvarez Sampaio.
- 2014.

Orientador: José Luiz Martins do
Nascimento;
Coorientadora: Elizabeth Sumi Yamada.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
do Pará, Instituto de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Neurociências e
Biologia Celular, Belém, 2014.

1. Parkinson, Doença de. 2. Sistema nervoso
Degeneração. 3. Memória. 4. Camundongo como
animal de laboratório. I. Título.
CDD 22. ed. 616.833

GABRIELA SANTOS ALVAREZ SAMPAIO

**SINTOMAS NÃO MOTORES NA DOENÇA DE PARKINSON:
MODELO DE LESÃO INTRAESTRIATAL POR 6-OHDA EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título Mestre em Neurociências.

Orientador: Dr. José Luiz Martins do Nascimento
Coorientadora: Dr^a. Elizabeth Sumi Yamada

Banca examinadora:

Dr. Edmar Tavares da Costa
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Dr^a. Márcia Consentino Kronka Sosthenes
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

**Belém
2014**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois é meu abrigo, minha paz, consolo e esperança.

Aos meus orientadores Dr^a Elizabeth Sumi Yamada e Dr. José Luiz Martins do Nascimento, pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa e pelos ensinamentos que levarei para o resto da vida.

Aos meus familiares, especialmente ao meu marido Gabriel Chelles e meus pais Sandra e Nilton, por todo apoio incondicional.

Aos colegas de laboratório, especialmente Solimar Cardoso, Daniela Garcez, Nilton Barreto, Luciana Ramos, Natália Pontes, Anderson Valente e Rick Gomes, pela colaboração e ajuda na execução dos experimentos.

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Escala de tempo ilustrando o desenho experimental.....	17
Figura 2: Modelo do teste do labirinto aquático de Morris.	20
Figura 3: Cortes histológicos analisados por estereologia.....	23
Figura 4: Massa corporal dos indivíduos durante os dias de experimento	24
Figura 5: Número de linhas cruzadas no campo aberto.....	25
Figura 6: Número de rotações no teste da apomorfina.	27
Figura 7: Labirinto aquático de Morris. Médias de latência em cada um dos quatro treinos diários para encontrar a plataforma de escape.	28
Figura 8: Labirinto aquático de Morris. Latência para encontrar a plataforma de escape nos três dias de testes.....	29
Figura 9: Labirinto aquático de Morris: memória de retenção	29
Figura 10: Padrões de navegação representativo no teste do labirinto aquático de Morris.	30
Figura 11: Comportamento de tigmotaxia	31
Figura 12: Teste de discriminação olfativa.....	32
Figura 13: Imunomarcação para TH na substância negra.....	33
Figura 14: Imunomarcação para NeuN no estriado.	34
Figura 15: Imunomarcação para NeuN no hipocampo.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sintomas da doença de Parkinson.	6
Tabela 2: Modelos experimentais da DP utilizando neurotoxinas: caracterização geral de modelos animais.....	9
Tabela 3: Efeito da lesão com 6-OHDA no comportamento de camundongos no teste do campo aberto.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA	6-hidroxidopamina
CA1	<i>Cornu Ammonis 1</i>
COMT	Catecolamina-o-metil-transferase
DA	Dopamina
DBS	Estimulação cerebral profunda
IMAO	Inibidor de monoaminoxidase
LPS	Lipopolissacarídeo
MANEB	etilenebisaditiocarbamato de manganês
MAO B	Monoamina oxidase B
MPDP	1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridina
MPP+	1-metil-4-fenilpiridinium
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridinio
NMDA	N-metil D-Aspartato
PFA	Paraformaldeido
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SN	Substancia Negra
SNC	Sistema Nervoso Central
SNpc	Substância Negra parte compacta
TH	Tirosina-Hidroxilase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Considerações gerais	1
1.2. Etiologia	2
1.3. Fisiopatologia	3
1.4. Quadro clínico	5
1.5. Diagnóstico e terapêutica	7
1.6. Modelos experimentais	8
<i>1.6.1. Modelagem de sintomas não motores</i>	13
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo geral	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Animais	17
3.2. Cirurgia	18
3.3. Testes comportamentais	18
<i>3.3.1. Teste do campo aberto</i>	19
<i>3.3.2. Teste das rotações induzidas por apomorfina</i>	19
<i>3.3.3. Teste do labirinto aquático de morris</i>	19
<i>3.3.4. Tigmotaxia</i>	20

3.3.5. Testes de discriminação olfativa	20
3.4. Obtenção de secções histológicas	21
3.5. Imunoistoquímica	21
3.6. Estereologia	22
3.7. Análise estatística	23
4. RESULTADOS	24
4.1. Peso dos animais e mortalidade	24
4.2. Análise comportamental	24
4.3. Análise histológica	32
5. DISCUSSÃO	36
5.1. As doses de 6-OHDA.....	36
5.2. Taxa de mortalidade	37
5.3. Administração bilateral intraestriatal de 6-ohda induz sintomas motores.....	37
5.4. Administração bilateral intraestriatal de 6-ohda induz sintomas não motores.....	38
5.5. Degeneração dopaminérgica na SN, depleção de neurônios.....	39
6. CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS.....	42

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum em idosos, caracterizada pela neurodegeneração de neurônios dopaminérgicos da substância negra (SN), com etiologia não claramente estabelecida, entretanto as causas podem estar associadas a exposição de toxinas ambientais e fatores genéticos. Os processos patológicos envolvidos na DP são disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, inflamação e excitotoxicidade. A sintomatologia da DP são alterações motoras, cognitivas e autonômicas. Contudo, poucos estudos analisam os sintomas não-motores da DP, principalmente em modelos animais. Nesse contexto o objetivo deste trabalho foi avaliar sintomas não-motores da DP em modelo animal com lesão provocada pela neurotoxina 6-hidroxidopamina com duas doses diferentes, injetadas bilateralmente no estriado. Para alcançar nossos objetivos realizamos os testes de campo aberto, apomorfina, labirinto aquático de Morris e testes de discriminação olfativa, além de análises histológicas. Nossos resultados mostraram alterações motoras, déficits de memória e aprendizado, associadas a diminuição de células dopaminérgicas na SN, neurônios estriatais e neurônios da região hipocampal CA1. Dessa forma, esse modelo para os sintomas não-motores da DP pode ser utilizado para a compreensão dos mecanismos que envolvem a doença, assim como para avaliar medidas terapêuticas que possam retardar ou interromper a progressão da DP.

Palavras-chave: Doença de Parkinson – 6-OHDA – estriado – memória – labirinto aquático de Morris.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease in the elderly, characterized by neurodegeneration of dopaminergic neurons of the substantia nigra (SN), with no clearly established etiology, though the causes may be associated with exposure to environmental toxins and genetic factors. The pathological processes involved in PD are mitochondrial dysfunction, oxidative stress, inflammation and excitotoxicity. The symptoms of PD are motor, cognitive and autonomic changes. However, few studies have analyzed the non-motor symptoms of PD, especially in animal models. In this context, the objective of this study was to assess non-motor symptoms of PD in animal models with lesions caused by the neurotoxin 6-hydroxydopamine with two different doses, injected bilaterally into the striatum. To achieve our goals we performed tests of open field, apomorphine, Morris water maze and olfactory discrimination tests, and histological analyzes. Our results showed motor abnormalities, learning and memory deficits associated with decreased dopaminergic cells in the SN, striatal neurons and neurons of the hippocampal CA1. Thus, this model for non-motor symptoms of PD can be used to understand the mechanisms involved in the disease, as well as to evaluate therapeutic strategies to slow or stop progression of PD.

Key words: Parkinson's disease – 6-OHDA – striatum – memory

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A doença de Parkinson (DP) é classicamente definida como uma desordem progressiva caracterizada por tremor em repouso, rigidez muscular, redução dos movimentos e instabilidade postural e esses sintomas estão associados à degeneração de neurônios dopaminérgicos da substância negra (SN) parte compacta, cujos axônios emitem projeções predominantemente para o estriado (ANTONY *ET AL.*, 2013). Sintomas como depressão, ansiedade, alterações cognitivas, distúrbios olfatórios e transtornos no sono também podem estar presentes (CHAUDHURI *ET AL.*, 2006; LANGSTON, 2006).

A idade média de início da DP é por volta dos 60 anos, e a duração média da doença a partir do seu diagnóstico é de 15 anos (LEES *ET AL.*, 2009). A incidência da DP é de 15-19 casos por 100 mil habitantes por ano no mundo sendo que na maioria dos estudos o pico de incidência fica entre 70 e 79 anos de idade (TWELVES *ET AL.*, 2003). Estima-se que cerca de 1% da população acima de 65 anos tem DP clinicamente diagnosticada, havendo aumento da incidência com a idade, e com uma projeção de 8,7 a 9,3 milhões de indivíduos afetados em 2030 (WIRDEFELDT *ET AL.*, 2011). Na maioria dos estudos, a incidência e a prevalência de DP é apontada como sendo maior no sexo masculino com um risco de 2% para homens e de 1,3% para mulheres de desenvolverem PD ao longo da vida (WIRDEFELDT *ET AL.*, 2011).

Na DP a forma esporádica é a mais comum, representando cerca de 90-95% dos casos, sem causa conhecida e prevalente em idosos. A forma familiar hereditária representa os 5-10% dos casos restantes, tendo em geral um desenvolvimento mais precoce; pelo menos 6 genes já foram associados a formas relativamente comuns de DP monogênica, sendo que existem aproximadamente 28 regiões cromossômicas distintas relacionadas à DP (ANTONY *ET AL.*, 2013).

Alguns fatores podem aumentar consideravelmente o risco do desenvolvimento da DP. O principal deles continua sendo a idade avançada (ANTONY *ET AL.*, 2013). Dentre os fatores ambientais, a exposição a pesticidas é a que possui evidências mais robustas (ELBAZ & MOISAN, 2008; MAELE-FABRY *ET AL.*, 2012). Outros fatores que se correlacionam positivamente com o aparecimento de DP, com evidências ainda não conclusivas são: hipertensão arterial, exposição ao manganês, exposição ao chumbo e retirada dos ovários. Por

outro lado, um risco menor tem sido associado ao consumo de chá verde ou preto, café, exposição ao tabaco e, em mulheres, a reposição de estrogênio após a menopausa (ELBAZ & MOISAN, 2008). Existe ainda um corpo de evidências limitadas para a associação negativa entre DP e consumo de álcool, atividade física, consumo de anti-oxidantes, sendo que a associação negativa de DP com consumo de cafeína e com o hábito de fumar são as que são consideradas como mais consistentes (WIRDEFELDT *ET AL.*, 2011).

1.2. ETIOLOGIA

A causa da DP esporádica é desconhecida, contudo, fatores ambientais e genéticos podem estar envolvidos. A hipótese de toxinas ambientais foi alavancada pela descoberta do parkinsonismo induzido pelo 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridínio (MPTP). Em 1982, o MPTP foi descoberto quando usuários de drogas desenvolveram síndrome parkinsoniana após o uso de meperidina sintética, que após investigações confirmou-se estar contaminada com MPTP (LANGSTON *ET AL.*, 1983). Os sintomas causados foram semelhantes aos da DP, devido aos efeitos tóxicos dos metabólitos do MPTP sobre os neurônios dopaminérgicos. Estudos demonstraram que a indução do quadro de parkinsoniano pelo MPTP em humanos é irreversível e estável (LANGSTON *ET AL.*, 1999).

O metabólito tóxico do MPTP, o 1-metil-4-fenilpiridinium (MPP⁺), é um inibidor do complexo I da mitocôndria, sugerindo o possível envolvimento mitocondrial na patogênese da DP (MIZUNO *ET AL.*, 1988). Outras toxinas ambientais como os pesticidas paraquat e rotenona também causam disfunções mitocondriais, têm sido utilizados em modelos experimentais de DP, e foram positivamente correlacionados com o desenvolvimento da DP em humanos (TANNER *ET AL.*, 2011).

Além de fatores ambientais, fatores genéticos também estão associados à DP. Diversos genes que causam DP familiar monogênica de herança autossômica dominante ou recessiva já foram identificados e estudados, dentre eles os genes α -sinucleína (*SNCA*), *LRRK2* (*cinase 2 rica em repetições de leucina*), *PINK1*, *DJ-1*, *ATP13A2* (*ATPase tipo 13A2*), *parkina*, *PARK5* (*ubiquitina C-terminal hidrolase L1*) e *GBA* (LEES *ET AL.*, 2009; ANTONY *ET AL.*, 2013). Os pacientes com mutações nos genes *LRRK2* e α -sinucleína desenvolvem um quadro muito semelhante à DP esporádica, sendo as mutações no gene *LRRK2* relativamente comuns nos judeus Ashkenazi e nos portugueses (LEES *ET AL.*, 2009).

Outra possibilidade é a existência de uma neurotoxina endógena capaz de gerar a neurodegeneração. Alterações no metabolismo normal poderiam originar substâncias tóxicas devido à exposição ao ambiente ou diferenças inerentes a vias metabólicas. Uma das fontes de toxinas endógenas pode ser o metabolismo normal da dopamina, o qual gera espécies reativas de oxigênio (ROS) (BLUM *ET AL.*, 2001; JINSMAA *ET AL.*, 2011).

1.3. FISIOPATOLOGIA

A característica patológica da DP é a degeneração de neurônios dopaminérgicos na substância negra parte compacta (SNpc), resultando na depleção de dopamina no estriado, composto pelo núcleo caudado e putâmen (JELLINGER, 2012). Esse neurotransmissor regula as projeções excitatórias e inibitórias dos núcleos da base, e o grau de perda neural e axonal dopaminérgica mostram alta correlação com a severidade e a duração da disfunção motora na DP (JELLINGER, 2012).

No eixo nigroestriatal, os corpos celulares dos neurônios estão na SNpc. Na DP, a perda desses neurônios, os quais normalmente contém neuromelanina, produz o achado histopatológico clássico de despigmentação da SNpc. A perda das projeções dopaminérgicas no estriado aparenta ser mais evidente do que a perda de corpos celulares na SN, sugerindo que os terminais dopaminérgicos do estriado são o primeiro alvo do processo de degeneração (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003).

A perda de neurônios dopaminérgicos pode ocorrer devido à morte por apoptose, uma via de sinalização intracelular ativada para provocar a morte celular programada ou suicídio celular. Acredita-se que o estresse oxidativo é um importante mecanismo patogênico de apoptose neural na DP. O estresse oxidativo é o desequilíbrio na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Os fatores importantes para a produção do estresse oxidativo são o alto consumo de oxigênio, altos níveis de ácido graxo polinsaturado na membrana neural e alta concentração de ferro. Esse estresse oxidativo, gerados por processos fisiológicos ou patológicos, possui a capacidade de provocar danos teciduais (ZHAO, 2009; ZHOU *ET AL.*, 2008).

A análise tecidual *post-mortem* de pacientes com DP constataram um aumento de peroxidação lipídica e dano ao DNA na SN. Essas alterações são geradas por uma superprodução de ROS no encéfalo dos pacientes (ZHAO, 2009; ZHOU *ET AL.*, 2008).

Alguns neurônios sobreviventes à neurodegeneração apresentam inclusões citoplasmáticas, denominadas de corpos de Lewy compostas principalmente pela proteína α -sinucleína. Greffard *et al.* (2010) descreveram uma proporção constante de 3,6% de neurônios com corpos de Lewy na substância negra de cérebros de pacientes que haviam falecido com diferentes graus de apresentação clínica de parkinsonismo. Baseado nesses achados, eles propuseram que os corpos de Lewy são formados e eliminados (com a morte neuronal) continuamente na substância negra doente reforçando a hipótese de que os corpos de Lewy contribuem para a morte neuronal. Cerca de 10% das pessoas com mais de 60 anos que morrem sem diagnóstico de doença neurológica possuem corpos de Lewy; uma condição denominada de patologia incidental de corpos de Lewy, que é considerada por muitos como representando uma fase pré-sintomática da DP (DICKSON *ET AL.*, 2008).

A degeneração neuronal com formação de corpos de Lewy também é encontrada em diversas regiões do sistema nervoso tais como neurônios colinérgicos do núcleo basal de Meynert, neurônios noradrenérgicos do *locus coeruleus*, neurônios serotoninérgicos do núcleo da rafe do tronco encefálico, assim como, neurônios do sistema olfatório, hemisférios cerebrais, medula espinal e sistema nervoso autônomo periférico (JELLINGER, 2012).

Estudando a presença de corpos de Lewy contendo α -sinucleína no sistema nervoso humano *post-mortem*, Braak e colaboradores (2003) sistematizaram esses achados e propuseram um estadiamento neuropatológico e clínico para a DP. Eles sugeriram que a doença inicia, como uma patologia envolvendo a α -sinucleína, em neurônios periféricos do plexo nervoso gastrointestinal (Plexo de Meissner) e/ou nas terminações nervosas olfatórias, e que se espalha através das vias nervosas passando por núcleos do tronco encefálico, de rostral para caudal, e atingindo regiões cada vez mais centrais como a própria substância negra, e posteriormente, as regiões meso e neocorticais (BRAAK *ET AL.*, 2003). O interessante desta proposição é que ela dá subsídios anatômicos para os sintomas não-motores da DP.

1.4. QUADRO CLÍNICO

Clinicamente, qualquer doença que apresente deficiência de dopamina no estriado ou dano estriatal direto, pode levar ao parkinsonismo, síndrome caracterizada por tremor em repouso, rigidez, instabilidade postural, bradicinesia (diminuição dos movimentos voluntários), sendo esses os quatro sinais cardinais utilizados classicamente para caracterizar a DP. Os sintomas motores usualmente iniciam assimetricamente, mas gradualmente se tornam bilaterais. A DP é a causa mais comum de parkinsonismo, contabilizando em torno de 80% dos casos (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003; WEINTRAUB *ET AL.*, 2008).

As apresentações clínicas da DP podem variar entre os pacientes. Em relação à sintomatologia motora clássica o sintoma inicial mais comum é o tremor em repouso. Esse sintoma é mais frequente em pacientes jovens; em idosos o sintoma mais proeminente é a bradicinesia. A extrema manifestação da bradicinesia é a acinesia, ou dificuldade em iniciar movimentos. O tremor pode ser o sinal mais visível, mas a bradicinesia é o sintoma mais debilitante da doença. Um dos últimos sintomas a aparecer é a instabilidade postural, o qual é um sinal do estágio avançado da DP (WEINTRAUB *ET AL.*, 2008). Entretanto, outras alterações motoras podem se manifestar mais precocemente sem que o próprio paciente perceba, tais como a diminuição na mímica da face, flexão de um braço com perda do balançar, fala monotônica (LEES *ET AL.*, 2009).

Evidências mais recentes mostram que os sintomas motores são apenas um aspecto de uma desordem multifacetada e complexa. Pacientes com DP podem apresentar diversos sintomas não motores como problemas cognitivos, psiquiátricos, distúrbios autonômicos, transtornos no sono e alterações sensoriais (Tabela 1) (CHAUDHURI *ET AL.*, 2006; LANGSTON, 2006; MARTINEZ-MARTIN *ET AL.*, 2007; PARK & STACY, 2009).

Alguns autores defendem que os sintomas não motores fazem parte de um quadro sintomatológico que precede as alterações motoras da DP, podendo dessa forma ser descritos como sintomas pré-motores (BRAAK *ET AL.*, 2003; LANGSTON, 2006). Tais sintomas pré-motores ocorreriam anos ou décadas antes do aparecimento das alterações motoras. Apenas os sintomas motores, que caracterizam o parkinsonismo, não representariam a DP na sua totalidade, mas apenas um aspecto dessa doença complexa (LANGSTON, 2006).

De fato, existem pesquisas relatando que pacientes com DP apresentam déficits olfativos e anormalidade nas estruturas olfatórias anos antes do diagnóstico do parkinsonismo

(BERENDSE *ET AL.*, 2001). Somando-se a isso, alguns trabalhos demonstram que a dopamina possui papel significativo na discriminação olfatória (BRAAK *ET AL.*, 2003; TILLERSON *ET AL.*, 2006).

O risco de demência parece estar mais associado à idade avançada do que à duração da doença, e também é maior em pacientes que apresentem distúrbios importantes de marcha e fala, depressão e resposta ruim à levodopa (LEES *ET AL.*, 2009). Segundo Brown e colaboradores (1997), o sistema neuroanatômico afetado pela DP está criticamente envolvido em processos de memória e aprendizagem. Alguns relatam que alterações cognitivas, incluindo deficiências na memória, comumente ocorrem nos estágios iniciais da DP (DUBOIS & PILLON, 1997).

Tabela 1: Sintomas da doença de Parkinson.

Sintomas motores	Sintomas não motores
Tremor em repouso	Demência
Bradicinesia	Depressão
Rigidez	Ansiedade
Instabilidade postural	Alterações mnemônicas
	Transtornos do sono
	Constipação
	Disfunção erétil
	Déficit olfativo

Fonte: Dubois & Pillon, 1997; Chaudhuri *et al.*, 2006; Langston, 2006; Weintraub *et al.*, 2008.

1.5. DIAGNÓSTICO E TERAPÊUTICA

O diagnóstico é essencialmente clínico, não havendo um teste definitivo capaz de diagnosticar a DP, com exceção do teste genético para a DP familiar. Dessa forma, exames clínicos devem ser realizados, e pelo menos dois dos sintomas motores clássicos devem estar presentes e com surgimento e progressão assimétrica. Para o diagnóstico, é necessário excluir outras causas de parkinsonismo, como formas secundárias e atípicas. Para a confirmação do diagnóstico também se avalia a resposta ao fármaco levodopa (MASSANO & BHATIA, 2012).

A primeira linha de terapia para a DP ainda consiste em estratégias de reposição de dopamina. A droga mais utilizada continua sendo a levodopa, e seu uso melhora drasticamente a qualidade de vida dos pacientes com DP no início da doença. Contudo, após 4-6 anos em tratamento, cerca de 40% dos pacientes provavelmente sofrerão com discinesias causadas por esse fármaco, gerando perda na qualidade de vida dos pacientes (AHLSSKOG & MUEENTER, 2001). Quando surgem as discinesias, há a possibilidade de adição de outras drogas, como inibidores de enzimas degradadoras desse neurotransmissor, como por exemplo, o inibidor da monoaminoxidase (IMAO), inibidor de catecolamina-o-metil-transferase (COMT), agonistas dopaminérgicos e antagonistas NMDA (N-metil D-Aspartato) (JANKOVIC & POEWE, 2012).

A restauração da transmissão dopaminérgica pela levodopa não melhora as alterações cognitivas na mesma extensão que os sintomas motores dependentes de dopamina (DUBOIS & PILLON, 1997; JUBAULT *ET AL.*, 2009). Logo, outros medicamentos são usados associados para o manejo de sintomas cognitivos, tais como inibidores da acetilcolinesterase para demência e antipsicóticos como quetiapina e clozapina para sintomas psicóticos (*e.g.* alucinações) (JANKOVIC & POEWE, 2012).

Procedimentos cirúrgicos também são realizados na DP, na sua maioria, usando a estimulação cerebral profunda (DBS), que substitui procedimentos ablativos. Na DBS um eletrodo é implantado, geralmente, no globo pálido interno ou no núcleo subtalâmico e conectados a um estimulador inserido na parede torácica. As variadas estimulações são ajustadas em relação à configuração do eletrodo, voltagem, frequência e duração de pulso a fim de maximizar os benefícios e minimizar os efeitos colaterais. Os resultados benéficos são apenas para manifestações que respondem à levodopa, contudo, a DBS não impede a

progressão ou o desenvolvimento da doença. Esse procedimento cirúrgico é mais indicado para pacientes que apresentam incapacidade em decorrência de complicação motora induzida pela levodopa (LONGO *ET AL.*, 2013).

Para o tratamento da DP, diversas alternativas têm sido intensamente buscadas por pesquisadores. Inúmeros fármacos têm sido testados a fim de retardar a degeneração neuronal como anti-oxidantes, agonistas dopaminérgicos e anti-apoptóticos (STOCCHI & OLANOW, 2003; SIMPKIN & JANKOVIC, 2003), além de pesquisas com transplantes de células e tecidos capazes de sintetizar catecolaminas (NISHIMURA *ET AL.*, 2003).

1.6. MODELOS EXPERIMENTAIS

Para haver um cuidado integral e eficaz dos pacientes com DP é de crucial importância reconhecer a importância dos modelos experimentais da DP. O uso desses modelos permite refinar estratégias de pesquisa que visem investigar a causa da doença, os mecanismos subjacentes aos sintomas e medidas terapêuticas que possam retardar ou interromper a sua progressão (MEREDITH *ET AL.*, 2008).

Dessa forma, diversos modelos experimentais tentam mimetizar a fisiopatologia e os sintomas da doença de Parkinson em animais (Tabela 2). A maioria dos modelos experimentais usam neurotoxinas que podem destruir ou alterar o sistema catecolaminérgico, como por exemplo, o MPTP e a 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA). Pesticidas como rotenona, paraquat e maneb também induzem algumas características da doença de Parkinson, quando administrados na circulação sistêmica de roedores. Uma característica comum dessas neurotoxinas é o fato de que todas afetam mitocôndrias, direta ou indiretamente, através da inibição do complexo mitocondrial I ou III, ou através da produção de radicais livres (SCHOBER, 2004; IANCU *ET AL.*, 2005, CICCHETTI *ET AL.*, 2009).

O MPTP é uma toxina muito utilizada em modelos animais de DP. Nos modelos experimentais, o MPTP pode ser administrado sistemicamente (i.p.) e rapidamente atravessa a barreira hematoencefálica. Subsequentemente o MPTP é oxidado em MPDP (1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridina) pela enzima monoamina oxidase B (MAO B), e depois convertido espontaneamente para MPP⁺ (1-metil-4-fenilpiridina). O MPP⁺ apresenta uma alta afinidade por transportadores de dopamina, dessa forma é transportado para dentro dos neurônios

dopaminérgicos inibindo a respiração mitocondrial através do bloqueio da cadeia transportadora de elétrons (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003; SCHOBER, 2004).

Tabela 2: Modelos experimentais da DP utilizando neurotoxinas: caracterização geral de modelos animais.

Toxinas	Perda de neurônios DA	Sintoma Motor	Sintoma não motor
MPTP	Estriado e SN	Déficit motor	Alteração na memória e aprendizado; depressão; ansiedade
6-OHDA	Estriado e SN	Rotação induzida por apomorfina; Déficit motor	Alteração na memória e aprendizado; depressão; ansiedade
Rotenona	Estriado e SN	Déficit motor	Depressão
Paraquat	SN	Déficit motor	-
Maneb	SN	Déficit motor	-

Fonte: Meredith *et al.*, 2008; Dauer & Przedborski, 2003; Branchi *et al.*, 2008; Da Cunha *et al.*, 2001; Santiago *et al.*, 2010; Cicchetti *et al.*, 2009.

Em modelos experimentais com ratos, o MPTP é injetado diretamente no encéfalo, pois a administração sistêmica crônica falha em provocar destruição seletiva de neurônios dopaminérgicos, possivelmente pelo fato dos capilares sanguíneos do encéfalo de ratos apresentarem altos níveis de MAO B, a qual constitui uma eficaz barreira hemato-encefálica enzimática (CHIUEH *ET AL.*, 1984; KALARIA *ET AL.*, 1987). Em camundongos e primatas a via de administração sistêmica de MPTP funciona adequadamente (PRZEBORSKI *ET AL.*, 2001).

Contudo, apesar de ser um excelente modelo, o uso de MPTP em modelos experimentais de DP representa um grande risco para humanos, que podem se contaminar através da ingestão, inalação e absorção (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003; SCHOBER, 2004). É necessário um laboratório com alto nível de biossegurança para sua utilização, o que torna o seu uso restrito. Do ponto de vista da neuropatologia, uma desvantagem do modelo do MPTP é a ausência de inclusões semelhantes aos corpos de Lewy (MEREDITH *ET AL.*, 2008).

A modelagem da DP utilizando pesticidas e herbicidas justifica-se pelos achados epidemiológicos que associam o aumento do risco de DP com fatores tais como residência em ambiente rural, ingestão de água de poço e exposição a agrotóxicos (UVERSKY, 2004). A rotenona, um pesticida muito utilizado na agricultura orgânica em vários países, é lipofílica e facilmente atravessa a barreira hematoencefálica. Na administração intravenosa crônica e constante em ratos Lewis utilizando-se minibombas osmóticas, há degeneração de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais acompanhados de corpos de Lewy (BETARBET *ET AL.*, 2000; SHERER *ET AL.*, 2003). Há ocorrência também de elevação de danos oxidativos, microgliose e aumento de depósito de ferro (MEREDITH *ET AL.*, 2008). Entretanto, em ratos da linhagem Wistar, a intoxicação por rotenona não causou degeneração no sistema nigroestriatal (DE ANDRADE, 2002). Há relatos de ocorrência de elevação de danos oxidativos, microgliose e aumento de depósito de ferro (MEREDITH *ET AL.*, 2008). Contudo, de acordo com outros autores, a degeneração neuronal não está restrita ao sistema nigral, ocorrendo também degeneração no estriado, no núcleo tegmentar pedúnculo-pontino e no *locus ceruleus* (HÖGLINGER *ET AL.*, 2003). A administração de rotenona também tem sido feita por via intraperitoneal, oral, intracranial ou intranasal, e parece haver uma ausência de especificidade de ação da toxina dentro e fora do SNC (Sistema Nervoso Central) (KIETZER, 2008). Dessa forma, no modelo com rotenona é difícil relacionar o déficit motor com a degeneração neural, pois não é possível descartar a influência da sua toxicidade sistêmica fora do sistema nervoso sobre o comportamento dos animais (LAPOINTE *ET AL.*, 2004; CICHETTI *ET AL.*, 2009). Recentemente, Cannon *et al.*, (2009) relataram que a injeção de rotenona emulsificada em triglicérides de cadeia média e injetada intraperitonealmente durante 3 a 14 meses, produz, em ratos Lewis, um modelo de PD reprodutível, com baixas taxas de mortalidade, com perda de 45% de neurônios dopaminérgico da SN e com a presença de inclusões contendo α -sinucleína.

O herbicida paraquat também induz um modelo tóxico da DP. Esse herbicida é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, logo é administrado de maneira sistêmica, e gera pequena ou nenhuma perda de neurônios dopaminérgicos na SN (MEREDITH *ET AL.*, 2008). O paraquat possivelmente entra no cérebro através de transportadores de aminoácidos neutros e posteriormente, é transportada para o interior das células de uma maneira dependente de sódio, podendo formar agregados de α -sinucleína. Dentro da célula do SNC a toxina atua através da formação de radicais superóxidos levando a toxicidade mitocondrial indireta, dessa forma interrompendo a respiração mitocondrial no complexo I (SHIMIZU *ET AL.*, 2001; MILLER,

2007; DAUER & PRZEDBORSKI, 2003). Entretanto, pesquisas ainda precisam demonstrar perda progressiva de células dopaminérgicas e déficit motor (MEREDITH *ET AL.*, 2008).

Outra toxina ambiental empregada em modelos de DP é o fungicida maneb (etilenebisaditiocarbamato de manganês). Essa toxina pode inibir o transportador de glutamato e interromper a liberação e recaptação de dopamina (MEREDITH *ET AL.*, 2008). O maneb atravessa a barreira hematoencefálica e inibe o complexo mitocondrial III, provocando diminuição de neurônios dopaminérgicos nigrais e diminuição da atividade motora dos animais. É administrado de maneira sistêmica (CICCHETTI *ET AL.*, 2009) e pode ser co-administrado com o paraquat para gerar toxicidade; as duas toxinas combinadas podem destruir mais de 50% de neurônios dopaminérgicos de ratos jovens ou adultos, associado com alterações motoras e microgliose (MEREDITH *ET AL.*, 2008).

Um dos modelos de DP mais utilizados é aquele baseado da administração da toxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA). A 6-OHDA é uma neurotoxina específica catecolaminérgica estruturalmente análoga à dopamina e noradrenalina. Agindo como um “falso substrato” a 6-OHDA é rapidamente acumulada em neurônios catecolaminérgicos. O complexo mecanismo de toxicidade envolve alquilação, rápida autooxidação (gerando peróxido de hidrogênio, superóxidos e radicais hidroxil) e o impedimento na produção de energia mitocondrial. Dessa forma, dentro dos neurônios a neurotoxina acumula-se no citosol, promovendo alta taxa de formação de radicais livres e como mecanismo adicional a 6-OHDA pode também se acumular nas mitocôndrias, onde inibe a atividade de transporte de elétrons, logo causando morte celular e necrose de células dopaminérgicas (CHOI *ET AL.*, 1999; SCHOBER, 2004; BLANDINI *ET AL.*, 2008).

O desenvolvimento da lesão nigroestriatal induzida pela 6-OHDA é associado a marcadores inflamatórios, como também pode ocorrer com as neurotoxinas rotenona e MPTP. A reação inflamatória é expressa pela ativação de microglias, população de macrófagos residentes. Diversos testes com imunomarcadores e tomografia por emissão de pósitrons confirmaram a presença de células inflamatórias no estriado e SN de animais lesionados com 6-OHDA. Resultados anteriormente descritos na DP em humanos relatam que a inflamação pode ser uma importante chave para o mecanismo do processo degenerativo (BLANDINI *ET AL.*, 2008).

De acordo com Schober (2004) nos modelos experimentais, a 6-OHDA precisa ser injetada diretamente no encéfalo através da cirurgia de estereotaxia, já que a toxina não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica quando injetada sistemicamente. A injeção de 6-OHDA deve ser realizada na substância negra, estriado ou feixe prosencefálico medial. A injeção no estriado provoca indução de morte neuronal mais progressiva e retrógrada, comparada às injeções da toxina na substância negra e prosencéfalo medial. As lesões no estriado são lentas e parciais e têm sido usadas para imitar o progresso lento da DP (SHIMOHAMA *ET AL.*, 2003).

As lesões de 6-OHDA podem ser bilaterais ou unilaterais. Nos modelos de lesão unilateral há um comportamento motor rotacional contralateral ou ipsilateral dos animais, induzido farmacologicamente após a administração sistêmica de apomorfina (agonista dopaminérgico não seletivo) ou anfetamina (estimulante da liberação de dopamina). A principal vantagem desse modelo é exatamente esse comportamento rotatório, que tem correlação com o grau de perda dopaminérgica e pode ser usado para rastreamento de terapias neuroprotetoras (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003).

A taxa de perda de neurônios dopaminérgicos e seus terminais estriatais depende da localização e dose da neurotoxina, assim como o tempo de sobrevivência após a lesão. Contudo, a toxicidade gerada pela 6-OHDA não provoca a formação dos corpos de Lewy (MEREDITH *ET AL.*, 2008).

Modelos experimentais para a DP também são desenvolvidos através de inflamação crônica ou aguda. A neuroinflamação é predominantemente mediada por microglia, células fagocíticas do sistema nervoso central. Quando ativada a microglia passa por uma mudança morfológica dramática convertendo-se para um estado amebóide com capacidade de fagocitose, e as células ativadas produzem substâncias pró-inflamatórias como citocinas, óxido nítrico e ROS. Esse processo é importante durante o desenvolvimento neuronal e em injúrias, contudo se ocorrer uma ativação excessiva ou falta de regulação pode haver danos oxidativos aos neurônios. Dessa forma, o LPS (Lipopolissacarídeo) está bem estabelecido para o uso em modelos experimentais de DP, pois é capaz de ativar rapidamente microglia associada à degeneração de neurônios dopaminérgicos da SN e estriado (MEREDITH *ET AL.*, 2008). Ratos injetados com LPS na SN rapidamente perdem neurônios TH-positivos e mostram comportamento motor característico de rotação ipsilateral após administração de anfetamina (IRAVANI *ET AL.*, 2005).

Além do uso de neurotoxinas e LPS para a modelagem da DP têm se difundido também o uso de modelos genéticos. Os animais utilizados normalmente são roedores, principalmente camundongos. Diversos genes associados à DP familiar já foram identificados, tais como o da α -sinucleína, LRRK2 (*leucine-rich repeat kinase 2*), Parkina, DJ-1 e PINK1 1 (*PTEN-induced kinases*). A maioria desses genes codificam proteínas encontradas nos corpos de Lewy ou estão envolvidos na função mitocondrial (TERZIOGLU & GALTER, 2008; DAWSON *ET AL.*, 2010).

Os modelos genéticos de DP apresentam efeitos mais sutis sobre o sistema dopaminérgico, como uma pequena diminuição de transportadores de dopamina e alterações motoras. Nenhum dos modelos genéticos com base em genes ligados a DP mimetizam os principais sintomas da doença, como a perda de neurônios dopaminérgicos. Dessa forma, em alguns estudos é comum o uso de modelos genéticos combinados com modelos utilizando toxinas, a fim de analisar o efeito da modificação genética na susceptibilidade a toxina (TERZIOGLU & GALTER, 2008).

1.6.1. MODELAGEM DE SINTOMAS NÃO-MOTORES

Diversos modelos para a DP utilizando neurotoxinas são focados na capacidade de induzir dano dopaminérgico nigroestriatal e alterações motoras associadas. Entretanto, poucos estudos modelam os sintomas não motores observados nos pacientes (Tabela 2) (DUBOIS & PILLON, 1997; LANGSTON, 2006).

Como já mencionado, pacientes com DP podem apresentar alterações em outras diversas funções do organismo, incluindo transtornos de ansiedade, déficits de memória, disfunção olfatória, distúrbios do sono, constipação intestinal, hipotensão ortostática, disfunção sexual e urinária, dor e parestesias, depressão, apatia, anedonia, fadiga e sintomas psicóticos (LANGSTON, 2006; JANKOVIC & POEWE, 2012). Existe, portanto, um interesse no desenvolvimento de modelos experimentais que possam reproduzir essas disfunções não motoras.

Alguns modelos em ratos têm sido descritos. Da Cunha e colaboradores (2001) caracterizaram a injeção bilateral intranigral de MPTP em ratos como modelo para avaliar aprendizado e memória. Esse modelo provoca uma perda de neurônios dopaminérgicos na

ordem de 40-70%, dessa forma sendo considerado um bom modelo da fase inicial da DP. Ferro e colaboradores (2005) compararam dois modelos animais de DP: ratos foram injetados bilateralmente com MPTP (100 µg) ou 6-OHDA (6 µg) na substância negra *pars compacta*. Ambos os modelos apresentaram diminuição significativa de dopamina no estriado e substância negra, assim como déficit no desempenho para memória de trabalho no teste do labirinto aquático de Morris. Contudo, os animais lesionados com 6-OHDA tiveram grande perda de peso associada à alta mortalidade. É sabido que lesões bilaterais da substância negra cursam com alto grau de apatia e mortalidade.

Mura e Feldon (2003) realizaram injeção unilateral ou bilateral de 6-OHDA (8 µg) no feixe medial do prosencéfalo de ratos, a fim de avaliar aprendizado espacial e alteração motora. Os animais injetados unilateralmente não apresentaram alterações no aprendizado, contudo os lesados bilateralmente apresentaram impedimentos na aprendizagem. Entretanto, o trabalho não esclarece os efeitos da diminuição de dopamina sobre o aprendizado e memória. A injeção no feixe medial do prosencéfalo pode ter contribuído para esses resultados, pois essa lesão pode provocar danos ou mudanças em outras redes de neurotransmissores, como noradrenérgicas e serotoninérgicas.

A injeção bilateral de 6-OHDA no estriado de ratos, também foi avaliada. Branchi *et al.* (2008) utilizaram 10,5 µg de 6-OHDA e relataram uma diminuição da marcação para TH comparada ao controle, quadros de depressão e ansiedade nos animais, mas ausência de alterações na aprendizagem e memória. Entretanto, Tadaiesky *et al.* (2008) utilizando uma concentração ligeiramente maior de 6-OHDA (12 µg) relataram alterações cognitivas e emocionais, como depressão, ansiedade, alterações na memória e aprendizado.

Em camundongos, De Leonibus *et al.* (2007) realizaram lesão estriatal bilateral com 4,5 µg de OHDA, e relataram um déficit cognitivo no processamento de informação visuo-espacial sem perda de memória generalizada. Com uma concentração um pouco maior (8 µg de 6-OHDA), Branchi *et al.* (2010) produziram redução de 40% de dopamina após lesão bilateral no estriado, os animais apresentaram dificuldades motoras e quadros semelhante ao ansioso, porém não houve alterações na memória e aprendizado no teste do labirinto aquático de Morris.

Ao avaliar alterações olfativas em ratos lesados com 6-OHDA, Tadaiesky *et al.* (2008) observaram ausência de alteração olfativa após injetar 12 µg de 6-OHDA no estriado de

ratos. Contudo, Prediger *et al.* (2010) administraram MPTP intranasal em camundongos e provocaram déficit olfativo nos animais.

É de grande interesse a existência de um modelo de sintomas não-motores da DP em camundongos, apresentando uma degeneração progressiva de dopamina sem grandes alterações motoras. A eficácia dos modelos não-motores de DP utilizando a 6-OHDA parece depender da dose de 6-OHDA utilizada, relacionada à quantidade de dopamina reduzida no estriado e substância negra. Injeções bilaterais na substância negra parecem produzir déficits cognitivos significativos, porém são altamente debilitantes gerando um alto índice de mortalidade. Injeções no feixe medial do prosencéfalo também geram grandes lesões e mudanças debilitantes para o animal. Por outro lado, lesões bilaterais no estriado com até 8 ug de 6-OHDA não parecem gerar déficits de memória consistentes. Um modelo adequado seria aquele que englobasse a maioria dos sintomas não motores da DP associados à perda de dopamina no estriado e substância negra, utilizando uma neurotoxina de fácil utilização, e com baixa mortalidade. Desta forma, a lesão estriatal bilateral em camundongos nos parece ser um modelo atraente que ainda carece de melhor caracterização.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL:

Validar a lesão bilateral intraestriatal com 6-OHDA em camundongos como um modelo experimental para os sintomas não-motores da doença de Parkinson.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

2.2.1. Comparar a taxa de mortalidade em relação a outros modelos.

2.2.2. Avaliar alterações na memória, aprendizado e olfação em camundongos submetidos a lesões estriatais bilaterais com diferentes concentrações de 6-OHDA através dos testes de labirinto aquático de Morris e olfativos.

2.2.3. Avaliar a ocorrência de diminuição no número de neurônios dopaminérgicos da substância negra marcados com métodos imunoistoquímicos, através de contagem estereológica.

2.2.4. Avaliar a ocorrência de diminuição no número de neurônios estriatais e hipocampais marcados com métodos imunoistoquímicos, através de contagem estereológica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Cinquenta e três camundongos machos, da linhagem suíço albino, com cerca de 70 dias, e pesando entre 41-47g, foram utilizados no início dos experimentos. Os animais foram provenientes do Instituto Evandro Chagas (Belém, Pará). Os animais foram alojados em cabines para biotério com temperatura e umidade relativa do ar controlada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$; 60%), em um ciclo claro/escuro 12/12h natural. Alimento e água ficaram disponíveis *ad libitum*. Todas as medidas foram tomadas para minimizar o sofrimento dos animais. Todos os procedimentos descritos neste documento foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (CEPAE-UFPA) sob o parecer No. BIO015-11 de 17 de setembro de 2010 (ANEXO).

Os animais foram divididos em três grupos: (i) Controle operado ou SHAM (N=10), o qual recebeu injeção intraestriatal apenas de veículo (solução de ácido ascórbico 0,2 mg/ml); (ii) 6-OHDA 15 μg bilateral (N=11), que recebeu uma injeção contendo 15 μg de 6-OHDA em cada estriado; (iii) 6-OHDA 20 μg bilateral (N=12), que recebeu 20 μg da neurotoxina em cada estriado.

Os animais foram submetidos a testes comportamentais e cirurgias estereotáxicas, tendo os experimentos duração total de 39 dias (Figura 1).

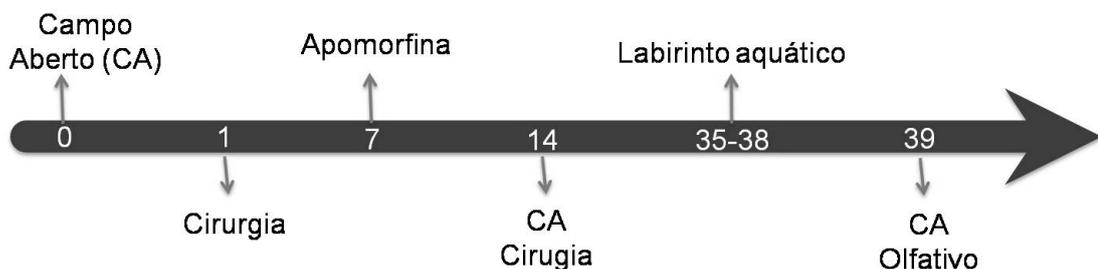


Figura 1: Escala de tempo ilustrando o desenho experimental, no período total de 39 dias, para os testes de campo aberto (CA), apomorfina, labirinto aquático de Morris e olfativo, além das cirurgias estriatais.

3.2. CIRURGIA

Todos os camundongos operados foram anestesiados com 0,1 ml/10g de peso por via intraperitoneal com uma mistura de cloridrato de cetamina (Vetanarcol, 50 mg/ml) e cloridrato de xilazina (Kensol, 20 mg/ml) diluídos em solução de cloreto de sódio a 0,9%, sendo a dose final de 75 mg/kg de cetamina e 20 mg/kg de xilazina. O nível anestésico foi avaliado através dos reflexos flexor e corneano. Após certificarmos de que o animal está profundamente anestesiado, o mesmo teve sua cabeça fixada em aparelho estereotáxico (Insight, Ribeirão Preto). Foi realizada injeção uni- ou bilateralmente no estriado dorsal através de cirurgia estereotáxica, utilizando microinjeção de 6-OHDA (Sigma/H4381) em duas diferentes doses (15 µg ou 20 µg) ou veículo, em cada hemisfério cerebral. A injeção foi realizada primeiramente no estriado esquerdo, e após duas semanas (14º dia) os animais foram novamente operados, injetando-se 6-OHDA ou veículo no estriado direito. O veículo utilizado foi solução de ácido ascórbico (Sigma/A4544) a 0,2%, a fim de evitar a oxidação da solução. As coordenadas para localização do centro do estriado dorsal foram: 1) Ântero-posterior (A-P) 0,8 mm a partir de bregma; 2) Médio-lateral (M-L) 1,5 mm a partir da linha média; 3) Dorso-ventral (D-V) 3,0 mm a partir da calota craniana, baseadas no Atlas de Estereotaxia para camundongos de Paxinos e Franklin (2004) e no trabalho de Cardoso (2008). Utilizamos uma seringa Hamilton de 10 µl para a injeção; o volume injetado foi de 2 µl (10 µg/µl ou 7,5 µg/µl) em uma taxa de 0,5 µl por minuto. Após cada injeção a seringa permaneceu no local por 3 minutos para difusão adequada da solução de 6-OHDA ou veículo. O peso dos animais foi averiguado a cada sete dias.

3.3. TESTES COMPORTAMENTAIS

Foram utilizados testes comportamentais para avaliar motricidade, presença de lesão nigroestriatal, aprendizado, memória, alterações olfativas e ansiedade. A motricidade foi avaliada pelo teste do campo aberto. A presença de lesão nigroestriatal foi averiguada pelo teste de rotações induzidas por apomorfina. Aprendizado e memória, através do teste do labirinto aquático de Morris. O comportamento tigmotático foi usado para inferir a ansiedade no teste do labirinto aquático. As alterações no olfato foram avaliadas através de teste de discriminação olfativa. Todos os testes foram filmados para análise posterior.

3.3.1. TESTE DO CAMPO ABERTO

O teste do campo aberto foi realizado três vezes: antes da 1ª cirurgia (dia 0), antes da 2ª cirurgia (dia 14) e ao término dos testes comportamentais (dia 39). O teste teve a duração de cinco minutos para cada animal, observando-se fatores como o número de linhas cruzadas pelos animais, o tempo gasto com limpeza, micção e defecção, e o número de vezes que o animal levantava o tronco ficando apenas sobre as patas traseiras (bipedestação) com ou sem apoio.

3.3.2. TESTE DAS ROTAÇÕES INDUZIDAS POR APOMORFINA

O teste com apomorfina (Sigma/A4393) foi realizado no 7º dia de experimento. O teste teve como objetivo avaliar a lesão provocada pela 6-OHDA apenas após a primeira injeção de 6-OHDA nos camundongos, em que somente um hemisfério cerebral sofreu dano. No teste foi contado o número de rotações que o animal realizava em torno de seu próprio eixo durante vinte minutos após a aplicação subcutânea de apomorfina (0,6 mg/Kg).

3.3.3. TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS

Três semanas após a segunda cirurgia (35º dia), o teste do labirinto aquático de Morris foi realizado em uma piscina circular com 80 cm de diâmetro, 33 cm de profundidade e preenchido com água. Na água foi colocado corante preto, a fim de impedir a visualização da plataforma e também para criar um contraste com a pelagem branca do animal. A temperatura da água foi mantida a 24-26°C. Algumas pistas visuais, desenhos geométricos coloridos, foram colocadas nas paredes da sala em que foi realizado o teste. Os testes foram filmados e as gravações foram posteriormente analisadas pelo programa ANY-maze Video Tracking system 4.99, com a finalidade de se obter a velocidade média de natação, distância percorrida e latência para encontrar a plataforma (Figura 2).

Todos os animais foram submetidos ao teste. Realizamos quatro dias consecutivos de testes com quatro treinos por dia, no qual o animal foi colocado na água com a face direcionada para a parede da piscina, e lhe foi permitido nadar livremente até a plataforma de escape de

acrílico transparente (8 x 8 x 32,5 cm) submersa 0,5 cm abaixo da superfície da água, localizada no centro de um dos quadrantes da piscina. O animal teve 60s para encontrar a plataforma, e caso não a encontrasse era gentilmente guiado até a mesma, lá permanecendo por 20s. Entre os intervalos de cada treino o animal foi mantido 30s fora da piscina.

A posição da plataforma foi mantida nos três primeiros dias de testes. No último dia, a plataforma foi retirada da piscina, sendo que nesse dia o animal permaneceu na água pelo período de 60s, a fim de avaliar a memória de retenção. A posição de início no qual o animal foi colocado na piscina variava de maneira aleatória durante os dias de treino.

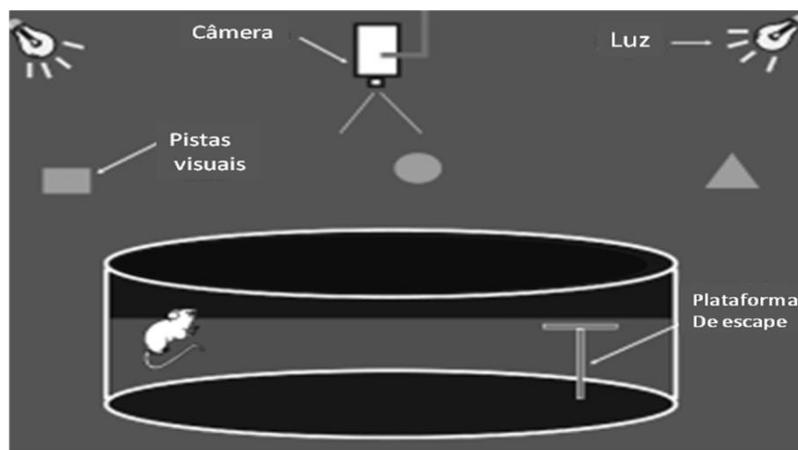


Figura 1: Modelo do teste do labirinto aquático de Morris (Adaptado de Terry, 2009).

3.3.4. TIGMOTAXIA

No teste do labirinto aquático de Morris também foi avaliada a tendência dos animais de nadar próximo à parede da piscina. Esse comportamento é denominado de tigmotaxia, o qual é descrito como um típico comportamento de medo e ansiedade (BARNETT, 1963). Após o término do teste, os vídeos foram analisados no programa ANY-maze Video Tracking System 4.99 e o tempo de natação na periferia da piscina foram quantificados em todos os dias de treino, a fim de inferir comportamento semelhante ao ansioso.

3.3.5. TESTES DE DISCRIMINAÇÃO OLFATIVA

No 39º dia de experimento, os animais foram colocados no campo aberto com dois blocos de madeira (medindo 2x2cm), sendo que um dos blocos havia ficado em gaiolas com

fêmeas por 12 horas no dia anterior e o outro bloco não tinha nenhum odor característico. O teste avaliou o tempo de exploração de cada animal no bloco com o odor da fêmea e no bloco sem o odor; o teste teve a duração de dois minutos (adaptado de TILLERSON *ET AL.*, 2006). Seria esperado que animais com olfato normal permanecessem maior tempo explorando o bloco com odor de fêmea. Logo, se houvesse diminuição na capacidade olfativa, o animal não conseguiria discriminar os odores, e exploraria os blocos de forma semelhante.

3.4. OBTENÇÃO DE SECÇÕES HISTOLÓGICAS

Após a realização dos testes comportamentais, os animais foram perfundidos com tampão salina e paraformaldeído (PFA) a 4% pH 7,2-7,4 durante cinco minutos para cada solução. Em seguida, foi realizada craniotomia para retirada dos encéfalos, e os mesmos foram pós-fixados em PFA (Synth/P1005.01.AH) a 2% por 48 horas. Após a pós-fixação o tecido foi crioprotetido em sacarose (Dinâmica/1894) a 30% por 72 horas, para finalmente serem realizados os cortes histológicos. As secções foram cortadas na espessura de 40 µm obtidas no aparelho criostato (*Leica CM 1850, Nussloch, Germany*). Depois da realização dos cortes histológicos, as secções foram armazenadas a 4-8°C em PFA 4% até a realização das colorações de imunistoquímica.

3.5. IMUNOISTOQUÍMICA

A marcação imunistoquímica da substância negra foi realizada utilizando-se o anticorpo primário anti-tirosina hidroxilase, específico para antígenos da enzima tirosina hidroxilase em neurônios catecolaminérgicos (anti-TH, 1:1000, coelho, monoclonal, CHEMICON/AB152). Também foi utilizado anticorpo primário específico para os antígenos de núcleos neuronais (anti-NeuN, 1:1000, camundongo, monoclonal, CHEMICON/MAB377) para marcação de neurônios hipocâmpais e estriatais. A recuperação antigênica foi realizada pela imersão dos cortes histológicos em tampão borato pH 9,0 à 60°C durante 30 minutos. As marcações inespecíficas foram bloqueadas utilizando-se soro normal de jumento incubado por 1 hora. A incubação com anti-TH e anti-NeuN em temperatura ambiente ocorreu durante a noite, seguida por incubação com anticorpo secundário anti-coelho para TH (1:200, monoclonal, JAKSON IMUNO RESEARCH/711-035-152) e anti-camundongo para NeuN

(1:200, monoclonal, JAKSON IMUNO RESEARCH/715-055-150) durante 2 horas. Entre cada etapa as secções foram lavadas durante 5 minutos em tampão fosfato 0,1M, com três repetições. A revelação foi com os cromógenos SG (Vector/SK-4700) e DAB (3,3'-diaminobenzidene) (Sigma/D-5637).

3.6. ESTEREOLOGIA

Utilizamos a estereologia para quantificação neuronal, após a marcação das células por imunohistoquímica. Utilizamos o método do fracionador óptico, o qual consiste em determinar a população total de uma região a partir de uma estimativa imparcial e sistemática para uma dada população a partir de uma amostra aleatória de uma fração da população. Utilizando-se a fórmula matemática:

$$\hat{X} = \frac{x}{f}$$

Onde, x é valor medido ou estimado a partir da amostra, f é a fração da amostra e X com o acento circunflexo é a estimativa do valor de interesse. O valor de f varia de 0 a 1, quando o valor é igual a 1 toda a população é a amostra (amostra exaustiva). Dessa forma, a estimativa imparcial para a população é o valor da amostra dividido pela fração.

A fim de estimar a quantidade de células o programa Estereologer 2.1 foi utilizado. A estimativa de células foi realizada usando caixas de contagem com área de 2500 μm^2 para substância negra, 625 μm^2 para estriado e 600 μm^2 para hipocampo (região CA1 - *Cornu Ammonis 1*). Foram analisadas 6 caixas de contagem para cada animal, num total de 32 secções. O contorno das áreas analisadas foi feito com objetiva de 2x e a contagem na objetiva de 40x. A espessura do tecido para a análise estereológica foi de 20 μm . Dessa forma, o programa delimita a área de contagem com linhas vermelhas e verdes (Figura 3), sendo que a linha vermelha delimita a área de exclusão e as linhas verdes são área de inclusão. O coeficiente de erro foi mantido menor que 0,1.

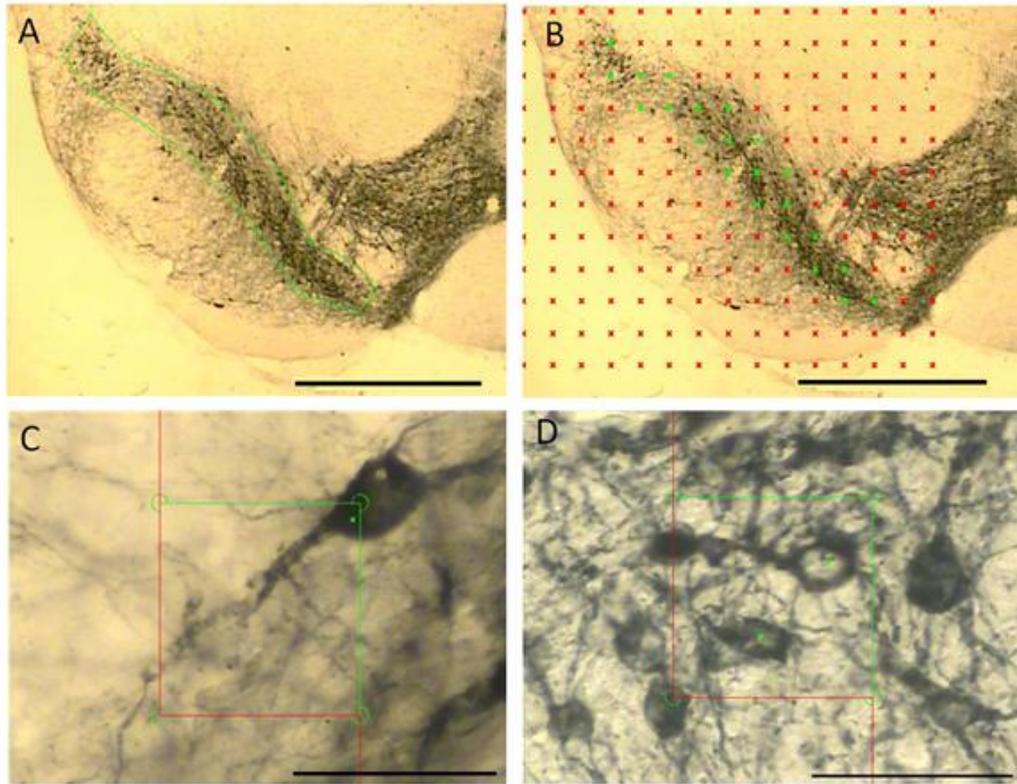


Figura 2: Cortes histológicos. A-B Objetiva 2x escala de 2mm; delimitação da área a ser quantificada pela linha/pontos verdes. C-D Objetiva 40x escala 0,5mm; caixa de contagem de células gerada pelo programa com linha de inclusão (verde) e linha de exclusão (vermelha).

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças estatísticas significativas para o teste de campo aberto, labirinto aquático de Morris, teste olfativo e a massa dos animais foram analisadas através da análise de variância (ANOVA) com dois critérios, seguidas pelo teste de Bonferroni para múltiplas comparações. ANOVA com um critério foi utilizado no teste de apomorfina e para a análise da quantificação neuronal, com pós-teste de Tukey. Todos os valores foram expressos como média \pm erro padrão. Significância estatística foi definida como $P \leq 0.05$ e $P \leq 0.01$.

4. RESULTADOS

4.1. PESO DOS ANIMAIS E MORTALIDADE

Nos grupos em que houve a lesão com 6-OHDA ocorreu maior perda de massa corporal dos animais em relação ao grupo sham. Houve também maior mortalidade dos indivíduos injetados com a toxina após a segunda cirurgia, período que também coincidiu com a perda de massa corporal mais acentuada (Figura 4). A maior perda foi registrada por volta do 21º dia, apresentando recuperação parcial nas semanas seguintes. Ao final do período de sobrevivência, os animais injetados com 6-OHDA ainda apresentaram, em média, uma massa corporal significativamente menor do que o grupo sham (Figura 4). A taxa de mortalidade foi de 27% para os animais que receberam 15 µg de 6-OHDA, 42% para o grupo de 20 µg de 6-OHDA e 0% no grupo sham.

4.2. ANÁLISE COMPORTAMENTAL

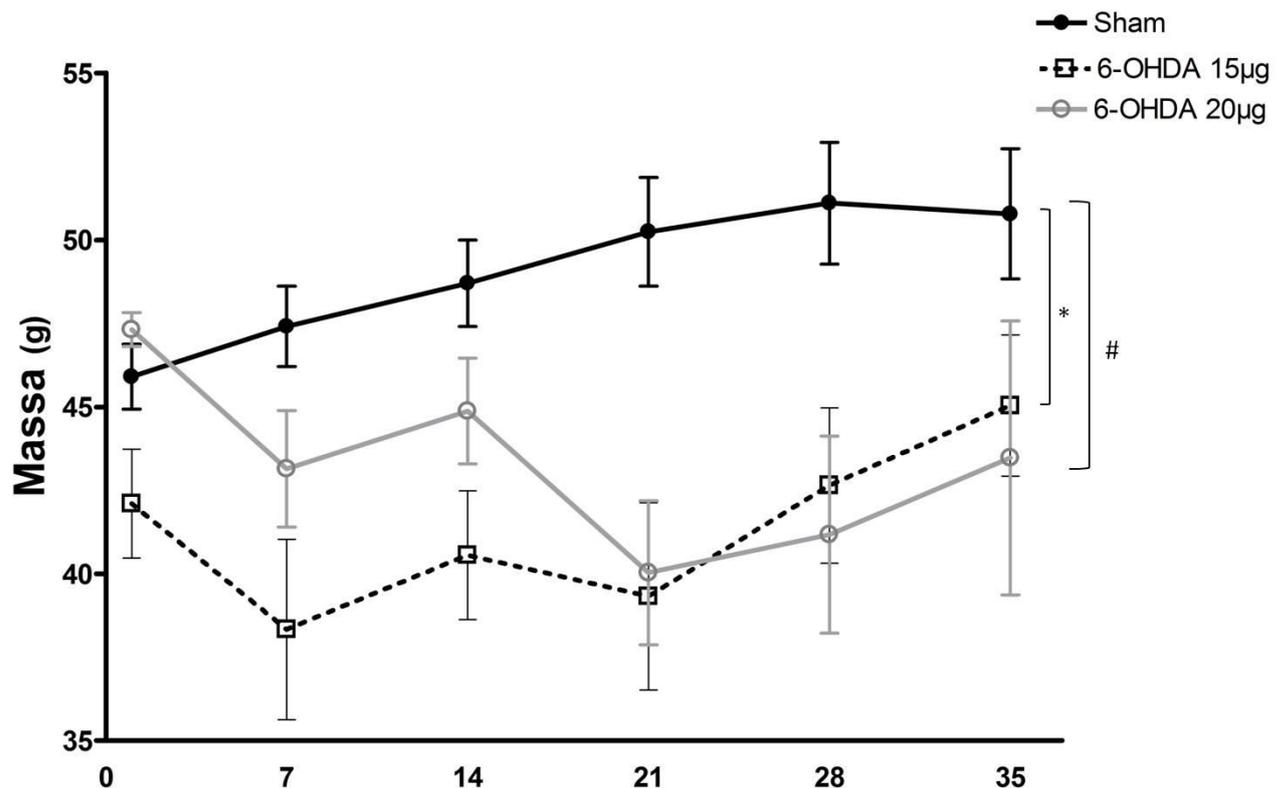


Figura 3: Massa corporal dos indivíduos durante os dias de experimento. * $p < 0,05$ sham versus 6-OHDA 15µg (7, 14, 21 e 28 dias); # $p < 0,01$ versus 6-OHDA 20 µg (21 e 28 dias) (média \pm erro padrão). Sham N=9, 6-OHDA 15µg N= 8 e 6-OHDA 20µg N=7.

Analisando o teste do campo aberto observamos que não ocorreu diferença no número de linhas cruzadas, indicando que a motilidade não foi afetada significativamente nos grupos experimentais. Comparando apenas os dias de teste houve diferenças entre o dia 0 e dia 39 para os grupos sham e 6-OHDA 15 μ g, mostrando uma habituação ao campo aberto e não uma alteração motora provocada pela lesão (Figura 5).

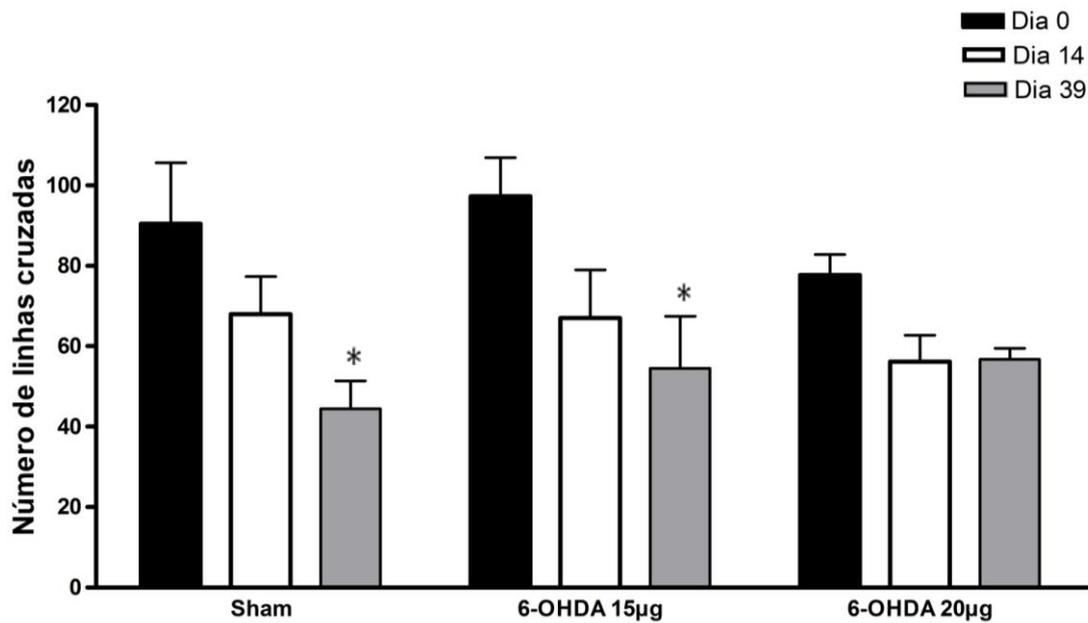


Figura 4: Número de linhas cruzadas no campo aberto antes das cirurgias (dia 0), 14^a e 39^a dia de experimento (média \pm erro padrão). * $p < 0,05$ versus Dia 0. N=9, 6-OHDA 15 μ g N= 8 e 6-OHDA 20 μ g N=7.

A tabela 3 mostra os demais parâmetros analisados no teste do campo aberto. Diferenças estatísticas ocorreram apenas entre o grupo 6-OHDA 15 μ g e sham nos dias 14 e 39 dos testes para bipedestação com apoio, esse dado indica comportamento semelhante ao da ansiedade nos animais lesados com 6-OHDA 15 μ g quando comparado aos animais sham.

Tabela 3. Efeito da lesão com 6-OHDA no comportamento de camundongos no teste do campo aberto.

Parâmetro	Dia de teste	Sham	6-OHDA 15 μ g	6-OHDA 20 μ g
Bipedestação com apoio	0	34,2 \pm 13,3	31,8 \pm 11,8	28,6 \pm 4,9
	14	25,9 \pm 12,2	12,8 \pm 6,2*	15,6 \pm 8,8
	39	17,3 \pm 7,6	6,25 \pm 6,45*	13,7 \pm 4,44
Bipedestação sem apoio	0	7,8 \pm 6,1	6,9 \pm 5,6	5,5 \pm 4,5
	14	5,6 \pm 3,6	4,6 \pm 5,5	2,3 \pm 2,3
	39	2,7 \pm 2,5	1,7 \pm 2	2,25 \pm 0,5
Limpeza	0	6,8 \pm 5,9	2,9 \pm 2	2 \pm 1
	14	5,8 \pm 2,9	3,0 \pm 2,3	2,5 \pm 1,4
	39	4,3 \pm 4,9	2,7 \pm 2,8	0,5 \pm 0,6
Defecção	0	1,6 \pm 1,6	3,4 \pm 2,4	3 \pm 1,6
	14	1,3 \pm 0,8	2,2 \pm 1,8	2,5 \pm 2,5
	39	2,11 \pm 1,17	1,75 \pm 1,28	1,43 \pm 1,4
Micção	0	0,4 \pm 0,7	0,1 \pm 0,32	1,1 \pm 0,8
	14	0 \pm 0	0 \pm 0	0,3 \pm 0,5
	39	0 \pm 0	0,5 \pm 0,76	0,43 \pm 0,79

Os valores são expressos como média \pm desvio padrão . Diferenças entre os grupos indicados pelo símbolo: * diferença com sham ; Two way ANOVA.

A presença da lesão provocada pela 6-OHDA foi averiguada pelo teste de apomorfina, o qual foi realizado no 7^a dia após a primeira injeção. O comportamento rotacional característico provocado pela lesão esteve presente em ambos os grupos injetados com 6-OHDA. O número de rotações foi estatisticamente diferente entre os grupos que receberam a neurotoxina, comparado ao grupo sham (Figura 6).

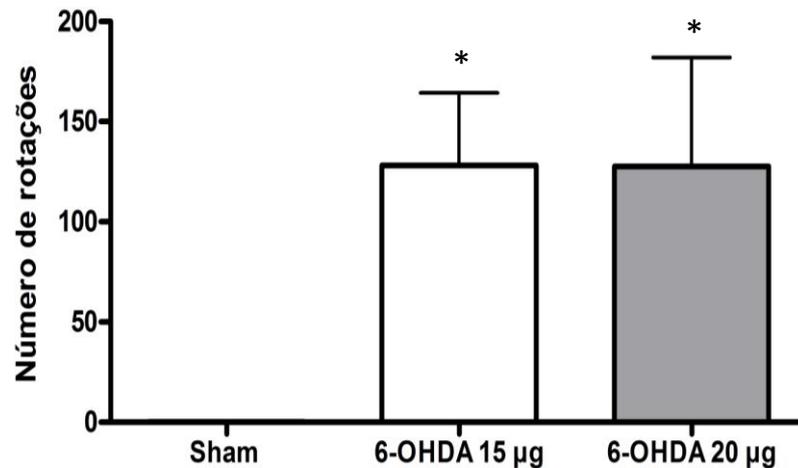


Figura 5: Número de rotações no teste da apomorfina. * $p < 0,05$ versus sham (média \pm erro padrão). Sham N=9, 6-OHDA 15µg N= 8 e 6-OHDA 20µg N=7.

Também investigou-se se houve alterações na memória e aprendizado dos animais após lesão com 6-OHDA. No teste do labirinto aquático de Morris analisamos a memória espacial. Como pode se observar na figura 7, a latência para se encontrar a plataforma foi diferente entre os grupos estudados. Analisando a progressão dos treinos durante o mesmo dia de teste, houve diferença entre o grupo sham e 6-OHDA 15µg. Para cada dia de treino essa diferença estatística permaneceu (ANOVA um critério, pós-teste de Bonferroni).

Comparando-se os diferentes dias de treino para cada grupo estudado, nossos resultados mostraram uma diminuição na latência para encontrar a plataforma no último dia de treino para a memória espacial (Figura 8). Para os grupos lesados com 6-OHDA, o tempo para encontrar a plataforma foi significativamente maior comparado ao grupo sham no terceiro dia de testes. Dessa forma, os animais lesados com ambas as doses de 6-OHDA tiveram alterações na memória e aprendizado.

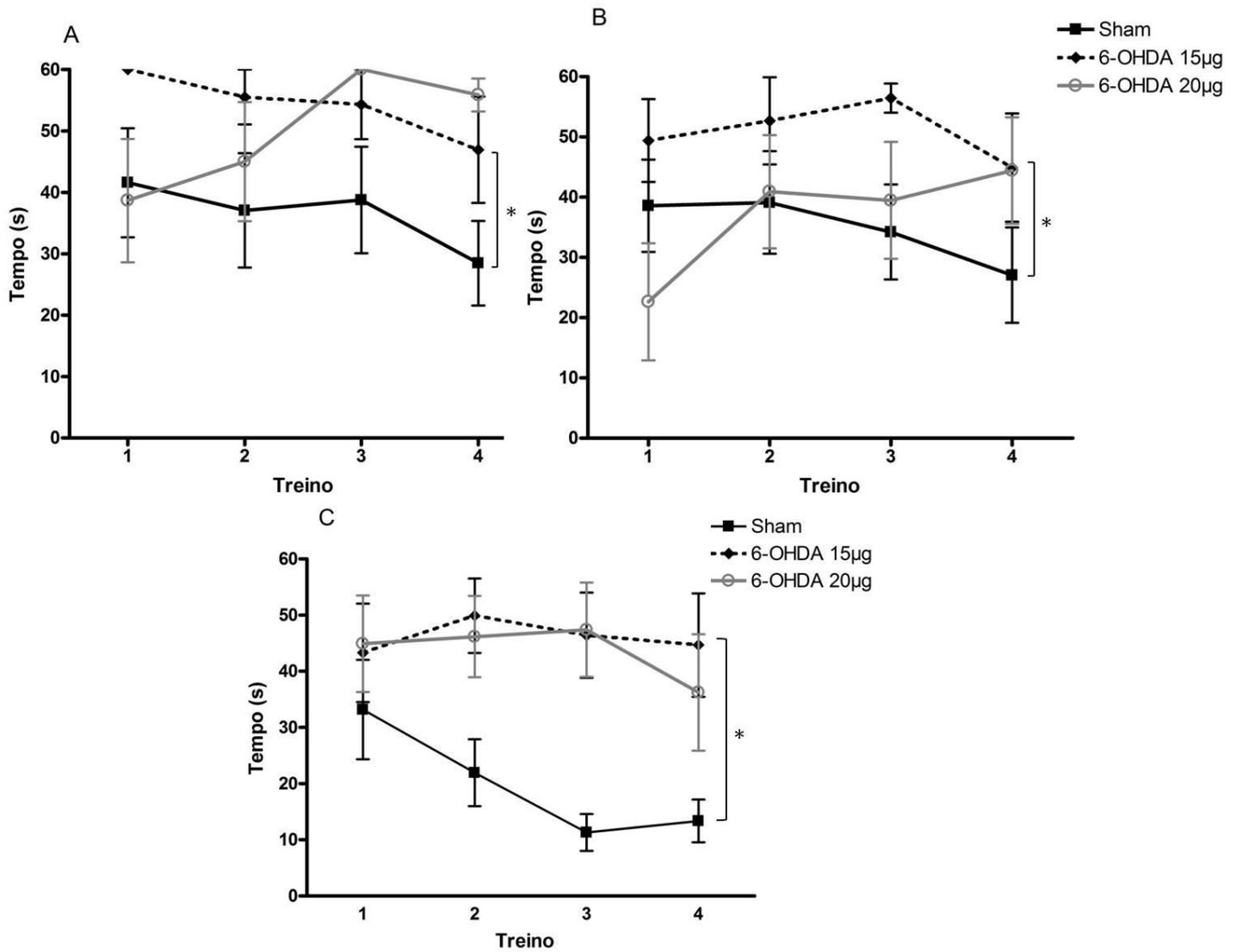


Figura 6: Labirinto aquático de Morris. Médias de latência em cada um dos quatro treinos diários para encontrar a plataforma de escape. A) Primeiro dia de teste do labirinto aquático. B) Segundo dia de teste do labirinto aquático. C) Terceiro dia de teste do labirinto aquático. * $P < 0,001$ versus sham (média \pm desvio padrão). Sham $N=9$, 6-OHDA $15\mu\text{g}$ $N=8$ e 6-OHDA $20\mu\text{g}$ $N=7$.

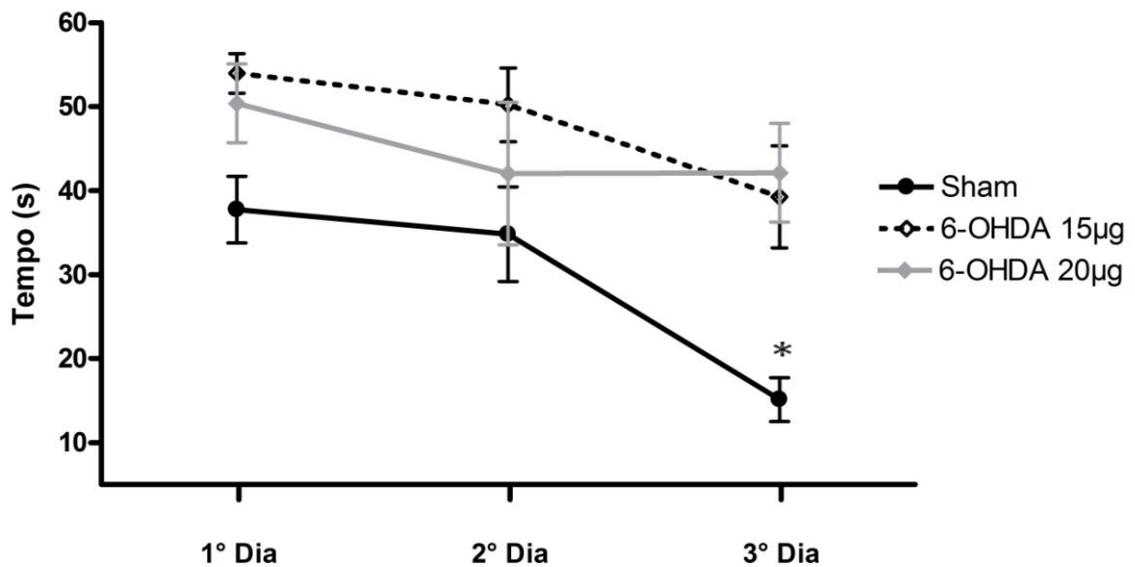


Figura 7: Labirinto aquático de Morris. Latência para encontrar a plataforma de escape nos três dias de testes. * $P < 0,001$ versus 6-OHDA 15 e 20µg para 3º dia (média \pm erro padrão). Sham $N=9$, 6-OHDA 15µg $N=8$ e 6-OHDA 20µg $N=7$.

Esses dados puderam ser confirmados no 4º dia de treino em que a plataforma foi retirada (probe test). O tempo de permanência no local onde estaria a plataforma de escape foi maior para o grupo sham ($2,19s \pm 0,66$), em relação aos grupos lesados com 6-OHDA 15µg ($1,37s \pm 0,98$) e 20µg ($0,8s \pm 0,43$), contudo só houve diferença significativa para o grupo lesado com 6-OHDA 20µg em relação ao sham (Figura 9).

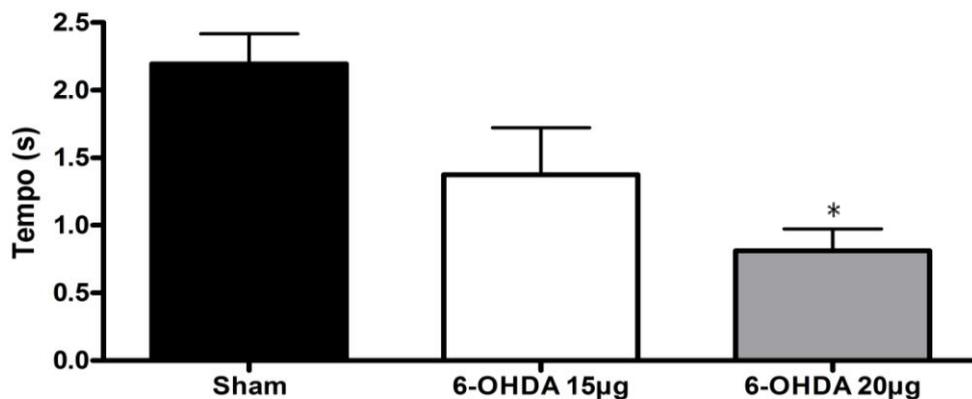


Figura 8: Labirinto aquático de Morris: memória de retenção. Tempo de permanência no local onde plataforma de escape estava presente nos dias anteriores de treino. * $P < 0,05$ versus Sham (média \pm erro padrão). Sham $N=9$, 6-OHDA 15µg $N=8$ e 6-OHDA 20µg $N=7$.

A figura 10 mostra o padrão representativo de busca dos animais, para os grupos sham e lesados com 15 e 20 μg de 6-OHDA para os quatro treinos diários. O padrão de navegação foi claramente alterado após a lesão com 6-OHDA em ambas as doses analisadas. Os animais do grupo sham entraram um maior número de vezes no quadrante onde a plataforma estava presente quando comparado aos grupos com 6-OHDA.

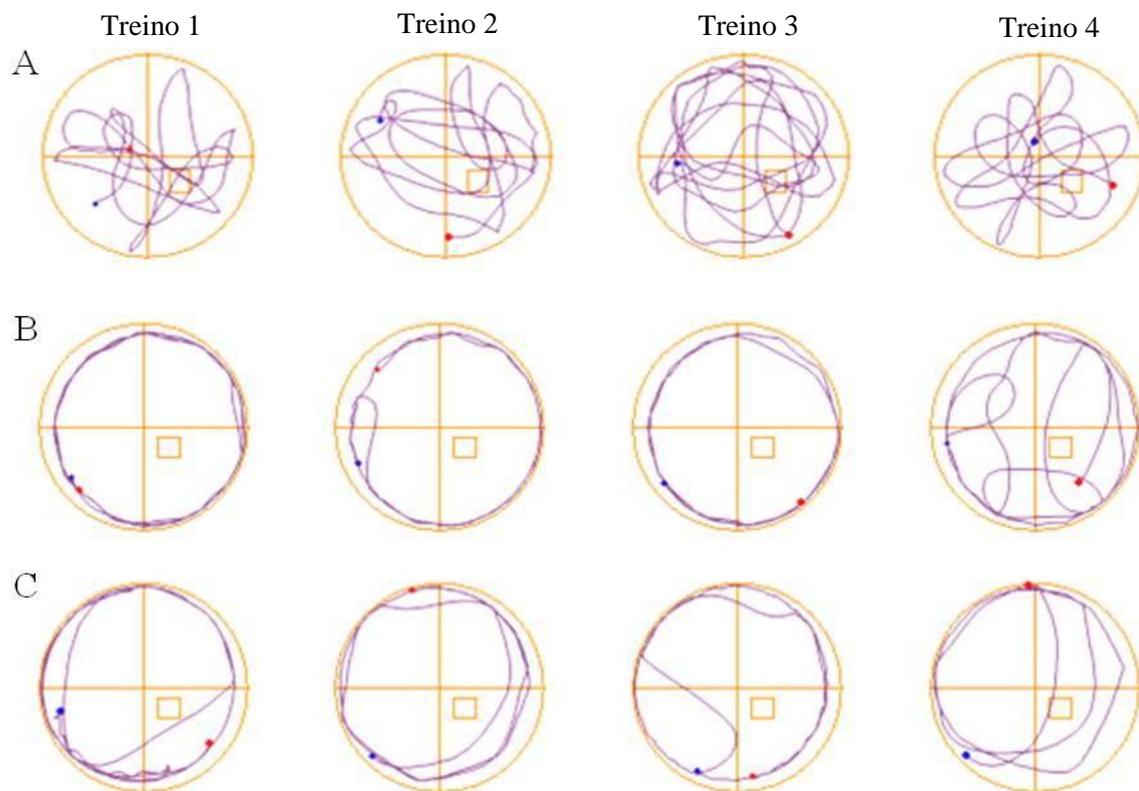


Figura 9: Padrões de navegação representativo no teste do labirinto aquático de Morris. Grupo sham (A), 6-OHDA 15 μg (B) e 6-OHDA 20 μg (C) no labirinto aquático de Morris no quarto dia de teste. A figura mostra a evolução da navegação dos animais médios em 4 treinos consecutivos, respectivamente. O quadrado laranja demonstra onde a plataforma estava presente nos dias anteriores. Sham N=9, 6-OHDA 15 μg N= 8 e 6-OHDA 20 μg N=7.

Ao analisar o comportamento de tigmotaxia observamos que no primeiro dia de testes os animais de todos os grupos apresentaram comportamento semelhante, não havendo diferença significativa entre os grupos. Esse comportamento pode ser devido ao comportamento semelhante ao ansioso, gerada pela exposição dos animais ao ambiente novo. Já no segundo dia de testes houve diferença no tempo de natação na periferia da piscina entre os grupos sham e 6-OHDA 15 μ g, contudo o grupo 6-OHDA 20 μ g apresentou grande variação amostral e não mostrou diferença estatística com o sham. No terceiro dia de experimentos, houve diferença significativa entre os grupos lesionados e sham para o comportamento de tigmotaxia, logo os animais lesionados apresentaram comportamento ansioso. Finalmente, no último dia testes em que é realizado o teste de retenção de memória, só houve diferença significativa entre os grupos sham e 6-OHDA 20 μ g (Figura 11).

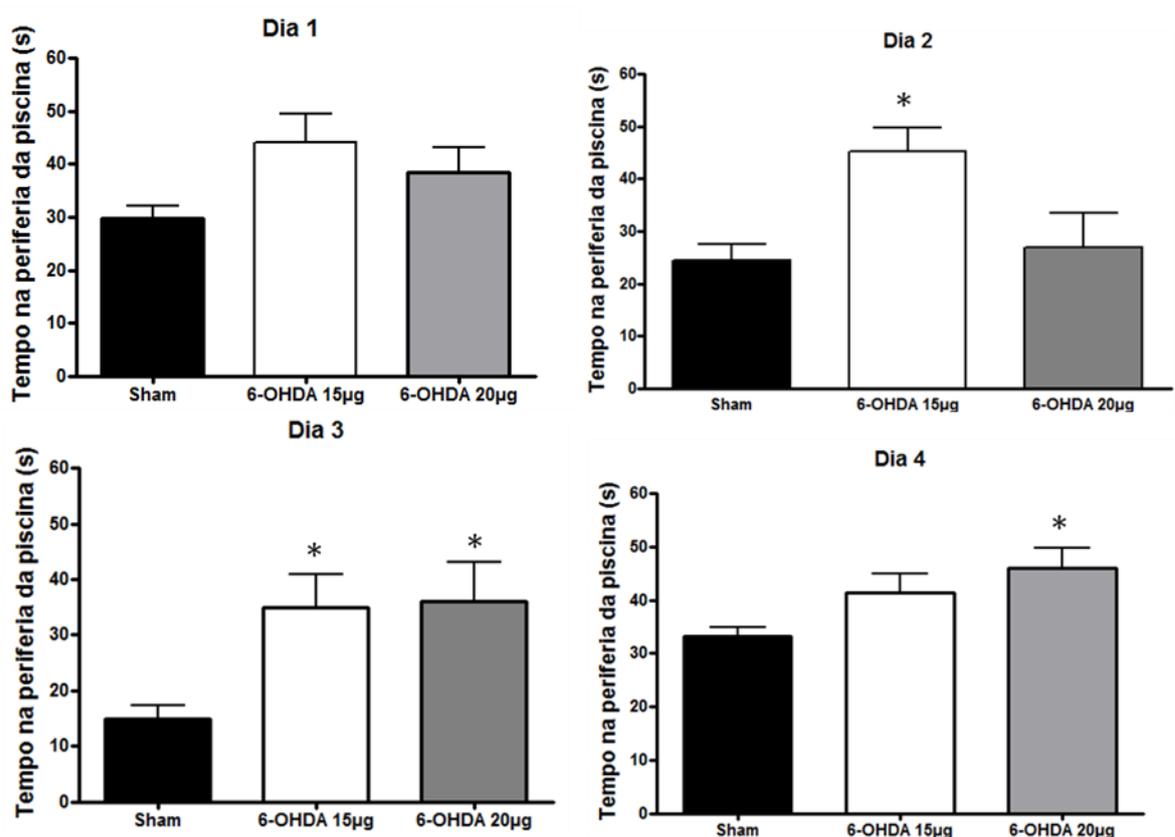


Figura 10: Comportamento de tigmotaxia dos grupos sham, 6-OHDA 15 μ g e 6-OHDA 20 μ g no labirinto aquático de Morris. * P<0,05 versus Sham (média \pm erro padrão). Sham N=9, 6-OHDA 15 μ g N= 8 e 6-OHDA 20 μ g N=7.

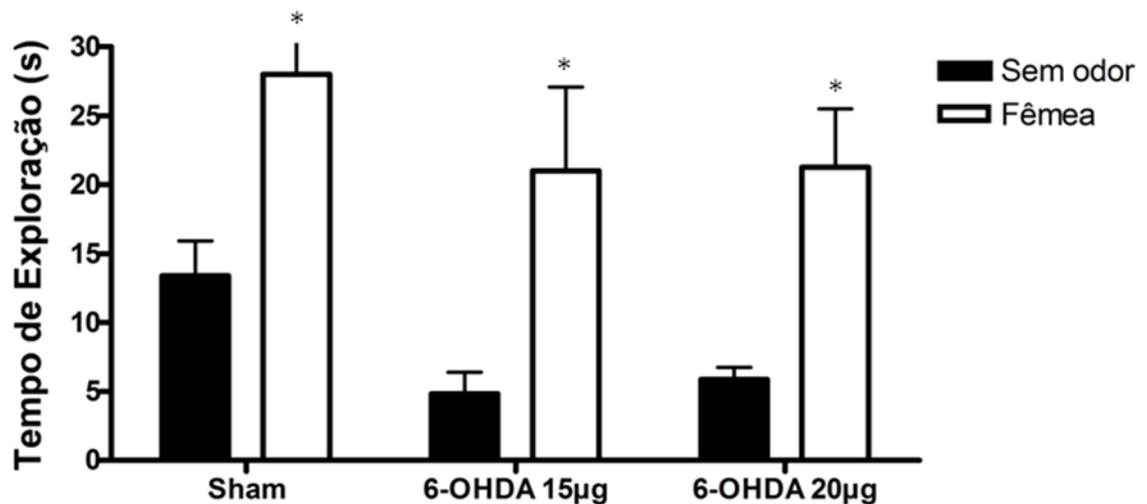


Figura 11: Teste de discriminação olfativa. Tempo de exploração em cubos de madeira com odor de fêmeas e sem odor característico. * $p < 0,05$ versus sem odor (sham, 6-OHDA 15 e 20µg) (média \pm erro padrão). Sham N=9, 6-OHDA 15µg N= 8 e 6-OHDA 20µg N=7

Finalmente, o teste de discriminação olfativa foi realizado para se investigar a capacidade dos indivíduos em distinguir odores. Nenhuma diferença entre os grupos sham e tratados com 6-OHDA foi encontrada. Todos os animais do estudo foram capazes de discriminar o odor da fêmea no bloco de madeira explorando-o por mais tempo em relação ao bloco sem odor característico (Figura 12). Dessa forma, nenhum dos animais apresentou déficit olfativo.

4.3. ANÁLISE HISTOLÓGICA

A análise histológica dos encéfalos dos animais revelou que a lesão por 6-OHDA no estriado provocou uma diminuição significativa de células TH-positivas na SN: grupo sham = $13208,72 \pm 2114,63$; grupo lesionado com 6-OHDA 15µg = $5072,68 \pm 1286,43$; grupo lesionado com 6-OHDA 20µg = $5813,14 \pm 889,9$ (média \pm desvio padrão). Comparado ao sham a perda de células marcadas na SN foi de 61% para o grupo 6-OHDA 15µg e de 53% para o grupo 6-OHDA 20µg (Figura 13).

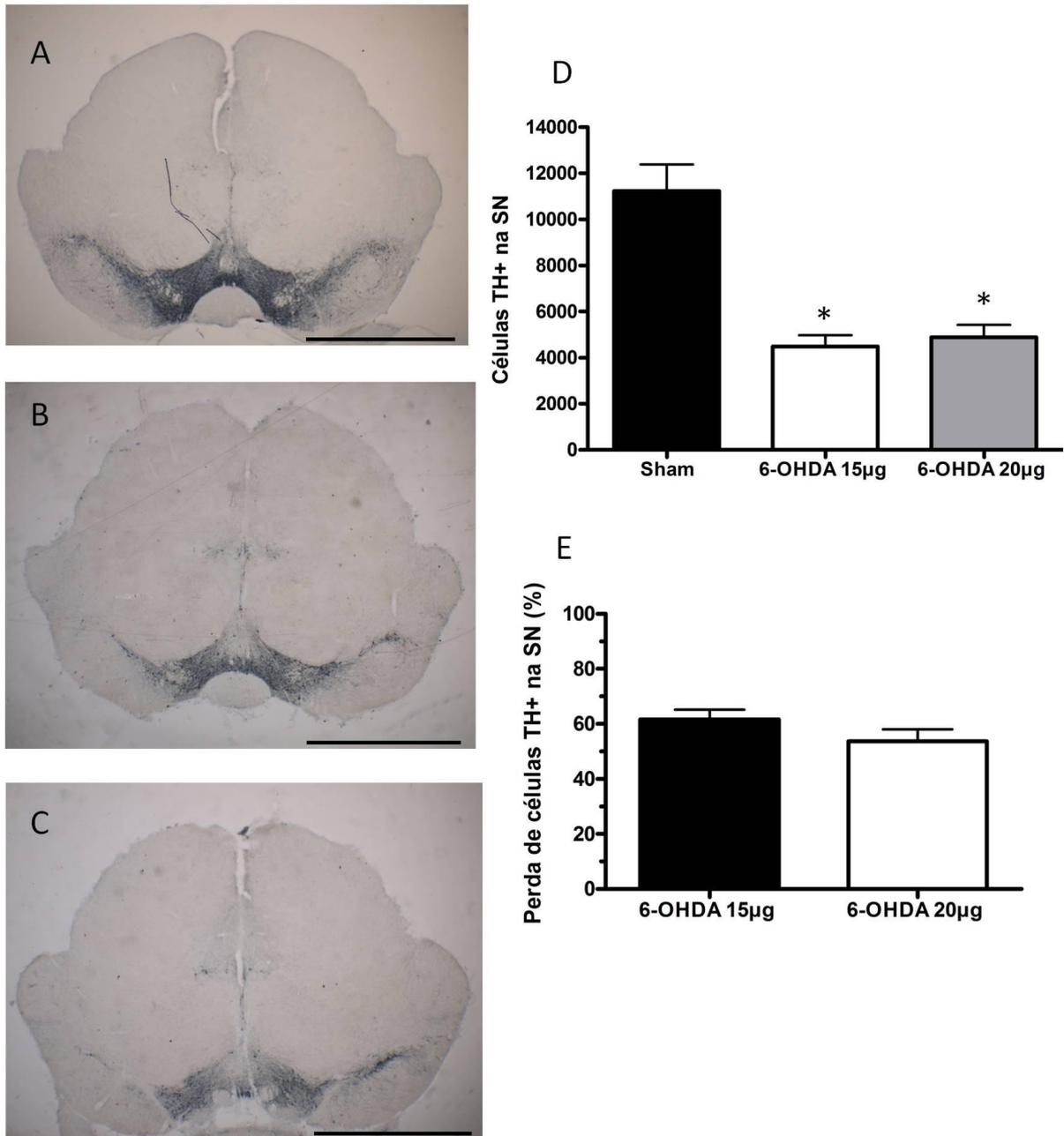


Figura 12: Imunomarcção para TH na substância negra para os grupos sham (A), 6-OHDA 15 (B) e 20µg (C). (D) Quantificação de células TH+ na SN. (E) Perda de células TH+ na SN. * $p < 0,01$ versus sham (média \pm erro padrão). Sham N=9, 6-OHDA 15µg N= 8 e 6-OHDA 20µg N=7. Escala 2mm.

A contagem estereológica nos encéfalos dos animais revelou que a lesão por 6-OHDA no estriado provocou uma diminuição significativa de neurônios no estriado: grupo sham = 1229287 ± 147143 ; grupo lesionado com 6-OHDA 15µg = 732799 ± 161499 ; grupo

lesionado com 6-OHDA 20 μ g = 748368 \pm 220312 (média \pm desvio padrão). Comparado ao sham a perda de neurônios no estriado foi de 40% para o grupo 6-OHDA 15 μ g e de 39% para o grupo 6-OHDA 20 μ g (Figura 14).

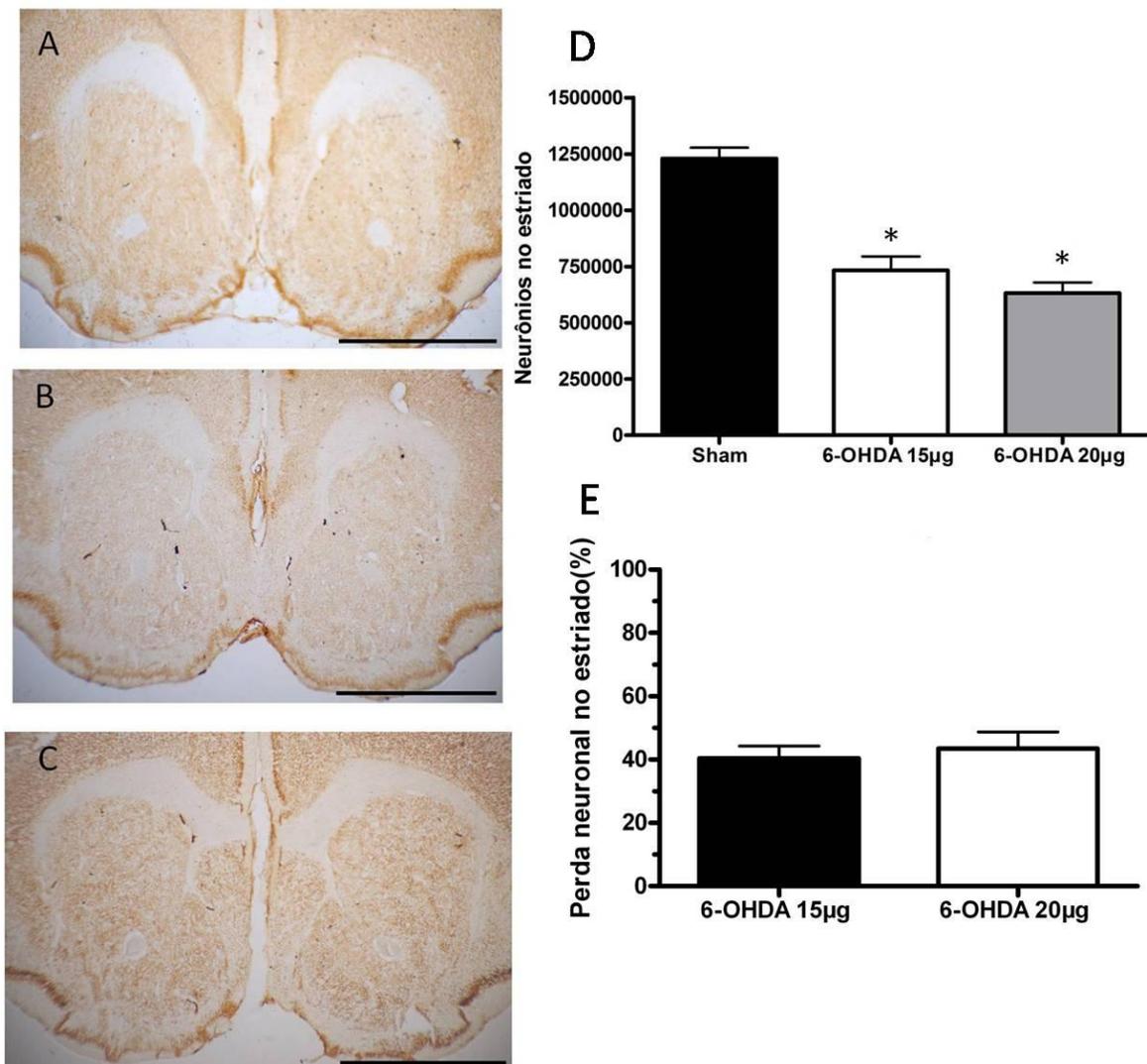


Figura 13: Imunomarcção para NeuN no estriado para os grupos sham (A), 6-OHDA 15 (B) e 20 μ g (C). (D) Quantificação de neurônios no estriado. (E) Perda de neurônios do estriado. * $p < 0,01$ versus sham (média \pm erro padrão). Sham N=9, 6-OHDA 15 μ g N= 8 e 6-OHDA 20 μ g N=7. Escala 2mm.

Na análise quantitativa dos neurônios CA1 hipocâmpais, obtivemos os seguintes resultados: grupo sham = 57946 \pm 7933; grupo lesionado com 6-OHDA 15 μ g = 50972 \pm

5880; grupo lesionado com 6-OHDA 20 μ g = 43511 \pm 6312 (média \pm desvio padrão). Houve diminuição significativa de neurônios em CA1 apenas no grupo 6-OHDA 20 μ g. Comparado ao sham a perda de neurônios em CA1 foi de 26% para o grupo 6-OHDA 20 μ g (Figura 15).

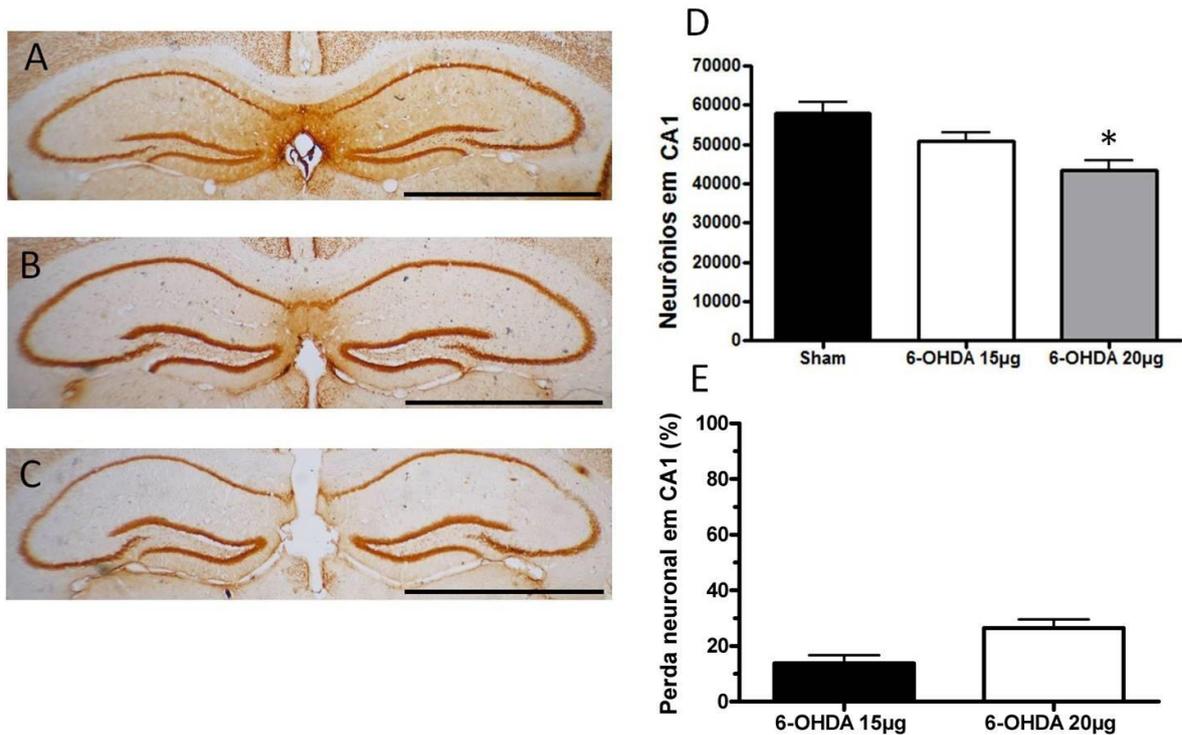


Figura 14: Imunomarcção para NeuN no hipocampo para os grupos sham (A), 6-OHDA 15 (B) e 20 μ g (C). (D) Quantificação de neurônios da região CA1 do hipocampo. (E) Perda de neurônios em CA1 do hipocampo. * $p < 0,01$ versus sham (média \pm erro padrão). Sham N=9, 6-OHDA 15 μ g N= 8 e 6-OHDA 20 μ g N=7. Escala 2mm.

5. DISCUSSÃO

Os modelos animais para a DP são uma importante ferramenta para o avanço da terapêutica experimental, do entendimento da etiologia e mecanismo da doença. Nesse contexto, os modelos experimentais de DP para sintomas não-motores necessitam de melhor caracterização.

5.1. AS DOSES DE 6-OHDA

O modelo de lesão com 6-OHDA é considerado o modelo mais comum para a DP, sendo largamente utilizado para testes terapêuticos (LE *ET AL.*, 2014). Nesse modelo, já está bem estabelecida a relação entre a lesão nigroestriatal produzida e os déficits motores, tanto em ratos quanto em camundongos (BLANDINI *ET AL.*, 2008; DAUER & PRZEDBORSKI, 2003). Contudo, para sintomas não motores ainda há grande variabilidade de resultados discrepantes (BRANCHI *ET AL.*, 2010; TADAIESKY *ET AL.*, 2008; CAMPOS *ET AL.*, 2013).

Diversas doses já foram testadas em ratos para mimetizar os sintomas não motores da DP. Injeção bilaterais de 6 µg de 6-OHDA na SN (FERRO *ET AL.*, 2005), de 8 µg de 6-OHDA na SN (CAMPOS *ET AL.*, 2013), de 8µg de 6-OHDA no feixe medial do prosencéfalo (MURA E FELDON, 2003), de 4 µg de 6-OHDA no feixe medial do prosencéfalo (CARVALHO *ET AL.*, 2013), de 10,5 µg de 6-OHDA no estriado (BRANCHI *ET AL.*, 2008), 12 µg de 6-OHDA no estriado (TADAIESKY *ET AL.*, 2008) e 15 µg de 6-OHDA no estriado (RAMPERSAUD *ET AL.*, 2012) foram capazes de recriar pelo menos um dos sintomas não motores comuns da DP, como alterações na memória, aprendizado, quadros depressivos e ansioso, associados à diminuição de marcação de TH-positivo na SN.

Entretanto em camundongos, poucos trabalhos foram realizados para avaliar sintomas não motores. DE LEONIBUS *ET AL.* (2007) realizou lesão intraestriatal bilateral com 4,5µg e BRANCHI *ET AL.* (2010) com 12 µg de 6-OHDA injetados no estriado e obtiveram como resultado a ausência de déficits emocionais e cognitivos, ocorrendo apenas depleção da marcação de TH-positivo na SN. Nossos resultados demonstraram que doses relativamente altas de 6-OHDA (15 µg e 20 µg) injetadas no estriado de camundongos suíços geram déficit emocional, cognitivo, aumento da ansiedade e diminuição de células TH-positivo na SN. Bonito-Oliva *et al.* (2013), mas utilizando doses menores (4 µg) no estriado dorsal de

camundongos C57BL/6J demonstraram déficit na memória de longa duração de reconhecimento de objetos. Os autores atribuíram tal déficit a disfunção no giro denteado.

5.2. TAXA DE MORTALIDADE

Em nossos resultados a perda de massa corporal foi mais acentuada no 21º dia de experimento para os grupos lesionados com a neurotoxina, ou seja, após a cirurgia bilateral, provocando a morte de 27% dos animais lesionados com a menor dose e 42% para a dose maior de 6-OHDA usada no estudo. Em estudo anterior (FERRO *ET AL.*, 2005) a taxa de mortalidade foi de 50% após lesão na SN com 6-OHDA em doses menores a que utilizamos, contudo em outros trabalhos não há relato da taxa de mortalidade. A mortalidade nos animais pode ser consequência de ingestão insuficiente de ração e/ou água, tendo como efeito a perda de massa corporal acentuada que observamos. A injeção de 6-OHDA pode induzir essa alteração comportamental e consequente diminuição da massa corporal dos animais (BANKIEWICZ *ET AL.*, 1999) pela redução da motivação na busca do alimento (DEUMENS *ET AL.*, 2002; FERRO *ET AL.*, 2005). A fim de tentar minimizar as consequências desse possível efeito na motivação, durante os períodos críticos pós-cirurgia, a ração era umedecida e colocada dentro da gaiola, e água era oferecida diretamente na boca do animal uma vez por dia. Mesmo assim, ainda houve mortalidade maior nos grupos injetados com 6-OHDA em relação ao grupo sham.

5.3. ADMINISTRAÇÃO BILATERAL INTRAESTRIATAL DE 6-OHDA INDUZ SINTOMAS MOTORES.

Em nosso trabalho observamos a presença de comportamentos rotacionais contralaterais característicos após a injeção do fármaco apomorfina nos animais lesados com 6-OHDA unilateralmente com as duas doses usadas no estudo. Esse comportamento rotacional caracteriza alterações motoras da DP, assim como confirma a existência da lesão. O comportamento rotacional revela uma degeneração dopaminérgica com perda de 70% da marcação TH+ na SN (CARVALHO *ET AL.*, 2013). Dessa forma, o teste de apomorfina é largamente utilizado para confirmar que a injeção de 6-OHDA e degeneração consequente foram bem sucedidas (IANCU *ET AL.*, 2005; CARVALHO *ET AL.*, 2013).

Um teste comportamental que pode ser usado para averiguar comportamento motor é o teste de atividade exploratória campo aberto, através da quantificação da frequência de locomoção (SANTIAGO *ET AL.*, 2010; CARVALHO *ET AL.*, 2013). Em nossos resultados não observamos uma alteração motora entre os grupos estudados. O teste apenas revelou uma habituação ao ambiente durante os dias de testes. Ou seja, os animais de todos os grupos analisados, independente da lesão, apresentaram uma diminuição de ambulação no campo aberto gerada provavelmente pela aclimação ao ambiente. Alterações na locomoção poderiam influenciar na habilidade natatória, diminuindo a velocidade e tempo para encontrar a plataforma, e dessa forma os resultados não poderiam ser interpretados como devido a uma falha no aprendizado (MURA E FELDON, 2003). Os resultados do presente estudo, por outro lado, mostram que a lesão bilateral não gera uma alteração motora que possa influenciar na locomoção e natação dos animais, tornando o modelo adequado para o uso no teste de labirinto aquático de Morris.

5.4. ADMINISTRAÇÃO BILATERAL INTRAESTRIATAL DE 6-OHDA INDUZ SINTOMAS NÃO MOTORES

Em relação aos sintomas não motores, como esperávamos na nossa hipótese inicial, a administração intraestriatal de 6-OHDA promoveu aumento no tempo para encontrar a plataforma no teste do labirinto aquático de Morris. O teste do labirinto aquático de Morris tem sido largamente utilizado para avaliar alterações cognitivas, como aprendizado e memória (TADAIESKY *ET AL.*, 2008; CAMPOS *ET AL.*, 2013). Estudos anteriores utilizando 6-OHDA falharam em gerar alterações cognitivas em modelos experimentais para a DP, utilizando diferentes tipos de lesões. Lesões no feixe medial do prosencéfalo (RAMPERSAUD *ET AL.*, 2012; CARVALHO *ET AL.*, 2013) e no estriado (BRANCHI *ET AL.*, 2008; BRANCHI *ET AL.*, 2010) foram realizadas e não obtiveram resultados de déficit na memória e aprendizado, avaliados através do teste do labirinto aquático de Morris e reconhecimento de objetos. Logo, nossos resultados mostraram que a doses de 20µg e 15 µg de 6-OHDA provocaram lesões que interferiram no aprendizado e na memória de retenção, avaliado através do teste do labirinto aquático de Morris.

Outro sintoma não motor da DP é a ansiedade (LANGSTON, 2006). Existem diversos testes comportamentais para avaliar ansiedade como tigmotaxia (HUANG *ET AL.*, 2012;

SANTUCCI *ET AL*, 2008) e campo aberto (CAROLA *ET AL*, 2002; CHOLERIS *ET AL*, 2001). No estudo presente, a avaliação do comportamento semelhante ao ansioso no campo aberto foi feita pela averiguação do comportamento de bipedestação (rearing), em que animais ansiosos tendem a diminuir esse comportamento (CAROLA *ET AL.*, 2002; CHOLERIS *ET AL.*, 2001), em nossos resultados houve redução do número de bipedestações no grupo lesionado com 6-OHDA em relação ao sham. O comportamento semelhante ao ansioso também foi observado no teste de tigmotaxia, onde os animais lesados com a 6-OHDA passaram mais tempo na periferia da piscina comparado aos animais controle, comportamento esse que reflete o medo dos animais a exposição em ambientes abertos provocando a ansiedade (HUANG *ET AL.*, 2012).

Sabe-se que lesões dopaminérgicas induzem anosmia em ratos (PREDIGER *ET AL.*, 2010). Contudo, os achados presentes no nosso estudo demonstraram ausência de déficit olfativo em camundongos tratados com 6-OHDA. Resultado semelhante ao encontrado por Tadaiesky e colaboradores (2008) em estudo realizado com ratos lesionados no estriado por 6-OHDA. Resultados positivos para alterações olfativas só foram encontrados após lesões intranasais por MPTP (PREDIGER *ET AL.*, 2010). Esses resultados sugerem que a lesão intraestriatal por 6-OHDA, mesmo em doses altas, não foi suficiente de provocar déficits olfativos.

5.5. DEGENERAÇÃO DOPAMINÉRGICA NA SN, DEPLEÇÃO DE NEURÔNIOS ESTRIATAIS E HIPOCAMPAIS.

Os resultados que observamos nos testes comportamentais também foram apoiados pelas análises histológicas que indicaram uma notável redução de células TH+ na SN, consistente com a hipótese de que a diminuição de dopamina na SN além de causar sintomas motores também gera sintomas cognitivos e emocionais nos pacientes (AHLKOG *ET AL.*, 2013). De fato, essa noção também é suportada por outros estudos experimentais em ratos que observaram comportamentos depressivos, ansiosos, alterações de memória e aprendizado juntamente com a depleção de dopamina na SN (TADAIESKY *ET AL.*, 2008; SANTIAGO *ET AL.*, 2010; CAMPOS *ET AL.*, 2013).

A contagem por estereologia na SN mostrou que houve redução de 53-61% de células TH+ marcadas em relação ao sham utilizando-se a dose 15µg ou 20µg de 6-OHDA. Carvalho

et al., (2013) encontraram em seus resultados 70% de redução de células TH+ na SN após lesão unilateral com 12 µg de 6-OHDA no feixe medial prosencefálico.

Adicionalmente, em nossos resultados também encontramos diminuição de 40% de células neuronais marcadas no estriado, após lesão com 6-OHDA. No estriado ocorre diminuição de terminais dopaminérgicos após lesão com 6-OHDA (TADAIESKY *ET AL.*, 2008), dessa forma a redução de neurônios no estriado pode estar relacionada à diminuição dos terminais dopaminérgicos.

E no hipocampo também houve redução de 26% de neurônios em CA1, após lesão por 6-OHDA. No hipocampo, os níveis de liberação de dopamina diminuem após lesão com 6-OHDA (COSTA *ET AL.*, 2012).

Esses dados sugerem uma relação da diminuição de dopamina, através da degeneração de células dopaminérgicas na SN pela 6-OHDA, com a perda neuronal no hipocampo. Visto que, da SN e da área tegumentar ventral partem projeções dopaminérgicas para a região hipocampal CA1 (GASBARRI *ET AL.*, 1994). Além disso, receptores dopaminérgicos tipo D1 no hipocampo têm sido implicados na potenciação de longa duração (LTP, do inglês Long term potentiation), a qual é considerada substrato neuronal para aprendizado, memória e plasticidade sináptica (EDELMAAN E LESSMANN, 2013).

Hipóteses recentes têm sido levantadas de que a dopamina e suas interações com o hipocampo modulam propriedades intrínsecas da membrana e a transmissão sináptica, dessa forma, afetando a memória dependente do hipocampo, aprendizado e comportamento (CALABRESI *ET AL.*, 2013). Estudos revelam que os níveis ambientais de dopamina endógena no hipocampo determinam a eficiência de STDP (spike timing-dependent plasticity) em CA1, ou seja, a diminuição da quantidade de dopamina em CA1 altera a plasticidade sináptica (EDELMAAN & LESSMANN, 2013).

Dessa forma, sugerimos que as alterações no aprendizado e memória que vimos em nossos resultados podem ter íntima relação com a diminuição de dopamina na SN. Como consequência, pode haver uma diminuição das projeções dopaminérgicas para o hipocampo, por fim culminando na depleção de neurônios hipocampais em CA1.

Esse foi o primeiro estudo a demonstrar que altas doses de 6-OHDA no estriado de camundongos geram uma combinação de déficits emocionais e cognitivos, como uma consequência da redução do número de neurônios TH-positivos na SN, de neurônios estriatais e neurônios da região hipocampal CA1.

6. CONCLUSÕES

1. A lesão bilateral intraestriatal com 6-OHDA em camundongos é válida como um modelo experimental para os sintomas não-motores da doença de Parkinson.
2. A lesão bilateral intraestriatal com 6-OHDA em camundongos é capaz de gerar alterações na memória e aprendizado, avaliado através dos testes de labirinto aquático de Morris.
3. A lesão bilateral intraestriatal com 6-OHDA em camundongos gera comportamento semelhante ao ansioso.
4. A lesão bilateral intraestriatal com 6-OHDA em camundongos não gera alterações olfativas.
5. A lesão por 6-OHDA no estriado de camundongos causa diminuição de neurônios dopaminérgicos na substância negra, diminuição de neurônios no estriado e hipocampo.
6. A taxa de mortalidade do modelo apresentado nesse estudo é menor que de estudos anteriores.

7. REFERÊNCIAS

- AHLSSKOG, J.E. & MUENTER, M.D. Frequency of Levodopa-Related Dyskinesias and Motor Fluctuations as Estimated From the Cumulative Literature MD2. **Movement Disorder** **16**: 448–458. 2001.
- AHLSSKOG, J. E.; ANTONINI, A; ALBIN,R. Dopaminergic treatment and nonmotor features of Parkinson disease: The horse lives. **Neurology** **81**: 854-855. 2013.
- ANDRADE, A.C.F. Efeitos da intoxicação por manganês e rotenona sobre o sistema nigroestriatal de ratos wistar: avaliação comportamental e imuno-histoquímica. 2002. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, 2002.
- ANTONY, P.M.A.; DIEDERICH, N.J.; KRUGER, R.; BALLING, R. The hallmarks of Parkinson's disease. **FEBS Journal** **280**: 5981–5993. 2013.
- BANKIEWICZ, K.S.; SANCHEZ-PERNAUTE, R.; OIWA. Y.; KOHUTNICKA, M.; CUMMINS, A.; EBERLING J. Preclinical models of Parkinson's disease. **Curr Protoc Neuroscience** **9**: 41–9.1999.
- BARNETT SA. The Rat: A Study in Behaviour. Chicago: Aldine :288. 1963.
- BERENDSE; H.W.; BOOIJ, J.; FRANCOIS, C.M.; BERGMANS, P.L.; HIJMAN, R.; STOOFF, J.C. Subclinical dopaminergic dysfunction in asymptomatic Parkinson's disease patients' relatives with a decreased sense of smell. **Annals Neurology** **50**:34–41. 2001
- BETARBET, R.; SHERER, T.B.; KIM, J.H.; BAPTISTA, M.; COOKSON, M.R.; GREENAMYRE, J.T. Rotenone models of Parkinson's disease: altered alpha-synuclein expression following chronic inhibition of complex I. **Society for Neuroscience Abstract** 386-316. 2002.
- BLANDINI, F.; ARMENTERO, M-T; MARTIGNONI, E. The 6-hydroxydopamine model: News from the past. **Parkinsonism and Related Disorders** **14**: S124-S129. 2008.
- BLUM, D.; TORCH, A.S.; LAMBENG, N.C.; NISSOU, M-D. D.; BENABID, E.A-L.; SADOUL, A.R.; VERNA, J-N. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA,

dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease . **Progress in Neurobiology** **65**: 135–172. 2001.

BONITO-OLIVA, A.; PIGNATELLI, M.; SPIGOLON, G.; YOSHITAKE, T.; SEILER, S.; LONGO, F.; PICCININ, S.; KEHR, J.; MERCURI, N. B.; NISTICO, R.; FISONE, G. Cognitive Impairment and Dentate Gyrus Synaptic Dysfunction in Experimental Parkinsonism. **Biology of Psychiatry**. 2013.

BRAAK, H.; TREDICI, K.D.; RUB, U.; DE VOS RAI, STEUR ENHJ, BRAAK E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology of Aging** **24**:197–211. 2003.

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

BRANCHI, I.; D'ANDREA, I.; ARMIDA, M.; CASSANO, T.; PÈZZOLA, A.; POTENZA, R.L.; MORGESE, M.G.; POPOLI, P.; ALLEVA, E. Nonmotor Symptoms in Parkinson's Disease: Investigating Early-Phase Onset of Behavioral Dysfunction in the 6-Hydroxydopamine-Lesioned Rat Model. **Journal of Neuroscience Research** **86**: 2050–2061. 2008.

BROWN, L. L.; SCHNEIDER, J. S.; LIDSKY, T. I. Sensory and cognitive functions of the basal ganglia. **Current Opinion in Neurobiology** **7**: 157–163. 1997.

CALABRESI, P.; CASTRIOTO A.; DI FILIPPO, M.; PICCONI, B. New experimental and clinical links between the hippocampus and the dopaminergic system in Parkinson's disease. **Lancet Neurol** **12**: 811–821. 2013.

CAMPOS, F. L.; CARVALHO, M. M.; CRISTOVÃO, N. C.; JE, G.; BALTAZAR, G.; SALGADO, A.; KIM, Y.; SOUSA, N. Rodent models of Parkinson's disease: beyond the motor symptomatology. **Frontiers in Behavioral Neuroscience** **7**: 1-11. 2013.

CANNON, J.R.; TAPIAS, V.M.; NA, H.M.; HONICK, A.S.; DROLET, R.E.; GREENAMYRE, J.T. A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**. **34**: 279–290. 2009.

CAROLA, V.; D'OLIMPIO, F.; BRUNAMONTI, E.; MANGIA, F.; RENZI, P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. **Behavioral Brain Research** **134**: 49-57. 2002.

CARVALHO, M.M.; FILIPA L CAMPOS, F. L.; COIMBRA, B.; PÊGO, J. M.; RODRIGUES, C.; LIMA, R. L.; RODRIGUES, A. J.; SOUSA, N.; SALGADO, A. J. Behavioral characterization of the hydroxidopamine model of Parkinson's disease and pharmacological rescuing of non-motor deficits. **Molecular Neurodegeneration** **8**: 14. 2013.

CHAUDHURI, K.R.; HEALY, D.G.; SCHAPIRA A.H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. **Lancet Neurology** **5**: 235–245. 2006.

CHIUEH, C.; MARKEY, S.P.; BURNS, R.S.; JOHANNESSEN, J.N.; PERT, A.; KOPIN, I.J. Neurochemical and behavioral effects of systemic and intranigral administration of N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6,-tetrahydropyridine in the rat. **European Journal of Pharmacology** **100**:189–94. 1984.

CHOI, W.S.; YOON, S.Y.; OH, T.H.; CHOI, E.J.; O'MALLEY, K.L.; OH, Y.J.; Two distinct mechanisms are involved in 6-hydroxydopamine- and MPP+- induced dopaminergic neuronal cell death: role of caspases, ROS, and JNK. **Journal of Neuroscience Research** **57**: 86-94. 1999.

CHOLERIS, E.; THOMAS, A.W.; KAVALIERS, M.; PRATO, F.S. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience and Biobehav Reviews** **3**: 235-60. 2001.

CICCHETTI, F.; DROUIN-OUELLET, J.; GROSS, R.E. Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? **Trends in Pharmacological Sciences** **30**: 475-483. 2009.

COSTA, C.; SGOBIO, C.; SILIQUINI, S.; TOZZI, A.; TANTUCCI, M.; GHIGLIERI, V.; DI FILIPPO, M.; PENDOLINO, V.; IURE, A.D.; MARTI, M.; MORARI, M; SPILLANTINI, M.G.; LATAGLIATA, E.G.; PASCUCCI, T.; PUGLISI-ALLEGRA, S.; GARDONI, F.; LUCA, D.L.; PICCONI, B.; CALABRESI, P. Mechanisms underlying the impairment of hippocampal long-term potentiation and memory in experimental Parkinson's disease. **Brain**: **135**: 1884–1899. 2012.

DA CUNHA, C., GEVAERD, M. S., VITAL, M. A., MIYOSHI, E., ANDREATINI, R., SILVEIRA, R., TAKAHASHI, R. N., AND CANTERAS, N. S. Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: A model for early Parkinson's disease amnesia. **Behavioral Brain Research** **124**: 9–18. 2001.

DAUER, W. & PRZEDBORSKI, S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. **Neuron** **39**: 889–909. 2003.

DAWSON, T.M.; KO, H.S.; DAWSON, V.L. Genetic animal models of Parkinson's disease. **Neuron** **66**: 646-661. 2010.

DE LEONIBUS, E.; LOPEZ, T.P.S.; OLIVERIO, A.; AMALRIC, M.; MELE, A. Spatial deficits in a mouse model of Parkinson disease. **Psychopharmacology** **194**: 517–525. 2007.

DEUMENS R, BLOKLAND A, PRICKAERTS J. Modelling Parkinson's Disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Experimental Neurology** **175**: 303–17. 2002.

DICKSON, D.W.; FUJISHIRO, H.; DELLEDONNE, A.; MENKE, J.; AHMED, Z.; KLOS, K.J.; JOSEPHS, K.A.; FRIGERIO, R.; BURNETT, M.; PARISI, J.E.; AHLKOG, J.E.. Evidence that incidental Lewy body disease is pre-symptomatic Parkinson's disease. **Acta Neuropathology** **115**:437–444. 2008.

DUBOIS, B.; PILLON, B. Cognitive deficits in Parkinson's disease. **Journal of Neurology** **44**: 2–8. 1997.

EDELMANN, E. & LESSMANN, V. Dopamine regulates intrinsic excitability there by gating successful induction of spike timing-dependent plasticity in CA1 of the hippocampus. **Frontiers in Neuroscience** **7**: 1 – 11. 2013.

ELBA, Z & MOISAN, F. Update in the epidemiology of Parkinson's disease. **Current Opinion Neurology** **4**: 454-460. 2008.

FERRO, M.M.; BELLISSIMO, M.I.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; ANGELLUCCI, M.E.M.; CANTERAS, N.S.; DA CUNHA; C. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: Histological, neurochemical, motor and memory alterations. **Journal of Neuroscience Methods** **148**: 78–87. 2005.

GASBARRI, A.; VERNEY, C.; INNOCENZI, R.; CAMPANA, E.; PACITTI, C. Mesolimbic dopaminergic neurons innervating the hippocampal formation in the rat: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study. **Brain Research** **668**: 71-79. 1994.

GREFFARD, S.; VERNY, M.; BONNET, A-N.; SEILHEAN, D.; HAUWC, J-J.; DUYCKAERTS, C. A stable proportion of Lewy body bearing neurons in the substantia nigra suggests a model in which the Lewy body causes neuronal death. **Neurobiology of Aging** **31**: 99–103. 2010.

HÖGLINGER GU, CARRARD G, MICHEL PP, MEDJA F, LOMBÈS A, RUBERG M, FRIGUET B, HIRSCH EC. Dysfunction of mitochondrial complex I and the proteasome: interactions between two biochemical deficits in a cellular model of Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry** **86**:1297-1307. 2003.

HUANG, Y.; ZHOU, W.; ZHANG, Y. Bright lighting conditions during testing increase thigmotaxis and impair water maze performance in BALB/c mice. **Behavioural Brain Research** **226**: 26– 31. 2012.

IANCU, R.; MOHAPEL, P.; BRUNDIN, P.; PAUL, G. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. **Behavioral Brain Research** **162**: 1–10. 2005.

IRAVANI MM, LEUNG CC, SADEGHIAN M, HADDON CO, ROSE S, JENNER P. The acute and the long-term effects of nigral lipopolysaccharide administration on dopaminergic dysfunction and glial cell activation. **European Journal of Neuroscience** **22**: 317–330. 2005.

JANKOVIC, J. & POEWE, W. Therapies in Parkinson's disease. **Movement disorders** **25**: 433-447. 2012.

JELLINGER, K. A. Neuropathology of Sporadic Parkinson's Disease: Evaluation and Changes of Concepts. **Movement Disorders** **27**: 2012.

JINSMAA, Y.; FLORANG, V.R.; REES, J.N.; MEXAS, L.M.; ECKERT, L.L.; ALLEN, E.M.G.; ANDERSON, D.G.; DOORN, J.A.. Dopamine-derived biological reactive intermediates and protein modifications: Implications for Parkinson's disease. **Chemico-Biological Interactions** **192**: 118–121. 2011.

JUBAULT, T.; MONETTA, L.; STRAFELLA, A.P.; LAFONTAINE, A-L.; MONCHI, O. L-Dopa Medication in Parkinson's Disease Restores Activity in the Motor Cortico- Striatal Loop but Does Not Modify the Cognitive Network. **PLoS ONE 4**: e6154. 2009.

KALARIA, R.N.; MITCHELL, M.J.; HARIK, S.I. Correlation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity with blood-brain barrier monoamine oxidase activity. **Proceedings in National Academic of Science U S A 10**: 3521-3525. 1987.

KIETZER, K.S. Avaliação do metabolismo oxidativo no sistema nigroestriatal de camundongos expostos ao pesticida e inibidor mitocondrial rotenona. 2008. Tese (Doutorado em Neurociências) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, 2008.

LANGSTON, J. L. The Parkinson's Complex: parkinsonism Is Just the Tip of the Iceberg. **Annals of neurology 59**: 591-596. 2006.

LANGSTON, J.W.; BALLARD, P.; TETRUD, J.W.; IRWIN, I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. **Science 4587**: 979-80. 1983.

LANGSTON, J.W.; FORNO, L.S.; TETRUD, J.; REEVES, A.G.; KAPLAN, J.A.; ARLUK, D. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl- 1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. **Annals of neurology 46**: 598–605. 1999.

LAPOINTE, N.; ST-HILAIRE, M.; MARTINOLI, M.G.; BLANCHET, J.; GOULD, P.; ROUILLARD, C.; CICCETTI F. Rotenone induces non-specific central nervous system and systemic toxicity. **FASEB Journal 6**: 717-719. 2004.

LE, W.; SAYANA, P.; JANKOVIC, J. Animal Models of Parkinson's Disease: A Gateway to Therapeutics? **Neurotherapeutics 11**: 92–110. 2014.

LEES, A.J.; HARDY, J.; REVESZ, T. Parkinson's Disease. **Lancet 373**: 2055-2066. 2009.

LONGO; FAUCI; KASPER; HAUSER; JAMESON; LOSCALZO. Medicina interna de Harrison. Editora AMGH 18ª edição. Porto Alegre. 2013.

MAELE-FABRY, G. V.; HOET, P.; VILAIN, F.; LISON, D. Occupational exposure to pesticides and Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis of cohort studies. **Environment International** **46**: 30–43. 2012.

MARTINEZ-MARTIN, P.; SCHAPIRA, A.H.; STOCCHI, F.; SETHI, K.; ODIN, P.; MACPHEE, G. Prevalence of nonmotor symptoms in Parkinson's disease in an international setting: study using nonmotor symptoms questionnaire in 545 patients. **Movement Disorders** **22**:1623–1629. 2007.

MASSANO, J. & BATHIA, K.P. Clinical approach to parkinson's disease: features, diagnosis, and principles of management. **Cold Spring Harb Perspect Med** **jan**:1-15. 2012.

MEREDITH, G.E.; SONSALLA, S.; CHESSELET, M.F. Animal Models of Parkinson's Disease Progression. **Acta Neuropathology** **115**: 385–398. 2008.

MILLER, G.W. Paraquat: the red herring of Parkinson's disease research. **Toxicology Science** **100**: 1–2. 2007.

MIZUNO, Y.; SUZUKI, K.; SONE, N.; SAITOH, T. Inhibition of mitochondrial respiration by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in mouse brain in vivo. **Neuroscience Letter** **91**: 349-53. 1988.

MURA, A. & FELDON, J. Spatial Learning in Rats Is Impaired After Degeneration of the Nigrostriatal Dopaminergic System. **Movement Disorders** **18**: 860–871. 2003.

NISHIMURA, F.; YOSHIKAWA, M.; KANDA, S.; NONAKA, M.; YOKOTA, H.; SHIROI, A.; NAKASE, H.; HIRABAYASHI, H.; OUJI, Y.; BIRUMACHI, J.; ISHIKASA, S.; SAKAKI, T. Potencial use of Embryonic Stem cells for the treatment of mouse Parkinsonian Model: Improved behavior by transplation of in vitro differentiated dopaminerg neurons from embryonic stem cells. **Stem Cells** **21**: 171-180. 2003.

PARK, A.; STACY, M. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. **Journal of Neurology** **256** (Suppl 3):S293–S298. 2009.

PREDIGER, R.D.S.; AGUIAR, A.S. JR.; ROJAS-MAYORQUIN, A.E.; FIGUEIREDO, C.P.; MATHEUS, F.C.; GINESTET, L.; CHEVARIN, C.; DEL BEL, E.; MONGEAU, R.; HAMON, M.; LANFUMEY, L.; RAISMAN-VOZARI, R. Single Intranasal Administration of

1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6- Tetrahydropyridine in C57BL/6 Mice Models Early Preclinical Phase of Parkinson's Disease. **Neurotoxicity Research** **17**:114–129. 2010.

PRZEBORSKI, S.; JACKSON-LEWIS, V.; NAINI, A.B.; JAKOWEC, M.; PETZINGER, G.; MILLER, R.; AKRAM, M. The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. **Journal of Neurochemistry** **76**: 1265-1274. 2001.

RAMPERSAUD, N.; HARKAVYI, A.; GIORDANO, G.; LEVER, R.; WHITTON, J.; WHITTON, P.S. Exendin-4 reverses biochemical and behavioral deficits in a pre-motor rodent model of Parkinson's disease with combined noradrenergic and serotonergic lesions. **Neuropeptides** **46**: 183–193. 2012.

SANTIAGO, R.M.; BARBIEIRO, J.; LIMA, M.M.S.; DOMBROWSKI, P.A.; ANDREATINI, R.; VITAL, M.A.B.F. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** **34**: 1104–1114. 2010.

SANTUCCI, A. C.; CORTES, C.; BETTICA, A.; CORTES, F. Chronic ethanol consumption in rats produces residual increases in anxiety 4 months after withdrawal. **Behavioural Brain Research** **188**: 24–3. 2008.

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

SHERER, T.B.; BETARBET, R.; TESTA, C. M.; SEO, B. B.; RICHARDSON, J.N. R.; KIM, J. H.; MILLER, G. W.; AKEMI, T. Y.; MATSUNO-YAGI, J.; GREENAMYR, T. Mechanism of Toxicity in Rotenone Models of Parkinson's Disease. **The Journal of Neuroscience** **23**:10756-10764. 2003.

SHIMIZU, K. *ET AL.* Carrier-mediated processes in blood–brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. **Brain Research** **906**:135–142. 2001.

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

SIMPKIN, N. & JANKOVIC, J. Neuroprotection in Parkinson Disease. **Archives of International Medicine** **163**:1650-1654. 2003.

STOCCHI, F & OLANOW, C.W. Neuroprotection in Parkinson's Disease: Clinical Trials. **Annals of neurology** **53**: S87–S99. 2003.

TADAIESKY, M.T.; DOMBROWSKI, P.A.; FIGUEIREDO, C.P; CARGNIN-FERREIRA, E.; DA CUNHA, C.; TAKAHASHI, R.N. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of parkinson's disease. **Neuroscience** **156**: 830–840. 2008.

TANNER, C.M.; KAMEL, F.; ROSS, G.W.; HOPPIN, J.A.; GOLDMAN, S.M.; KORELL, M.; MARRAS, C.; BHUDHIKANOK, G.S.; KASTEN, M.; CHADE, A.R.; COMYNS, K.; RICHARDS, M.B.; MENG, C.; PRIESTLEY, M.; FERNANDEZ, H.H.; CAMBI, F.; UMBACH, D.M.; BLAIR, A.; SANDLER, D.P.; LANGSTON, J.W. Rotenone, Paraquat, and Parkinson's Disease. **Environmental Health Perspectives** **19**: 866-872. 2011.

TERRY, A.V. Methods of Behavioral Analysis in Neuroscience. Buccafusco JJ Editor. Boca Raton. 2009.

TERZIOGLU, M. & GALTER, D. Parkinson's disease: genetic versus toxin-induced rodent models. **FEBS Journal** **275**: 1384–1391. 2008.

TILLERSON, J.L; CAUDLE, W.M.; PARENT, J.M.; GONG, C; SCHALLERT, T.; MILLER, G.W. Olfactory discrimination deficits in mice lacking the dopamine transporter or the D2 dopamine receptor. **Behavioural Brain Research** **172**: 97–105. 2006.

TWELVES D, PERKINS KS, COUNSELL C. Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease. **Movement Disorders** **18**: 19-31. 2003.

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

WEINTRAUB, D.; COMELLA, C. L.; HORN, S. Parkinson's disease - Part 1: Pathophysiology, symptoms, burden, diagnosis, and assessment. **The American Journal of Managed Care** **14**: 40–48. 2008.

WIRDEFELDT, K.; ADAMI, H.-O.; COLE, P.; TRICHOPOULOS, D.; MANDE, J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. **European Journal of Epidemiology** **26**:S1–S58. 2011.

ZHAO, B. Natural Antioxidants Protect Neurons in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. **Neurochemistry Research** **34**:630–638. 2009.

ZHOU, C.; HUANG, Y.; PRZEDBORSKI, S. Oxidative Stress in Parkinson's Disease: A Mechanism of Pathogenic and Therapeutic Significance. **Anna N Y Academy Science** **1147**: 93–104. 2008.