

**CAMILA GUIMARÃES MOREIRA**

**PADRONIZAÇÃO DO MODELO ANIMAL DE PARKINSONISMO INDUZIDO  
POR INFUSÃO DE ROTENONA NA SUBSTÂNCIA NEGRA PARS COMPACTA**

CURITIBA

2008

**CAMILA GUIMARÃES MOREIRA**

**PADRONIZAÇÃO DO MODELO ANIMAL DE PARKINSONISMO INDUZIDO  
POR INFUSÃO DE ROTENONA NA SUBSTÂNCIA NEGRA PARS COMPACTA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia, ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Aparecida B. F. Vital

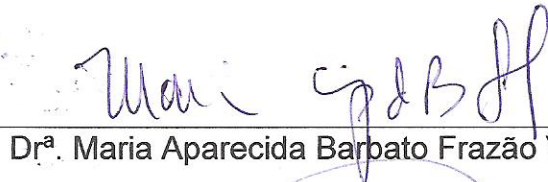
CURITIBA

2008

1  
2 **ATA DO JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

3 Ao quarto dia do mês de julho do ano de dois mil e oito, às quatorze horas, Anfiteatro n° 07  
4 do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão  
5 Examinadora da Dissertação de Mestrado de autoria da Pós-Graduanda em Farmacologia,  
6 **CAMILA GUIMARÃES MOREIRA**, intitulada: “PADRONIZAÇÃO DO MODELO  
7 ANIMAL DE PARKINSONISMO INDUZIDO POR INFUSÃO DE ROTENONA NA  
8 SUBSTÂNCIA NEGRA”, sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida Barbatto Frazão  
9 Vital e composta pelos professores: Dr. Marcelo de Meira Santos Lima (Dept<sup>o</sup>  
10 Farmacologia-UNIVILLE); Dr<sup>a</sup> Alexandra Acco (Dept<sup>o</sup> Farmacologia-UFPR); Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>  
11 Miriam Elizabeth Mendes Angelucci (Suplente-Dept<sup>o</sup> Farmacologia-UFPR); Prof. Dr.  
12 Silvio Marques Zanata (Suplente-Dept<sup>o</sup> Patologia Básica-UFPR). A Banca Examinadora  
13 iniciou os trabalhos, a candidata teve quarenta e cinco minutos para expor oralmente seu  
14 trabalho, sendo em seguida argüida durante quinze minutos por cada um dos membros da  
15 Banca, e tendo trinta minutos para responder a cada uma das argüições. No final a  
16 Comissão Examinadora emitiu o seguinte parecer: Aprovada. De acordo  
17 com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a Pós-  
18 Graduanda foi aprovada. Para a publicação o trabalho deverá sofrer as modificações  
19 sugeridas, que serão conferidas por sua orientadora. Nada mais havendo a tratar, a  
20 Presidente deu por encerrada a sessão, da qual foi lavrada a presente ata, que será assinada  
21 pela Presidente e pelos demais Membros da Banca Examinadora, em Curitiba, 04 de julho  
22 de 2008.

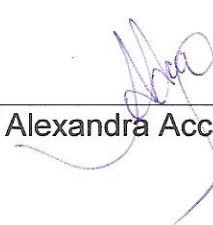
23  
24



Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida Barbatto Frazão Vital (Presidente-Orientadora-UFPR)



Dr. Marcelo de Meira Santos Lima (Dept<sup>o</sup> Farmacologia-UNIVILLE)



Dr<sup>a</sup> Alexandra Acco (Dept<sup>o</sup> Farmacologia- UFPR)



## PARECER

A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado “PADRONIZAÇÃO DO MODELO ANIMAL DE PARKINSONISMO INDUZIDO POR INFUSÃO DE RETENONA NA SUBSTÂNCIA NEGRA”, de autoria da pós-graduanda: CAMILA GUIMARÃES MOREIRA, sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida Barbato Frazão Vital e composta pelos professores: Dr. Marcelo de Meira Santos Lima (Dept<sup>o</sup> Farmacologia-UNIVILLE); Dr<sup>a</sup> Alexandra Acco (Dept<sup>o</sup> Farmacologia-UFPR); Dr<sup>a</sup> Miriam Elizabeth Mendes Angelucci (Suplente-Dept<sup>o</sup> Farmacologia-UFPR); Dr. Silvio Marques Zanata (Suplente-Dept<sup>o</sup> Patologia Básica-UFPR). De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a Pós-Graduanda foi aprovada. Para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pela sua orientadora. Em Curitiba, 04 de julho de 2008.

Dr<sup>a</sup> Maria Aparecida Barbato Frazão Vital – (Presidente-Orientadora-UFPR)

Dr. Marcelo de Meira Santos Lima (Dept<sup>o</sup> Farmacologia-UNIVILLE)

Dr<sup>a</sup> Alexandra Acco (Dept<sup>o</sup> Farmacologia – UFPR)

**Dedico este trabalho à Ketnem Reifur**  
***(in memoriam)***

## **AGRADECIMENTOS**

**Aos meus pais, Gilberto e Marcia, pelo amor, carinho, dedicação e incentivo constantes e às minhas irmãs, Priscilla e Paula, pelo apoio, companheirismo e carinho; vocês são meu alicerce;**

**À prof Dra. Maria A.B.F. Vital, não só pela sua orientação e dedicação ao trabalho, mas principalmente pela oportunidade, paciência, incentivo e sincera amizade;**

**Às minhas queridas amigas Pamela Sabioni e Deborah Ariza, por terem facilitado a realização deste estudo, pela amizade, incentivo, disponibilidade e por estarem presentes em minha vida;**

**Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Farmacologia da UFPR especialmente à Alessandra, Sílvia, Nair e Linda e a toda equipe de professores, pela responsabilidade, dedicação e empenho com os quais conduzem seus trabalhos;**

**Aos meus amigos do departamento Yara, Diego, Patricia, Janaína, Izonete, Daniel, Mariza, Angela, Edmar, Plínio, Michele, Estér, Lucélia, Evellyn, Amanda, Adriana, Alliete, Laryssa, Arthur, Carol e Evelise por estarem sempre ao meu lado, pela ajuda, momentos de carinho e apoio.**

**Aos meus amigos Patricia Palmer, Thais, Rafael, Charles, Rafaela, Léia, Juliana, Marina, Michel, Ana Carolina, Ricardo, Déia, Lorena, Patricia, Iris, Ana Paula e Tony por todos os momentos de vivência, alegrias, tristezas, respeito e amor.**

**A todos que de alguma maneira tiveram alguma participação neste trabalho.**

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS _____	vii
LISTA DE FIGURAS _____	ix
RESUMO _____	xi
ABSTRACT _____	xii
1. INTRODUÇÃO _____	13
1.1 Definição e tipos de parkinsonismo _____	13
1.2 Doença de Parkinson _____	14
1.2.1 Histórico _____	14
1.2.2 Características clínicas _____	15
1.2.3 Etiologia _____	16
1.2.4 Características neuroquímicas e neuropatológicas _____	18
1.2.5 Patogênese _____	20
<i>Enovelamento e agregação de proteínas</i> _____	21
<i>Disfunção mitocondrial e estresse oxidativo</i> _____	22
<i>Inflamação</i> _____	23
<i>Excitotoxicidade</i> _____	24
1.2.6 Modelos animais _____	25
<i>6-hidroxidopamina</i> _____	27
<i>MPTP</i> _____	28
<i>Rotenona</i> _____	29
2. OBJETIVOS _____	34
2.1 Objetivo geral _____	34
2.2 Objetivos específicos _____	34
3. MATERIAL E MÉTODOS _____	35
3.1 Animais _____	35
3.2 Drogas _____	35
3.3 Delineamento experimental geral _____	35
3.4 Cirurgia estereotáxica _____	36
3.5 Testes comportamentais _____	37

3.5.1 Campo aberto _____	37
3.5.2 Esquiva ativa de duas vias _____	38
3.6 Determinação de níveis estriatais e nigrais de neurotransmissores	38
3.7 Análise estatística _____	39
4. RESULTADOS _____	40
4.1 Avaliação comportamental _____	40
4.1.1 Parâmetros motores avaliados nos animais após infusão de rotenona _____	40
4.1.2 Avaliação cognitiva de ratos tratados com rotenona intranigral _____	45
4.2 Avaliação neuroquímica _____	48
4.2.1 Avaliação dos níveis estriatais de neurotransmissores _____	48
4.2.2 Avaliação dos níveis nigrais de neurotransmissores _____	53
5. DISCUSSÃO _____	59
6. CONCLUSÕES _____	66
7. REFERÊNCIAS _____	67



## LISTA DE ABREVIATURAS

- 5-HIAA** - Ácido 5-Hidroxiindolacético
- 5-HT** - Serotonina (5-hidroxitriptamina)
- 6-OHDA** - 6-hidroxidopamina
- ATV** - Área Tegmental Ventral
- BHE** - Barreira hematoencefálica
- CEAA** - Comitê de Ética em Experimentação Animal
- CL** - Corpúsculos de Lewy
- COMT** - Catecol-O-metiltransferase
- COX** - Ciclooxygenase
- DA** - Dopamina
- DAT** - Transportador de dopamina
- DMSO** - Dimetilsulfóxido
- DNA** - Ácido desoxirribonucléico
- DOPAC** - Ácido 3,4-diidroxifenilacético
- DP** - Doença de Parkinson
- DE** - Detecção eletroquímica
- EDTA** - Ácido etilenodiamino tetra-acético
- FPM** - Feixe prosencefálico medial
- GSH** - Glutathiona
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - Peróxido de hidrogênio
- HPLC** - Cromatografia líquida de alta eficiência
- HVA** - Ácido homovanílico
- IL** - Interleucina
- L-DOPA (Levodopa)** - L-3,4-diidroxifenilalanina
- MAO** - Monoamino oxidase
- MPP<sup>+</sup>** - 1-metil-4-fenilpiridinium
- MPPP** - 1-metil-4-fenil-4-propionoxipiperidina
- MPTP** - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
- NA** - Noradrenalina
- NMDA** - Receptores N-metil-D-aspartato

**NOS** - Óxido Nítrico Sintase

**NO** - Óxido Nítrico

**iNOS** - Óxido Nítrico Sintase induzida

**Paraquat** - N,N'-dimetil-4,4'-bipiridinium

**PEG** - Polietilenoglicol

**PGE<sub>2</sub>** - Prostaglandina

**RNS** - Espécies reativas de nitrogênio

**ROS** - Espécies reativas de oxigênio

**s.c.** - Subcutânea

**SNpc** - Substantia nigra pars compacta

**TNF- $\alpha$**  - Fator de Necrose tumoral alfa

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> Inclusão citoplasmática (corpo de <i>Lewy</i> )	20
<b>FIGURA 2</b> Vias envolvidas com a excitotoxicidade	25
<b>FIGURA 3</b> Estrutura química da Rotenona	29
<b>FIGURA 4</b> Mecanismo de ação da rotenona	30
<b>FIGURA 5</b> Comparação entre as freqüências de locomoção de grupos tratados com Rotenona	41
<b>FIGURA 6</b> Comparação entre as freqüências de levantar de grupos tratados com Rotenona	42
<b>FIGURA 7</b> Comparação entre o tempo de imobilidade de grupos tratados com Rotenona	43
<b>FIGURA 8</b> Comparação entre os tempos de latência de grupos tratados com Rotenona	44
<b>FIGURA 9</b> Efeitos da administração intranigral de rotenona no número de esquivas dos animais	45
<b>FIGURA 10</b> Efeitos no número de tentativas sem respostas dos animais	46
<b>FIGURA 11</b> Efeitos no número de escapes dos animais	47
<b>FIGURA 12</b> Efeitos nos níveis estriatais de DA	48

<b>FIGURA 13</b> Efeitos nos níveis estriatais de DOPAC	49
<b>FIGURA 14</b> Efeitos nos níveis estriatais de HVA	50
<b>FIGURA 15</b> Efeitos nos níveis estriatais de NA	51
<b>FIGURA 16</b> Efeitos nos níveis estriatais de 5-HT	52
<b>FIGURA 17</b> Efeitos nos níveis estriatais de 5-HIAA	52
<b>FIGURA 18</b> Efeitos da injeção intranigral de rotenona nos níveis nigrais de DA	53
<b>FIGURA 19</b> Efeitos nos níveis nigrais de DOPAC	54
<b>FIGURA 20</b> Efeitos nos níveis nigrais de HVA	55
<b>FIGURA 21</b> Efeitos nos níveis nigrais de NA	56
<b>FIGURA 22</b> Efeitos nos níveis nigrais de 5-HT	57
<b>FIGURA 23</b> Efeitos nos níveis nigrais de 5-HIAA	58

## RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum, caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo ventral e inclusões citoplasmáticas conhecidas como Corpúsculos de *Lewy* (CL), afetando 5% da população com idade acima de 85 anos. É uma doença multifatorial com uma complexa etiologia, incluindo fatores de risco genéticos, ambientais e envelhecimento. A patogênese não é totalmente compreendida, mas acredita-se envolver estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, processos neuroinflamatórios, metabolismo da dopamina e apoptose. Estudos recentes têm relacionado a exposição a agentes ambientais, incluindo pesticidas, com um aumento do risco de desenvolvimento da DP. A Rotenona é um potente inibidor do complexo-I mitocondrial e parece reproduzir características comportamentais da DP em ratos. Destrói seletivamente neurônios dopaminérgicos, causando deficiência de dopamina na região do estriado, a qual leva à deficiência de funções motoras. Foi examinado o comportamento de ratos Wistar machos após a administração bilateral intranigral de rotenona (12µg/µl PEG). Os parâmetros frequência de locomoção, frequência de levantar, latência e tempo de imobilidade dos animais foram avaliados através do teste do campo aberto e os resultados mostraram que os animais lesados por rotenona 24 horas após a cirurgia estereotáxica, apresentaram diminuição da locomoção e levantar e aumento dos tempos. Na esQUIVA ativa os animais do grupo rotenona demonstraram redução do aprendizado de hábito e memória procedural apenas 30 dias após a lesão. A dose de rotenona escolhida e a via de administração, nesse trabalho, causaram redução de 61% dos níveis de DA no estriado dos animais 30 dias após a lesão provocada pela cirurgia estereotáxica, o mesmo não ocorrendo na substância negra (SNpc). Portanto, nossos dados sugerem que o modelo animal da rotenona apresentou muitas características que mimetizam a DP; entre elas, a hipolocomoção, prejuízo de aprendizado/memória e diminuição dos níveis estriatais de dopamina intimamente relacionados à doença.

## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder, characterized by the loss of midbrain dopamine neurons and Lewy body inclusions affecting 5% of the population by the age of 85. It is a multi-factorial disease with a complex etiology, including genetic risk factors, environmental exposure and aging. The pathogenesis is not fully understood, but involves oxidative stress, mitochondrial dysfunction, neuroinflammatory processes, metabolism of dopamine and apoptosis. Yet recent epidemiological studies have linked exposure to environmental agents, including pesticides, as factors that increase risk of developing the disease. Rotenone is a pesticide that produces a rodent model of PD because such chemical is a potent specific inhibitor of mitochondrial complex- I, which reproduce the behavioral features of PD in rats. It destroys dopaminergic neurons selectively, causing deficiency of dopamine in striatum which leads to impaired motor functions. We examined the behavior of the male Wistar rats after the bilateral intranigral administration of rotenone (12µg/µl PEG). The locomotion analysis was made by the open field test. The results showed that after 24 hours the animals affected by rotenone that were submitted to the stereotaxic surgery had a decreased on their locomotion capabilities. The animals demonstrated a deficiency in habit learning and procedural memory only 30 days after the lesion. The same did not happen in previous tests through the active avoidance. The rotenone dose on this research was able to inflict a decrease of 61% the dopamine striatal levels on the animal only 30 days after the lesion caused by the stereotaxic surgery. These results did not occur with the SNpc. Therefore our data suggest that the rotenone animal model presented many characteristics that mimic the DP. Among them is the hipolocomotion, deficit in learning and memory and decrease in the striatal levels of neurotransmitters intimately related with the disease.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Definição e tipos de parkinsonismo

Doença de Parkinson (DP) e parkinsonismo não são sinônimos. Parkinsonismo é um termo genérico que designa uma série de doenças com causas diferentes e que têm em comum a presença de sinais e sintomas parkinsonianos (aqueles sintomas encontrados na DP), ou seja, possuem características clínicas e patológicas similares.

Os sintomas parkinsonianos não são limitados à DP; muitos outros distúrbios afetam o sistema dopaminérgico nigroestriatal e possuem características clínicas e patológicas similares. O parkinsonismo pode surgir de várias diferentes enfermidades, embora a DP seja mais comum, atingindo cerca de 80% dos casos (DRECHSEL and PATEL, 2008).

Segundo AHLKOG (2001), a DP deve ser diferenciada dos demais tipos de manifestações, visto que qualquer processo que danifique as estruturas dos gânglios da base e suas conexões, ou prejudique suas funções, pode ser capaz de induzir a diferentes tipos de parkinsonismo. Todas apresentam iguais anormalidades bioquímicas e neuroquímicas, principalmente em relação à depleção do conteúdo de dopamina no mesencéfalo (PRZEDBORSKI, 2005).

A doença de Parkinson também é conhecida como parkinsonismo primário ou idiopático. As outras formas são: parkinsonismo secundário e parkinsonismo atípico (DAUER and PRZEDBORSKI, 2003; FAHN and SULZER, 2004).

No Parkinsonismo secundário uma causa específica pode ser identificada. Os principais tipos são o parkinsonismo pós-encefalítico, medicamentoso, arteriosclerótico e tóxico. Já no atípico, estão incluídos: atrofia de múltiplos sistemas, onde várias partes do sistema nervoso podem estar afetadas (degeneração estriatonigral, atrofia olivo-ponto-cerebelar e a Síndrome de Shy-Drager); Paralisia supranuclear progressiva, Degeneração corticobasal, Demência com corpos de Lewy, entre outras (DAUER and PRZEDBORSKI, 2003; FAHN and SULZER, 2004).

## 1.2 Doença de Parkinson

### 1.2.1) Histórico

Em sua clássica monografia, em 1817, “*Essay on the Shaking Palsy*”, James Parkinson descreveu a essência das características clínicas da segunda doença neurodegenerativa mais comum relacionada com idade, depois da doença de Alzheimer. Embora mais de um século tenha passado antes da descoberta da característica patológica principal (perda de neurônios da substância negra parte compacta - SNpc), o ritmo de descobrimento acelerou apenas com a descoberta da dopamina em encéfalos de mamíferos por Arvid Carlsson em 1957. Os neurônios da SNpc foram então associados com a via dopaminérgica nigroestriatal e essa linha de pesquisa culminou em mais duas descobertas. Primeiro, foi verificado que a perda de neurônios da SNpc provocava a deficiência de dopamina estriatal, a qual é responsável pela maioria dos sinais e sintomas da doença. Segundo, a reposição de dopamina estriatal através da administração oral do precursor da dopamina, levodopa (L-3,4-diidroxifenilalanina) aliviou a maioria desses sintomas. Embora o descobrimento da levodopa tenha revolucionado o tratamento da DP, logo foi descoberto que após vários anos de tratamento muitos pacientes desenvolveram movimentos involuntários, conhecidos como “discinesias”, que são difíceis de controlar e atrapalham significativamente a qualidade de vida. Em 1997, foram descobertas mutações no gene da  $\alpha$ -sinucleína que causa uma forma de DP familiar. Em apenas cinco anos após essa descrição, mais três genes que causam a DP foram identificados. Esses genes relacionados com a DP agem através de vias moleculares comuns e essa descoberta pode levar à criação de um novo modelo animal para estudo da patogênese. Isso também é importante para determinar quais das proteínas patogênicas participam nos eventos moleculares que conduzem à neurodegeneração em modelos animais existentes, a fim de avaliar quais desses modelos mimetizam os eventos patogênicos da doença em humanos (DAUER and PRZEDBORSKI, 2003).



### 1.2.2) Características clínicas

DP é uma doença progressiva com uma média de início aos 55 anos, com um aumento de incidência com a idade (DAUER and PRZEDBORSKI, 2003), de 1-2% aos 50 anos a aproximadamente 5% até a idade de 85 anos (DRECHSEL and PATEL, 2008). Em cerca de 95% dos casos de DP, não há uma aparente ligação genética (DP idiopática), sendo que no restante dos casos, a doença é herdada; esses sujeitos possuem os sinais e sintomas mais graves e antes da introdução da levodopa, a taxa de mortalidade desses era três vezes maior que em sujeitos que possuíam a doença relacionada à idade (DAUER and PRZEDBORSKI, 2003).

A doença é clinicamente caracterizada por alguns sinais principais que incluem rigidez, tremor em repouso, bradicinesia, instabilidade postural (DRECHSEL and PATEL, 2008), “freezing” (DAUER and PRZEDBORSKI, 2003) e distúrbios do sono (GERLACH and RIEDERER, 1996; DAUER and PRZEDBORSKI, 2003; KLOCKGETHER, 2004; FAHN and SULZER, 2004; CHAUDHUR *et al.*, 2006). O tremor na DP ocorre em repouso, mas pode diminuir com movimentos voluntários e acredita-se não atrapalhar as atividades do dia-a-dia. A rigidez se refere ao aumento de resistência (rigidez) aos movimentos passivos dos membros dos pacientes. Bradicinesia (diminuição dos movimentos), hipocinesia (redução da amplitude dos movimentos) e acinesia (ausência de movimentos inconscientes normais, como o movimento dos braços ao caminhar), manifestam-se como uma variedade de sinais, incluindo falta de expressão facial (hipomímia), diminuição do volume da voz (hipofonia), hipersalivação, diminuição do tamanho (micrografia) e velocidade da escrita, e diminuição do comprimento do passo durante a caminhada. A bradicinesia pode prejudicar significativamente a qualidade de vida porque interfere em atividades do cotidiano como se vestir ou comer. Os pacientes com DP podem desenvolver uma típica postura inclinada e podem perder os reflexos posturais normais, levando a quedas e, às vezes, ao confinamento numa cadeira de rodas. *Freezing*, a inabilidade em começar um movimento voluntário como caminhar é um comum sintoma de parkinsonismo. Sintomas não-motores como o prejuízo cognitivo, distúrbios de sono, disfunção

olfativa e depressão (DAUER and PRZEDBORSKI, 2003) são também comuns e resultantes de danos de múltiplas áreas no cérebro (DRECHSEL and PATEL, 2008). Também se pode observar anormalidades de afeto - humor deprimido (podem ficar sentados quietos sem coragem de participar de atividades, passivos ou reservados) e da cognição (alguns pacientes desenvolvem, mesmo na fase tardia, outros não (ROSS *et al.*, 2007)). A demência é significativamente freqüente, especialmente em pacientes mais velhos (DAUER and PRZEDBORSKI, 2003).

A variação de características fenotípicas para cada paciente pode variar substancialmente. Alguns pacientes possuem tremor assimétrico em repouso e boa resposta a L-DOPA. Outros pacientes apresentam grande rigidez e bradicinesia, com relativa baixa resposta a L-DOPA. Há também diferenças na extensão da instabilidade postural e autonômica (ROSS and SMITH, 2007).

### 1.2.3) Etiologia

A DP é uma doença multifatorial com uma etiologia muito complexa incluindo fatores de risco genéticos, exposição ambiental e envelhecimento (ROSS and SMITH, 2007).

A causa da DP idiopática é desconhecida, com incerteza sobre o papel das toxinas do meio ambiente e fatores genéticos. A hipótese de toxinas ambientais foi dominante por muito tempo, especialmente por causa do exemplo da pós-encefalite e a descoberta da indução do parkinsonismo pelo MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina). No entanto, a descoberta de genes envolvidos com a DP tem renovado o interesse na susceptibilidade de fatores hereditários (DI MONTE, 2003). Porém, o envelhecimento ainda é o principal fator de risco para seu desenvolvimento.

A hipótese ambiental se baseia na neurodegeneração relacionada à DP resultante da exposição a uma neurotoxina dopaminérgica. Teoricamente, a neurodegeneração progressiva da DP pode ser produzida por uma exposição crônica à neurotoxina ou por uma exposição limitada iniciando uma cascata de eventos deletérios (DI MONTE, 2003). Estudos epidemiológicos têm regularmente relacionado fatores ambientais com o aumento do risco de incidência da DP em

locais rurais, os quais possuem exposição a substâncias químicas da agricultura. Além disso, um relativo número de agentes tóxicos tem sido associado com o desenvolvimento da doença, incluindo metais, solventes e monóxido de carbono. Portanto, a exposição a pesticidas deve receber uma atenção especial por causa de sua aplicação no dia-a-dia. Recentemente, DRECHSEL and PATEL (2008) demonstraram uma consistente correlação entre exposição a pesticidas e DP com uma grande associação resultante do contato a longo prazo. Em um estudo com 100.000 pessoas, ROSS and SMITH (2007) sugeriram que a exposição individual a pesticidas provocou o aumento de 70% na incidência da DP, porém, ainda não se sabe qual agente(s) químico(s) possui (em) essa propriedade, ressaltando a idéia que toxinas ambientais contribuem para causar a doença.

Os agentes químicos usados na agricultura como rotenona, paraquat, dieldrin e maneb têm recebido uma grande atenção nos dias atuais. Eles contribuem para a morte de neurônios dopaminérgicos da SNpc em parte pela indução do estresse oxidativo, mas há similaridades e diferenças entre eles que poderão ser úteis para o entendimento dos possíveis mecanismos de neurodegeneração relacionados à DP (DRECHSEL and PATEL, 2008).

Outra possibilidade, que não pode ser considerada um fator ambiental ou genético, é de que uma toxina endógena possa ser responsável pela neurodegeneração na DP. Alterações no metabolismo normal podem criar substâncias tóxicas por causa de uma exposição ambiental ou diferenças de vias metabólicas herdadas. Uma fonte de toxinas endógenas pode advir do próprio metabolismo da dopamina, com formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Juntamente com a hipótese de toxinas endógenas, vem a observação de pacientes que possuem um polimorfismo específico no gene que codifica a enzima citocromo P450, o qual pode ser um grande risco de desenvolvimento da doença em pacientes jovens. Além do mais, isoquinolina, um derivado tóxico de neurônios dopaminérgicos, foi encontrado no encéfalo de pacientes com a doença (DI MONTE, 2003).

#### 1.2.4) Características neuroquímicas e neuropatológicas

Embora a DP seja uma doença multifatorial, patologicamente ela é caracterizada pela degeneração progressiva de neurônios dopaminérgicos na SNpc, que se projeta para o estriado e desempenha um papel essencial na função motora (DRECHSEL and PATEL, 2008). Além disso, se observa a presença de inclusões citoplasmáticas protéicas intraneurais, conhecidas como “Corpúsculos de Lewy” (CL) (QUIK *et al.*, 2007) em neurônios dopaminérgicos remanescentes (DRECHSEL and PATEL, 2008).

Os corpos celulares dos neurônios nigroestriatais estão na SNpc e se projetam primariamente para o putâmen. A perda desses neurônios, que normalmente contêm grandes quantidades de neuromelanina, produz a clássica despigmentação da SNpc. Os neurônios dopaminérgicos mesolímbicos (corpos celulares que residem adjacentes à SNpc na Área tegmental ventral - ATV) são muito menos afetados na DP. Conseqüentemente, existe uma menor depleção de dopamina no caudado, o principal local de projeção desses neurônios (DAUER and PRZEDBORSKI, 2003).

O início dos sintomas clínicos (bradicinesia, rigidez e tremor) ocorre quando a dopamina estriatal declina em aproximadamente 70% ou mais e quando há perda de 50% ou mais de neurônios dopaminérgicos nigrais (QUIK *et al.*, 2007).

Estudos neuropatológicos da DP sugerem possíveis indícios da patogênese da doença. Primeiro, a perda de neurônios dopaminérgicos associada à DP tem uma característica topográfica, diferente do padrão visto no envelhecimento normal. Na DP, a perda de células é concentrada nas porções ventrolateral e caudal da SNpc, ao passo que durante o envelhecimento normal, a região dorsomedial da SNpc é afetada. Segundo, o grau da perda nas terminações do estriado parece ser mais pronunciado do que a magnitude da perda de neurônios dopaminérgicos da SNpc, sugerindo que os neurônios terminais do estriado são os alvos primários dos processos degenerativos e que a morte neuronal na DP pode ser resultado de um processo de morte retrógrada. O conceito de morte anterógrada inclui as observações que, em macacos tratados com MPTP, a destruição de terminais estriatais precede a destruição de corpos celulares da

SNpc; e que em ratos tratados com MPTP, a proteção de terminais estriatais preveniu a perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc (DAUER and PRZEDBORSKI, 2003).

O córtex pré-frontal é um local primário de projeção para ATV de neurônios dopaminérgicos, provavelmente essa diferença pode ser muito importante no entendimento da relativa resistência de neurônios ATV na degeneração relacionada à DP (DAUER and PRZEDBORSKI, 2003).

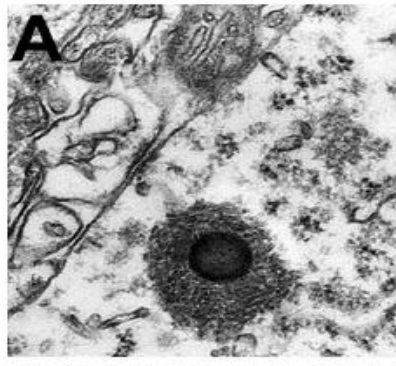
Embora as evidências experimentais indicarem que a DP é caracterizada somente pela perda de neurônios dopaminérgicos, a neurodegeneração se estende além desses neurônios dopaminérgicos, ou seja, muitos sistemas estão envolvidos (QUIK *et al.*, 2007). BRAAK e colaboradores (2002) identificaram CL em numerosas regiões não-dopaminérgicas do encéfalo, incluindo o *Locus coeruleus*, núcleo da rafe, tálamo, amígdala, núcleo pedunculopontino, núcleo olfatório e córtex cerebral (QUIK *et al.*, 2007).

A degeneração de estruturas do hipocampo e do *input* cortical colinérgico contribui para a elevada taxa de demência que acompanha a DP, particularmente em pacientes mais idosos. No entanto, as correlações clínicas das lesões de vias serotoninérgicas e noradrenérgicas não são claramente caracterizadas como as lesões dos sistemas dopaminérgicos (ex: muitos pacientes desenvolvem depressão meses ou anos antes do início de sintomas motores da DP, que pode ser devido ao envolvimento de vias não-dopaminérgicas) (DAUER and PRZEDBORSKI, 2003).

O papel dos CL na morte neuronal ainda é controverso, assim como sua correlação com a doença de Alzheimer e com a DP (DAUER and PRZEDBORSKI, 2003).

Os CL são inclusões citoplasmáticas eosinofílicas com proteínas agregadas compostos por numerosas proteínas, incluindo  $\alpha$ -sinucleína, parkina, ubiquitina e neurofilamentos; encontrados em todas as regiões afetadas do cérebro. Possui diâmetro em torno de 15 $\mu$ m e tem uma estrutura organizada, um núcleo denso com hialina circundado por um halo claro (ver Fig. 1). Estudos de microscopia

eletrônica revelam um núcleo granulovesicular circundado por um anel (DAUER and PRZEDBORSKI, 2003).



**Fig. 1. Figura de uma inclusão citoplasmática (Corpúsculo de Lewy), retirada de HALLIDAY *et al.*, 2004.**

#### 1.2.5) Patogênese

Seja qual for o insulto inicial que provoca neurodegeneração, estudos em modelos animais de DP e as funções dos genes implicados nas formas herdadas da doença sugerem duas hipóteses principais da patogênese da doença. A primeira hipótese defende que o enovelamento anormal e agregação de proteínas são causadores da morte de neurônios dopaminérgicos da SNpc, enquanto a outra proposta sugere que a disfunção mitocondrial e o conseqüente estresse oxidativo, incluindo espécies tóxicas oxidadas da dopamina podem levar ao dano neuronal (DAUER and PRZEDBORSKI, 2003).

Os fatores citados anteriormente não são mutuamente exclusivos e servem para ajudar na elucidação da seqüência na qual eles agem e saber qual dos pontos da interação entre essas vias são a chave para o fim de neurônios dopaminérgicos da SNpc (DAUER and PRZEDBORSKI, 2003).

### ***Enovelamento e agregação de proteínas***

A deposição anormal de proteínas no tecido encefálico é uma característica de várias doenças neurodegenerativas associadas à idade. Embora a composição e localização (intra ou extracelular) de proteínas agregadas diferirem de doença para doença, uma característica comum sugere que a deposição de proteínas, *per se*, ou algum evento relacionado, são tóxicos para os neurônios (LAYFIELD *et al.*, 2003).

A agregação ou enovelamento de proteínas solúveis podem ser neurotóxicos através de uma série de mecanismos. A agregação de proteínas pode causar danos, talvez pela deformação da célula ou pela interferência do tráfego intracelular em neurônios. As inclusões protéicas podem também seqüestrar proteínas que são importantes para a sobrevivência celular. Provavelmente deve existir uma correlação entre formação de inclusões celulares e neurodegeneração. No entanto, há um controverso corpo de evidências, particularmente vindo de estudos da doença de Huntington, que sugerem que não há correlação entre formação de inclusões intracelulares e morte celular. As inclusões citoplasmáticas protéicas podem não ser resultantes apenas de proteínas enoveladas precipitadas, mas, na verdade, de um processo ativo que consiste no seqüestro de proteínas solúveis enoveladas no ambiente celular. A formação de inclusões pode ser uma medida de defesa para ajudar na remoção de proteínas solúveis enoveladas. A habilidade de chaperonas em proteger contra a neurodegeneração provocada por proteínas relacionadas à doença (incluindo  $\alpha$ -sinucleína que medeia a perda de neurônios dopaminérgicos) comprova que proteínas enoveladas solúveis são neurotóxicas (LAYFIELD *et al.*, 2003).

Em pacientes com DP genética, acredita-se que a mutação em algumas proteínas seja a causa da doença; diretamente pela indução anormal e possibilidade de conformações protéicas tóxicas ou indiretamente pela interferência com processos que normalmente reconhecem ou processos de enovelamento de proteínas. Na DP, os CL contêm  $\alpha$ -sinucleína oxidada modificada, a qual, *in vitro*, exhibe uma grande propensão em agregar  $\alpha$ -sinucleínas

não modificadas. Nesse sentido, vários herbicidas e pesticidas induzem o enovelamento ou agregação de  $\alpha$ -sinucleína (LAYFIELD *et al.*, 2003).

Células respondem a proteínas enoveladas através da indução de chaperonas, mas se não são corretamente desdobradas, elas são alvos da degradação proteossômica pela poliubiquitinação. Com a idade, a habilidade das células para induzir uma variedade de chaperonas é danificada, bem como a atividade do proteossoma. A disfunção proteossômica e o conseqüente acúmulo de proteínas enoveladas podem provocar um círculo vicioso com excesso de proteínas enoveladas além da inibição de atividade proteossômica instantânea (MEREDITH *et al.*, 2004).

### ***Disfunção mitocondrial e estresse oxidativo***

A hipótese do estresse oxidativo postula que o desequilíbrio no balanço de ROS e as espécies reativas de nitrogênio (RNS) contribui para o dano oxidativo de macromoléculas celulares, levando à morte celular. A premissa dessa hipótese é baseada em alguns estudos que demonstram o potencial para a geração de peróxido de hidrogênio e outras ROS durante o metabolismo oxidativo da dopamina (DRECHSEL and PATEL, 2008).

Outros fatores contribuem para o aumento do estresse oxidativo: aumento de níveis basais de atividade aeróbica; auto-oxidação da dopamina, seus precursores e metabólitos, para formas quinonas e semi-quinonas capazes de reagir com grupamentos sulfidríla de proteínas, incluindo glutathiona (GSH); e aumento de níveis de ferro na SNpc contribuindo para a reação de Fenton, levando à redução do peróxido de hidrogênio para produzir o radical hidroxila (mais reativo). Análises *post mortem* de encéfalos de pacientes com DP confirmam o alto nível de estresse oxidativo na SNpc, caracterizado pelo aumento na concentração de ferro, diminuição dos níveis de GSH, aumento da lipoperoxidação e a oxidação de DNA e proteínas (DRECHSEL and PATEL, 2008).

Como a mitocôndria possui o papel primordial na produção de ROS celulares, sua disfunção é um aspecto intrínseco da hipótese do estresse



oxidativo, ou seja, são mecanismos interligados. A diminuição da atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial foi observada não só na SNpc de pacientes com a DP, mas também em plaquetas e linhagens de células *cybrid* (linhas de células arquitetadas para conter derivados mitocondriais vindos das plaquetas dos pacientes). Essa inibição pode levar à geração de ROS, que podem ter como alvo a cadeia transportadora de elétrons, levando à nova inibição com subsequente produção de ROS e dano mitocondrial. Inibição da mitocôndria pode romper estoques vesiculares de dopamina, levando ao seu aumento citosólico e sua auto-oxidação. Neurônios dopaminérgicos da SNpc parecem ser vulneráveis à inibição do complexo I (DRECHSEL and PATEL, 2008; NEHRU *et al.*, 2008).

A possibilidade de que um defeito na fosforilação oxidativa desempenhe um papel na patogênese da DP foi reforçada com o descobrimento que o MPTP bloqueia o transporte elétrico mitocondrial através da inibição do complexo I. Estudos subsequentes identificaram anormalidades na atividade deste complexo na DP (LENAZ *et al.*, 2006). Estudos *in vitro* mostram como um defeito nesse complexo pode expor células ao estresse oxidativo e à inibição da cadeia de transporte de elétrons. A redução da fosforilação oxidativa identificada na DP não está confinada ao cérebro; redução na atividade do complexo I foi também descoberto nas plaquetas de pacientes com DP (LENAZ *et al.*, 2006).

### **Inflamação**

Diversas evidências dão suporte à existência de mecanismos relacionados à inflamação encefálica (neuroinflamação) em pacientes com DP. A etapa inicial dessa resposta ocorre pela ativação da população das células da glia, mais especificamente microglia (GAO *et al.*, 2003). Essa ativação promove a liberação de substâncias pró-inflamatórias e neurotoxinas, que acabam por potencializar a lesão (GAO *et al.*, 2002). As substâncias responsáveis por essa cadeia de eventos incluem citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 (IL-1), ROS, eicosanóides e aminoácidos excitatórios.

No entanto, muitos aspectos da inflamação são essenciais para o combate de uma doença. Diferentes populações de células da glia auxiliam na remoção de

restos celulares, destruição de patógenos e liberação de fatores neurotróficos. Ou seja, a ativação da microglia pode fazer com que seja desempenhado um papel neuroprotetor através da promoção da sobrevivência neuronal, recuperação de neurônios lesados, eliminação de substâncias tóxicas e reparação tecidual (LIMA *et al.*, 2006).

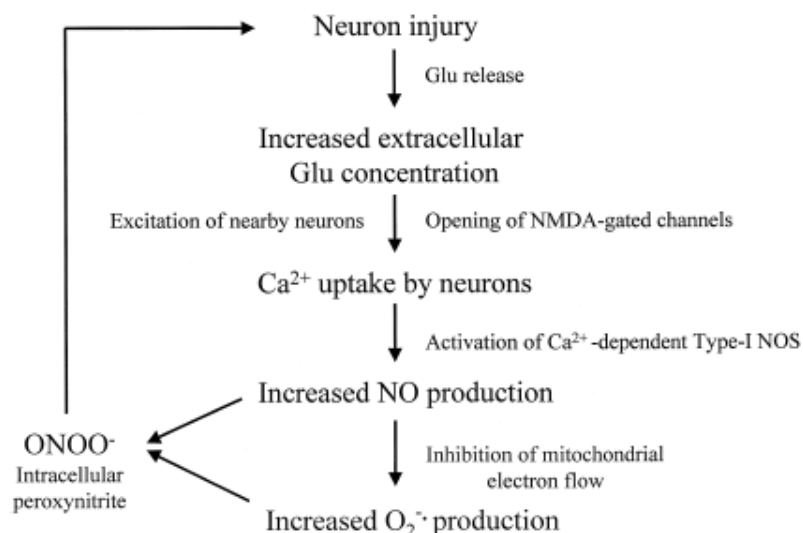
A DP, assim como seu modelo animal induzido por MPTP, possui como característica a indução do aumento da expressão da enzima ciclooxigenase tipo 2 (COX-2), que por sua vez catalisa a produção de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (TEISMANN *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2006).

A inflamação também pode contribuir para a produção de ROS e tem sido implicada na patogênese da DP. A ativação da microglia em resposta a uma injúria é associada com uma *upregulation* da óxido nítrico sintase indutível (iNOS), resultando no aumento da produção de óxido nítrico (NO). Nesta linha, a SNpc de pacientes com PD mostram um aumento da expressão da iNOS (DRECHSEL and PATEL, 2008).

### **Excitotoxicidade**

As teorias de excitotoxicidade se voltam para o subtipo de receptor de glutamato, o N-metil-D-aspartato (NMDA), porque o canal iônico ligado a NMDA possui alto nível de condutância para cálcio e sódio; e elevados níveis de cálcio intracelular são conhecidos por desencadear eventos levando à morte celular (WU and JOHNSON, 2007).

Estudos demonstram que a estimulação de receptores NMDA e o estresse oxidativo advindo da disfunção mitocondrial podem atuar sinergicamente (Fig. 2) para aumentar o risco da DP (WU and JOHNSON, 2007).



**Fig. 2. Vias envolvidas com a excitotoxicidade na DP, retirado de TORREILLES *et al.*, 1999.**

Há intensos debates acerca do processo primário da doença, ou seja, quais são os eventos primários ou secundários no mecanismo patogênico. Modelos genéticos e os baseados em toxinas têm um importante papel no entendimento da função do estresse oxidativo na DP. Modelos de toxinas como a 6-OHDA (6-hidroxi-dopamina), MPTP e paraquat são baseados na sua habilidade de gerar ROS em neurônios. Modelos de pesticidas como a rotenona, maneb e dieldrin confirmam o papel dos agentes ambientais e estresse oxidativo na doença. Com o intuito de se compreender a patogênese da DP, é crucial o conhecimento sobre os mecanismos pelo qual os agentes ambientais e neurotoxinas seletivas dopaminérgicas causam o estresse oxidativo (DRECHSEL and PATEL, 2008).

#### 1.2.6) Modelos animais

Como há diferenças do sistema motor entre roedores e humanos, o valor de um comportamento fenotípico particular depende de uma relação estabelecida entre a função dopaminérgica estriatal e uma aparente similaridade com um sintoma da DP. Especificamente, comportamentos que podem resultar de uma deficiência de dopamina estriatal, podem progredir com a reposição de dopamina. A formação de CL é uma característica desejável, mas não essencial; são características da DP, mas não são específicos. São encontrados na maioria dos

casos clínicos da doença, mas não são vistos em DP relacionada à parkina (DAUER and PRZEDBORSKI, 2003).

Esses modelos são baseados na premissa de que neurônios dopaminérgicos têm uma cascata que leva à morte neuronal que pode ser ativada por uma extensão de insultos. Essa cascata de eventos pode identificar novas moléculas de relevância potencial para a patogênese ou tratamento da DP. O modelo mais notável é o MPTP, parcialmente por causa da surpreendente similaridade entre a DP e intoxicações individuais com MPTP. Finalmente, modelos “sintomáticos” ou “fisiopatológicos” mimetizam os sintomas motores da DP e são usados para desenvolver terapias sintomáticas ou estudar questões relacionadas às vias. Somente primatas não-humanos mimetizam exatamente os sintomas motores da DP e, por isso, estes constituem os melhores sujeitos experimentais (DAUER and PRZEDBORSKI, 2003).

Modelos animais são importantes ferramentas para o entendimento do processo da doença. Para a DP, diferentes modelos são produzidos, e esses podem ser classificados em três grupos de acordo com critérios farmacológicos, comportamentais e bioquímicos (ALAM and SCHMIDT, 2002).

- Validade preditiva: como exemplo tem-se o modelo do haloperidol ou de antagonistas dopaminérgicos. É considerado o nível mais baixo de validade e tem similaridade como isomorfismo farmacológico da DP. A geração de sinais e sintomas é, no entanto, totalmente não-relacionada à DP idiopática (ALAM and SCHMIDT, 2002).

- Validade de face: esses modelos avaliam a similaridade do fenômeno entre o modelo e doença. O MPTP e 6-OHDA são encontrados nesse grupo e fornecem uma similaridade com a sintomatologia, mas não com mecanismos (ALAM and SCHMIDT, 2002).

- Validade de constructo: maior critério de validade em modelos animais. Ele deve cumprir os critérios da validade de face e preditiva e também compartilhar os mesmos mecanismos que a doença possui. A inibição do complexo I mitocondrial induzida por rotenona que leva à ocorrência de CL e à degeneração seletiva de

neurônios dopaminérgicos pode representar um modelo com validade de constructo (ALAM and SCHMIDT, 2002).

### ***Modelos baseados em toxinas:***

Entre as neurotoxinas usadas para induzir neurodegeneração dopaminérgica, 6-OHDA, MPTP e mais recentemente, rotenona e paraquat têm recebido mais atenção. Todas essas neurotoxinas provocam a formação de ROS. A rotenona e MPTP são similares em sua habilidade de inibir potencialmente o complexo I, mas mesmo assim mostram diferenças significantes. Somente o MPTP é ligado claramente à forma de parkinsonismo humano e por isso é o modelo mais estudado (DAUER and PRZEDBORSKI, 2003).

#### a) 6-OHDA (6-hidroxidopamina):

Foi o primeiro modelo animal de DP associado com a morte de neurônios dopaminérgicos da SNpc, introduzido há mais de 30 anos. Embora a 6-OHDA induza uma enfermidade diferente da DP, ainda é extensivamente usada (DAUER and PRZEDBORSKI, 2003). É um análogo hidroxilado da dopamina (DA) que usa o mesmo sistema de transporte da DA e noradrenalina para produzir degeneração específica de neurônios catecolaminérgicos (DRECHSEL and PATEL, 2008). A toxicidade é relativamente seletiva para os transportadores dopaminérgicos e noradrenérgicos. Dentro dos neurônios, a 6-OHDA se acumula no citosol, gerando ROS e inativando macromoléculas biológicas pela geração de quinonas que atacam grupos nucleofílicos (DAUER and PRZEDBORSKI, 2003).

Como não pode atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), a 6-OHDA deve ser administrada localmente através de injeção estereotáxica diretamente na substância negra ou no feixe prosencefálico medial (FPM), o qual leva projeções ascendentes dopaminérgicas e serotoninérgicas ao encéfalo ou no estriado. Após a injeção na SN ou no MFB, os neurônios dopaminérgicos começam a se degenerar dentro de 24hs e morrem sem morfologia apoptótica. Quando injetado no estriado, a 6-OHDA produz uma degeneração retrógrada de neurônios nigroestriatais que dura cerca de uma a três semanas. No entanto, nenhuma dessas manipulações

leva à formação dos CL. Essa toxina produz um comportamento rotatório nos animais, onde a magnitude depende do grau da lesão nigroestriatal. A lesão unilateral pode ser analisada quantitativamente; assim, a notável vantagem deste modelo está na habilidade de avaliar as propriedades de drogas anti-parkinsonianas (testes de eficácia (DRECHSEL and PATEL, 2008)). Igualmente à DA, essa toxina pode ser metabolizada pela monoaminoxidase (MAO) para gerar ROS. Embora os radicais quinonas produzidos durante a oxidação da 6-OHDA sejam capazes de produzir dano celular através da reação nucleofílica (proteínas e DNA), eles não parecem ser os responsáveis primários pelo efeito tóxico (DRECHSEL and PATEL, 2008).

b) MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina):

Em 1982, usuários jovens de drogas desenvolveram uma síndrome parkinsoniana progressiva rápida após o uso intravenoso de uma preparação de MPPP (1-metil-4-fenil-4-propionoxipiperidina), um derivado da heroína. O MPTP foi o contaminante neurotóxico responsável, produzido durante a produção ilícita de MPPP num laboratório caseiro. Em humanos e macacos, o MPTP produz uma síndrome parkinsoniana irreversível e severa caracterizada por todas as características da DP, incluindo tremor, rigidez, diminuição de movimentos, instabilidade postural, entre outras, e a resposta benéfica da Levodopa e o desenvolvimento de complicações motoras a longo prazo com essa terapia são virtualmente idênticos aos vistos em pacientes com a DP. Também similar à DP, a susceptibilidade ao MPTP aumenta com a idade em ratos e macacos (DAUER and PRZEDBORSKI, 2003).

Como na DP, macacos e ratos tratados com baixas doses de MPTP exibem degeneração preferencialmente no putâmen comparada aos neurônios dopaminérgicos da região do caudado. Os danos nas vias dopaminérgicas pelo MPTP seguem um padrão similar ao visto na DP, incluindo grande perda de células na SNpc. Na ATV, a perda de neurônios se dá preferencialmente nos segmentos ventral e lateral da SNpc. Uma das possibilidades que torna a SN mais

susceptível ao processo de morte induzido por neurotoxinas é a presença da neuromelanina (DAUER and PRZEDBORSKI, 2003).

A neuromelanina atua como um depósito de compostos tóxicos e pode contribuir para a neurodegeneração na DP. Em macacos tratados com MPTP ocorreu aumento da formação de ROS e uma interação com ferro, seletivamente nos neurônios pigmentados. Além disso, uma variedade de moléculas interage com neuromelanina, incluindo pesticidas, MPTP e MPP<sup>+</sup> (DAUER and PRZEDBORSKI, 2003).

O modelo do MPTP em macacos não inclui duas características básicas existentes na DP. Primeiro, neurônios do *locus coeruleus* não são reduzidos. Segundo, houve aparecimento de formações de inclusões intraneuronais que se assemelham com os CL, mas não houve confirmação de que seriam formações clássicas em animais e em humanos intoxicados com MPTP (DAUER and PRZEDBORSKI, 2003).

O modelo do MPTP em macacos é o melhor padrão para se avaliar novas estratégias e agentes para o tratamento dos sintomas da DP. Por causa de considerações práticas, como o alto custo, os macacos não têm sido usados para explorar mecanismos moleculares da neurodegeneração dopaminérgica; o modelo MPTP em ratos é tipicamente utilizado para esses estudos (DAUER and PRZEDBORSKI, 2003).

c) Rotenona:

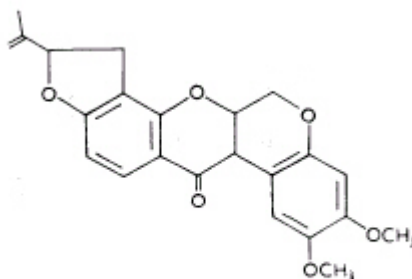
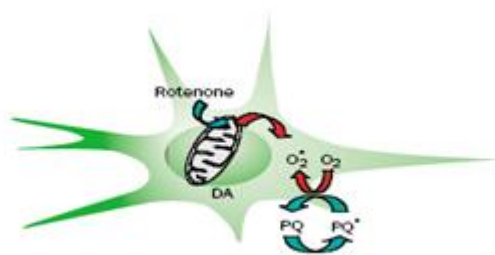


Fig. 3. Estrutura química da Rotenona, retirado de BOVÉ *et al.*, 2005.

É um inseticida de ocorrência natural isolado de espécies de plantas do gênero *Derris* e *Lonchorcarpus* (TADA-OIKAWA *et al.*, 2003). É o mais potente membro dos rotenóides, uma família de compostos citotóxicos naturais (NEHRU *et al.*, 2008); foi amplamente utilizada como inseticida e veneno para peixes. É altamente lipofílico e tem acesso rápido a todos os órgãos (PERIER *et al.*, 2003).

Sua toxicidade é relevante porque é muito utilizada como herbicida em jardins privados e em várias preparações para uso em humanos e animais contra piolhos (NEHRU *et al.*, 2008).

A citotoxicidade da rotenona é atribuída pela ligação irreversível e inativação do complexo NADH desidrogenase (geralmente conhecido como complexo I) da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, conforme Fig. 4. Também executa sua toxicidade através da indução de apoptose (a mitocôndria parece desempenhar um papel essencial neste processo). Em adição, as ROS também participam nas vias de morte celular nesse modelo (TADA-OIKAWA *et al.*, 2003).



**Fig. 4. Estresse oxidativo em neurônios dopaminérgicos. Rotenona e Paraquat (PQ) geram ânions superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) através do bloqueio do fluxo de elétrons mitocondriais. Extraído de DI MONTE (2003).**

Além da formação de ROS e outros radicais livres, há também interferência com os níveis intracelulares de Ca<sup>+2</sup> e rompimento da síntese de ATP (WU and JOHNSON, 2007).

Muitas evidências sugerem que a toxicidade da rotenona em neurônios dopaminérgicos se dá através do estresse oxidativo. Além disso, essa toxina também pode potencializar a excitotoxicidade mediada pelo glutamato (WU and JOHNSON, 2007). KRESS and REYNOLDS (2005), mostraram que a associação



de rotenona e glutamato causou morte em cultura de neurônios dopaminérgicos. Todavia, nem a toxina, nem o NMDA foram tóxicos isoladamente na mesma concentração.

A rotenona também provoca despolimerização de microtúbulos, causando ruptura de vesículas transportadoras, as quais liberam dopamina dentro ou próximo de neurônios dopaminérgicos, oxidando e provocando danos aos neurônios (NEHRU *et al.*, 2008).

TADA-OIKAWA e colaboradores (2003) demonstraram que a rotenona induziu a geração de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), seguida por uma significativa mudança no potencial de membrana mitocondrial. Eles sugeriram que a formação de peroxinitrito derivada da geração de  $H_2O_2$  através da inibição do complexo NADH desidrogenase e/ou ativação de NAD(P)H oxidase, causaria rompimento da membrana mitocondrial na apoptose induzida por rotenona.

Além disso, SHERER e colaboradores (2003 - a) mostraram que a ativação microglial induzida pela rotenona após exposição crônica por 4 semanas era evidente com mínima astrocitose, característica também observada em pacientes com DP.

A rotenona possui grande toxicidade seletiva em neurônios dopaminérgicos *in vitro* e *in vivo* (GREENAMYRE *et al.*, 2003); e a inibição do complexo I induzida por ela, leva à formação de CL (BETARBET *et al.*, 2000; PERIER *et al.*, 2003) . Atravessa a barreira hematoencefálica bem como membranas celulares, independente de transportadores (GREENAMYRE *et al.*, 2003) por causa de sua estrutura lipofílica (ALAM and SCHMIDT, 2002).

Além disso, ALAM and SCHMIDT (2002) demonstraram que a rotenona depletou dopamina e reduziu a concentração do ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) e do ácido homovanílico (HVA), no entanto, níveis de noradrenalina e serotonina não foram afetados, mostrando sua toxicidade seletiva para neurônios dopaminérgicos.

Outra característica importante é que a administração periférica de rotenona, juntamente com doses baixas de L-DOPA associada a um inibidor seletivo da decarboxilase, revertem os sinais de parkinsonismo induzidos por

rotenona (ALAM and SCHMIDT, 2004). Animais intoxicados por ela desenvolvem postura anormal e diminuição de movimento, mas é desconhecido qual desses sinais melhorou com a administração de Levodopa (PERIER *et al.*, 2003).

Os estudos em animais se dão principalmente pela via intraperitoneal; há outros que introduzem a rotenona estereotaxicamente ou por via intrajugular ou ainda intramuscular para produzir os sinais de parkinsonismo. Esses dados levam a uma questão controversa de relevância dessas vias para pacientes com a doença, ou seja, uma discussão sobre a correlação entre essas vias e a exposição ambiental (ALAM and SCHMIDT, 2002).

Segundo ALAM and SCHMIDT (2002) a exposição crônica por injeção intraperitoneal pode ser comparada à exposição crônica ambiental e, por conseguinte, à exposição da vida real.

GREENAMYRE e colaboradores (2003) ao usarem um protocolo de infusão sistêmica e crônica em ratos, encontraram, após um período de dias e semanas, degeneração seletiva de neurônios dopaminérgicos da SN; esta degeneração iniciou-se nos terminais nervosos e progrediu retrogradamente aos corpos celulares. Também ocorreu o aumento de dano protéico oxidativo em regiões dopaminérgicas no encéfalo, similar ao dano oxidativo encontrado na doença. Comportamentalmente, estes animais desenvolveram sinais de parkinsonismo, incluindo bradicinesia e rigidez. Ratos tratados com esta toxina também desenvolveram postura flexionada e *freezing* (sinais relacionados à DP avançada).

Enquanto esses estudos demonstram forte sugestão quanto à rotenona ser o melhor modelo animal, a alta mortalidade observada nos animais seguida da administração sistêmica dessa substância restringe seu uso (SARAVANAN *et al.*, 2005). Levando em conta o fato que altas doses de rotenona necessárias para provocar dano nigroestriatal após administração sistêmica também afetam a fosforilação oxidativa em órgãos periféricos vitais, causando mortalidade, GREENAMYRE e colaboradores (2005) investigaram e observaram que a infusão intranigral de baixas doses de rotenona poderia causar lesão neuronal.

Mais recentemente, ROJO e colaboradores (2007) analisaram a relação entre alguns pesticidas e o fator de risco da DP e questionaram o fato do uso de

vias não naturais de exposição a esses pesticidas, como injeção intraperitoneal e intravenosa, as quais devem passar por defesas corporais. Com isso, descreveram um novo modelo animal baseado na inoculação intranasal crônica de neurotoxinas, uma nova ferramenta para descobrir o potencial de perigo de toxinas ambientais como fatores de risco para a DP, mais coerente com a exposição ambiental. No entanto, nesse estudo, não foi observada alteração motora em ratos e camundongos tratados com rotenona, bem como depleção de dopamina estriatal.

Diante desses dados, percebe-se que esse modelo animal da rotenona pode representar um modelo que causa processos neurotóxicos similares à DP e que precisa ser mais bem estudado. Esta doença é caracterizada por uma redução de 15-30% da atividade do complexo mitocondrial. Dado que a deficiência do complexo I persiste ao longo da vida do ser humano (contribuindo para a doença), a rotenona pode mimetizar o processo de desenvolvimento em humanos e, então, representar um modelo único com validade de constructo (como dito anteriormente, o maior critério de validação para modelos animais) (ALAM and SCHMIDT, 2002). Deste modo, neste trabalho foi avaliado o efeito comportamental e neuroquímico da administração intranigral de rotenona em ratos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo geral do estudo foi de padronizar o modelo animal da rotenona quando infundida bilateralmente na SNpc de ratos Wistar.

### **2.2 Objetivos específicos**

- 1) Avaliar o comportamento motor dos animais em diferentes tempos no teste de campo aberto após infusão de rotenona;
- 2) Determinar se a administração intranigral de rotenona poderia influenciar o aprendizado e memória dos animais;
- 3) Determinar os níveis de neurotransmissores e metabólitos na substância negra e estriado após infusão de rotenona;
- 4) Investigar se a lesão é seletiva para neurônios dopaminérgicos;

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Os animais utilizados foram ratos Wistar machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Animais que pesavam entre 280-320g no início dos experimentos foram usados. Todos foram mantidos em sala com temperatura controlada (aproximadamente 22°C), com ciclo claro-escuro de 12h (7:00-19:00hs). Água e comida foram fornecidas à vontade aos animais durante todos os experimentos. Todos os procedimentos utilizados estão de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEAA) do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (protocolo nº 0145).

#### **3.2 Drogas**

- Rotenona (12µg/µl e 24µg/µl Sigma Chemical Co., EUA) em 1µl de Polietilenoglicol (PEG) 400;
- Lidocaína;
- Equitesin (45,7ml de água destilada; 4,25g de hidrato de cloral; 2,13g de sulfato de magnésio; 11,5ml de álcool; 0,972g de tiopental e 42,8ml de propilenoglicol).

#### **3.3 Delineamento experimental geral**

Todos os animais foram deixados na sala de aclimação do departamento de Farmacologia por pelo menos 7 dias antes dos experimentos. Foram separados 5 (cinco) animais por caixa e ao atingirem o peso entre 280-320g, sofreram a cirurgia estereotáxica.

Na primeira etapa os animais foram divididos em grupos diferentes: Controle, Sham, Rotenona 12µg/µl e Rotenona 24µg/µl. Os animais do grupo controle não passaram pela cirurgia estereotáxica, os do grupo Sham, passaram pela cirurgia, porém não houve infusão de nenhuma substância; e os animais dos grupos Rotenona passaram pelo mesmo procedimento, a única diferença foi que a

velocidade de infusão para o primeiro grupo foi de 0,33 $\mu$ l/min e no segundo, a velocidade foi de 0,5 $\mu$ l/min.

Vinte e quatro horas após a cirurgia, os animais passaram pelo teste do campo aberto. O mesmo teste ocorreu nos dias 10, 20 e 30 após a cirurgia estereotáxica.

A segunda etapa consistiu no teste da Esquiva ativa de 2 (duas) vias para avaliação de aprendizado e memória dos animais nos grupos: Controle, Sham, Veículo e Rotenona 12 $\mu$ g/ $\mu$ l. O treino dos animais ocorreu 7 dias após a cirurgia estereotáxica para termos certeza que o comportamento motor dos animais não fosse interferir nos resultados desta etapa. As sessões-teste aconteceram nos dias 8, 15 e 30 após a cirurgia estereotáxica, ou seja, a primeira sessão-teste foi feita 24 horas após o treino dos animais.

Por último, os animais foram avaliados com relação à concentração de alguns neurotransmissores e metabólitos nigroestriatais após infusão da toxina na SNpc, seguidos da dissecação da substância negra e estriado nas 24 horas e 30 dias após a cirurgia estereotáxica. Os compostos avaliados foram: Noradrenalina (NA), Serotonina (5-HT), Ácido 5-Hidroxiindolacético (5-HIAA), DA, DOPAC e HVA.

### **3.4 Cirurgia estereotáxica**

Os animais submetidos à cirurgia estereotáxica (grupos Rotenona, Polietilenoglicol - PEG e Sham) foram inicialmente anestesiados com Equitesin (0,3mg/kg – i.p.). Após a anestesia, administrou-se o anestésico local (lidocaína 0,2ml com 2% de vasoconstritor – subcutânea - s.c.) na derme que recobre o crânio dos ratos. Após este procedimento, foram submetidos à cirurgia estereotáxica (estereotáxico – David Kopf, modelo 957 L) e receberam infusão bilateral intranigral de Rotenona ou PEG. Foram utilizadas as seguintes coordenadas: antero-posterior (AP): -5,0 mm a partir do bregma; médio-lateral (ML): +/- 2,1 mm a partir da linha média; dorso-ventral (DV): -8,0 mm a partir da calota craniana, adaptado de Paxinos e Watson (1986). Os volumes injetados foram de 1 $\mu$ l ou 2 $\mu$ l (fluxo de 0,33 $\mu$ l/min ou 0,5 $\mu$ l/min, respectivamente). Os ratos do grupo Sham seguiram o mesmo procedimento, mas não receberam infusão de

rotenona ou PEG, e os animais do grupo controle não foram operados, apenas manipulados.

A microinfusão de toxina ou veículo foi realizada com o auxílio de uma agulha (30 gauge) conectada a um tubo de polietileno adaptado a uma microseringa de 10 $\mu$ l (Hamilton, EUA) que, por sua vez, foi encaixada a uma bomba de infusão (Harvard Apparatus, EUA). Após o término da microinfusão, a agulha foi mantida por mais 2 minutos no local para evitar refluxo da rotenona ou do PEG. Em seguida, o escalpo foi suturado e os animais foram retirados do estereotáxico. A temperatura da sala foi controlada até que os animais se recuperassem da anestesia, voltando, assim, para suas caixas.

Os animais operados apresentaram uma boa recuperação pós-cirúrgica, sem observação de mortalidade estatisticamente significativa em nenhum dos grupos.

### **3.5 Testes comportamentais**

#### **3.5.1 Campo Aberto**

Este teste foi empregado para determinar alterações motoras em todos os grupos de animais, 24 horas, 10, 20 e 30 dias após a cirurgia estereotáxica. O aparato consiste numa arena retangular (40x50x63cm), apresentando o chão e três paredes de madeira e uma parede de vidro (50x52cm). O chão do aparato era dividido por linhas pretas em 20 pequenos quadrados (10x10cm).

Os animais foram gentilmente colocados em um canto do campo aberto e avaliados durante 5min. Essa avaliação incluiu a frequência de locomoção (penetrar em uma divisão com as quatro patas), de levantar (apoio somente nas patas traseiras, com o tronco perpendicular ao chão da arena), duração de imobilidade (sem atividade motora, paralisado completamente) e tempo de latência (tempo que o animal leva para iniciar o movimento após ter sido colocado no quadrado do canto). Cada animal foi avaliado individualmente e o aparelho foi limpo entre um animal e outro com solução de etanol 5% (BROADHURST, 1960).

Uma câmera de vídeo foi fixada no topo da caixa e todos os movimentos e comportamentos foram gravados e o filme foi observado posteriormente.

### 3.5.2 Esquiva ativa de duas vias

Sete dias após a cirurgia, os animais foram treinados na tarefa de esquiva ativa de duas vias em uma caixa automatizada (GEMINI Avoidance System) com dois compartimentos claros. O piso da caixa é formado por barras de cobre com espessura de 1mm e espaçadas de 10 em 10 mm. A comunicação entre os dois compartimentos é feita por uma porta mantida sempre aberta. Na sessão de treino, os animais foram colocados na caixa de condicionamento e, após um período de habituação de 3 minutos, seguiram 31 pareamentos de campainha (1,5 khz, 60 db, 5s) com um choque nas patas (0,4 mA com varredura de 60 hz) por 5 s ou até que o animal cruzasse para o outro lado da caixa. O tempo entre cada campainha varia randomicamente, entre 10-50s. As sessões de teste (8, 15 e 30dias) foram idênticas à primeira (treino), exceto pelo tempo de habituação que foi de 2 minutos. Em todas as sessões, o número de esquivas (cruzamento enquanto soa a campainha, antes do choque) e o tempo de escape (desde o momento em que se inicia o choque) foram armazenados pelo equipamento de forma automática (DA CUNHA *et al.*, 2001; PERRY *et al.*, 2004).

### **3.6 Determinação de níveis estriatais e nigrais de neurotransmissores**

Os níveis de alguns neurotransmissores foram determinados por HPLC-ED (Cromatografia líquida de alta eficiência com detector eletroquímico).

As amostras de SN e estriado de cada animal foram suspendidas com ácido perclórico 0,1 M contendo 0,02% de metabissulfito de sódio como anti-oxidante. Este material foi fragmentado com sonda de ultra-som e centrifugado a 10.000 x g por 20 minutos a 4° C.

Do sobrenadante, 20 µL foram injetados em uma estação de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) composta por bomba LC-20AT (Shimadzu Corporation, Japão), um detector eletroquímico (ESA Coulochem III Electrochemical Detector) equipado com uma célula-guarda (ESA 5020) com um



potencial de 350 mV e uma célula analítica com potencias de oxidação de 100 mv para o primeiro eletrodo e 450 mV para o segundo eletrodo. As separações foram realizadas em uma coluna de fase reversa Fusion RP C-18 (Phenomenex, EUA), dimensões 150 x 4,6 mm, partículas de 4 $\mu$ m, em temperatura de 25°C equipada com uma pré-coluna com dimensões de 4 x 3,0 mm (Security Guard Cartridges Fusion-RP). Os cromatogramas de neurotransmissores e metabólitos foram integrados e analisados pelo software LC Solutions (Shimadzu).

A fase móvel utilizada para a análise era constituída de: ácido cítrico 20 g; ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) 40 mg; ácido octanossulfônico 200 mg; 900 mL água de miliQ; metanol 10 %; pH ajustado em 4,0; fluxo de 1,0 mL/min.

As áreas dos picos foram comparadas às áreas dos padrões externos dos mesmos neurotransmissores e metabólitos para sua identificação e quantificação. Os resultados foram expressos como ng das aminas analisadas por massa de tecido fresco (g).

### **3.7 Análise estatística**

Os parâmetros avaliados no teste do campo aberto e esquiva ativa de duas vias e os dados oriundos do HPLC (para detecção de níveis de neurotransmissores) foram analisados através do teste ANOVA de 2 vias seguido do *post hoc* de Newman-Keuls. O nível de significância considerado foi  $P < 0,05$ . Os valores foram representados como média  $\pm$  E.P.M.

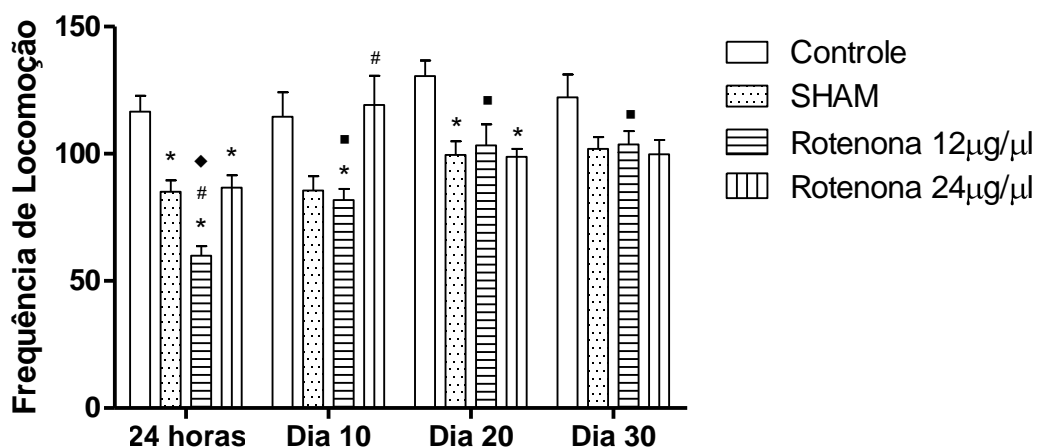
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Avaliação comportamental

#### 4.1.1 Parâmetros motores avaliados nos animais após infusão intranigral de rotenona 12 $\mu$ g/ $\mu$ l e 24 $\mu$ g/ $\mu$ l

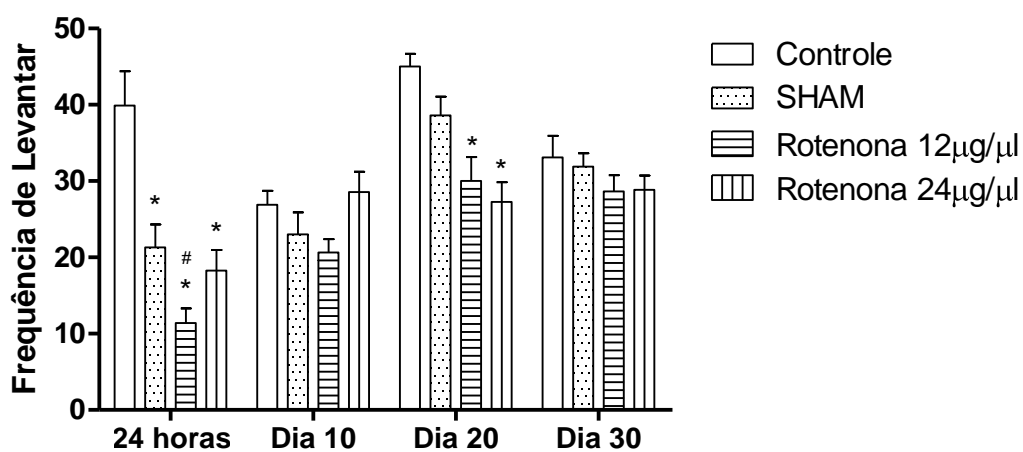
Os animais foram divididos em quatro grupos diferentes, controle (n=10), Sham (n=10), rotenona 12 $\mu$ g/ $\mu$ l (n=8) e rotenona 24 $\mu$ g/ $\mu$ l (n=7); e os parâmetros frequência de locomoção, frequência de levantar, duração de imobilidade e tempo de latência para o início do movimento foram analisados de acordo com o item 3.5.1, 24 h, 10, 20 e 30 dias após a cirurgia estereotáxica.

A figura 5 apresenta os dados referentes ao parâmetro freqüência de locomoção medida 24 h, 10, 20 e 30 dias após cirurgia estereotáxica. O grupo rotenona 12 $\mu$ g/ $\mu$ l avaliado 24 h após a cirurgia, apresentou diminuição significativa da locomoção quando comparado aos outros três grupos (controle, sham e rotenona 24 $\mu$ g/ $\mu$ l). Nos demais tempos (10, 20 e 30 dias), verificamos que os ratos do mesmo grupo rotenona 12 $\mu$ g/ $\mu$ l aumentaram a freqüência de locomoção no decorrer do tempo quando comparado às 24 h.



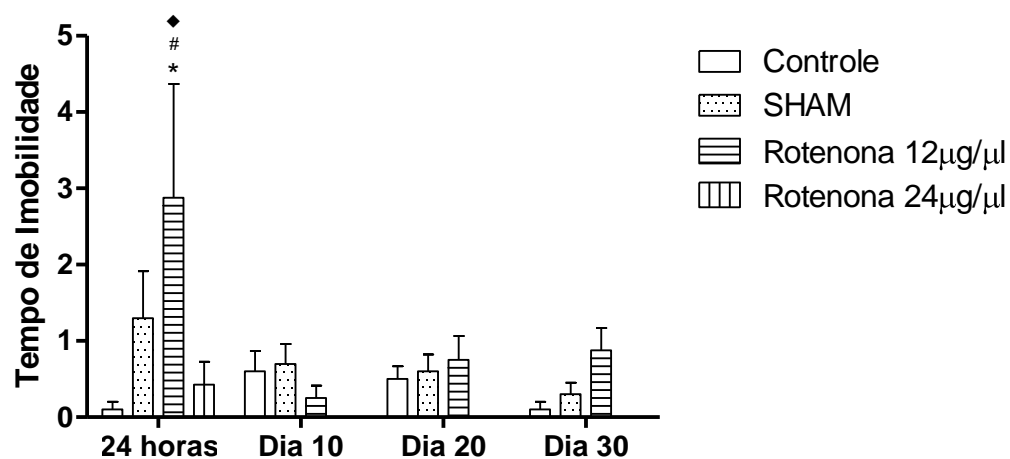
**Fig. 5. Comparação entre as freqüências de locomoção de grupos de ratos tratados com Rotenona.** Os animais foram tratados com Rotenona 12 $\mu$ g/ $\mu$ l e Rotenona 24 $\mu$ g/ $\mu$ l, e analisados no campo aberto 24 h, 10, 20 e 30 dias após a cirurgia estereotáxica. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. \* $P$ <0,05 comparado ao grupo controle no mesmo dia de teste. # $P$ <0,05 comparado ao grupo veiculo no mesmo dia de teste. \* $P$ <0,05 comparado ao grupo Rotenona 24 $\mu$ g/ $\mu$ l no mesmo dia de teste. # $P$ <0,05 comparado ao grupo Rotenona 12 $\mu$ g/ $\mu$ l 24 h. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguido do teste de Newman-Keuls.

A figura 6 ilustra os dados referentes ao parâmetro freqüência de levantar observados 24 h, 10, 20 e 30 dias após cirurgia estereotáxica. Os dados mostram que a rotenona em ambas as doses reduziu o levantar dos animais 24 h e 20 dias após a cirurgia estereotáxica quando estes foram comparados com o grupo controle. Porém, somente os ratos do grupo rotenona 12 $\mu$ g/ $\mu$ l nas 24 h mostraram aumento deste parâmetro em comparação ao grupo sham.



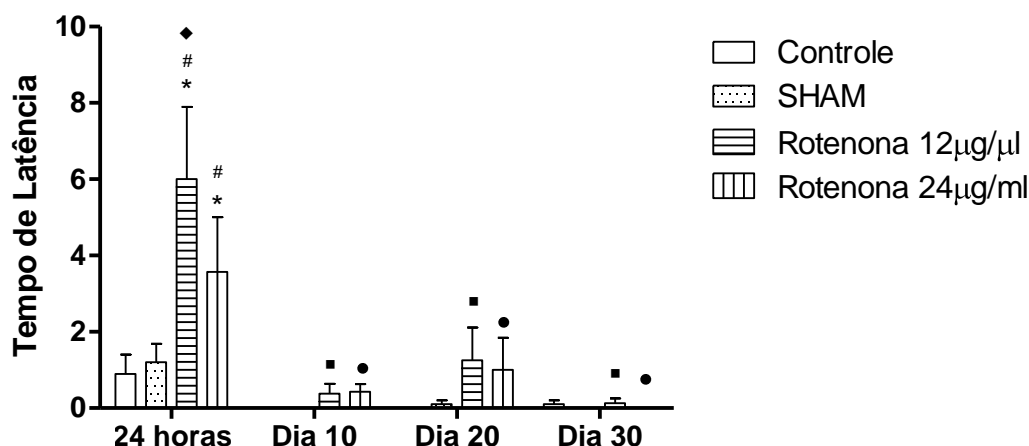
**Fig. 6. Comparação entre as freqüências de levantar de grupos de ratos tratados com Rotenona.** Os animais foram tratados com Rotenona 12 $\mu$ g/ $\mu$ l e Rotenona 24 $\mu$ g/ $\mu$ l, e analisados no campo aberto 24 h, 10, 20 e 30 dias após a cirurgia estereotáxica. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. \* $P$ <0,01 comparado ao grupo controle no mesmo dia de teste. # $P$ <0,05 comparado ao grupo veiculo no mesmo dia de teste. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguido do teste de Newman-Keuls.

Na avaliação do parâmetro tempo de imobilidade, a figura 7 mostra que os ratos do grupo rotenona 12 $\mu$ g/ $\mu$ l apresentaram aumento do tempo quando comparado aos demais grupos 24 h após a cirurgia estereotáxica.



**Fig. 7. Comparação entre o tempo de imobilidade de grupos de ratos tratados com Rotenona.** Os animais foram tratados com Rotenona 12 $\mu$ g/ $\mu$ l e Rotenona 24 $\mu$ g/ $\mu$ l, e analisados no campo aberto 24 h, 10, 20 e 30 dias após a cirurgia estereotáxica. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. \* $P$ <0,001 comparado ao grupo controle no mesmo dia de teste. # $P$ <0,01 comparado ao grupo veiculo no mesmo dia de teste. ♦ $P$ <0,01 comparado ao grupo Rotenona 24 $\mu$ g/ $\mu$ l no mesmo dia de teste. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguido do teste de Newman-Keuls.

De maneira semelhante ao parâmetro anterior, a figura 8 ilustra que o grupo rotenona 12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  apresentou um aumento do tempo de latência quando comparado aos demais grupos 24 h após a cirurgia estereotáxica. Além disso, os animais do grupo rotenona 24 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  mostraram aumento do tempo de latência quando comparado aos grupos controle e veículo 24 h após a cirurgia estereotáxica. Observamos também diferença significativa nas 24 h para os grupos rotenona 12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  e 24 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  quando comparados aos demais tempos de teste (10, 20 e 30 dias após a cirurgia estereotáxica).

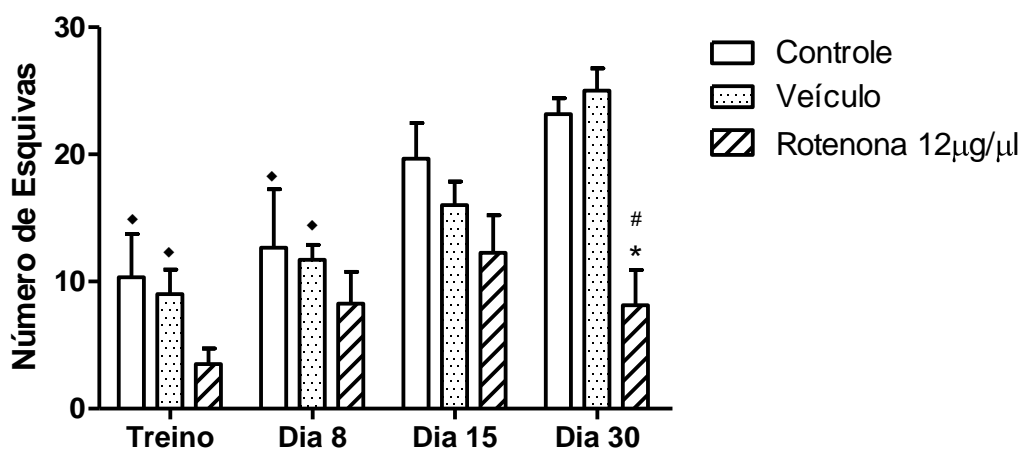


**Fig. 8. Comparação entre os tempos de latência de grupos de ratos tratados com Rotenona.** Os animais foram tratados com Rotenona 12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  e Rotenona 24 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , e analisados no campo aberto 24 h, 10, 20 e 30 dias após a cirurgia estereotáxica. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo controle no mesmo dia de teste. # $P < 0,05$  comparado ao grupo veículo no mesmo dia de teste. ♦ $P < 0,01$  comparado ao grupo Rotenona 24 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  no mesmo dia de teste. ■ $P < 0,001$  comparado ao grupo Rotenona 12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  24 h. • $P < 0,05$  comparado com Rotenona 24 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  24 h. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguido do teste de Newman-Keuls.

#### 4.1.2 Avaliação cognitiva de ratos tratados com rotenona intranigral

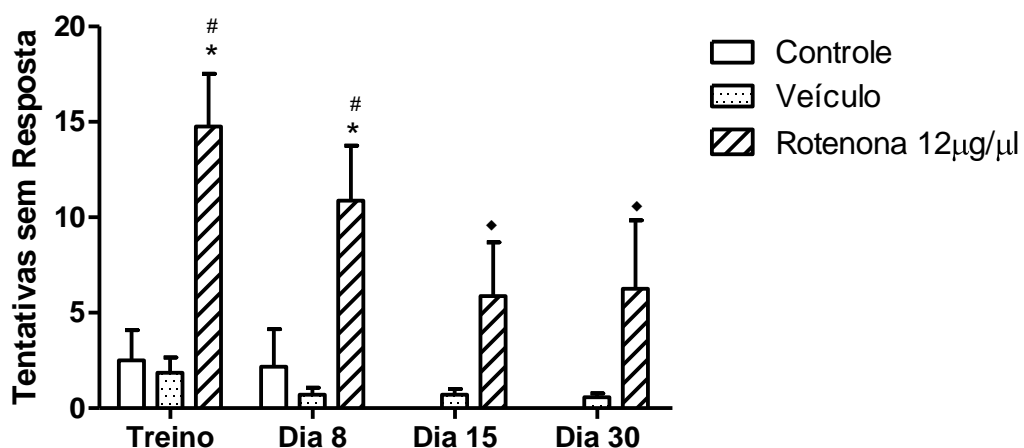
No teste comportamental para avaliação cognitiva dos animais, através da esquiva ativa de duas vias, foram analisados os parâmetros de: número de esquivas (cruzamento enquanto soa a campainha, antes do choque), número de escapes (desde o momento em que se inicia o choque) e número de vezes que o animal não respondia aos estímulos (som e choque) para três diferentes grupos: Controle (n=10), Veículo (n=10), e Rotenona 12 $\mu$ g/ $\mu$ l (n=9). Esses animais passaram por uma sessão treino (7 dias após a cirurgia estereotáxica), e três sessões-teste (8, 15 e 30 dias após) conforme descrito no item 3.5.2.

Na figura 9 verificamos o aumento do número de esquivas nos animais do grupo controle e veículo; entretanto, no grupo rotenona 12 $\mu$ g/ $\mu$ l, na sessão-teste do dia 30, houve uma diminuição do número de esquivas quando comparado aos valores dos ratos dos grupos controle e veículo no mesmo dia.



**Fig. 9. Efeitos da administração intranigral de rotenona no número de esquivas dos animais.** Os animais foram analisados na esquiva ativa de duas vias nos tempos de 7, 8, 15 e 30 dias após a cirurgia estereotáxica. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. \* $P$ <0,01 comparado ao grupo controle. # $P$ <0,05 comparado ao grupo veículo. \* $P$ <0,05 comparado ao mesmo grupo no dia 30. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguido do teste de Newman-Keuls.

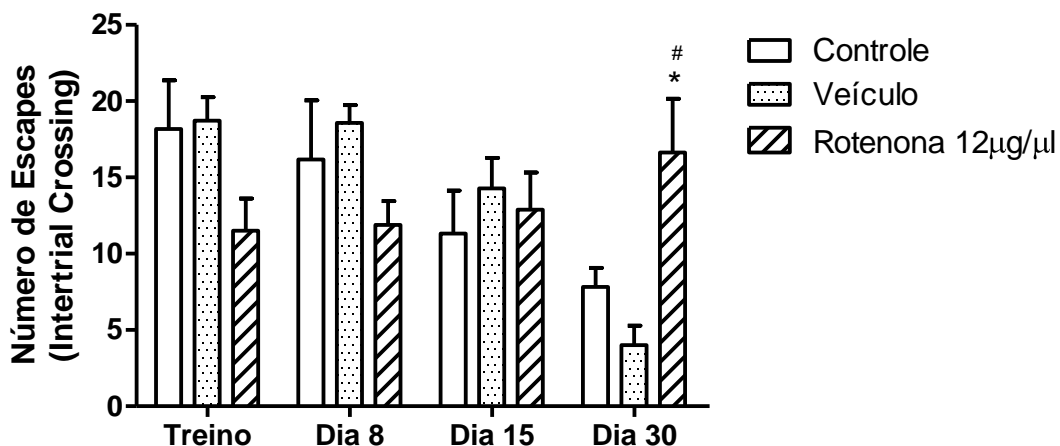
Na figura 10 observamos o oposto, ou seja, os animais dos grupos controle e veículo não mostraram diferença entre o treino e os testes realizados. Por outro lado, nos animais do grupo rotenona, verificamos um grande número de tentativas sem resposta nas sessões treino e teste do dia 8, porém esse número de tentativas diminuiu significativamente no dia 15 e 30.



**Fig. 10. Efeitos da administração intranigral de rotenona no número de tentativas sem respostas dos animais.** Os animais foram analisados na esquiva ativa de duas vias nos tempos de 7, 8, 15 e 30 dias após a cirurgia estereotáxica. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo controle no mesmo dia de teste. # $P < 0,05$  comparado ao grupo veículo no mesmo dia de teste. ^ $P < 0,05$  comparado ao grupo Rotenona 12µg/µl na sessão treino. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguido do teste de Newman-Keuls.



A figura 11 apresenta os dados das tentativas de escape entre os grupos estudados. Os resultados mostram que houve uma diminuição desse parâmetro apenas nos animais do grupo veículo no dia 30 quando comparado aos diferentes dias. Além disso, foi verificado um aumento do número de escape nos ratos do grupo rotenona no dia 30 quando comparada ao grupo veículo.



**Fig. 11. Efeitos da administração intranigral de rotenona no número de escapes dos animais.** Os animais foram analisados na esquiva ativa de duas vias nos tempos de 7, 8, 15 e 30 dias após a cirurgia estereotáxica. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo veículo nos outros tempos. # $P < 0,05$  comparado ao grupo veículo no mesmo dia de teste. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguido do teste de Newman-Keuls.

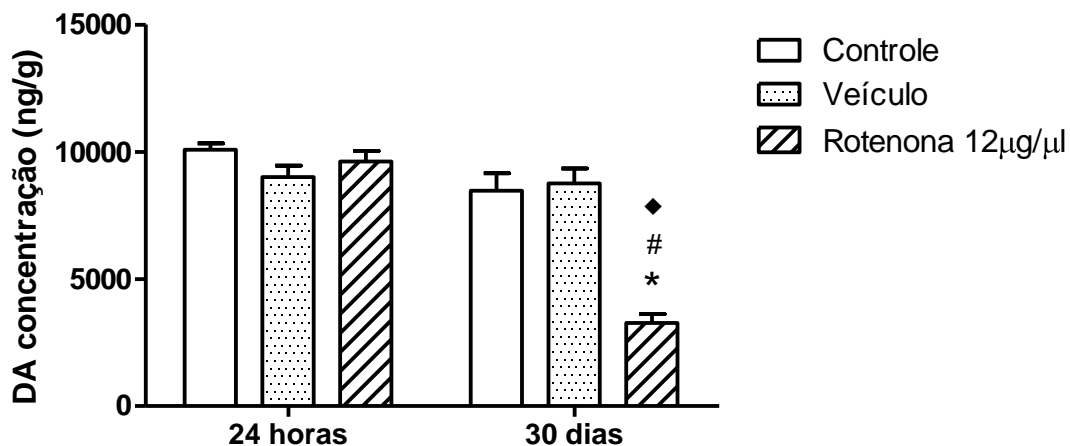
## 4.2 Avaliação neuroquímica

### 4.2.1 Avaliação dos níveis estriatais de animais tratados com Rotenona

A avaliação dos níveis estriatais dos neurotransmissores e metabólitos foi realizada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção Eletroquímica (HPLC-ED).

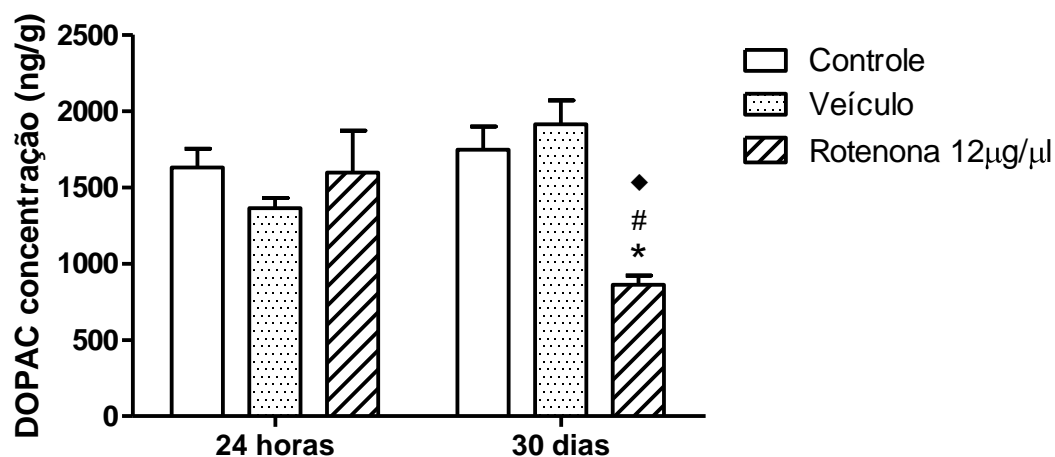
Foram determinadas as mudanças nos níveis de NA, 5HT (e o metabólito 5 HIAA) e DA (e metabólitos DOPAC e HVA) no estriado dos animais 24 horas e 30 dias após a cirurgia estereotaxica, conforme descrito no item 3.6. Os grupos foram divididos em: Controle 24 h (N=6), Veículo 24 h (N=8), Rotenona 12 $\mu$ g/ $\mu$ l 24 h (N=7), Controle 30 dias (N=8), Veículo 30 dias (N=11) e Rotenona 12 $\mu$ g/ $\mu$ l 30 dias (N=5).

A figura 12 mostrou que houve diminuição significativa de DA no grupo rotenona 12 $\mu$ g/ $\mu$ l 30 dias após a infusão desta através da cirurgia estereotáxica. Essa diminuição de dopamina foi significativa quando comparada aos grupos controle e veículo (30 dias) e entre o mesmo grupo comparado com as 24 h.



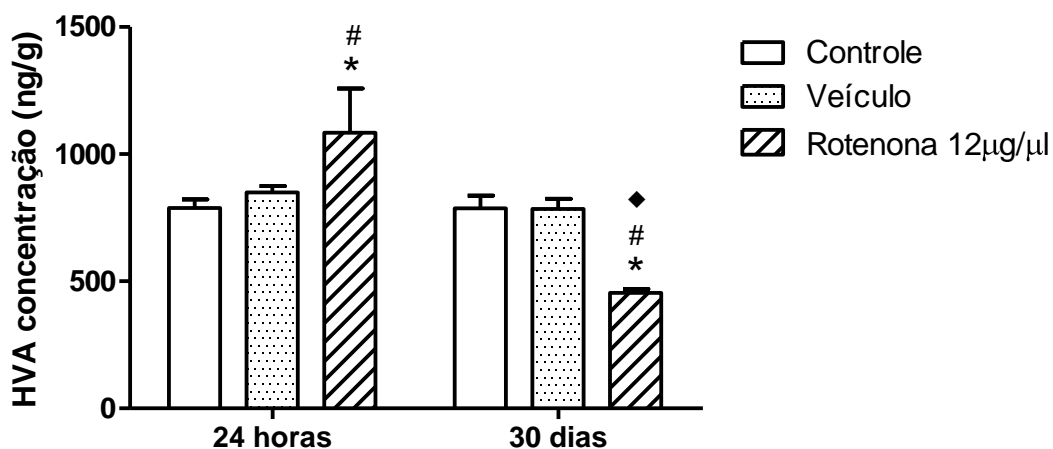
**Fig. 12. Efeitos da injeção intranigral de rotenona nos níveis estriatais de DA.** Os animais foram eutanasiados 24 h e 30 dias após a infusão da toxina. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. \* $P$ <0,001 comparado ao grupo controle no mesmo dia de teste. # $P$ <0,001 comparado ao grupo veículo no mesmo dia de teste. ♦ $P$ <0,001 comparado ao mesmo grupo no tempo de 24 h. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguido do teste de Newman-Keuls.

A quantificação dos níveis de DOPAC estriatal (Fig. 13) mostrou redução significativa deste metabólito nos ratos do grupo da rotenona 30 dias quando comparado aos outros dois grupos. Além disso, essa diferença também ocorreu ao comparar o mesmo grupo 24 h após a cirurgia estereotáxica.



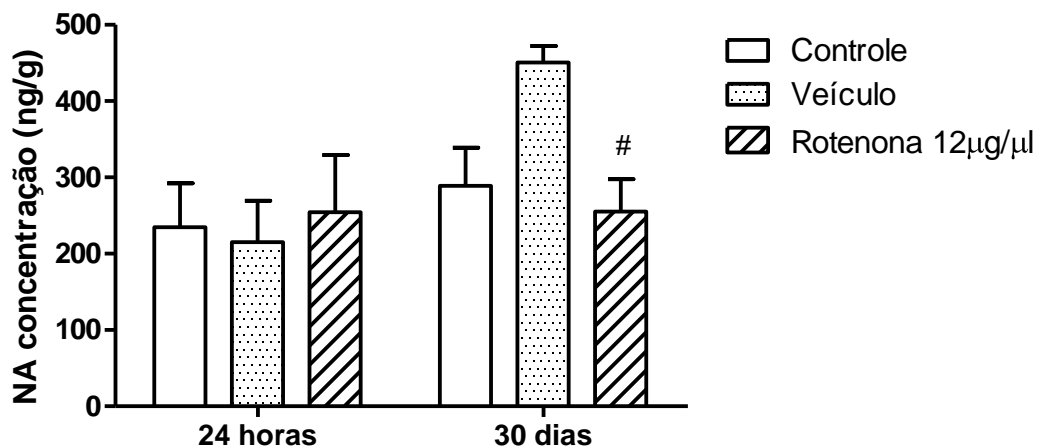
**Fig. 13. Efeitos da injeção intranigral de rotenona nos níveis estriatais de DOPAC.** Os animais foram eutanasiados 24 h e 30 dias após a infusão da toxina. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo controle no mesmo dia de teste. # $P < 0,01$  comparado ao grupo veiculo no mesmo dia de teste. \* $P < 0,01$  comparado ao mesmo grupo no tempo de 24 h. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguido do teste de Newman-Keuls.

A figura 14 apresenta os dados referentes aos níveis de HVA no estriado de ratos. Os resultados mostram que inicialmente houve um aumento do metabólito 24 h após a cirurgia estereotáxica para os ratos do grupo rotenona quando comparado aos outros grupos controles; além disso, o nível do metabólito HVA nos animais do grupo Rotenona 12 $\mu$ g/ $\mu$ l 30 dias diminuiu consideravelmente quando comparado ao tempo de 24 h.



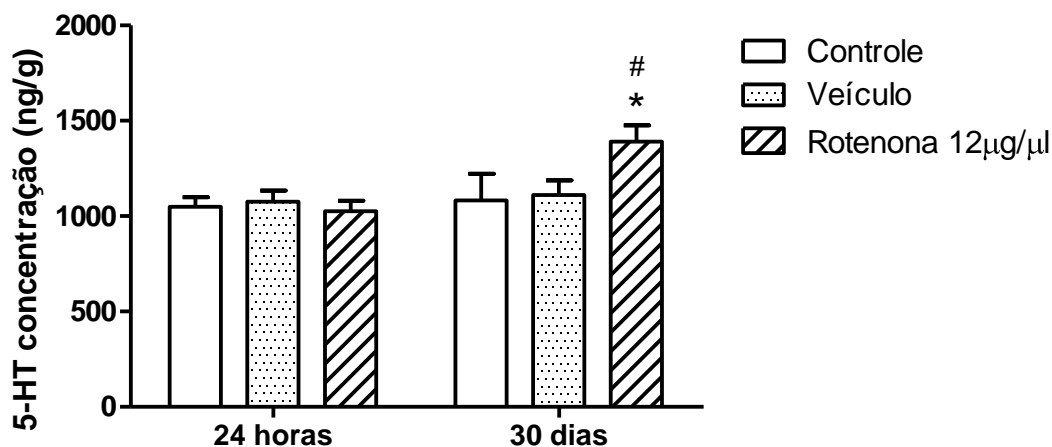
**Fig. 14. Efeitos da injeção intranigral de rotenona nos níveis estriatais de HVA.** Os animais foram eutanasiados 24 h e 30 dias após a infusão da toxina. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo controle no mesmo dia de teste. # $P < 0,05$  comparado ao grupo veiculo no mesmo dia de teste. \* $P < 0,001$  comparado ao mesmo grupo no tempo de 24 h. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguido do teste de Newman-Keuls.

A figura 15 apresenta os dados da concentração estriatal de NA. O grupo Rotenona 12 $\mu$ g/ $\mu$ l exibiu diminuição quando comparado ao grupo veículo 30 dias após a cirurgia estereotáxica.



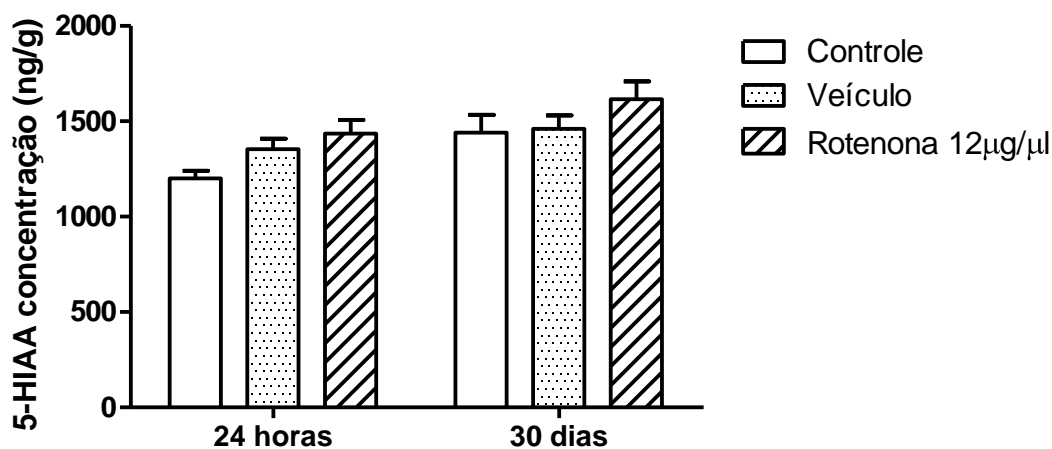
**Fig. 15. Efeitos da injeção intranigral de rotenona nos níveis estriatais de NA.** Os animais foram eutanasiados 24 h e 30 dias após a infusão da toxina. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. # $P < 0,05$  comparado ao grupo veículo no mesmo dia de teste. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguido do teste de Newman-Keuls.

A figura 16 mostra que os níveis estriatais de 5-HT mostraram aumento no grupo Rotenona 12 $\mu$ g/ $\mu$ l 30 dias após a infusão de toxina em comparação aos outros grupos.



**Fig. 16. Efeitos da injeção intranigral de rotenona nos níveis estriatais de 5-HT.** Os animais foram eutanasiados 24 h e 30 dias após a infusão da toxina. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. \* $P$ <0,05 comparado ao grupo controle no mesmo dia de teste. # $P$ <0,05 comparado ao grupo veiculo no mesmo dia de teste. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguido do teste de Newman-Keuls.

Porém, os níveis estriatais de 5-HIAA (Fig. 17) não sofreram alterações após os procedimentos realizados.



**Fig. 17. Efeitos da injeção intranigral de rotenona nos níveis estriatais de 5-HIAA.** Os animais foram eutanasiados 24 h e 30 dias após a infusão da toxina. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguido do teste de Newman-Keuls.

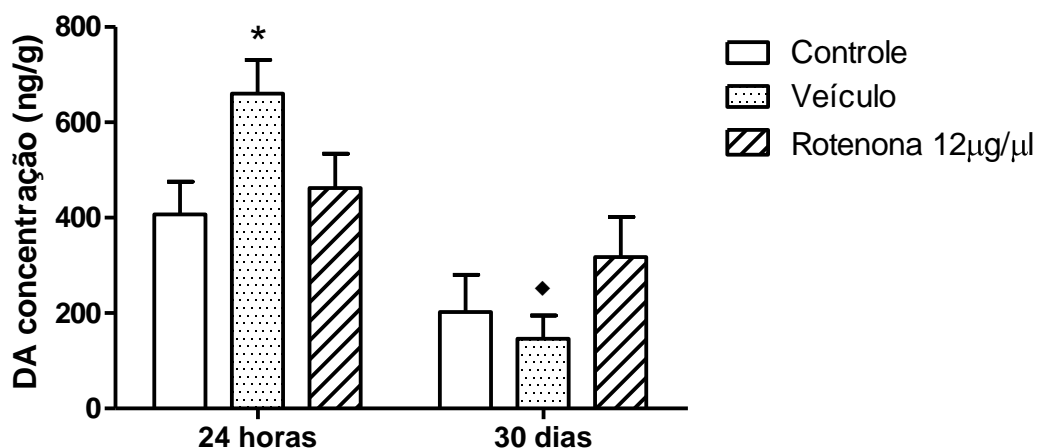
#### 4.2.2 Avaliação dos níveis nigrais de animais tratados com Rotenona

##### *Delineamento experimental*

A avaliação dos níveis nigrais dos neurotransmissores e metabólitos foram quantificados através Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção Eletroquímica (HPLC-ED).

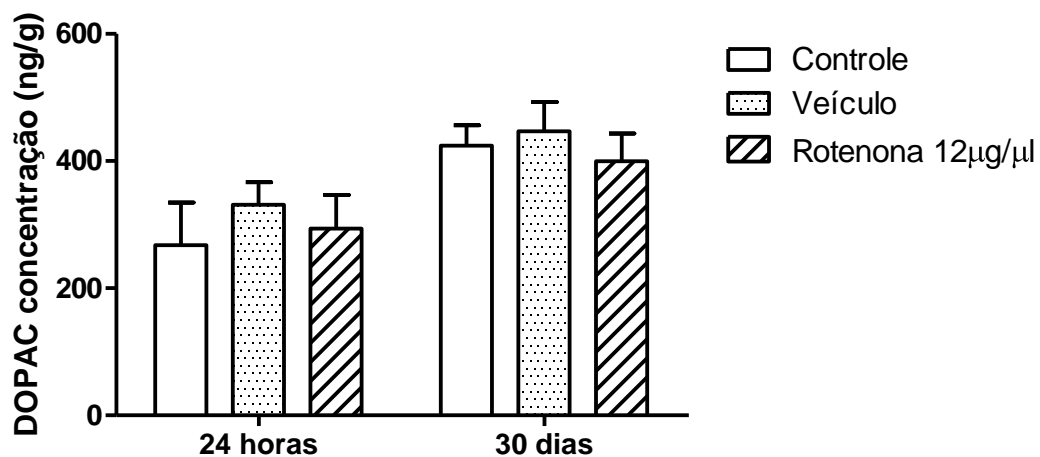
Da mesma forma que aquela vista na análise dos estriados (item 4.2.1), foram determinadas as mudanças nos níveis nigrais de NA, 5HT (e o metabólito 5 HIAA) e DA (e metabólitos DOPAC e HVA) no estriado dos animais nos tempos de 24 horas e 30 dias após a cirurgia estereotaxica, conforme item 3.6. Os grupos foram divididos em: Controle 24 h (N=6), Veículo 24 h (N=8), Rotenona 12 $\mu$ g/ $\mu$ l 24 h (N=7), Controle 30 dias (N=8), Veículo 30 dias (N=11) e Rotenona 12 $\mu$ g/ $\mu$ l 30 dias (N=5).

Os resultados da figura 18 mostram que houve um aumento nos níveis de DA no grupo veículo 24 h após a cirurgia estereotáxica quando estes animais foram comparados ao grupo controle e diminuição da concentração deste, 30 dias após. Por outro lado, verificou-se diminuição dos níveis de DA na SN dos animais do grupo veículo quando comparados aos demais grupos 30 dias após a cirurgia.



**Fig. 18. Efeitos da injeção intranigral de rotenona nos níveis nigrais de DA.** Os animais foram eutanasiados 24 h e 30 dias após a infusão da toxina. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo controle no mesmo dia de teste. ♦ $P < 0,05$  comparado ao grupo veículo 24 h. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguido do teste de Newman-Keuls.

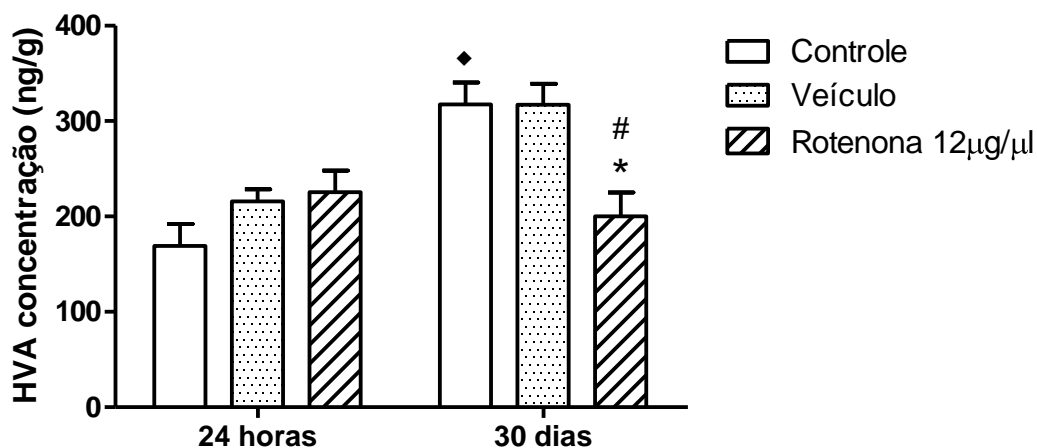
A figura 19 apresenta os dados referentes aos níveis de DOPAC na substância negra de ratos. Nossos dados mostram que não houve diferença entre os grupos.



**Fig. 19. Efeitos da injeção intranigral de rotenona nos níveis nigrais de DOPAC.** Os animais foram eutanasiados 24 h e 30 dias após a infusão da toxina. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguido do teste de Newman-Keuls.

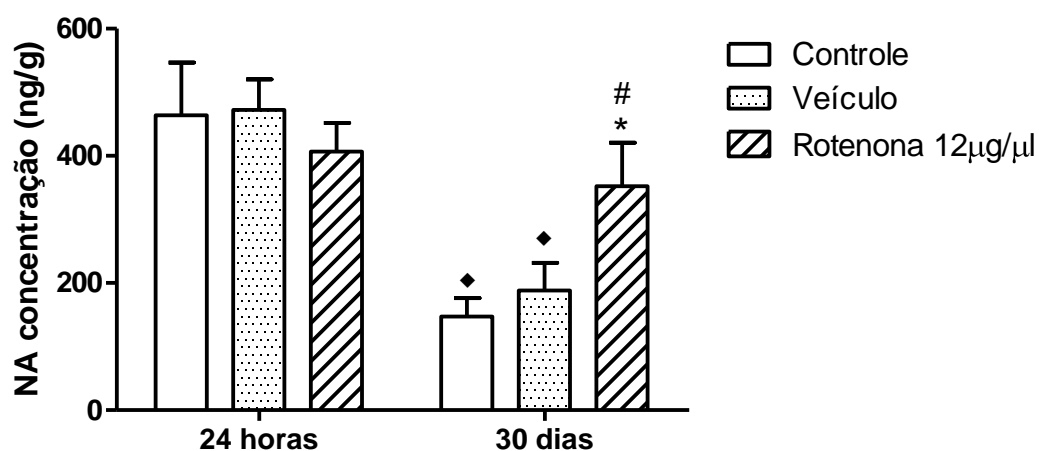


Os níveis de HVA estão representados na figura 20. No grupo controle 30 dias houve um aumento dos níveis desse metabólito quando comparados ao mesmo grupo no tempo de 24 h e uma diminuição do grupo da Rotenona 12 $\mu$ g/ $\mu$ l no dia 30 quando comparado aos grupos controle e veículo no mesmo dia.



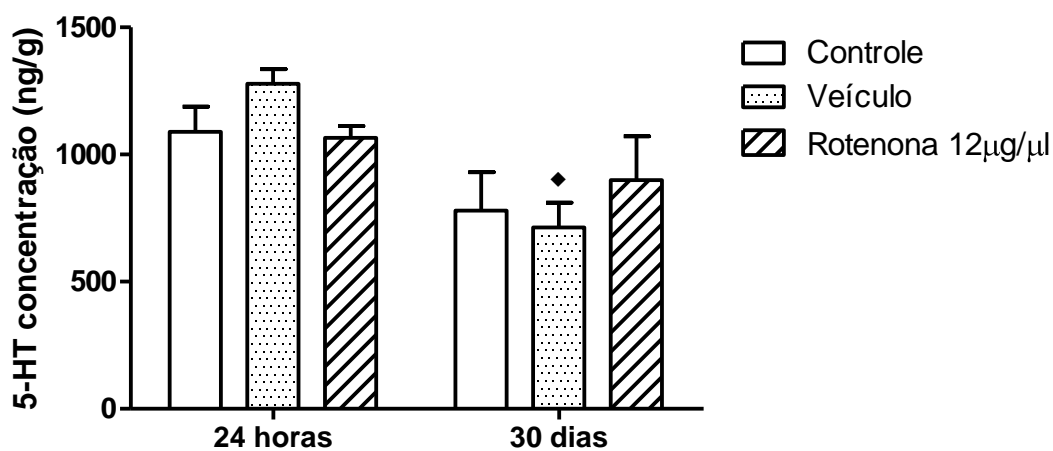
**Fig. 20. Efeitos da injeção intranigral de rotenona nos níveis nigrais de HVA.** Os animais foram eutanasiados 24 h e 30 dias após a infusão da toxina. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. \* $P < 0,01$  comparado ao grupo controle no mesmo dia de teste. # $P < 0,01$  comparado ao grupo veículo no mesmo dia de teste. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo controle 24 h. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguido do teste de Newman-Keuls.

A quantificação de NA ilustrada na figura 21 mostra que houve aumento dos níveis deste neurotransmissor nos ratos do grupo rotenona 30 dias após a infusão de toxina em comparação aos valores de NA nigrais dos demais grupos. Mais ainda, verificou-se redução dos níveis desta monoamina nos ratos dos grupos controle e veículo quando comparados aos respectivos controles 24 h após a cirurgia.



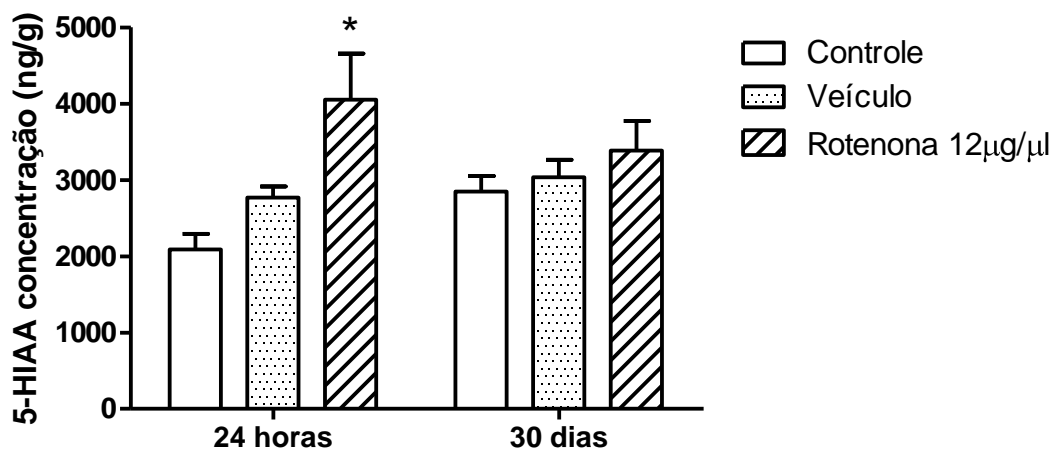
**Fig. 21. Efeitos da injeção intranigral de rotenona nos níveis nigrais de NA.** Os animais foram eutanasiados 24 h e 30 dias após a infusão da toxina. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M.  $^{\diamond}P < 0,01$  comparado ao mesmo grupo 24 h.  $^*P < 0,01$  comparado ao grupo controle no mesmo dia de teste.  $^{\#}P < 0,05$  comparado ao grupo veículo no mesmo dia de teste. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguido do teste de Newman-Keuls.

A figura 22 apresenta os dados referentes aos níveis de 5-HT na substância negra. Os resultados mostraram que houve uma diminuição nos níveis de serotonina 30 dias após a cirurgia estereotáxica para o grupo veículo.



**Fig. 22. Efeitos da injeção intranigral de rotenona nos níveis nigrais de 5-HT.** Os animais foram eutanasiados 24 h e 30 dias após a infusão da toxina. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo veículo 24 h. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguido do teste de Newman-Keuls.

E finalmente, os níveis de 5-HIAA estão representados na figura 23. Houve um aumento da concentração de níveis nigrais do metabólito da serotonina no grupo rotenona 12 $\mu$ g/ $\mu$ l quando comparado ao grupo controle apenas nas 24 h.



**Fig. 23. Efeitos da injeção intranigral de rotenona nos níveis nigrais de 5-HIAA.** Os animais foram eutanasiados 24 h e 30 dias após a infusão da toxina. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo controle no mesmo dia de teste. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguido do teste de Newman-Keuls.

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados desse estudo mostram que o modelo animal de rotenona mimetiza sinais de parkinsonismo. Neste sentido, após administração intranigral, este pesticida causou alterações no comportamento motor e na memória, além da diminuição dos níveis estriatais de DA e seus metabólitos.

Nosso grupo tem estudado alguns modelos animais de parkinsonismo como 6-OHDA, reserpina, lipopolissacarídeo (LPS) e MPTP. O interesse pela rotenona surgiu em função deste pesticida ser empregado em medicamentos de uso veterinário. Deste modo, de acordo com a literatura, a rotenona nos parecia ser um modelo animal promissor devido à possibilidade de validade de constructo, cumprindo critérios de isomorfismo farmacológico da DP, uma similaridade com a sintomatologia e compartilhando os mesmos mecanismos da doença como inibição da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria e formação de ROS (TADA-OIKAWA, *et al.*, 2003; BASHKATOVA *et al.*, 2004; GRIVENNIKOVA and VINOGRADOV, 2006; RADAD *et al.* 2006; BETARBET *et al.* 2006; SARAVANAN *et al.*, 2006). Alguns autores também verificaram que a rotenona causou agregação de  $\alpha$ -sinucleína e morte seletiva de neurônios dopaminérgicos característicos da DP (SHERER *et al.*, 2003; DIAZ-CORRALES *et al.*, 2005; BETARBET *et al.* 2006).

No início do presente trabalho, buscou-se estudar uma dose que fosse referência para o início dos experimentos. Assim, no estudo de SARAVANAN e colaboradores (2005) foram empregadas diferentes doses: 2, 6 e 12 $\mu$ g/ $\mu$ l de rotenona dissolvidas na mistura de diluentes DMSO:PEG (1:1) infundidas unilateralmente na SN. Estes autores mostram que somente as doses 6 e 12 $\mu$ g/ $\mu$ l provocaram neurotoxicidade dopaminérgica progressiva e aumento da geração de ROS no sistema nigroestriatal mimetizando a DP idiopática. Mais ainda, SINDHU *et al.* (2006) observaram que a rotenona infundida unilateralmente na dose única de 6 $\mu$ g/ $\mu$ l na substância negra reproduziu achados comportamentais e neuroquímicos típicos da síndrome parkinsoniana.

Assim, de acordo com estes estudos, escolhemos a dose 12 $\mu$ g/ $\mu$ l (utilizada por SARAVANAN *et al.*, 2005), e uma outra dose mais alta - 24 $\mu$ g/ $\mu$ l (para verificar

se ocorreria aumento dos sinais relacionados ao parkinsonismo nos animais). Também fizemos uma modificação no veículo, ou seja, nesse trabalho realizamos a solubilização da rotenona apenas com o PEG, diferentemente de trabalhos acima citados (SARAVANAN *et al.*, 2005; SINDHU *et al.*, 2006), que fizeram a mistura DMSO:PEG (1:1). Essa modificação foi introduzida em função de achados na literatura que relatam que o DMSO foi capaz de estimular a ocorrência de apoptose (VONDRACEK *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2001; NYGREN *et al.*, 1987).

A observação da atividade geral dos animais foi realizada em campo aberto. Foram avaliados parâmetros motores como as freqüências de locomoção e de levantar, e foram medidos os tempos de imobilidade e de latência para início do primeiro movimento. Este procedimento foi realizado 24 horas, 10, 20 e 30 dias após a infusão da neurotoxina. Nossos dados mostram que a infusão intranigral bilateral de rotenona produziu diminuição das freqüências de locomoção e de levantar, bem como aumento dos tempos de latência e imobilidade 24 horas após a cirurgia na dose 12µg/µl (Figuras 5, 6, 7 e 8). O grupo de ratos que recebeu a infusão de 24µg/µl de rotenona mostrou diminuição da locomoção e de levantar e aumento do tempo de latência para início do primeiro movimento; o tempo de imobilidade não foi alterado nesta dose. Por esta razão, a dose escolhida para as próximas etapas foi 12µg/µl.

As diferenças encontradas nas figuras 5, 6, 7 e 8 permitem relacionar o comportamento motor do animal com sinais/sintomas cardinais do paciente com DP, como é o caso da bradicinesia e acinesia. Nossos resultados corroboram os resultados de outros autores que também verificaram alterações motoras similares aos encontrados neste estudo (ALAM and SCHMIDT, 2002, 2004).

A hipocinesia é uma importante característica demonstrada nesse modelo, possuindo uma validade de face com a DP, ou seja, características que ocorrem na doença podem ser comparadas a esses parâmetros (redução da locomoção e freqüência de levantar e aumento do tempo de imobilidade) no modelo animal da rotenona. A avaliação da latência para iniciar os movimentos pode ser correlacionada à bradicinesia encontrada nos pacientes portadores de DP

(SEDELIS *et al.*, 2001), sinal também verificado nos animais tornados parkinsonianos pela rotenona.

Outra observação relevante nesta investigação foi que 10, 20 e 30 dias após a lesão com rotenona, os animais foram novamente expostos ao campo aberto. Foi verificada a recuperação da atividade motora dos animais que receberam a rotenona, pois não verificamos diferença entre os parâmetros observados no campo aberto entre os grupos experimentais e controle. A recuperação da função motora observada pode ser explicada pela recuperação de neurônios dopaminérgicos que já foi demonstrada tanto na literatura (GASPAR *et al.*, 1993) como em trabalhos do grupo (PERRY *et al.* 2004, 2005; LIMA *et al.* 2007, REKSIDLER *et al.*, 2007). Os mecanismos compensatórios que ocorrem podem envolver a redução da captação neuronal, e alteração do número e/ou afinidade dos receptores.

Alterações comportamentais relatadas após destruição nigroestriatal podem ocorrer simultaneamente aos mecanismos compensatórios. Inicialmente, a perda de células nigroestriatais e a diminuição de inervações para o estriado podem ser compensadas pelo aumento na produção de dopamina através do *out-put* vindo de células remanescentes; e também pelo aumento no número de receptores dopaminérgicos pós-sinápticos e na sensibilidade (ZIGMOND and STRIKER, 1984; ZIGMOND, 1997; PERRY *et al.*, 2005). De fato, em outros trabalhos foi verificado aumento da atividade motora após infusão de MPTP na SN de ratos (TANILA *et al.*, 1998; PERRY *et al.*, 2004; LIMA *et al.*, 2007).

Outro aspecto não menos importante que a recuperação da função dopaminérgica que ocorre em roedores pode ser a capacidade da rotenona, em nosso delineamento experimental, de causar uma lesão parcial. De fato, nossos resultados de dosagem de neurotransmissores mostram que a redução dos níveis estriatais de DA nos animais que foram infundidos com rotenona foi de 61%.

Nosso grupo já demonstrou que a infusão bilateral de MPTP na SN produziu redução de 40% dos níveis de DA estriatal e 57% no número de neurônios reativos à TH na SN (DA CUNHA *et al.*, 2001; GEVAERD *et al.*, 2001; PERRY *et al.*, 2005). Além disso, no estudo realizado por LIMA *et al.* (2007)

observou-se que a infusão de LPS, MPTP ou 6-OHDA causou redução de 38%, 37% e 32%, respectivamente, na expressão da enzima TH na SN mas não no estriado 24 h após a infusão destas toxinas. Além disso, REKSIDLER *et al.* (2007) mostraram que a redução de TH no estriado somente foi observada 21 dias após a infusão de MPTP. Ou seja, nenhum modelo animal consegue mimetizar com exatidão todas as características da DP. Pois a depleção de DA que evidencia os primeiros sinais motores é de aproximadamente 70%.

Outro teste realizado para avaliar a função motora dos animais foi o teste da catalepsia/catatonia, que não mostrou alterações estatisticamente significativas (dados não apresentados no trabalho). Esse resultado não corrobora os resultados de ALAM and SCHMIDT (2002, 2004), que verificaram aumento da catalepsia dos animais após tratamento prolongado (60 dias) com rotenona nas doses 1,5 e 2,5mg/ml/dia, via i.p.. Uma possível explicação para entender a ausência de catalepsia no corrente estudo pode ser devida à diferença no delineamento experimental entre o nosso estudo e o de ALAM and SCHMIDT (2002, 2004), que usaram menores doses e por tempo prolongado.

Além dos sinais e sintomas motores que são observados nos pacientes com DP, há outros não motores, entre eles o prejuízo cognitivo (DAUER and PRZEDBORSKI, 2003). Segundo SHOHAMY e colaboradores (2005), o déficit de memória e aprendizado em pacientes com DP é geralmente caracterizado como prejuízo de aprendizado de hábito e procedural, como tarefas de associação condicional. Outros modelos animais, como o MPTP e 6-OHDA, causam prejuízo cognitivo característico em momentos em que a função motora dos animais já foi recuperada (DA CUNHA *et al.*, 2001; PERRY *et al.*, 2004; FERRO *et al.*, 2005; REKSIDLER *et al.*, 2007). Existem poucos estudos sobre a toxina rotenona e seus efeitos nos processos de aprendizado e memória dos animais. Mais ainda, resultados do nosso laboratório mostram que os animais lesados com MPTP apresentaram aumento do tempo de latência para encontrar a plataforma no primeiro e segundo dias de exposição ao labirinto aquático, versão *cued test*, comparado aos grupos controle e SHAM (PERRY *et al.*, 2005; REKSIDLER *et al.*, 2007). Em particular, ALVES *et al.* (2000) mostraram que a reserpina foi capaz de



produzir amnésia transitória quando administrada imediatamente após a sessão treino na esquivas passiva. Este efeito amnésico foi observado nos testes realizados 24 h e 1 semana após o treino, mas não foi verificado no teste realizado 2 semanas após a administração de reserpina. Este fato mostra que a depleção de catecolaminas é um efeito reversível.

No nosso trabalho, a avaliação cognitiva dos animais foi feita através da esquivas ativa de duas vias e foram analisados os parâmetros: número de esquivas, número de escapes (fugas) e número de vezes que o animal não respondia aos estímulos. O treino foi realizado no sétimo dia após a infusão de rotenona e os testes foram realizados no 8º, 15º e 30º dias após a cirurgia estereotáxica. Na esquivas ativa de duas vias, o som da campainha é considerado um estímulo condicionado e o choque, incondicionado. A aquisição de memória foi estimada pelo aumento do número de esquivas na sessão-treino (7 dias). A consolidação da memória, no entanto, foi estimada pelo aumento do número de esquivas nas sessões-teste quando comparado à sessão treino.

Os resultados mostram que não houve diferença entre o número de esquivas entre os ratos controle e do grupo rotenona (Fig. 9) na sessão treino e teste 8 e 15 dias após a cirurgia. Por outro lado, no teste realizado 30 dias após a infusão de rotenona houve redução do número de esquivas nos animais do grupo rotenona em comparação ao controle e sham (Fig. 9) indicando prejuízo na consolidação da memória destes ratos. Com relação ao número de escapes (*intertrial crossing*) os dados mostram que houve redução deste parâmetro nos ratos dos grupos controle e sham devido ao aprendizado e/ou memória naturais decorrentes da repetição da tarefa. Os animais do grupo rotenona mostraram aumento do número de escapes, indicando prejuízo da evocação da memória.

Nossos resultados anteriores do campo aberto mostram uma reversão da hipolocomoção dos animais tratados com rotenona, acreditamos que o número baixo de resposta ao som ou a falta de resposta (Tentativas sem Resposta, Fig. 10) dos animais do grupo rotenona podem ser devidos à diminuição do aprendizado ou até mesmo pela redução dos processos de consolidação da memória. Além disso, o grupo rotenona na sessão teste do dia 30 apresentou

dificuldade em executar o procedimento, possivelmente por haver uma progressão da perda de neurônios dopaminérgicos da SN.

Considerando-se que na esQUIVA ativa a curva de aprendizado envolve estruturas estriatais e que a DA participa dos processos de formação de memória (BELISSIMO *et al.*, 2004) era previsível imaginar que este pesticida produzisse redução dos processos de aprendizado e memória como esperado para um modelo de parkinsonismo.

Além dos achados comportamentais, o presente trabalho mostrou diminuição dos níveis estriatais de DA e seus metabólitos no grupo rotenona 30 dias após a cirurgia estereotáxica (Fig. 12, 13 e 14). Também houve um aumento inicial de HVA no estriado 24 horas após a cirurgia (Figura 13). Isso pode ser explicado através de um mecanismo de compensação dos neurônios que não foram lesados. Aumento dos níveis 5-HIAA 24 horas e de serotonina 30 dias após a cirurgia estereotáxica também foram observados (Figura 16 e 17).

Segundo SARAVANAN *et al.* (2005) e SINDHU *et al.*, 2006, a rotenona produziu morte seletiva de neurônios dopaminérgicos expostos à rotenona. Nossos dados corroboram esses trabalhos. De fato, ALAM and SCHMIDT (2002), verificaram redução de DA, DOPAC e HVA quando a rotenona foi administrada via i.p. nas doses 1,5mg/ml e 2,5mg/ml por um período de dois meses. Em adição, SHERER e colaboradores (2003), realizaram administração subcutânea (s.c.) crônica (28 e 56 dias) nas doses 2 e 3 mg/kg/dia de rotenona e avaliaram perda neuronal por imunofluorescência. Eles observaram que a degeneração foi seletiva para esse tipo de neurônios, além de evidenciar que essa degeneração era seletiva para via nigroestriatal sem afetar neurônios estriatais pós-sinápticos ou neurônios de outras regiões. Mais ainda, RADAD *et al.* (2006) também observaram que a rotenona destruiu neurônios dopaminérgicos primários, bem como que essa lesão era tempo e dose-dependente. Segundo ROJO e colaboradores (2007), a inoculação intranasal de rotenona 30 e 60mg/kg/dia (por 30 dias) depletou em torno de 50% e 20%, respectivamente, os níveis de DA e DOPAC. Recentemente, NEHRU e colaboradores (2008), administraram rotenona na dose de 2mg/kg s.c. por um período de 35 dias e também obtiveram achados

de diminuição de DA; Nesta linha de raciocínio, RAVENSTIJIN *et al.* (2008) compararam duas vias de administração da toxina, s.c. (3mg/kg/dia) e 3 doses infundidas na SN (0.5, 2.0 e 5.0µg). Nos animais que receberam a administração s.c., a intensidade de lesão dopaminérgica foi menor, mas houve maior toxicidade de órgãos periféricos; com a infusão intranigral, houve uma diminuição de neurônios dopaminérgicos em torno de 30% em 28 dias.

Apesar de alguns autores mostrarem diferenças entre espécies de ratos, como por exemplo, a maior susceptibilidade a toxinas mitocondriais em ratos Lewis comparados a ratos Sprague-Dawley e Wistar (BETARBET *et al.*, 1998 e OUARY *et al.*, 2000); nossos resultados apresentaram resultados semelhantes a de outros autores, mesmo quando estes utilizaram animais diferentes dos utilizados no presente trabalho.

Um modelo ideal da DP deve reproduzir degeneração nigroestriatal lenta, progressiva e seletiva. No presente estudo foi descrito um modelo promissor da DP no qual uma única infusão intranigral causou lesão seletiva de neurônios dopaminérgicos e degeneração anterógrada de neurônios da SN após trinta dias. Esse modelo pode ajudar no entendimento da fisiopatologia da DP e pode ser um modelo animal adequado para investigação de novos recursos terapêuticos.

Em conclusão, nossos resultados reforçam a idéia de que as alterações cognitivas, motoras e neuroquímicas presentes no modelo animal de rotenona são similares àqueles encontrados na DP.

## 6. CONCLUSÕES

- 1) As duas doses de rotenona causaram hipolocomoção (12µg/µl e 24µg/µl de PEG);
- 2) Houve alteração motora dos animais (frequência de locomoção, frequência de levantar e tempo de imobilidade), similar àquela observada em outros modelos animais; porém essas foram revertidas em pouco tempo por mecanismos compensatórios;
- 3) Os animais avaliados no teste de esquiva ativa de duas vias apresentaram uma dificuldade no aprendizado de hábitos e déficit de memória, tempo-dependente, através da diminuição no número de esquivas; características nunca avaliadas antes para esse modelo animal;
- 4) Houve diminuição nos níveis de DA, DOPAC e HVA 30 dias após a cirurgia estereotáxica no grupo da Rotenona, sugerindo que houve morte de neurônios dopaminérgicos na SNpc, e que a lesão parece ser progressiva, característica essencial para a DP;
- 5) A lesão provocada pela Rotenona foi seletiva para neurônios dopaminérgicos;
- 6) Os resultados demonstraram que a administração aguda intranigral de rotenona provocou mudanças neuroquímicas e comportamentais, de maneira tempo-dependente, no sistema nigroestriatal, mimetizando a DP idiopática;
- 7) O modelo da rotenona, de acordo com o protocolo testado, é adequado para descobertas na DP, especialmente no *screening* de novas drogas para a doença.

## 7. REFERÊNCIAS

AHLSKOG, J.E. Diagnosis and differential diagnosis of Parkinson's disease and parkinsonism. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 7, p. 63-74, 2001.

ALAM, M., SCHMIDT, W. J. Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. **Behavioral Brain Research**, v. 136, p. 317-324, 2002.

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

ALVES, C.S.D., ANDREATINI, R., DA CUNHA, C., TUFIK, S., VITAL, M.A.B.F. Phosphatidylserine reverses reserpine-induced amnesia. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 404, p. 161-167, 2000.

BASHKATOVA, V.; ALAM, M.; VANIN, A.; SCHMIDT, W.J. Chronic administration of rotenone increases levels of nitric oxide and lipid peroxidation products in rat brain. **Experimental Neurology**, v. 186, p. 235-241, 2004.

BELISSIMO, M.I.; KOUZMINE, I.; FERRO, M.M.; OLIVEIRA, B.H.; CANTERAS, N.S.; DA CUNHA, C. Is the unilateral lesion of the left substantia nigra pars compacta sufficient to induced working memory impairment in rats? **Neurobiology of Learning and Memory**, v.82, p. 150-158, 2004.

BETARBET, R., AVILES, C. R. M., SHERER, T. B., MASTROBERARDINO, P. G., MCLENDON, C., KIM, J. H., LUND, S., NA, H. M., TAYLOR, G., BENCE, N. F., KOPITO, R., SEO, B. B., YAGI, T., YAGI, A., KLINEFELTER, G., COOKSON, M. R., GREENAMYRE, T. Intersecting pathways to neurodegeneration in Parkinson's disease: effects of the pesticide rotenone on DJ-1,  $\alpha$ -synuclein, and the ubiquitin-proteasome system. **Neurobiology of disease**, v. 22, p. 404-420, 2006.

BOVÉ, J.; PROU, D.; PERIER, C.; PRZEDBORSKI, S. Toxin-Induced models of Parkinson's disease. **The journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 2, p. 484-494, 2005.

BRAAK, H., DEL TREDICI, K., BRATZKE, H., HAMM-CLEMENT, J., SANDMANN-KEIL, D., RUB, U. Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease: preclinical and clinical stages. **J. Neurol.**, v. 249, p. 1-5, 2002.

CHAUDHUR, K.R.; HEALY, D.G.; SCHAPIRA, A.H.V. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. **Lancet Neurol.**, v. 5, p. 235-245, 2006.

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

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

DI MONTE, D. A. The environmental and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins? **The lancet Neurology**, 2003.

DIAZ-CORRALES, F.J., ASANUMA, M., MIYAZAKI, I., MIYOSHI, K., OGAWA, N. Rotenone induces aggregation of  $\gamma$ -tubulin protein and subsequent disorganization of the centrosome: relevance to formation of inclusion bodies and neurodegeneration. **Neuroscience**, v. 133, p. 117-135, 2005.

DRECHSEL, D.A.; PATEL, M. Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. **Free Radical Biology & Medicine**, 2008.

FAHN, S.; SULZER, D. Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease. **The journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics**, v. 1, p. 139-154, 2004.

FERRO, M.M., BELISSIMO, 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**, v. 148, p. 78-87, 2005.

GAO, HUI. MING.; LIU, B.; WANGGIN, Z.; JAU-SHYONG, H. Distinct role of microglia in rotenone-induced degeneration in dopamine neurons. **J. Neurosci**, v. 22, p. 782-790, 2002.

GAO, HUI. MING.; LIU, B.; WANGGIN, Z.; JAU-SHYONG, H. Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 24, p. 395-400, 2003.

GERLACH, M., RIEDERER, P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. **J. Neural Transm.**, v. 103, p. 987-1041, 1996.

GEVAERD, M.S., MIYOSHI, E., SILVEIRA, R., CANTERAS, N.S., TAKAHASHI, R.N., DA CUNHA, C. L-DOPA restores striatal dopamine level but fails to reverse MPTP-induced memory deficits in rats. **Int. J. Neuropsychopharmacol.**, v. 4, p. 361-370, 2001.

GREENAMYRE, J. T., BETARBET, R., SHERER, T.B. The rotenone model of Parkinson's disease: genes, environment and mitochondria. **Parkinsonism and Related Disorders**, p. 59-64, 2003.

GRIVENNIKOVA, V.G., VINOGRADOV, A.D. Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1757, p. 553-561, 2006.

KLOCKGETHER, T. Parkinson's disease: clinical aspects. **Cell and Tissue Research**, v. 318, p. 115-120, 2004.

LAYFIELD, R., CAVEY, J. R., LOWE, J. Role of ubiquitin-mediated proteolysis in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. **Ageing Research reviews**, p. 343-356, 2003.

LENAZ, G., FATO, R., GENOVA, M. L., BERGAMINI, C., BIANCHI, C., BIONDI, A. Mitochondrial complex I: structural and functions aspects. **Biochimica and Biophysica Acta**, p. 1406-1420, 2006.

LIMA, M.M.S.; REKSIDLER, A.B.; ZANATA, S.M.; MACHADO, H.B.; TUFIK, S.; VITAL, M.A.B.F. Different parkinsonism models produced time-dependent induction COX-2 in the substantia nigra in rats. **Brain Research**, v. 1101, p. 117-125, 2007.

MEREDITH, G. E., HALLIDAY, G. M., TOTTERDELL, S. A critical review of the development and importance of proteinaceous aggregates in animal models of Parkinson's disease: new insights into Lewy body formation. **Parkinsonism and Related Disorders**, p. 191-202, 2004.



MORRIS, M.E., IANSEK, R. Characteristics of motor disturbance in Parkinson's disease and strategies for movement rehabilitation. **Human Movement Science**, v. 15, p. 649-669, 1996.

NEHRU, B., VERMA, R., KHANNA, P., SHARMA, S.K. Behavioral alterations in rotenone model of Parkinson's disease: Attenuation by co-treatment of centrophenoxine. **Brain Research**, v. 1201, p. 122-127, 2008.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 2 ed. San Diego: Academic Press; 1986.

PERIER, C., BOVÉ, J., PRZEDBORSKI, S. The rotenone model of Parkinson's disease. **Trends in Neurosciences**, 2003.

PERRY, J.C., VITAL, M.A.B.F., FRUSSA-FILHO, R., TUFIK, S., PALERMO-NETO, J. Monosialoganglioside (GM<sub>1</sub>) attenuates the behavioural effects of long-term haloperidol administration in supersensitive rats. **European Neuropsychopharmacology**, v. 14, p. 127-133, 2004.

PERRY, J.C., HIPÓLIDE, D.C., TUFIK, S., MARTINS, R.D., DA CUNHA, C., ANDREATINI, R., VITAL, M.A.B.F. Intra-nigral MPTP lesion in rats: Behavioral and autoradiography studies. **Experimental Neurology**, v. 195, p. 322-329, 2005.

PRZEDBORSKI, S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 11, p. S3-S7, 2005.

QUIK, M., BORDIA, T., O'LEARY, K. Nicotinic receptors as CNS targets for Parkinson's disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, p. 1224-1234, 2007.

RADAD, K., RAUSCH, W. D., GILLE, G. Rotenone induces cell death in primary dopaminergic culture by increasing ROS production and inhibiting mitochondrial respiration. **Neurochemistry International**, v. 49, p. 379-386, 2006.

REKSIDLER, A.B.; LIMA, M.M.S.; ZANATA, S.M.; MACHADO, H.D.; DA CUNHA, C.; ANDREATINI, R.; TUFIK, S.; VITAL, M.A.B.F. The COX-2 inhibitor parecoxib produces neuroprotective effects in MPTP-lesioned rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 560, p. 163-175, 2007.

ROJO, A.I., CAVADA, C., SAGARRA, M.R., CUADRADO, A. Chronic inhalation of rotenone or paraquat does not induce Parkinson's disease symptoms in mice or rats. **Experimental Neurology**, v. 208, p. 120-126, 2007.

ROSS, C.A., SMITH, W.W. Gene-environment interactions in Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 13, p. S309-S315, 2007.

ROUSE, S.T., MARINO, M.J., BRADLEY, S.R., AWAD, H., WITTMANN, M., CONN, P.J. Distribution and roles of metabotropic glutamate receptors in the basal ganglia motor circuit: implications for treatment of Parkinson's disease and related disorders. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 88, p. 184-190, 2000.

SARAVANAN, K.S., SINDHU, K.M., MOHANAKUMAR, K.P. Acute intranigral infusion of rotenone in rats causes progressive biochemical lesions in the striatum similar to Parkinson's disease. **Brain Research**, p. 147-155, 2005.

SARAVANAN, K.S., SINDHU, K.M., SENTHILKUMAR, K.S., MOHANAKUMAR, K.P. L-deprenyl protects against rotenone-induced, oxidative stress-mediated dopaminergic neurodegeneration in rats. **Neurochemistry International**, v. 49, p. 28-40, 2006.

SEDELIS, M., SCHWARTING, R.K.W., HUSTON, J.P. Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Behavioral Brain Research**, v. 125, p. 109-125.

SINDHU, K. M., BANERJEE, R., SENTHILKUMAR, K. S., SARAVANAN, K. S., RAJU, B. C., RAO, J. M., MAHANAKUMAR, K. P. Rats with unilateral median forebrain bundle, but not striatal or nigral, lesions by the neurotoxins MPP<sup>+</sup> or rotenone display differential sensitivity to amphetamine and apomorphine. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 84, p. 321-329, 2006.

SHERER, T.B., BATARDET, R., KIM, J. H., GREENAMYRE, J. T. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and  $\alpha$ -synuclein aggregation. **Experimental neurology**, p. 9-16, 2003 (a).

SHERER, T.B., BATARDET, R., KIM, J. H., GREENAMYRE, J. T. Selective microglial activation in the rat rotenone model of Parkinson's disease. **Neuroscience Letters**, p. 87-90, 2003 (b).

SHOHAMY, D.; MYERS, C.E.; GROSSMAN, S.; SAGE, J.; GLUCK, M.A. The role of dopamine cognitive sequence learning: evidence from Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 156, p. 191-199, 2005.

TADA-OIKAWA, S., HIRAKU, Y., KAWANISHI, M., KAWANISHI, S. Mechanism for generation of hydrogen peroxide and change of mitochondrial membrane potential during rotenone-induced apoptosis. **Life Sciences**, v. 73, p. 3277-3288, 2003.

TANILA, H., BJORKLUND, M., RIEKKINEN Jr., P. Cognitive changes in mice following moderate MPTP moderate exposure. **Brain Res. Bull.**, v. 45, p. 577-582, 1998.

TORREILLES, F., SALMAN-TABCHEH, S., GUÉRIN, M.C., TORREILLES, J. Neurodegenerative disorders: the role of peroxynitrite. **Brain Research Reviews**, v. 30, p. 153-163, 1999.

WU, Y-N., JOHNSON, S.W. Rotenone potentiates NMDA currents in substantia nigra dopamine neurons. **Neuroscience Letters**, v. 421, p. 96-100, 2007.

ZIGMOND, M.J. Do compensatory processes underlie the preclinical phase of neurodegenerative disease? Insights from an animal model of parkinsonism. **Neurobiology of disease**, v. 4, p. 247-253, 1997.

ZIGMOND, M.J., STRICKER, E.M. Parkinson's disease studies with an animal model. **Life Sciences**, v. 35, p. 5-18, 1984.