

**ANGELA REKSIDLER BRAGA**

**EFEITOS DO PARECOXIB - UM INIBIDOR DA COX 2 - NO MODELO  
DE PARKINSONISMO INDUZIDO POR MPTP EM RATOS**

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Aparecida B. F.  
Vital

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Andreatini

CURITIBA  
2005

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

1 Ao sétimo dia do mês de novembro do ano de dois mil e cinco, às 14 horas, no Anf. 10,  
2 do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a  
3 Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado de autoria da Pós-Graduanda em  
4 Farmacologia, **ÂNGELA REKSIDLER BRAGA**, intitulada: "Efeitos do Parecoxib –  
5 um inibidor da COX-2- no modelo de Parkinsonismo induzido por MPTP em ratos",  
6 sob orientação da Profª Drª Maria Aparecida Barbato Frazão Vital, e composta pelos  
7 professores: Dr. HELIO GUIDONI TEIVE (Neurologia-UFPR) e Dr. Cláudio da Cunha  
8 ( Farmacologia-UFPR). A Banca Examinadora iniciou os trabalhos. A candidata teve  
9 quarenta e cinco minutos para expor oralmente seu trabalho, sendo em seguida argüida  
10 durante quinze minutos por cada um dos membros da Banca, e tendo trinta minutos para  
11 responder a cada uma das argüições. No final a Comissão Examinadora emitiu o  
12 seguinte parecer de acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação  
13 em Farmacologia, a Pós-Graduanda foi aprovada. Para a publicação  
14 o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas por sua  
15 orientadora. Nada mais havendo a tratar, a Presidente deu por encerrada a sessão, da  
16 qual foi lavrada a presente ata, que será assinada pela Presidente e pelos demais  
17 Membros da Banca Examinadora, em Curitiba, 07 de novembro de 2005.  
18

Drª Maria Aparecida Barbato Frazão Vital (Orientadora)

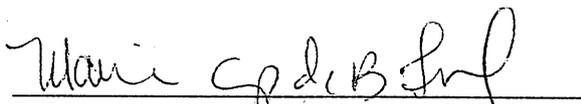
Dr. Helio Guidoni Teive (Deptº Neurologia-UFPR)

Dr. Cláudio da Cunha (Deptº Farmacologia-UFPR)

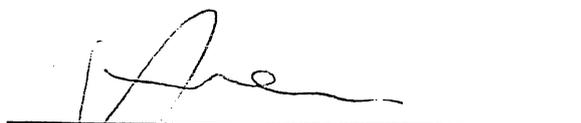


## PARECER

A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado “EFEITOS DO PARECOXIB – UM INIBIDOR DA COX-2 – NO MODELO DE PARKINSONISMO INDUZIDO POR MPTP EM RATOS”, de autoria da Pós-Graduanda, **ÂNGELA REKSIDLER BRAGA**, e composta pelos Professores Dr<sup>a</sup> Maria Aparecida Barbato Frazão Vital, (orientadora-UFPR), Dr. Helio Guidoni Teive (Dept<sup>o</sup> Neurologia – UFPR), Dr. Cláudio da Cunha (Dept<sup>o</sup> Farmacologia - 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 orientadora. Em Curitiba, 07 de novembro de 2005.

  
Dr<sup>a</sup> Maria Aparecida Barbato Frazão Vital

  
Dr. Helio Guidoni Teive

  
Dr. Cláudio da Cunha

Agradeço a Deus

Aos meus familiares

Aos meus amigos

Aos meus Professores do Depto. de Farmacologia e

ao Professor Dr. Sílvia Zanata do depto. de Patologia

Agradeço a minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria A. B. F. Vital (pela dedicação e por seu exemplo)

Agradeço ao meu co-orientador Prof. Dr. Roberto Andreatini

Agradeço ao Prof. Dr. Cláudio Da Cunha

Agradeço a farmacêutica Sílvia Gennari e aos funcionários do biotério e do Depto. de Farmacologia

Agradeço aos meus colegas (e grandes amigos) do curso de mestrado

Agradeço ao meu marido Marcelo (companheiro, amigo e incentivador)

Agradeço a vida dos animais que foram utilizados nos experimentos

*Obrigada pela oportunidade e incentivo que vocês me proporcionaram de poder enxergar a vida de maneira diferente, encontrar a beleza da observação e de fazer ciência.*

*Obrigada pela chance de poder mudar o mundo!*

Angela Reksidler Braga



## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
RESUMO.....	viii
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>02</b>
1.1 DOENÇA DE PARKINSON.....	02
1.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA DP.....	03
1.2.1 Déficits Cognitivos na DP.....	03
1.3 CARACTERÍSTICAS NEUROQUÍMICAS E NEUROPATOLÓGICAS DA DP.....	04
1.4 ETIOLOGIA DA DP.....	07
1.5 MODELOS ANIMAIS DA DP.....	08
1.5.1 modelo animal de parkinsonismo induzido por MPTP.....	09
1.6 INFLAMAÇÃO E DP.....	10
1.6.1 Neuroinflamação e DP.....	13
1.7 ANTIINFLAMATÓRIOS E DP.....	14
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
3.1 ANIMAIS.....	17
3.2 DROGAS.....	17
3.3 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO COM PARECOXIB.....	17
3.4 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.....	17
3.5 OBSERVAÇÕES COMPORTAMENTAIS.....	18
3.5.1 Campo aberto.....	18
3.5.2 Labirinto aquático de Morris.....	19
3.5.2.1 Versão <i>cued test</i> .....	20
3.6 ENSAIOS BIOQUÍMICOS.....	20
3.6.1 Extração de proteínas.....	20
3.6.2 Western blotting.....	21
3.6.3 Análise densitométrica.....	21
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
4.1 RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DO TESTE DO CAMPO ABERTO.....	22
4.2 RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DO TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO - VERSÃO <i>CUED</i> .....	25
4.3 RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO DA TH POR WESTERN BLOTTING.....	29
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>42</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>43</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

AD - Doença de Alzheimer  
AIE – antiinflamatório esteroideal  
AINE - antiinflamatório não-esteroideal  
ATP - adenosina trifosfato  
ATV - área tegmental ventral  
5-HT - serotonina  
CL - corpúsculo de Lewy  
COX - ciclooxigenase  
COMT - catecol-O-metiltransferase  
DA - dopamina  
DAT - transportador de dopamina  
DOPAC - 3,4-dihidroxi-fenilacético  
DP - Doença de Parkinson  
GABA - ácido  $\gamma$ -aminobutírico  
HVA - ácido homovanílico  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio  
Ig - imunoglobulina  
IL - interleucina  
i.v.- via intravenosa  
LPS - lipopolissacarídeo  
MAO-B - monoamino oxidase-B  
MPDP<sup>+</sup> - 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinium  
MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina  
MPP<sup>+</sup> -1-metil-4-fenilpiridina  
NO – óxido nítrico  
PG - prostaglandinas  
ROS - espécies reativas de oxigênio  
6 - OHDA - 6 - hidroxidopamina  
SN - Substância negra  
SNC - sistema nervoso central  
SNpc - Substância negra parte compacta  
TH - tirosina hidroxilase  
TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral  $\alpha$   
VMAT-2 - transportador vesicular da monoamina 2

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da via nigro-estriatal normal e na DP e imunohistoquímica marcando inclusões intracelulares em neurônios dopaminérgicos na SNpc.....	05
Figura 2: Representação esquemática do metabolismo do MPTP e das vias do MPP <sup>+</sup> intracelular.....	10
Figura 3: Campo aberto.....	19
Figura 4: Labirinto aquático de Morris versão <i>cued test</i> .....	20
Figura 5: Efeitos da administração de parecoxib em ratos tratados com MPTP intranigral no parâmetro de latência no teste do campo aberto.....	22
Figura 6: Efeitos da administração de parecoxib em ratos tratados com MPTP intranigral no parâmetro de locomoção no teste do campo aberto.....	23
Figura 7: Efeitos da administração de parecoxib em ratos tratados com MPTP intranigral no parâmetro de levantar no teste do campo aberto.....	24
Figura 8: Efeitos da administração de parecoxib em ratos tratados com MPTP intranigral no parâmetro de imobilidade no teste do campo aberto.....	25
Figura 9: Efeitos da administração de parecoxib em ratos tratados com MPTP intranigral no teste do Labirinto Aquático de Morris – versão <i>cued test</i> durante 12 dias, no parâmetro da latência.....	26
Figura 10: Efeitos da administração de parecoxib (2 mg/kg diariamente) em ratos tratados com MPTP intranigral no teste do Labirinto Aquático de Morris –	

versão *cued test* durante 12 dias, no parâmetro de velocidade.....26

Figura 11: Trajetórias representativas dos grupos de animais submetidos ao labirinto aquático de Morris - versão *cued test*.....28

Figura 12: Western blotting da TH na SN de ratos controle, sham e MPTP tratados com salina e parecoxib sacrificados 24 h após a cirurgia.....29

Figura 13: Western blotting da TH no estriado de ratos controle, sham e MPTP tratados com salina e parecoxib sacrificados 24 h após a cirurgia.....30

Figura 14: Western blotting da TH na SN de ratos controle, sham e MPTP tratados com salina e parecoxib sacrificados 7 dias após a cirurgia.....31

Figura 15: Western blotting da TH no estriado de ratos controle, sham e MPTP tratados com salina e parecoxib sacrificados 7 dias após a cirurgia.....31

Figura 16: Western blotting da TH na SN de ratos controle, sham e MPTP tratados com salina e parecoxib sacrificados 14 dias após a cirurgia.....32

Figura 17: Western blotting da TH no estriado de ratos controle, sham e MPTP tratados com salina e parecoxib sacrificados 14 dias após a cirurgia.....33

Figura 18: Western blotting da TH na SN de ratos controle, sham e MPTP tratados com salina e parecoxib sacrificados 21 dias após a cirurgia.....33

Figura 19: Western blotting da TH no estriado de ratos controle, sham e MPTP tratados com salina e parecoxib sacrificados 21 dias após a cirurgia.....34

## RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma das mais comuns desordens neurodegenerativas, que ocorre de maneira progressiva e irreversível com maior incidência em idosos. Além das alterações motoras e autonômicas, já foi demonstrado que os pacientes com DP apresentam redução nos processos cognitivos.

A DP assim como seu modelo animal induzido por MPTP possuem como característica induzirem o aumento da expressão da enzima ciclooxigenase tipo 2 (COX-2), que por sua vez catalisa a produção de prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>). As enzimas COX estão envolvidas com alterações complexas de muitas patologias do sistema nervoso central (SNC). A expressão aumentada da COX-2 tem sido observada em neurônios lesados e degenerados, o que sugere que a COX-2 contribua para o dano neuronal. Assim, neste trabalho buscou-se investigar a influência do tratamento com o parecoxib, que tem como alvo primário a isoenzima COX-2, na possível reversão de alterações motoras e cognitivas e do conteúdo de tirosina hidroxilase (TH) na substância negra (SN) e no estriado de ratos tratados com 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) intranigral através de cirurgia estereotáxica.

Os animais foram divididos em grupos da seguinte maneira: MPTP+salina, MPTP+parecoxib, Sham+salina, Sham+parecoxib, controle+salina e controle+parecoxib. Os animais do grupo MPTP foram submetidos à cirurgia estereotáxica e receberam a microinfusão bilateral de MPTP diretamente na SN. Para a cirurgia foram utilizadas as seguintes coordenadas estereotáxicas: antero-posterior (AP): 5.0 mm a partir do bregma; médio-lateral (ML):  $\pm 2.1$  mm a partir da linha média e dorso-ventral (DV): -7.7 mm a partir da calota craniana e foram injetados 100  $\mu$ g de MPTP em 1  $\mu$ l de solução salina com um fluxo de 0,33  $\mu$ l/min. O grupo Sham foi submetido à cirurgia, no entanto não recebeu MPTP e o grupo controle não foi submetido à cirurgia estereotáxica.

O tratamento farmacológico utilizou o parecoxib (Bextra, Pharmacia Pfizer Ltda) dissolvido em solução salina 0,9%, nas doses de 10 mg/kg, 1 hora antes da cirurgia estereotáxica e na dose de 2 mg/kg durante vinte e dois dias após a cirurgia dias após a cirurgia estereotáxica. O comportamento motor dos grupos foi avaliado, através do teste do campo aberto nos tempos: 24 horas, 7, 14 e 21 dias após a cirurgia. Os resultados apresentaram evidências de um efeito neuroprotetor conferido pelo parecoxib, uma vez que 24 horas após a cirurgia não se observou redução nos parâmetros de locomoção e levantar, nestes animais em comparação ao grupo controle+salina. Além disso, verificamos a redução do tempo de imobilidade, em comparação ao grupo controle+salina. No entanto, 7 e 14 dias após a cirurgia o parecoxib apresentou um possível efeito modulatório sobre a atividade dopaminérgica dos animais lesados, haja vista que o grupo MPTP+salina apresentou hiperlocomoção, nestes tempos, enquanto que o grupo MPTP+parecoxib não diferiu do grupo controle+salina.

O tratamento com parecoxib preservou a habilidade dos animais lesados em realizar a tarefa do labirinto aquático de Morris – versão *cued test*, indicando um efeito restaurador na memória de hábito, avaliados neste teste.

Os dados de western blotting também indicam que o parecoxib apresentou efeito neuroprotetor quanto ao conteúdo de TH na SN nos tempos de 7, 14 e 21 dias após a cirurgia estereotáxica, ao passo que este efeito neuroprotetor foi visto no estriado apenas nos tempos de 14 e 21 dias. Sugere-se que o MPTP produziu redução no conteúdo de TH no estriado, de forma tardia, em relação à SN. Este efeito pode ser em decorrência da extensão da lesão. O retardo no aparecimento da depleção de TH no estriado sugere que o parecoxib apresente um efeito neuroprotetor por preservar, de alguma forma, o conteúdo de TH dos neurônios. Portanto, esse efeito não se deve a uma possível indução, *per se*, da expressão de TH nos neurônios estriatais.

Portanto, o MPTP pode ser considerado um bom modelo animal para o estudo das alterações motoras, cognitivas e bioquímicas da DP. Os resultados do presente estudo indicaram que o parecoxib preveniu a neurotoxicidade do MPTP neste modelo animal da DP.

## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the one of the most common neurodegenerative disorders. Besides the motor and autonomic impairments, PD patients present reduction of cognitive processes.

PD and their most known animal model, MPTP, share as a remarkable characteristic, the specific induction of cyclooxygenase-2 (COX-2) protein, which by itself, catalyses the production of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). The up-regulation of COX-2 has been described in neuronal lesions, suggesting that enzyme contributes neuronal damages.

The objective of this study was to investigate the influence of parecoxib, a selective COX-2 inhibitor, in the motor, cognitive and biochemical parameters of MPTP-lesioned rats.

The groups of rats were divided randomly as followed: MPTP+saline, MPTP+parecoxib, Sham+saline, Sham+parecoxib, control+saline and control+parecoxib. Stereotaxic surgeries were proceeded with bilateral intranigral infusions of 1 µL of MPTP (100 µg/1µL) or Sham procedures. The following coordinates were used: - 5.0mm from bregma; mediolateral (ML): ± 2.1mm from midline; dorsoventral (DV): -7.7mm from skull.

The pharmacological treatment used parecoxib (Bextra, Pharmacia Pfizer Ltda) diluted in saline 0.9% at 10 mg/kg 1 h before the surgeries and 2 mg/kg daily, until the end of the experiments. Open field was performed 24 h, 7, 14 and 21 days after the surgeries. The results presented evidences of a neuroprotective effect conferred by parecoxib 24 h after surgery, in locomotion parameter. On the other hand, 7 and 14 days parecoxib showed a possible modulatory effect on the dopaminergic activity, of the MPTP-lesioned rats.

Water maze task – cued test version was performed to evaluate the habit memory, which is dependent on the striata. Parecoxib treatment showed a preservation effect in that parameter.

Western blotting data also indicated a neuroprotective effect, attributed by the parecoxib treatment, on the Tyrosine hydroxylase content present in the SN (TH) at the timepoints 7, 14 and 21 days after surgeries. Nevertheless, this neuroprotective effect was observed only 14 and 21 days in the striatum, suggesting that the size of the lesion is important for determine the TH response, present in the tissue.

In summary, the MPTP model can be considered a good animal model to study the motor, cognitive and biochemical alterations present in PD. The present results demonstrated that parecoxib treatment prevented the neurotoxicity of MPTP in this animal model.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson (DP) é uma das mais comuns desordens neurodegenerativas. Cerca de 1 a 3% da população com mais de 65 anos de idade é afetada (EBERHARDT E SCHULZ, 2003; LANG E LOZANO, 1998). Há evidências de que atualmente existe um aumento na prevalência da DP (ORR *et al.*, 2002).

A média de idade para ocorrência da DP é de 55 anos, sendo que o seu risco de desenvolvimento aumenta em cinco vezes por volta dos 70 anos de idade (HALD E LOTHARIUS, 2005). Contudo, podem-se encontrar pacientes com início da doença mais precoce, antes dos 40 anos e até mesmo abaixo dos 21 anos de idade (MENESES E TEIVE, 2003). É a segunda doença neurodegenerativa relacionada à idade depois da Doença de Alzheimer (AD) (DAUER E PRZEDBORSKI, 2003; EBERHARDT E SCHULZ, 2003).

A evolução da DP é progressiva, desencadeada pela perda neuronal irreversível e incapacitante e é caracterizada por desordens de movimento (MENESES E TEIVE, 1996). Não se observa prevalência por sexo (LEV *et al.*, 2003; ORR *et al.*, 2002). Os sintomas clínicos são caracterizados por anormalidades motoras que incluem tremor, fraqueza muscular, instabilidade postural e escassez de movimentos voluntários (TEISMANN *et al.*, 2003). Estes sintomas podem ser acompanhados por disfunções autonômicas e distúrbios psico-orgânicos como depressão e apatia (BIRKMAYER E RIEDERER, 1985; VALLDEORIOLA *et al.*, 1997; CALNE, 2001).

Os sintomas clínicos da DP foram descritos pela primeira vez em 1817 por James Parkinson (médico inglês e membro do colégio real de cirurgiões) no seu clássico “Ensaio sobre a paralisia agitante” (DAUER E PRZEDBORSKI, 2003; TEIVE E MENESES, 1996). Em 1920, Jean-Martin Charcot reconheceu o pioneirismo de James Parkinson na descrição da paralisia agitante denominando-a com o nome do seu descobridor (BURCH E SHEERIN, 2005). E mesmo após mais de um século do descobrimento da DP a sua patogênese ainda não é completamente entendida (SHIMOHAMA, 2003), e o seu tratamento é basicamente sintomático (LEV *et al.*, 2003).

A doença é também caracterizada por uma maciça e progressiva destruição dos neurônios dopaminérgicos na substância negra (SN) (KUROSAKI, *et al.*, 2004). No estriado também há perda dos metabólitos da dopamina (DA): ácido homovanílico (HVA) e 3,4-dihidroxi-fenilacético (DOPAC) (LANG E LOZANO, 1998; MIZUNO, 1999), e redução da atividade de enzimas envolvidas na síntese de DA, como a tirosina hidroxilase (TH) e DOPA-descarboxilase (GERLACH E RIEDERER, 1996).

## 1.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA DP

Clinicamente é caracterizada pelos seguintes sinais cardinais: tremor em repouso, lentidão nos movimentos voluntários, rigidez e instabilidade postural (FAHN, 2000). Esses sintomas podem ser acompanhados por anomalias posturais, sintomas vegetativos (que incluem aumento de salivação, seborréia, constipação, vermelhidão e sudorese) e distúrbios psico-orgânicos como depressão, apatia, e demência (GERLACH E RIEDERER, 1996). Anormalidades de humor e cognição também ocorrem freqüentemente; pacientes se tornam passivos ou retraídos, com falta de iniciativa; eles permanecem calados a menos que sejam encorajados a participarem de atividades. Respondem demoradamente a questões, e os processos cognitivos são vagarosos (“bradifrenia”) (DAUER E PRZEDBORSKI, 2003). Usualmente existe uma assimetria nos sinais e sintomas motores extrapiramidais (GELB *et al.*, 1999).

### 1.2.1 Déficits cognitivos na DP

Além das alterações motoras e autonômicas, já foi demonstrado que os pacientes com DP apresentam redução dos processos cognitivos (LINDER *et al.*, 1999). Ocorre a diminuição de iniciativa, do interesse pelos acontecimentos do cotidiano e das coisas pessoais ou familiares, representando o estágio depressivo da DP além do mais sinais de demência podem ocorrer (ANDRADE E FERRAZ, 1996). A deficiência cognitiva é um sintoma comum em pacientes com DP e tem sido freqüentemente descrita nos estágios iniciais da DP, fase pré-sintomática, quando as alterações motoras ainda não se mostram evidentes (CALNE, 2001; FERRO *et al.*, 2005).

DA CUNHA E COLS. 2001, sugerem que os déficits cognitivos que ocorrem na DP estão provavelmente relacionados ao prejuízo na aquisição da memória e no processo de retenção. Em pacientes com DP, as alterações cognitivas encontradas envolvem lentidão no processamento de informações e prejuízo na aquisição das memórias de curto prazo (VALLDEORIOLA *et al.*, 1997), esse tipo de memória é classificado levando-se em conta a natureza ou o tempo de duração da informação, e está envolvida com o armazenamento de informações por minutos a horas; podendo posteriormente formar memória de longa duração (duram muitos meses ou anos) (IZQUIERDO, 2002).

A memória também pode ser classificada de acordo com a natureza da informação processada em declarativa e não-declarativa. A memória declarativa ou explícita é a memória a qual o indivíduo tem a habilidade de lembrar conscientemente das informações; a memória não-declarativa ou implícita está relacionada com fatores involuntários e inconscientes, sendo adquirida e evocada automaticamente (HAY *et al.*, 2002; DANION *et al.*, 2001).

Uma terceira forma de classificação da memória envolve a função. Um exemplo deste tipo de memória é a operacional ou memória de trabalho, que consiste na capacidade do indivíduo reter uma determinada informação por alguns segundos ou minutos enquanto o trabalho está sendo realizado. Este tipo de memória diferencia-se das demais por não produzir arquivos e seu processamento é acompanhado por poucas alterações bioquímicas dependentes, principalmente, do córtex pré-frontal (IZQUIERDO, 2002).

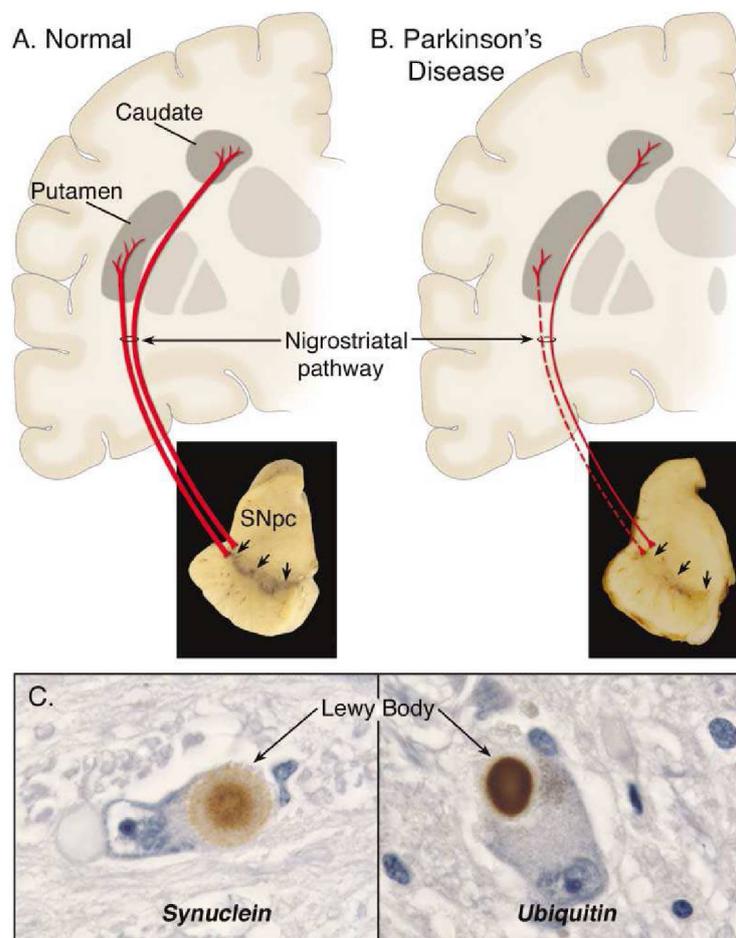
Neste sentido, a redução da atividade dopaminérgica no estriado e no lobo frontal na DP pode provocar prejuízo na memória de trabalho, dificultando o processo da memória declarativa que requer estratégias operacionais (STEBBINS *et al.*, 1999).

E desta forma, os déficits cognitivos observados na DP são principalmente sobre o funcionamento visual-espacial, memória e execução de funções. Os déficits de memória incluem: aprendizados de procedural, memória de trabalho e defeitos na retenção de memória (DA CUNHA *et al.*, 2001).

### 1.3 CARACTERÍSTICAS NEUROQUÍMICAS E NEUROPATOLÓGICAS DA DP

Os sinais patológicos são: perda de neurônios dopaminérgicos da SN (ORR, 2002) e presença de inclusões citoplasmáticas chamadas de corpúsculo

de Lewy (CL) (DAUER E PRZEDBORSKI, 2003). A via dopaminérgica nigroestriatal é composta por neurônios dopaminérgicos cujos corpos celulares se localizam na substância negra parte compacta (SNpc) e projetam seus axônios para o estriado (PRZEDBORSKI, 2005) (Figura 1).



**Figura 1:** Representação esquemática da via nigroestriatal normal (A) e na DP (B). Em C imunohistoquímica marcando inclusões intracelulares (CL) em neurônios dopaminérgicos na SNpc. Extraído de: (DAUER E PRZEDORSKI, 2003).

Os CL são agregados eosinofílicos intracitoplasmáticos compostos por uma variedade de proteínas como:  $\alpha$ -sinucleína, parkina, ubiquitina e neurofilamentos (TOGO *et al.*, 2001). E outras anormalidades histológicas podem ser encontradas em diferentes sistemas celulares dopaminérgicos e não-dopaminérgicos (DAUER E PRZEDORSKI, 2003).

A degeneração de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal leva a redução dos níveis de DA no estriado e em outros núcleos dos gânglios da base (GERLACH E RIEDERER, 1996). Os gânglios da base formam um grupo de núcleos subcorticais que controlam os movimentos voluntários; são eles: estriado (caudado e putamen), globo pálido (interno e externo), núcleo subtalâmico, e SN (pars compacta e reticulata) (BURCH E SHEERIN, 2005).

A deficiência de DA, que é mais pronunciada no putamen, é característica em todas as formas de manifestações da doença, não ocorrendo em nenhuma outra doença neurodegenerativa. O caudado apresenta uma deficiência intermediária de DA enquanto o estriado ventral é menos afetado (REYNOLDS E GARRETT, 1986; HOSTINK E MORRISH, 1999).

Correlações entre análises clínicas e bioquímicas, mostram que os sintomas característicos da DP começam a aparecer quando aproximadamente 80% e 60% do conteúdo de DA no putamen e na SNpc respectivamente é perdido (DAUER E PRZEDBORSKI, 2003). As enzimas responsáveis pela degradação da DA, catecol-O-metiltransferase (COMT) e monoamino oxidase-B (MAO-B) não apresentam suas atividades reduzidas. Em contraste com esses distúrbios pré-sinápticos, os receptores pós-sinápticos de DA no estriado aparecem inalterados e completamente funcionais sendo isso evidenciado por estudos de *binding* de receptor (GERLACH E RIEDERER, 1996).

Em fases avançadas da doença ocorrem mudanças em outros neurotransmissores e em outros sistemas de neuromoduladores. A redução da noradrenalina está relacionada com a destruição de neurônios noradrenérgicos e é responsável por certos sintomas não motores da DP, como por exemplo, demência, depressão e estados vegetativos (GERLACH E RIEDERER, 1996).

Existe queda da concentração de serotonina (5-HT) demonstrada em todas as regiões cerebrais, embora não existam evidências de processos degenerativos envolvidos. Ocorre também uma diminuição na atividade da enzima glutamato descarboxilase, enzima responsável pela biossíntese do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), que pode ser consequência da neurodegeneração dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal (GERLACH E RIEDERER, 1996).

#### 1.4 ETIOLOGIA DA DP

Apesar de vários esforços feitos para esclarecer a origem da doença sua etiologia permanece um mistério, dificultando desta forma a prevenção de sua ocorrência (HUNOT, 2001; FERGER E TEISMANN, 2001).

De 5 a 10% dos casos da DP observam-se ligações entre a ocorrência da doença e mutações em um pequeno número de genes (forma familiar) (VILA E PRZEDBORSKI, 2004; HALD E LOTHARIUS, 2005).

Mutações na  $\alpha$ -sinucleína na forma familiar da DP são herdadas de maneira autossômica dominante, e as formas mutantes desta proteína apresentam uma função tóxica nas células dopaminérgicas (DAWSON E DAWSON, 2003; ERIKSEN *et al.*, 2005). Uma completa supressão da proteína  $\alpha$ -sinucleína não resulta no desenvolvimento do fenótipo da DP (ERIKSEN *et al.*, 2005). Além do mais, CHANDRA E COLS., 2004, demonstraram que a redução dos níveis da  $\alpha$ -sinucleína é terapêuticamente possível pois a redução da expressão desta proteína em camundongos é bem tolerada. A redução da expressão da  $\alpha$ -sinucleína foi benéfica pois preveniu a neurotoxicidade dopaminérgica mediada pelos altos níveis desta proteína e também preveniu a neurotoxicidade pela neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) em camundongos (DAUER, 2002).

Tem-se demonstrado que a forma monogênica do parkinsonismo causado por mutações da *parkina* (herdada de maneira recessiva) representa uma importante causa do parkinsonismo precoce sem histórico familiar, especialmente antes dos 30 anos de idade. Entretanto, mesmo quando o início ocorre entre idades de 30 e 45 anos, a *parkina* ainda é responsável por 8% dos casos isolados de parkinsonismo. O fenótipo gerado pela *parkina* é variável, porém não pode ser distinguido de casos não derivados dela (PERIQUET *et al.*, 2003).

Apesar das diferentes características clínicas e patológicas das formas de manifestação da DP, ambas (familiar e não-familiar) apresentam as mesmas anormalidades bioquímicas, principalmente em relação à depleção do conteúdo de DA mesencefálico (PRZEDBORSKI, 2005).

Teoricamente, a neurodegeneração progressiva pode ser provocada por uma exposição crônica a neurotoxinas dopaminérgicas, ou por uma breve exposição que leva ao início de uma cascata de eventos deletérios (DAUER E PRZEDBORSKI, 2003). O fato de que um grupo de jovens intoxicados com MPTP desenvolveu uma síndrome semelhante a DP (LANGSTON, 1983) é um exemplo de como uma toxina exógena pode mimetizar as características clínicas e patológicas da doença. Além do MPTP, alguns fatores ambientais e ocupacionais como o herbicida paraquat, que é similar estruturalmente ao MPP<sup>+</sup> (1-metil-4-fenilpiridina) (MPP<sup>+</sup> é o metabólito ativo do MPTP) e o inseticida rotenona, que apresenta toxicidade mitocondrial semelhante ao MPP<sup>+</sup>, são largamente utilizados e distribuídos no meio-ambiente e estão associados com um aumento da prevalência da doença (GORELL *et al*, 2004).

TANNER, 1992 demonstrou em estudos epidemiológicos em humanos, que há um aumento no risco de desenvolvimento da DP em residentes rurais expostos a herbicidas e pesticidas. Por outro lado, HERNAN e COLS, 2002 demonstram que fumantes e bebedores de café estão inversamente associados com o risco de desenvolver a doença. Reforçando desta maneira o conceito de que fatores ambientais podem interferir na susceptibilidade do desenvolvimento da DP (DAUER E PRZEDBORSKI, 2003).

Outra possibilidade para a causa, além das hipóteses genéticas e ambientais, é a neurodegeneração causada por toxinas endógenas, que podem ser originadas em virtude de erros em algumas vias metabólicas e que fatores, incluindo a inflamação também estariam envolvidos na patogênese da DP (SAIRAM *et al.*, 2002).

## 1.5 MODELOS ANIMAIS DA DP

Modelos animais são fundamentais para os avanços das ciências médicas, pois eles permitem um estudo dos mecanismos patogênicos e dos princípios terapêuticos do tratamento dos sintomas na doença humana. Uma vez compreendido os mecanismos causais da doença, os modelos animais também são importantes no desenvolvimento da terapêutica para o tratamento desta. Modelos animais refletem as características da doença no homem,

simulam as mudanças patológicas, histológicas e bioquímicas da doença e seus distúrbios funcionais (GERLACH E RIEDERER, 1996).

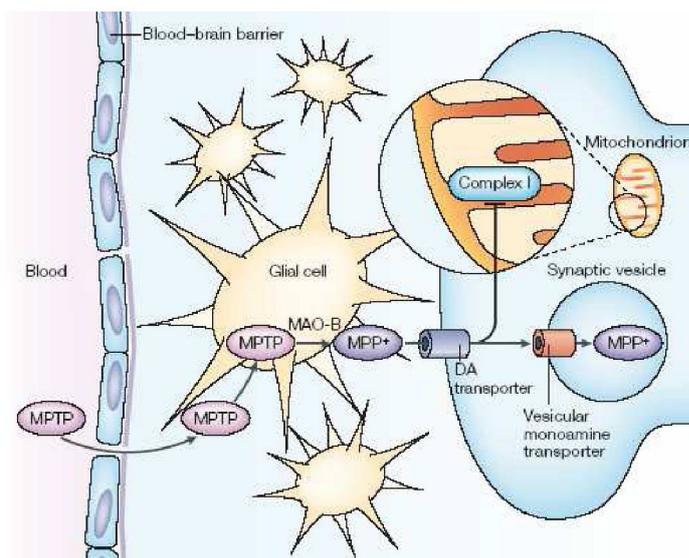
A DP é uma doença humana, e não se manifesta espontaneamente em animais, é somente observada através da administração de agentes neurotóxicos, como por exemplo, a utilização do MPTP (GERLACH E RIEDERER, 1996).

#### 1.5.1 Modelo animal de parkinson induzido por MPTP

O reconhecimento do MPTP como neurotoxina foi em 1982 quando um grupo de dependentes de drogas desenvolveu um parkinsonismo grave. A síndrome foi causada por uma auto-administração de um análogo de heroína sintética, que por sua vez continha como contaminante o MPTP, sendo este altamente lipossolúvel, fato que lhe confere a grande capacidade de cruzar a barreira hemato-encefálica (LANGSTON, 1983; BALLARD, 1985).

Uma vez no cérebro, a pró-toxina MPTP é oxidada a 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinium (MPDP<sup>+</sup>) pela MAO-B nas células da glia e em neurônios serotoninérgicos. Então, ele é convertido a MPP<sup>+</sup> (provavelmente por oxidação espontânea) que é a molécula tóxica, essa molécula, através de um mecanismo desconhecido, atravessa o espaço extracelular. Como a molécula do MPP<sup>+</sup> é polar, ela depende de carreadores de membrana plasmática para entrar nas células. O MPP<sup>+</sup> é um substrato de alta afinidade para o transportador de dopamina (DAT), bem como para o transportador de noradrenalina e serotonina (PRZEDBORSKI *et al*, 2001; DAUER E PRZEDBORSKI, 2003).

Dentro dos neurônios, o MPP<sup>+</sup> pode seguir por duas rotas principais: (1) Pode se ligar ao transportador vesicular da monoamina 2 (VMAT-2), que transloca o MPP<sup>+</sup> para dentro das vesículas sinaptossomais; esse seqüestro do MPP<sup>+</sup> ocorre para proteger as células da neurodegeneração induzida por MPTP, a toxina seqüestrada previne seu acesso à mitocôndria. (2) Pode se concentrar dentro da mitocôndria; quando isso ocorre, o MPP<sup>+</sup> bloqueia o complexo I, que interrompe a transferência de elétrons para a ubiquinona. Essa perturbação aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e diminui a síntese de adenosina tri-fosfato (ATP) (PRZEDBORSKI *et al*, 2001; DAUER E PRZEDBORSKI, 2003; VILA E PRZEDBORSKI, 2003 ) (Figura 2).



**Figura 2.** Representação esquemática do metabolismo do MPTP e das vias do  $MPP^+$  intracelular. Extraído de: (VILA E PRZEDBORSKI, 2003).

O MPTP causa uma síndrome parkinsoniana grave e irreversível que reproduz grande parte das características da DP, incluindo tremor, rigidez, movimentos vagarosos e instabilidade postural. (PRZEDBORSKI *et al.*, 2001). Em adição a esses prejuízos motores alguns autores têm mostrado que esta toxina produz prejuízos na memória não-declarativa de hábito (DA CUNHA *et al.*, 2001, 2002, 2003; PERRY *et al.*, 2004).

A infusão intranigral bilateral de MPTP em ratos leva a redução de 40 – 70% dos níveis estriatais de DA e prejuízo cognitivo que relaciona este modelo com a fase inicial da DP (DA CUNHA *et al.*, 2001; MIYOSHI *et al.*, 2002; PERRY *et al.*, 2004, 2005).

O MPTP produz uma lesão seletiva da via dopaminérgica nigroestriatal que mimetizam os sintomas e algumas alterações neuropatológicas da DP. Desta forma, o modelo que utiliza o MPTP é aceito para investigar o mecanismo patológico da doença (PRZYBYLKOWSKI, *et al.*, 2004).

## 1.6 INFLAMAÇÃO E DP

A inflamação é a primeira linha de defesa do organismo contra danos teciduais ou infecções, no entanto, uma resposta inflamatória excessiva pode tornar-se fonte de uma lesão tecidual ainda maior do que a provocada pelo

estímulo inicial. Os neurônios, como resultado de uma grande diferenciação celular, apresentam pouca ou nenhuma habilidade em se dividirem além de uma fraca capacidade de recuperação frente a lesões, tornam-se, portanto extremamente vulneráveis a processos auto-destrutivos, tais como os processos imune e inflamatório (GAO *et al.*, 2003). O ponto de partida da resposta inflamatória no cérebro é a ativação da população das células da glia, mais especificamente a microglia. Outros tipos celulares como oligodendrócitos, que também compõe a população de células da glia no cérebro, não são implicados neste tipo de ativação. A microglia, que por sua vez compõe o montante de células imunes residentes no cérebro, é sensível as menores variações na SN, podendo tornar-se ativada durante a maioria das condições neuropatológicas como DA, Esclerose Múltipla, AIDS, demência, traumas e DP (GAO *et al.*, 2003).

A ativação microglial acarreta numa contribuição para o aumento do dano neuronal, particularmente em doenças neurodegenerativas, onde a liberação de substâncias pró-inflamatórias e neurotoxinas acabam por potencializar a lesão (GAO *et al.*, 2003). 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 do processo inflamatório 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 estas células tenham um papel neuroprotetor através da promoção da sobrevivência neuronal, restauração de neurônios lesados, eliminação de substâncias tóxicas e reparação tecidual (GAO *et al.*, 2003).

Agentes infecciosos tais como bactérias, vírus, lipopolissacarídeo (LPS), e toxinas ambientais (metais pesados e pesticidas) podem ativar diretamente a microglia. A microglia ativada libera uma gama de neurotoxinas que subsequentemente induzem inflamação e posterior morte celular neuronal (GAO *et al.*, 2003).

A DP assim como seu modelo animal induzido por MPTP possuem como característica induzirem o aumento da expressão da enzima

ciclooxigenase tipo 2 (COX-2), que por sua vez catalisa a produção de prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>). Estudos epidemiológicos sugerem que a inflamação aumenta o risco de se desenvolver uma condição neurodegenerativa tal como a AD e DP (TEISMANN *et al.*, 2003).

De acordo com essa premissa, processos inflamatórios associados ao aumento da expressão de COX-2 e, portanto níveis elevados de PGE<sub>2</sub>, relacionam-se a eventos deletérios levando a neurodegeneração em várias condições patológicas (ALMER *et al.*, 2001; ANDREASSON *et al.*, 2001). Verificou-se que a expressão de COX-2 pode estar aumentada 16 h após a infusão intranigral de MPTP, 8-16 h após infusão intranigral de LPS e 4-24 h após infusão intranigral de 6-hidroxidopamina (6-OHDA), sugerindo que o processo inflamatório associado ao aumento de expressão de COX-2 está presente em modelos animais (LIMA *et al.*, submitted).

As enzimas COX estão envolvidas com alterações complexas de muitas patologias do sistema nervoso central (SNC). A expressão aumentada da COX-2 tem sido observada em neurônios lesados e degenerados, o que sugere que a COX-2 contribua para o dano neuronal (PRZYBYLKOWSKI, *et al.*, 2004).

A COX compreende três isoformas, COX-1, COX-2 e COX-3 sendo esta última isoforma um produto do gene da COX-1 e sua função ainda não foi estabelecida (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002). As enzimas COX são prontamente expressas em muitos tecidos incluindo o cérebro. O aumento da expressão da COX-2, quando comparada a COX-1, é observado em muitas condições patológicas do SNC e também em modelos experimentais como: após a injeção de ácido caínico, isquemia, lesões cerebrais, câncer, e doenças infecciosas do cérebro. A expressão da COX-2 também foi encontrada aumentada em cérebros de pacientes com AD, bem como na SN e no estriado de pacientes com DP em amostras *post-mortem* (PRZYBYLKOWSKI, *et al.*, 2004).

Evidências experimentais indicam que a inibição do processo inflamatório correlaciona-se com uma diminuição de lesões neuronais, fato este que suporta a idéia de que a inflamação possui um papel reforçador da neurodegeneração na DP (GAO *et al.*, 2003).

### 1.6.1 Neuroinflamação e DP

O termo inflamação é genericamente usado para descrever um acúmulo local de fluidos, proteínas plasmáticas e células brancas do sangue, que é iniciado por uma lesão física, infecção ou reação imune local (HUNOT *et al.*, 2001). Enquanto que respostas inflamatórias agudas denotam um rápido e frequentemente efeito transitório, inflamações crônicas ocorrem quando há uma infecção persistente, ou durante uma resposta auto-imune. Em estágios mais avançados as vias efetoras imunológicas levam ao desenvolvimento inflamações crônicas, e posteriores lesões teciduais.

No sistema nervoso central efeitos lesivos, como os mediados por respostas imunes, estão implicados na patogênese de doenças como a esclerose múltipla. Nesta doença, a ativação de células microgliais, produtoras de citocinas próinflamatórias (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), por células T-CD4 infiltradas cronicamente está envolvida com a morte celular de oligodendrócitos e subsequente desmielinização de fibras nervosas, gerando os efeitos clínicos da doença (fraqueza muscular, dificuldade de movimentação, etc) (HUNOT *et al.*, 2001).

Na DP sugere-se que anormalidades imunológicas possibilitem a existência de um caráter auto-imune à doença. Diversos estudos têm apontado imunoglobulinas (Igs) reagindo com tecidos catecolaminérgicos, incluindo auto-anticorpos contra neurônios dopaminérgicos no fluido cefalorraquidiano e plasma de pacientes portadores da DP (MCRAE-DEGUEURCE *et al.*, 1986).

Diversas evidências dão suporte à existência de mecanismos relacionados à inflamação cerebral (neuroinflamação) em pacientes com DP. As primeiras evidências reportaram um aumento significativo nos níveis de citocinas no estriado e fluido cefalorraquidiano de pacientes parkinsonianos comparados com indivíduos controle. Essas citocinas incluem TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-6, citocina associada a ativação de célula T (IL-2), citocinas antiinflamatórias (IL-4) e diversos fatores de crescimento. Este aumento nos níveis de citocinas, aparentemente, é específico para a via nigroestriatal não sendo observado em regiões corticais, sugerindo que a produção de citocinas é estritamente confinada à região da lesão (NAGATSU *et al.*, 2000). Entretanto, como a produção de citocinas no estriado não alcança a SN, onde os neurônios

dopaminérgicos degeneram na DP, este dado dificilmente pode indicar como esta produção pode estar diretamente ligada à DP.

O que há de consenso é que as citocinas pró-inflamatórias são produzidas na vizinhança dos neurônios dopaminérgicos devendo estar implicadas na patogênese da doença (HUNOT *et al.*, 2001).

### 1.7 ANTIINFLAMATÓRIOS E DP

O processo neuroinflamatório é caracterizado como um importante fator que contribui ao processo neurodegenerativo crônico na DP, assim como em seus modelos animais (MPTP, MPP<sup>+</sup>, 6-OHDA). De fato, evidências experimentais demonstram que a inibição da resposta neuroinflamatória, com o uso de drogas antiinflamatórias, pode ser uma estratégia neuroprotetora, havendo atenuação da degeneração de neurônios dopaminérgicos, observada experimentalmente (GAO *et al.*, 2003).

A dexametasona, um antiinflamatório esteroidal (AIE), tem sido descrito com uma droga que possui atividade de inibir parcialmente a reação microglial, levando a um decréscimo na produção de citocinas pró-inflamatórias e de óxido nítrico (NO), o que resulta numa atenuação da lesão gerada por MPTP (KURKOWSKA-JASTRZEBSKA *et al.*, 1999). No entanto há evidências contrárias ao possível efeito neuroprotetor supostamente conferido à dexametasona, no mesmo modelo animal (AUBIN *et al.*, 1998). Uma eventual terapia a longo prazo, utilizando AIEs, tornar-se ia limitada levando-se em conta os efeitos colaterais (principalmente imunossupressão) dessa classe drogas.

Tendo isso posto, o foco das possibilidades terapêuticas vira-se em direção aos antiinflamatórios não-esteroidais (AINE), drogas estas que apresentam um bom potencial neuroprotetor, porém ainda a ser melhor explorado (GAO *et al.*, 2003).

Agentes inibidores não seletivos da enzima COX, como o salicilato de sódio, demonstraram atenuar significativamente a depleção dopaminérgica induzida por MPP<sup>+</sup> em camundongos, sendo este um efeito independente de PGs, e sim associado a inativação de radicais hidroxil (SAIRAM *et al.*, 2003).

Além disso, sugere-se que inibidores da COX-2 bloqueiam a degeneração do conteúdo de DA dos neurônios, induzida por MPTP (TEISMANN E FERGER, 2001).

Há estudos epidemiológicos que sugerem a existência de uma correlação entre o uso de AINEs e a redução na incidência de casos de doenças neurodegenerativas tais como a AD e DP (MCGEER E MCGEER, 2001; CHEN *et al.*, 2003).

Neste sentido, vários experimentos têm demonstrado que o pré-tratamento com drogas antiinflamatórias (AINES), que inibem a atividade da COX ou a administração de MPTP em animais nocaute para o gene que codifica a enzima COX-2, leva a proteção parcial ou total da toxicidade do MPTP. Isso demonstra a importância da função da COX-2 na degeneração induzida por MPTP (PRZYBYLKOWSKI *et al.*, 2004).

O Parecoxib é uma pró-droga, altamente solúvel em água, de um inibidor da COX-2 de segunda geração, o valdecoxib, de administração parenteral. O parecoxib é rapidamente convertido em valdecoxib, que possui uma potente atividade analgésica e antiinflamatória (SATYANARAYANA *et al.*, 2004).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- O objetivo geral do presente estudo foi de investigar a influência do tratamento com o parecoxib, que tem como alvo primário a isoenzima COX-2, na possível reversão de alterações motoras, na memória de hábito e do conteúdo de TH na SN e no estriado de ratos tratados com MPTP intranigral através de cirurgia estereotáxica.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o comportamento motor dos animais tornados parkinsonianos, através da infusão intranigral de MPTP, e tratados com parecoxib;
- Verificar os efeitos da administração prolongada de parecoxib, em ratos que receberam MPTP intranigral, no teste de memória do labirinto aquático de Morris versão *cued test*;
- Quantificação por imunodeteção da TH, na SN e estriado durante o tratamento com parecoxib.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Os animais utilizados foram ratos Wistar machos, de três meses de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná (UFPR), pesando cerca de 260 a 300g, mantidos em sala com temperatura controlada ( $22\pm 2C^\circ$ ), em ciclo claro-escuro de 12horas, com água e comida à vontade.

#### 3.2 DROGAS

- MPTP (Sigma Chemical Co, USA), 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  dissolvidos em solução salina (NaCl 0,9%);
- Parecoxib (Bextra, Pharmacia Pfizer Ltda) dissolvidos em solução salina 0,9%, utilizado nas doses de 10 mg/kg, 1 hora antes da cirurgia estereotáxica e na dose de 2 mg/kg durante vinte e dois dias após a cirurgia dias após a cirurgia estereotáxica;
- Solução salina (NaCl 0,9%).

#### 3.3 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO COM PARECOXIB

Os ratos tratados com parecoxib 10 mg/kg, 1 hora antes da cirurgia estereotáxica e na dose de 2 mg/kg diariamente via i.p., foram avaliados no teste de campo aberto 24 horas e 7, 14 e 21 dias após a cirurgia estereotáxica. Em uma segunda etapa os mesmos grupos de animais foram avaliados no labirinto aquático de Morris - versão *cued test* do sétimo ao décimo oitavo dia após a infusão de MPTP por cirurgia estereotáxica. Por fim, realizou-se o ensaio de imunodeteção do conteúdo de TH presente na SN e estriado através do ensaio de western blotting nos tempos de 24 horas, 7, 14 e 21 dias após cirurgia estereotáxica.

#### 3.4 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais submetidos à cirurgia estereotáxica são inicialmente anestesiados com Equitesin (0,3mg/kg – i.p.). Após a anestesia administra-se 0,10 mL de penicilina G-procaína (20.000 U/0,05 mL – i.m.), sulfato de atropina

(0,4 mg/kg – i.p.) e o anestésico local (lidocaína 0,2 mL com 2% de vasoconstritor – s.c.) na derme que recobre o crânio dos ratos.

Os ratos foram submetidos à cirurgia estereotáxica (estereotáxico - David Kopf, modelo 957L) e receberam a microinfusão bilateral de MPTP diretamente na SN. Para a cirurgia foram utilizadas as seguintes coordenadas estereotáxicas: antero-posterior (AP): 5.0 mm a partir do bregma; médio-lateral (ML):  $\pm 2.1$  mm a partir da linha média e dorso-ventral (DV): -7.7 mm a partir da calota craniana e foram injetados 100  $\mu$ g de MPTP em 1  $\mu$ l de solução salina com um fluxo de 0,33  $\mu$ l/min.

A microinfusão de neurotoxina é realizada com auxílio de uma agulha (30 gauge) conectada a um tubo de polietileno adaptado a uma micro-seringa de 10  $\mu$ L (Hamilton, EUA) que por sua vez, é encaixada em uma bomba de infusão (Harvard Apparatus, EUA). Após o término da microinfusão a agulha foi mantida no local por mais 2 minutos para evitar refluxo da neurotoxina. Em seguida, o escalpo foi suturado e os animais retirados do estereotáxico. Os ratos então foram colocados em suas gaiolas de origem.

Os animais do grupo Sham foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico. No entanto, os animais não receberam a neurotoxina, sendo somente introduzida à agulha nas mesmas coordenadas estereotáxicas. Os ratos do grupo controle não foram submetidos à cirurgia estereotáxica, mas foram retirados da gaiola de moradia para manuseio durante algumas horas.

Os animais foram divididos em grupos da seguinte maneira: MPTP+salina, MPTP+parecoxib, Sham+salina, Sham+parecoxib, controle+salina e controle+parecoxib.

### 3.5 OBSERVAÇÕES COMPORTAMENTAIS

Os animais de todos os grupos foram submetidos aos testes comportamentais após a cirurgia, sob as mesmas condições.

#### 3.5.1 Campo Aberto

Os animais foram colocados sobre o círculo central do campo aberto e seu comportamento avaliado durante 5 minutos. Essa avaliação inclui 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 círculo central da arena). Cada animal foi avaliado individualmente e o aparelho foi limpo entre um animal e outro com solução de álcool 5% (Figura 3).



**Figura 3:** Campo aberto.

### 3.5.2 Labirinto aquático de Morris

Os animais foram testados no labirinto aquático de Morris que é constituído por um tanque circular de cor preta, com 170 cm de diâmetro e 50 cm de altura, preenchido com água em uma profundidade de 32 cm. As temperaturas da água e da sala são controladas e em torno de  $22 \pm 2$  °C. De início foram estabelecidas quatro posições que servem como ponto de partida para os ratos, estas são: norte, sul, leste e oeste; permitindo desta forma, a divisão da superfície em quatro quadrantes iguais: nordeste, sudeste, noroeste e sudoeste. Na sala onde os experimentos foram realizados existem dicas visuais ao redor do tanque, como por exemplo: figuras fixadas nas paredes, janela e porta, para auxiliar os animais durante os testes.

#### 3.5.3.1 Versão *cued test*

Foi utilizada uma plataforma acrílica transparente (11x14x29 cm) com uma esfera com a metade superior pintada de preto e a inferior branca, de 7 cm de diâmetro fixada sobre a plataforma acrílica (figura 4). Durante o experimento a plataforma foi mantida submersa a 2 cm abaixo da superfície da água, enquanto que a esfera permaneceu visível aos ratos. Nos dias de teste a plataforma com a esfera foi fixada em um dos quatro quadrantes: nordeste, sudeste, noroeste e sudoeste, respectivamente, enquanto que o animal era

solto para nadar até encontrar a plataforma em um dos quatro pontos de partida: sul, leste, norte e oeste, respectivamente. O animal deveria encontrar a plataforma em um tempo máximo de 60 s, quando o tempo máximo era atingido, os animais foram gentilmente conduzidos pelo experimentador até a plataforma com a esfera (dica visual). Após os ratos encontrarem a dica, eles permaneceram sobre a esfera por 20 s, após esse tempo os animais foram retirados da plataforma e colocados durante 30 s na gaiola de moradia fora do labirinto aquático. Neste período a plataforma foi trocada de posição pelo experimentador. Os animais foram submetidos ao mesmo procedimento até que se completem os quatro pontos de partida. As posições de partida e da plataforma foram planejadas de forma que as distâncias proximais e distais fossem alternadas.

A latência (tempo que os animais levam para encontrar a plataforma), e a velocidade dos animais foram quantificados pelo *software* 2020 Plus Tracking System.



**Figura 4:** Labirinto aquático de Morris versão *cued test*.

## 3.6 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

### 3.6.1 Extração de proteínas

Os animais foram decapitados após cirurgia esterotáxica, em seguida seus mesencéfalos foram dissecados rapidamente para a retirada bilateral da SN e estriado. Estas estruturas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para que se evitasse a degradação de seus conteúdos protéicos. Após isso o tecido isolado foi homogeneizado em tampão de lise gelado (pH 7,4)

contendo 50 mM de Tris-HCl, 250mM de NaCl, 1% NP-40, 0,1% SDS, 0,25% deoxicolato de sódio, 0,25% de DTT, 20 $\mu$ M de PMSF e tablete completo de inibidor de protease (Roche). O lisado foi então centrifugado a 10.000 x g, 4°C por 20 minutos. O sobrenadante corresponde ao extrato protéico que por sua vez foi pipetado e congelado a -80°C em alíquotas para posterior dosagem do conteúdo total de proteínas pelo método de LOWRY (1951).

### 3.6.2 Western blotting

Para o experimento de imunodeteccção (western blotting), foi utilizada metodologia padrão conforme descrito por SAMBROOK *et al.*, 1989. De forma breve, será descrito a seguir: amostras de 30  $\mu$ g de proteína foram aplicadas em gel de poliacrilamida-SDS a 12%. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF, as quais foram reagidas com anticorpos específicos contra TH (Sigma St. Louis, MO, USA) 1:2000 e em seguida foram reagidas com o anticorpo anti-mouse HRP (Amersham) 1:5000. A visualização foi realizada com o sistema de quimioluminescência (Santa Cruz Biotechnology). Utilizaram-se filmes de raios-X Kodak T-MAT, revelador e fixador Kodak em concentrações apropriadas.

### 3.6.3 Análise densitométrica

As bandas foram quantificadas por análise computadorizada de imagem (com auxílio do *software ImageJ* versão 1.32j domínio público <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) onde a densidade ótica de cada banda foi aferida. Inicialmente o sistema de análise calcula a média dos valores de densidade ótica para a região delimitada pelo operador. Esta região deve ter uma área suficiente para abrigar todas as bandas (uma de cada vez) visíveis no filme, não devendo ser alterada, quando se passa a analisar uma outra banda. O valor final de intensidade relativa foi expressa em porcentagem em relação ao grupo controle+salina.

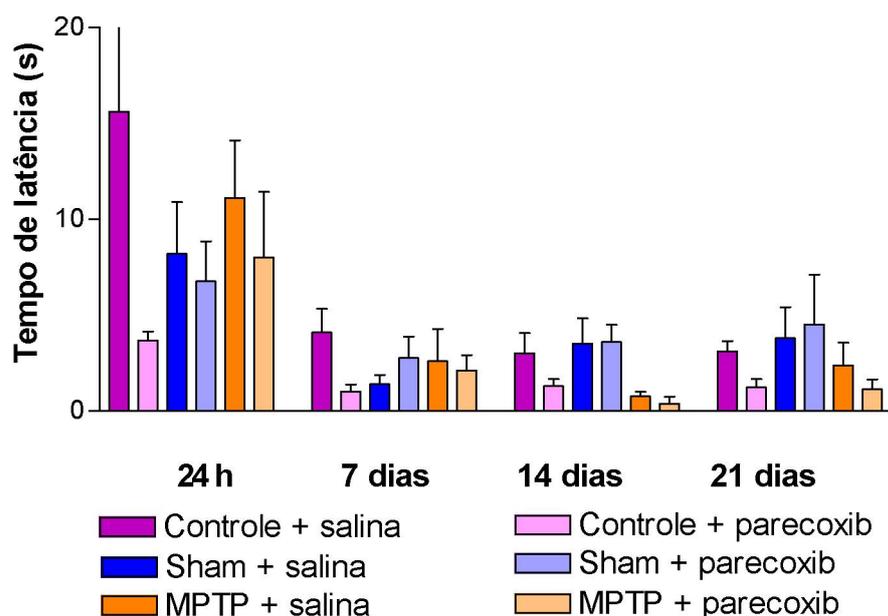
### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros avaliados no teste do campo aberto (latência para o início do movimento, frequência de locomoção, frequência de levantar e tempo de imobilidade) e no teste do labirinto aquático versão *cued* (latência para encontrar a plataforma e velocidade de natação) foram analisados por ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey. Os dados obtidos pelo ensaio de Western blotting foram analisados por ANOVA e seguido do teste de Newman-Keuls. O nível de significância considerado foi  $P < 0.05$ . Os valores foram representados como média  $\pm$  S.E.M.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DO TESTE DO CAMPO ABERTO

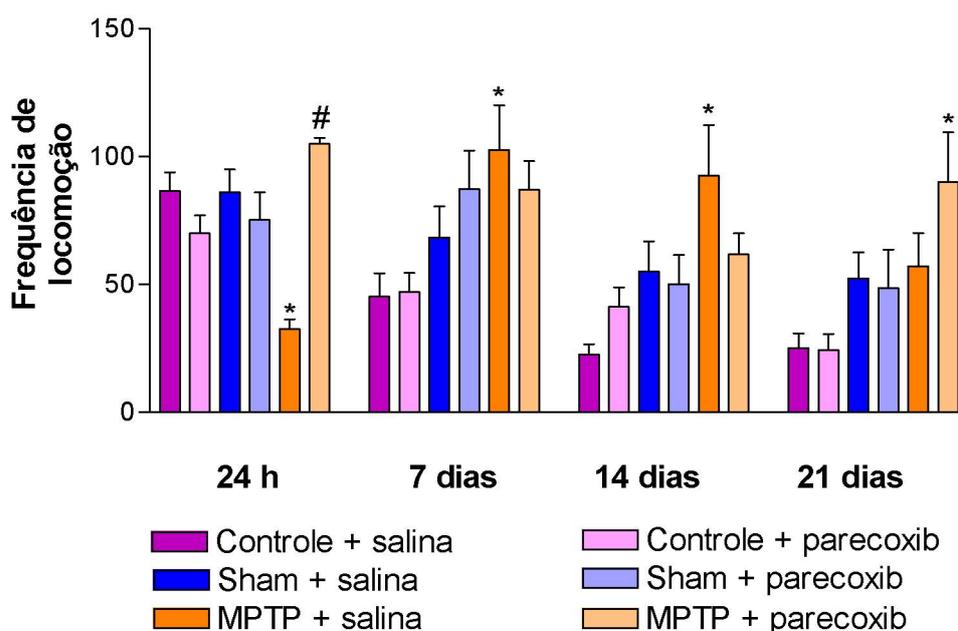
A Figura 5 representa a latência para iniciar o movimento em ratos lesados com MPTP e tratados prolongadamente com parecoxib. Os dados mostram que não há diferença significativa entre os grupos neste parâmetro em todas as sessões de observação.



**Fig. 5.** Efeitos da administração de parecoxib (10 mg/kg 1 h antes da cirurgia e dois mg/kg diariamente) em ratos tratados com MPTP intranigral no parâmetro de latência no teste do campo aberto. Os valores representam a média  $\pm$  S.E.M. Não houve diferença significativa entre os grupos. ( $n=10$  por grupo). ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey.

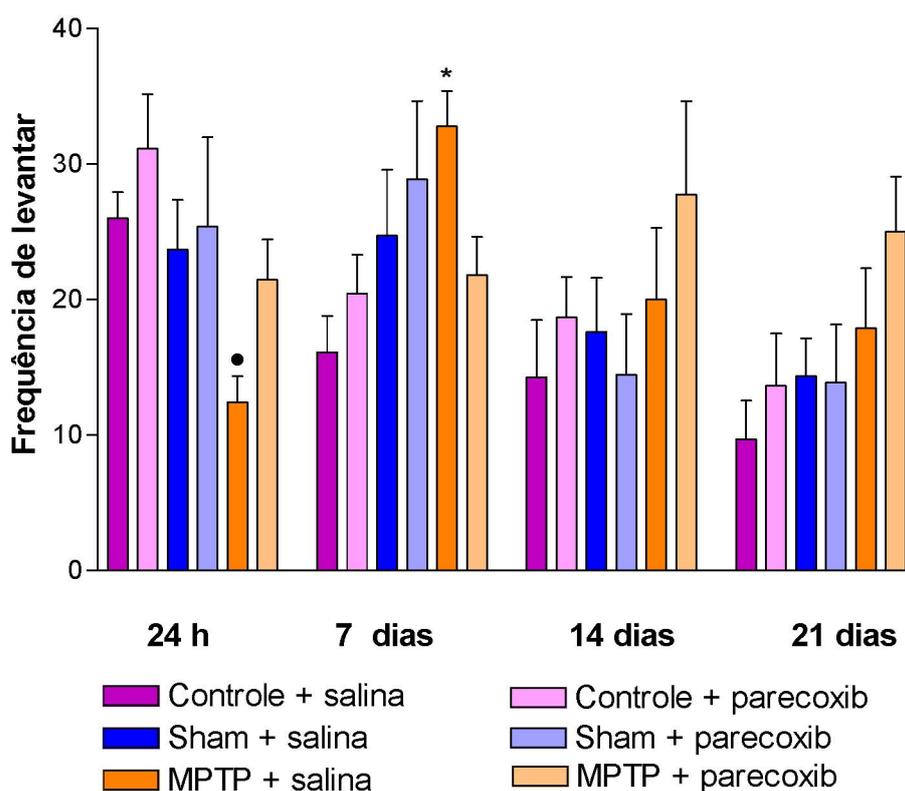
A frequência de locomoção está representada na Figura 6. Os resultados indicam que 24 h após a infusão do MPTP, o grupo MPTP+salina exibiu diminuição de locomoção em comparação com os grupos controle+salina, controle+parecoxib, sham+salina e sham+parecoxib ( $F(5,47)=12,29$ ;  $p<0,0001$ ).

Sete e 14 dias após a infusão com MPTP, o grupo MPTP+salina exibiu um aumento significativo na locomoção quando comparado ao grupo controle ( $F_{7\text{dias}}(5,50)= 3.54$ ;  $P = 0.008$ ) ( $F_{14\text{dias}}(5,44)= 4.01$ ;  $P = 0.0044$ ). Vinte e um dias após a cirurgia este grupo não diferiu dos outros grupos. O grupo MPTP+parecoxib mostrou um aumento significativo na locomoção quando comparado ao grupo MPTP+salina 24 h após a cirurgia ( $F(5,47)= 12.29$ ;  $p < 0.0001$ ). Sete e 14 dias após a lesão, este grupo não apresentou diferença na locomoção quando comparado ao grupo controle+salina e MPTP+salina. Entretanto, 21 dias após a cirurgia, o grupo MPTP+parecoxib mostrou um aumento significativo na locomoção em comparação ao grupo controle+salina e ao grupo controle+parecoxib ( $F(5,41)= 3.63$ ;  $p = 0.0082$ ).



**Fig. 6.** Efeitos da administração de parecoxib (10 mg/kg 1 h antes da cirurgia e 2 mg/kg diariamente) em ratos tratados com MPTP intranigral no parâmetro da locomoção no teste do campo aberto. Os valores representam a média  $\pm$  S.E.M. \* $P<0.05$  comparado ao grupo controle+salina; # $P<0.05$  comparado ao grupo MPTP+salina. ( $n=10$  por grupo). ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey.

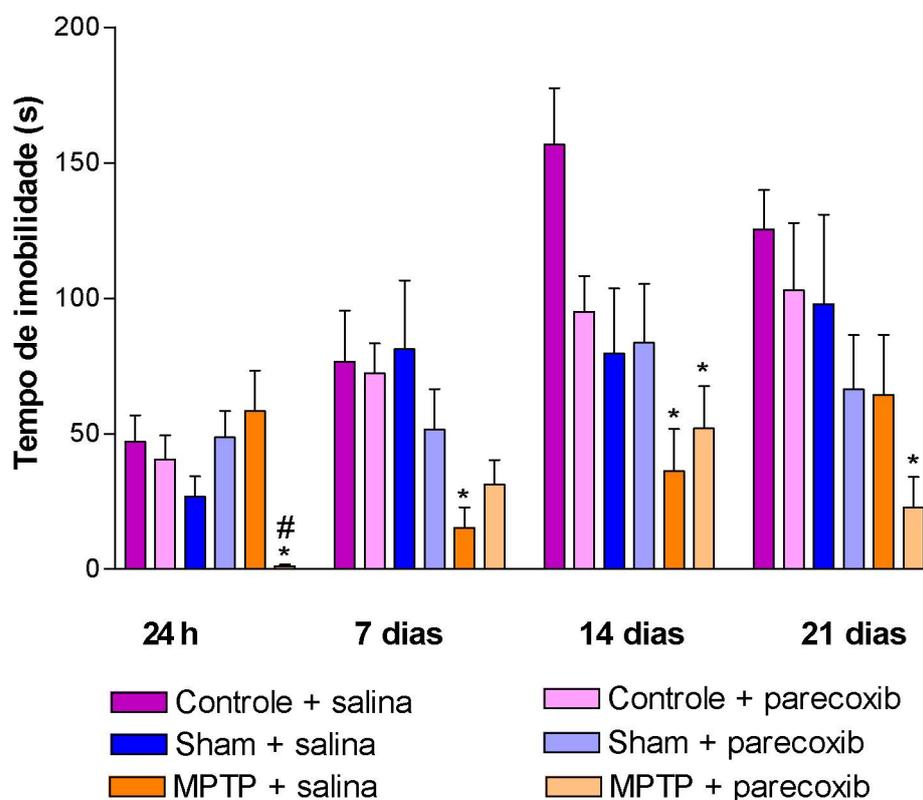
Na Figura 7 está ilustrada a freqüência de levantar. Os dados demonstram que 24 h após a lesão o grupo MPTP+salina apresentou uma diminuição significativa deste parâmetro em relação ao grupo controle+parecoxib ( $F(5,50)= 3.066$ ;  $P = 0.0172$ ). Aos sete dias o grupo MPTP+salina exibiu um aumento significativo na freqüência de levantar quando comparado ao grupo controle+salina ( $F(5,49)= 2.60$ ;  $p = 0.0362$ ). O tratamento com parecoxib não alterou o parâmetro de levantar nos grupos controle+salina e MPTP+salina. Quatorze e 21 dias após a cirurgia não houve diferença significativa entre os grupos.



**Fig. 7.** Efeitos da administração de parecoxib (10 mg/kg 1 h antes da cirurgia e 2 mg/kg diariamente) em ratos tratados com MPTP intranigral no parâmetro de levantar no teste do campo aberto. Os valores representam a média  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  comparado ao grupo controle+salina; • $P < 0.05$  comparado ao grupo controle+parecoxib. ( $n=10$  por grupo). ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey.

O tempo de imobilidade apresentado na Figura 8 mostrou que 24 h após a cirurgia o grupo MPTP+salina não diferiu dos animais controle, mas mostrou um aumento significativo no tempo de imobilidade quando comparado ao grupo MPTP+parecoxib ( $F(5,46)= 4.43$ ;  $p = 0.0022$ ). Aos sete dias, o grupo MPTP+salina exibiu uma diminuição da imobilidade quando comparado aos

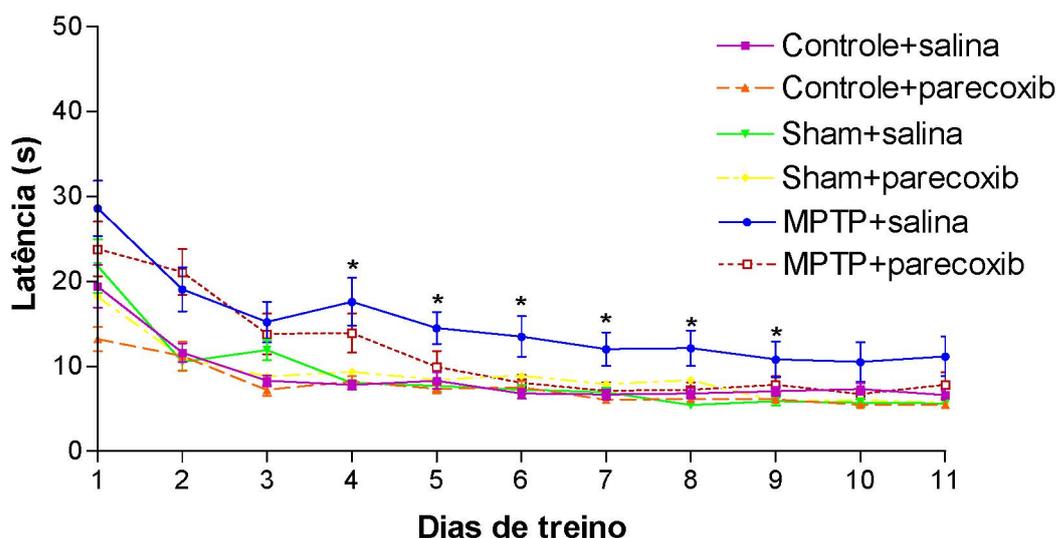
grupos controle+salina e sham+salina ( $F(5,45)= 3.43$ ;  $P = 0.0102$ ), e 14 dias após a lesão os grupos MPTP+salina e MPTP+parecoxib apresentaram uma diminuição no tempo de imobilidade quando comparados ao grupo controle+salina ( $F(5,44)= 4.28$ ;  $p = 0.0029$ ). Na observação realizada aos 21 dias apenas o grupo MPTP+parecoxib mostrou uma redução na imobilidade quando comparado ao grupo controle+salina ( $F(5,39)= 2.97$ ;  $p = 0.022$ ).



**Fig. 8.** Efeitos da administração de parecoxib (10 mg/kg 1 h antes da cirurgia e 2 mg/kg diariamente) em ratos tratados com MPTP intranigral no parâmetro de imobilidade no teste do campo aberto. Os valores representam à média  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  comparado ao grupo controle+salina; # $P < 0.05$  comparado ao grupo MPTP+salina. ( $n=10$  por grupo). ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey.

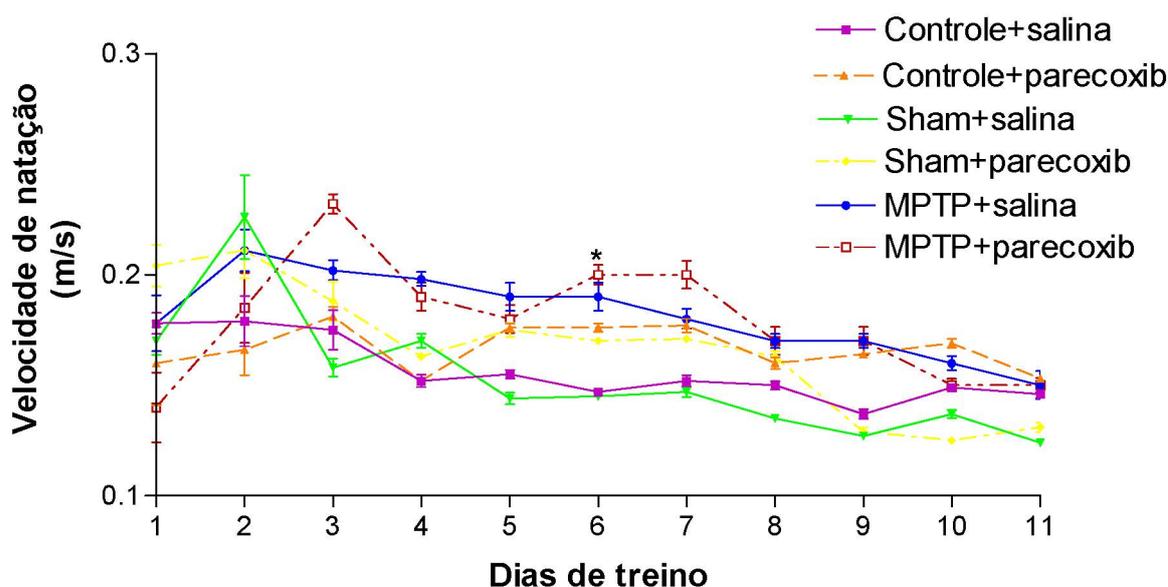
#### 4.2 RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DO TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO – VERSÃO CUED

Como pode ser visto na Figura 9, os ratos MPTP+salina apresentaram um aumento significativo no tempo de latência para encontrar a plataforma quando comparados com o grupo de animais controle+salina, começando no 4º. dia até o 9º. dia de treino. Por outro lado, não houve diferenças no tempo de latência para encontrar a plataforma, em todas as sessões de treinos entre os grupos MPTP+parecoxib e controle+salina.



**Fig. 9.** Efeitos da administração de parecoxib (2 mg/kg diariamente) em ratos tratados com MPTP intranigral no teste do Labirinto Aquático de Morris – versão *cued test* durante 12 dias, no parâmetro da latência. Os valores representam à média  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  comparado ao grupo controle+salina. ( $n=10$  por grupo). ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey.

A Figura 10 ilustra a velocidade de natação em todas as sessões de treino. O tratamento com parecoxib aumentou a velocidade para encontrar a plataforma dos animais lesados com MPTP durante a sessão realizada no 6º dia de treino quando comparado com os animais do grupo controle+salina.



**Fig. 10.** Efeitos da administração de parecoxib (2 mg/kg diariamente) em ratos tratados com MPTP intranigral no teste do Labirinto Aquático de Morris – versão *cued test* durante 12 dias, no parâmetro de velocidade. Os valores representam à média  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  comparado ao grupo controle+salina. ( $n=10$  por grupo). ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey.

A Figura 11 ilustra as trajetórias representativas referentes a cada grupo de animais. Estas trajetórias foram obtidas ao longo do 8º dia de treino do labirinto aquático de Morris – versão *cued test*, sendo que, para fins comparativos, os animais representados a seguir foram soltos da mesma posição (norte) e a plataforma encontrava-se na posição 3. O grupo MPTP+salina apresentou trajetória claramente confusa na tarefa de encontrar a plataforma, enquanto que o grupo MPTP+parecoxib, qualitativamente, não diferiu suas trajetórias em relação aos grupos controle, durante a realização desta tarefa.

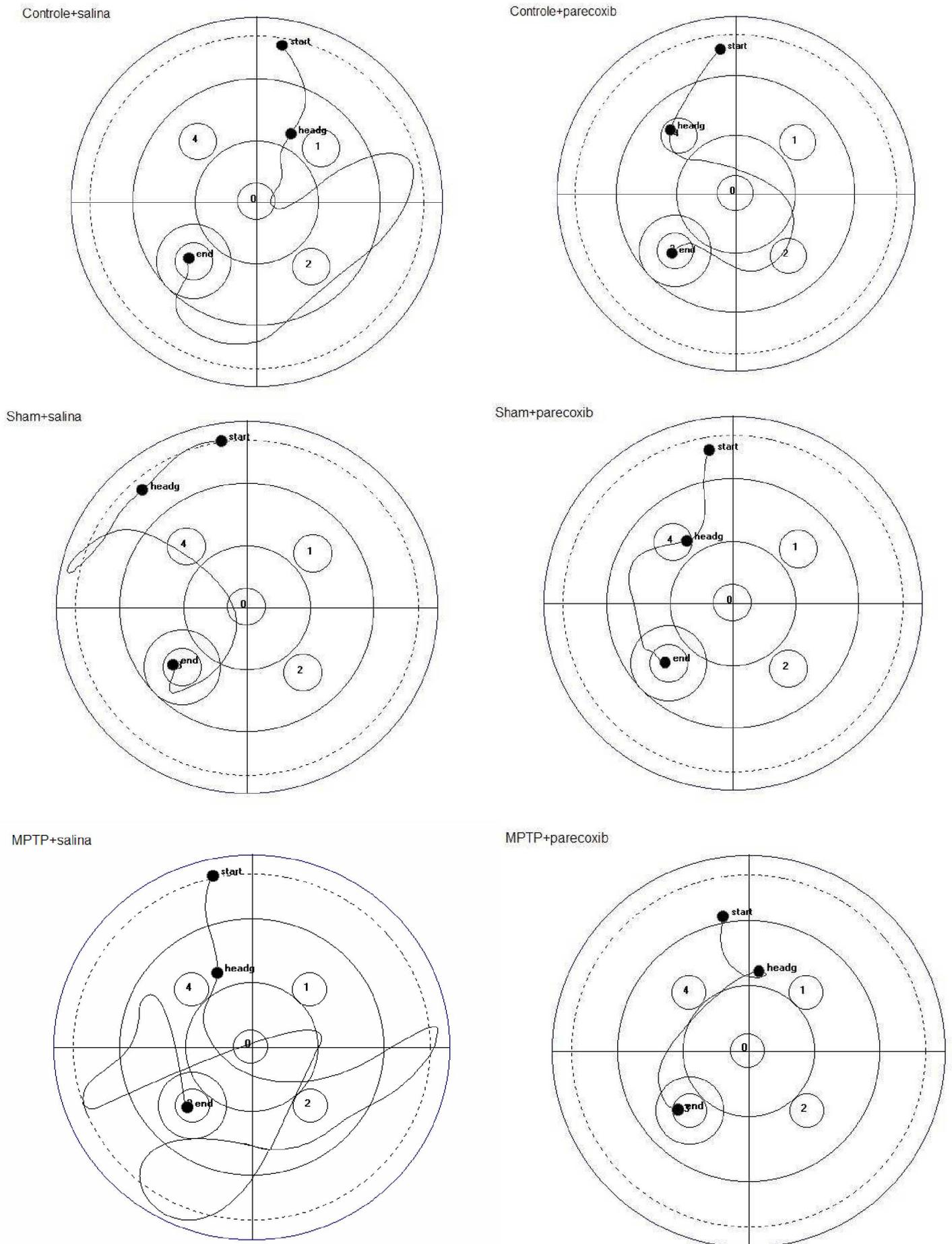
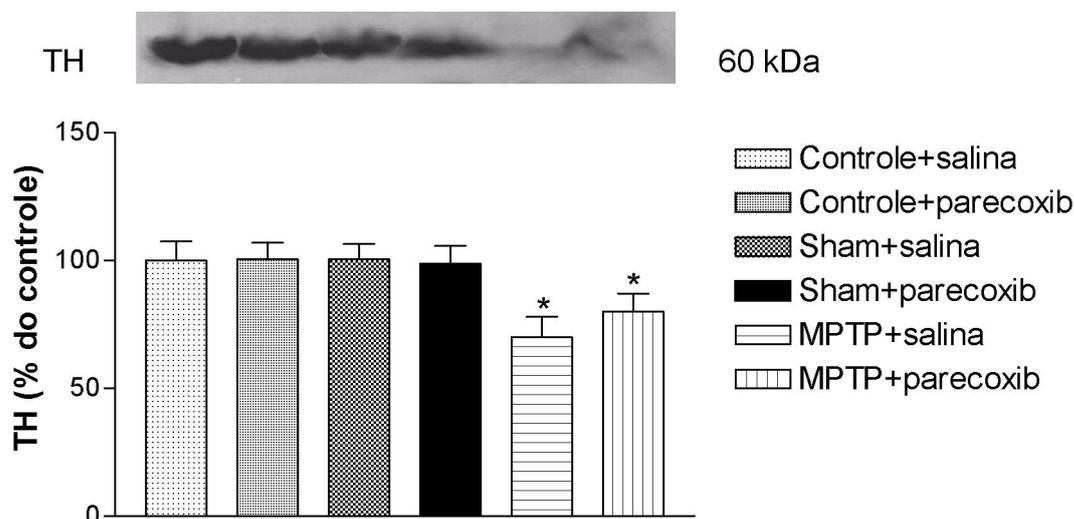


Fig. 11. Trajetórias representativas dos grupos de animais submetidos ao labirinto aquático de Morris - versão *cued test*.

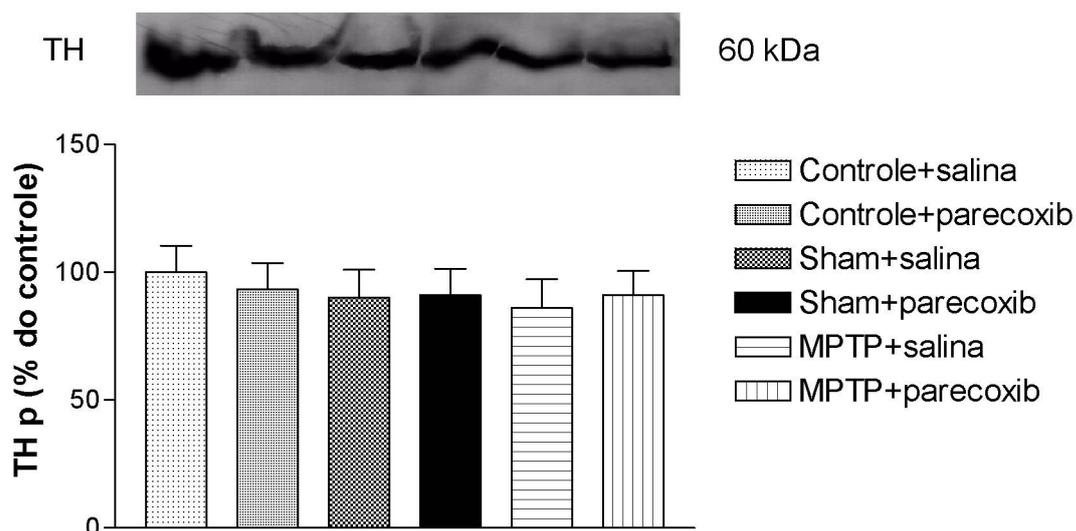
#### 4.3 RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO DA TH POR WESTERN BLOTTING

A análise por western blotting da SN revelou uma significativa redução ( $P < 0.05$ ) na quantidade de TH dos animais dos grupos MPTP+salina e MPTP+parecoxib, em comparação ao grupo controle+salina, nesta estrutura 24 h após a cirurgia. Os grupos controles e sham não mostraram diferenças na quantidade de TH (Figura 12).



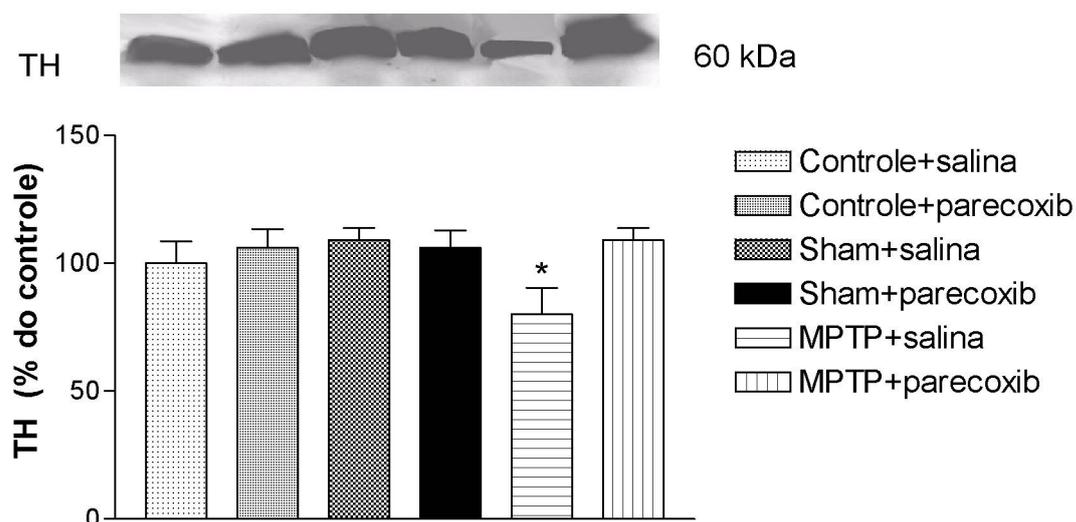
**Figura 12.** Western blotting da TH na SN realizada com ratos controle, sham e MPTP tratados com salina e parecoxib. Os animais foram sacrificados 24 h após a cirurgia. Os resultados representam três análises idênticas. Os valores representam à média  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  comparado aos grupos controle e sham. (n=1 animal por grupo). ANOVA seguida pelo teste de Neuman-Keuls.

A Figura 13 mostra a análise por western blotting do estriado obtido 24 horas após a cirurgia estereotáxica. O resultado revelou não haver diferença estatisticamente significativa entre o conteúdo de TH presente no grupo MPTP+salina e MPTP+parecoxib em comparação ao grupo controle+salina. Os grupos controles e sham não mostraram diferenças na quantidade de TH.



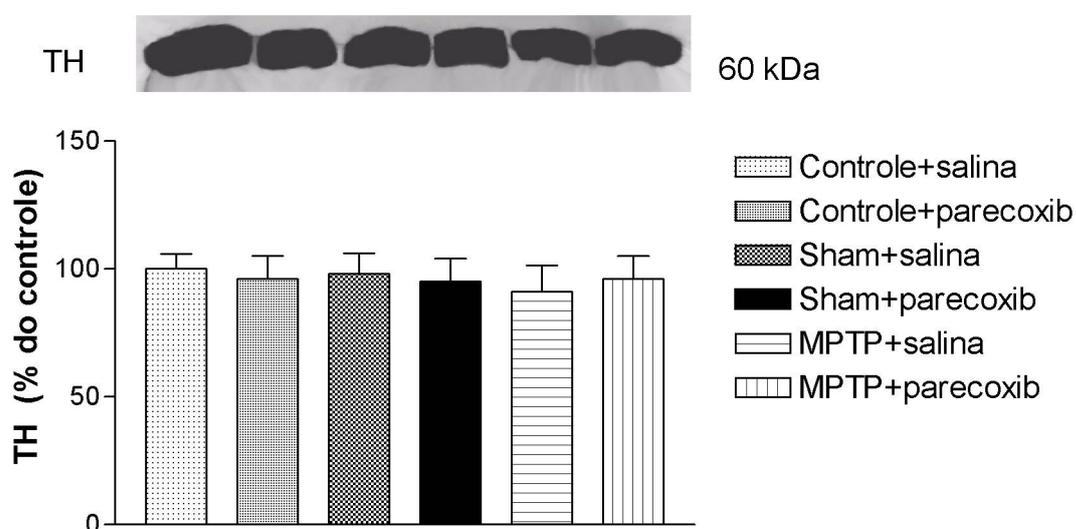
**Figura 13.** Western blotting da TH no estriado realizada com ratos controle, sham e MPTP tratados com salina e parecoxib. Os animais foram sacrificados 24 h após a cirurgia. Os resultados representam três análises idênticas. Os valores representam à média  $\pm$  S.E.M. (n=1 animal por grupo). ANOVA seguida pelo teste de Neuman-Keuls.

A análise por western blotting da SN, 7 dias após a cirurgia estereotáxica (Figura 14), mostrou uma redução significativa ( $P < 0.05$ ) no conteúdo de TH do grupo MPTP+salina em comparação ao grupo controle+salina. O grupo MPTP+parecoxib não diferiu em comparação ao grupo controle+salina. Os grupos controles e sham não mostraram diferenças na quantidade de TH.



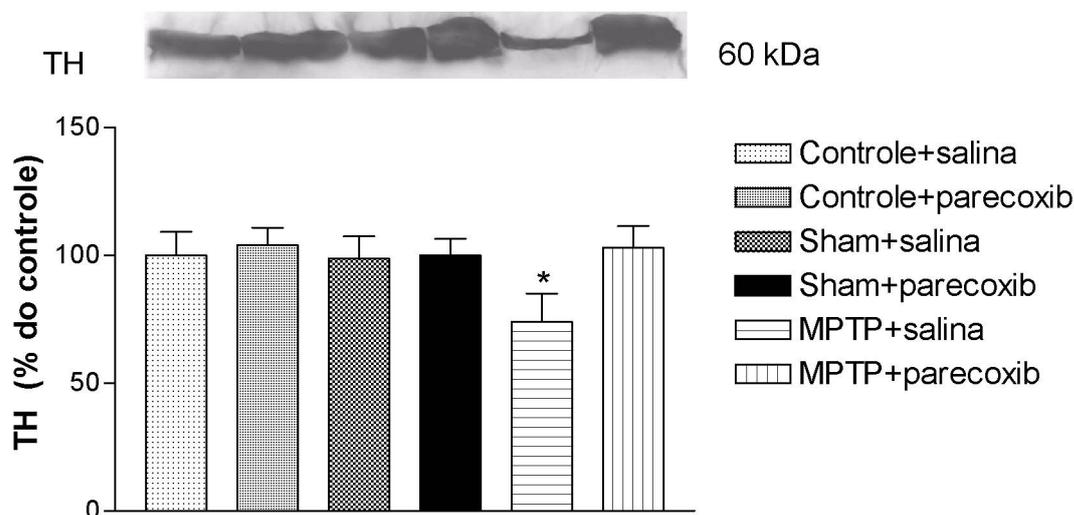
**Figura 14.** Western blotting da TH na SN realizada com ratos controle, sham e MPTP tratados com salina e parecoxib. Os animais foram sacrificados 7 dias após a cirurgia. Os resultados representam três análises idênticas. Os valores representam à média  $\pm$  S.E.M. \* $P$ <0.05 comparado aos grupos controle e sham. (n=1 animal por grupo). ANOVA seguida pelo teste de Neuman-Keuls.

A Figura 15 mostra a análise por western blotting do estriado obtido 7 dias após a cirurgia estereotáxica. O resultado revelou não haver diferença estatisticamente significativa entre o conteúdo de TH presente no grupo MPTP+salina e MPTP+parecoxib em comparação ao grupo controle+salina. Os grupos controle+salina e controle+parecoxib não mostraram diferenças na quantidade de TH.



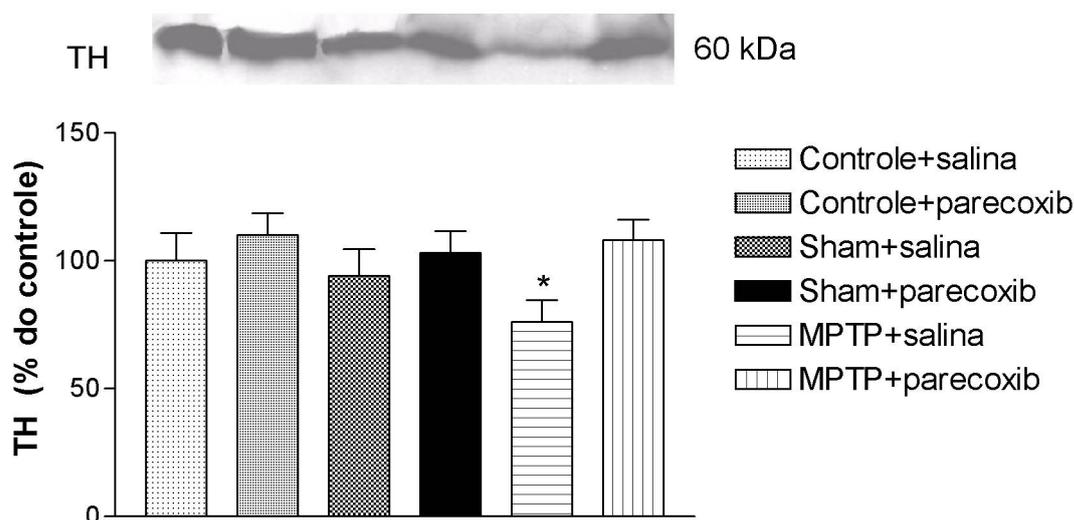
**Figura 15.** Western blotting da TH no estriado realizada com ratos controle, sham e MPTP tratados com salina e parecoxib. Os animais foram sacrificados 7 dias após a cirurgia. Os resultados representam três análises idênticas. Os valores representam à média  $\pm$  S.E.M. (n=1 animal por grupo). ANOVA seguida pelo teste de Neuman-Keuls.

A análise por western blotting da SN, 14 dias após a cirurgia estereotáxica (Figura 16), mostrou uma redução significativa ( $P < 0.05$ ) no conteúdo de TH do grupo MPTP+salina em comparação ao grupo controle+salina. O grupo MPTP+parecoxib não diferiu estatisticamente em relação ao grupo controle+salina. Os grupos controles e sham não mostraram diferenças na quantidade de TH.



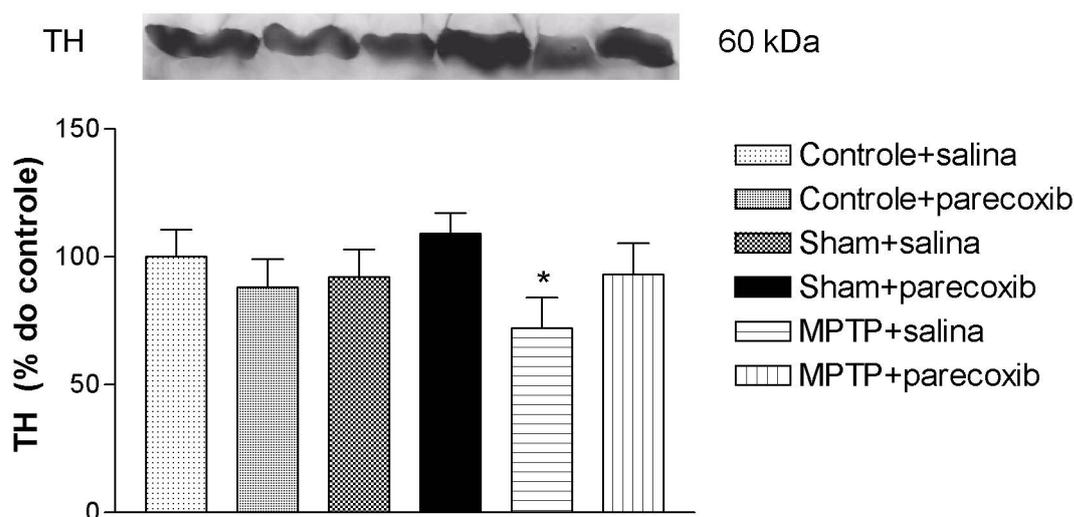
**Figura 16.** Western blotting da TH na SN realizada com ratos controle, sham e MPTP tratados com salina e parecoxib. Os animais foram sacrificados 14 dias após a cirurgia. Os resultados representam três análises idênticas. Os valores representam à média  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  comparado aos grupos controle e sham. (n=1 animal por grupo). ANOVA seguida pelo teste de Neuman-Keuls.

A análise por western blotting do estriado, 14 dias após a cirurgia estereotáxica (Figura 17), mostrou uma redução significativa ( $P < 0.05$ ) no conteúdo de TH do grupo MPTP+salina em comparação ao grupo controle+salina. O grupo MPTP+parecoxib não diferiu em comparação ao grupo controle+salina. Os grupos controles e sham não mostraram diferenças na quantidade de TH.



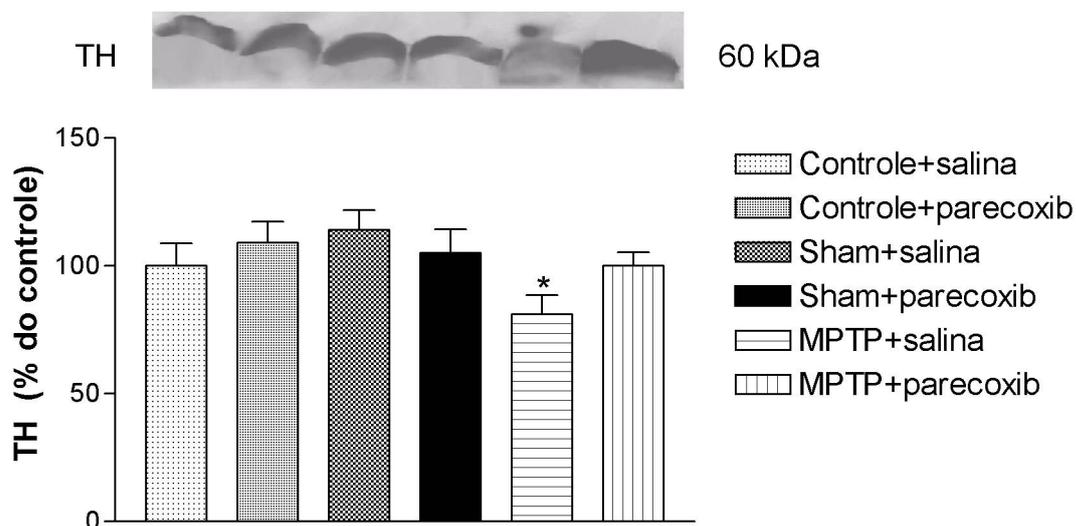
**Figura 17.** Western blotting da TH no estriado realizada com ratos controle, sham e MPTP tratados com salina e parecoxib. Os animais foram sacrificados 14 dias após a cirurgia. Os resultados representam três análises idênticas. Os valores representam à média  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  comparado aos grupos controle e sham. (n=1 animal por grupo). ANOVA seguida pelo teste de Neuman-Keuls.

A análise por western blotting da SN, 21 dias após a cirurgia estereotáxica (Figura 18), mostrou uma redução significativa ( $P < 0.05$ ) no conteúdo de TH do grupo MPTP+salina em comparação ao grupo controle+salina. O grupo MPTP+parecoxib não diferiu em comparação ao grupo controle+salina. Os grupos controles e sham não mostraram diferenças na quantidade de TH.



**Figura 18.** Western blotting da TH na SN realizada com ratos controle, sham e MPTP tratados com salina e parecoxib. Os animais foram sacrificados 21 dias após a cirurgia. Os resultados representam três análises idênticas. Os valores representam à média  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  comparado aos grupos controle e sham. (n=1 animal por grupo). ANOVA seguida pelo teste de Neuman-Keuls.

A análise por western blotting do estriado, 21 dias após a cirurgia estereotáxica (Figura 19), mostrou uma redução significativa ( $P < 0.05$ ) no conteúdo de TH do grupo MPTP+salina em comparação ao grupo controle+salina. O grupo MPTP+parecoxib não diferiu em comparação ao grupo controle+salina. Os grupos controles e sham não mostraram diferenças na quantidade de TH.



**Figura 19.** Western blotting da TH no estriado realizada com ratos controle, sham e MPTP tratados com salina e parecoxib. Os animais foram sacrificados 21 dias após a cirurgia. Os resultados representam três análises idênticas. Os valores representam à média  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  comparado aos grupos controle e sham. (n=1 animal por grupo). ANOVA seguida pelo teste de Neuman-Keuls.

## 5. DISCUSSÃO

Os dados do presente estudo mostram que inibição seletiva da enzima COX-2, através da administração do parecoxib, atenuou a neurotoxicidade induzida pela administração intranigral de MPTP. Esta neurotoxicidade foi quantificada por ensaios comportamentais (campo aberto e labirinto aquático de Morris) e bioquímicos (western blotting).

Os resultados de campo aberto gerados pelo modelo de parkinsonismo induzido por MPTP mostram que, os parâmetros relacionados mais diretamente ao comportamento exploratório dos animais (locomoção e levantar), encontram-se significativamente reduzidos para o grupo MPTP+salina em comparação aos grupos controle+salina e controle+parecoxib, 24 h após a cirurgia. Este fato indica que o modelo de MPTP em ratos produziu hipoatividade dos animais como esperado em um modelo desta patologia. Além disso, este resultado está em concordância com dados anteriores do grupo (PERRY *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2005). Em oposição a isso, o grupo MPTP+parecoxib, nesse mesmo tempo e no parâmetro da locomoção, não apresentou diferença significativa em comparação ao grupo controle+salina, ou seja, MPTP+parecoxib diferiu significativamente quando comparado ao MPTP+salina. Além disso, MPTP+parecoxib apresentou diminuição significativa no parâmetro de imobilidade em comparação ao grupo controle+salina. Isto indica que esta inibição seletiva da COX-2 atenuou os efeitos neurotóxicos do MPTP. De fato, a literatura corrobora estes resultados que apontam efeitos neuroprotetores advindos desta inibição, no modelo de lesão induzida por MPTP e 6-OHDA (FENG *et al.*, 2002; SÁNCHEZ-PERNAUTE, 2004).

Sete dias após a cirurgia os animais foram novamente testados em campo aberto, sendo que o grupo MPTP+salina apresentou aumento significativo nos parâmetros de locomoção e levantar além de redução significativa no tempo de imobilidade, em comparação ao grupo controle+salina. Esse aumento de ambulação e redução de imobilidade, referente ao grupo lesado por MPTP, possivelmente ocorra em decorrência de um processo de modulação dopaminérgica referente aos neurônios sobreviventes à lesão. E desta forma os neurônios apresentam um

comportamento compensatório frente à perda neuronal gerada pela lesão. O grupo MPTP+parecoxib não apresentou diferenças estatísticas em comparação ao grupo controle+salina em nenhum dos parâmetros observados sete dias após a lesão.

Quatorze dias após a cirurgia realizou-se novamente o teste de campo aberto onde se observou diferença estatística no parâmetro de locomoção. O grupo MPTP+salina apresentou um aumento neste parâmetro quando comparado ao controle+salina e o grupo MPTP+parecoxib não diferiu em relação ao controle+salina. Os animais dos grupos MPTP+salina e MPTP+parecoxib mostraram redução da imobilidade em comparação aos animais do grupo controle+salina.

Vinte e um dias após a cirurgia apenas o grupo MPTP+parecoxib diferiu em relação ao controle+salina, sendo que estas diferenças foram quanto à locomoção (aumentada) e imobilidade (reduzida) em comparação ao grupo controle+salina. Neste mesmo período o grupo MPTP+salina não diferiu em nenhum parâmetro quando comparado ao grupo controle+salina.

Estes resultados estão em acordo com resultados prévios de nosso grupo, onde estima-se que o modelo animal induzido por MPTP pode ser considerado um modelo adequado para mimetizar as alterações motoras associadas a fase inicial da DP. Desta forma pode-se afirmar que o MPTP causou redução significativa dos níveis estriatais de DA, em animais por ele lesados (DA CUNHA *et al.*, 2001; GEVAERD *et al.*, 2001; MIYOSHI *et al.*, 2002; PERRY *et al.*, 2004).

Os resultados do campo aberto apresentam evidências de um efeito neuroprotetor conferido pelo parecoxib, uma vez que 24 horas após a cirurgia não se observou redução nos parâmetros de locomoção e levantar, nestes animais quando comparados ao grupo controle+salina. Além disso, verificamos a redução do tempo de imobilidade, em comparação ao grupo controle+salina. Essa característica de preservar o comportamento exploratório normal dos animais lesados por MPTP, observada 24 horas após a cirurgia, ocorre unicamente em função da dose de 10 mg/kg de parecoxib administrada 1 hora antes da cirurgia. No entanto, 7 e 14 dias após a cirurgia o parecoxib apresentou um possível efeito modulatório sobre a atividade dopaminérgica dos animais lesados, haja vista que o grupo MPTP+salina apresentou

hiperlocomoção, nestes tempos, enquanto que o grupo MPTP+parecoxib não diferiu do grupo controle+salina, sugerindo que o tratamento com parecoxib também poderia estar envolvido na redução desta hiperlocomoção causada pelo MPTP.

Vinte e um dias após a cirurgia o grupo MPTP+parecoxib apresentou aumento na locomoção e diminuição na imobilidade, enquanto que o grupo MPTP+salina não diferiu do grupo controle+salina. Sugere-se que o parecoxib ainda module a atividade dopaminérgica neste tempo, considerando o aumento significativo da locomoção, seguido pela redução da imobilidade.

A principal vantagem do modelo de parkinsonismo induzido por MPTP intranigral é de reproduzir prejuízos específicos de memória declarativa de hábito, que são observados em portadores da DP, principalmente na fase inicial da doença. Os prejuízos na memória não correspondem ao déficit motor, que de outra forma poderia gerar erros de interpretação nos escores de memória (FERRO *et al.*, 2005). Este fato está de acordo com estudos anteriores de nosso grupo, que reportam o prejuízo na habilidade de ratos lesados por MPTP em realizarem tarefas de memória (DA CUNHA *et al.*, 2001; MIYOSHI *et al.*, 2002; BELISSIMO *et al.*, 2004; PERRY *et al.*, 2004; BRAGA *et al.*, 2005).

Os resultados apresentados neste trabalho correlacionam-se com os efeitos esperados pela administração intranigral de MPTP. Ou seja, o grupo MPTP+salina apresentou aumento significativo no tempo de latência para encontrar a plataforma, em comparação ao grupo controle+salina (Figura 9). Esse aumento verificado no 4º dia de treino, por sua vez, não corresponde a um eventual prejuízo motor gerado pelo MPTP, levando em conta que o primeiro dia de treino corresponde ao sétimo dia após a cirurgia esterotáxica. Ou seja, neste tempo não se observou redução da função motora nos ratos do grupo MPTP+salina (Figura 6). O prejuízo na habilidade de realizar a tarefa no labirinto aquático de Morris provavelmente foi devido à lesão da via dopaminérgica, haja vista que a lesão do estriado (caudado-putâmen) dorsolateral causou prejuízo na performance dos animais em realizar esta tarefa com dica visual (versão *cued test*) (PACKARD E MCGAUGH, 1992; DEVAN E DONALD, 1999).

O tratamento com parecoxib (MPTP+parecoxib) resultou numa manutenção do perfil de realização da tarefa. Ou seja, em nenhum dos dias testados o grupo MPTP+parecoxib diferiu do grupo controle+salina quanto ao parâmetro de latência (Figura 9).

Quanto à velocidade média de natação (Figura 10) o tratamento com parecoxib aumentou a velocidade média de natação, do grupo MPTP+parecoxib, somente no 6º dia de treino em comparação ao grupo controle+salina. Além disso, pode-se verificar a diferença entre os distintos padrões de trajetória de natação apresentados entre o grupo MPTP+salina e os demais ao longo do teste (Figura 11). Ou seja, fica evidente a dificuldade do grupo MPTP+salina em realizar a tarefa de encontrar a plataforma em comparação aos grupos controle e sham. Em oposição a isso, os ratos do grupo MPTP+parecoxib apresentaram trajetórias similares quando vista lado a lado com estes mesmos grupos controle. Este resultado demonstra claramente que o antiinflamatório apresentou efeito modulatório na atividade dopaminérgica no estriado (caudado-putâmen), reduzindo o prejuízo na memória não-declarativa de hábito observado nos resultados do labirinto aquático - versão *cued test*.

Até o presente momento, não é possível afirmar qual o mecanismo farmacológico para explicar este efeito modulatório. Entretanto, é possível inferir que a inibição da enzima COX-2 possa aumentar a atividade do sistema dopaminérgico nigroestriatal.

ZHANG E COLS 2005, mostram que a DA renal modula a expressão da COX-2 por modificar a reabsorção no túbulo proximal. Mais ainda SÁNCHEZ-PERNAUTE E COLS, 2004, mostraram que a inibição da COX-2 pelo celecoxib foi capaz direta ou indiretamente (via inibição da ativação da microglia) de prevenir ou reduzir a degeneração do sistema dopaminérgico no modelo de parkinsonismo induzido por 6-OHDA em ratos.

Defeitos no sistema ubiquitina/proteossoma, em função de mutações ou da idade, levam ao estresse oxidativo (SHRINGARPURE E DAVIS, 2002) podendo produzir moléculas neurotóxicas (DAUER E PRZDBORSKI, 2003). Proteínas agregadas causam danos diretos pela deformação celular ou interferindo com o tráfego de neurônios (DAUER E PRZDBORSKI, 2003). Desta forma observou-se que o uso de inibidores da COX-2 preveniu estes

fenômenos de agregação protéica em neurônios dopaminérgicos (LI *et al.*, 2003). Outra evidência de modulação do sistema dopaminérgico, pelo uso de inibidores da COX-2, é demonstrada pelo bloqueio da oxidação dopaminérgica, mediada pela COX-2, através do tratamento com rofecoxib. Ou seja, o rofecoxib preveniu a formação da cisteinil-dopamina (metabólito neurotóxico da DA) durante a administração de MPTP em camundongos (TEISMANN *et al.*, 2003). Também foi demonstrado que os AINES possuem a habilidade de *scavenger* de ROS (CHEN *et al.*, 2003).

Por outro lado, PRZYBYLKOWSKI *et al.*, 2004 demonstraram que o tratamento com rofecoxib, iniciado após a administração intraperitoneal de MPTP em camundongos, não gerou neuroproteção, tanto em relação aos níveis de DA estriatal, quanto ao conteúdo de TH estriatal.

Tem sido reportado que a expressão de COX-2 é induzida especificamente em neurônios dopaminérgicos presentes na SNpc. Este fato já foi verificado em mesencéfalos humanos especialmente no modelo animal induzido por MPTP, durante a destruição da via nigroestriatal (TEISMANN *et al.*, 2003). Outras evidências da importância do papel da COX-2 na mediação da neurodegeneração dopaminérgica nigroestriatal são referentes ao uso de inibidores da COX-2, que por sua vez apresentam efeito neuroprotetor (AUBIN *et al.*, 1998; NAKAYAMA *et al.*, 1995; SCALI *et al.*, 2000; KURKOWSKA-JASTRZEBSKA *et al.*, 2002).

Este efeito neuroprotetor sugerido pela literatura ficou evidenciado ao se realizar os ensaios de imunodeteção da TH através do ensaio de western blotting. A Figura 12 mostra a depleção de 30% no conteúdo de TH na SN dos animais do grupo MPTP+salina 24 horas após a cirurgia. O grupo MPTP+parecoxib também apresentou depleção significativa de 20% no conteúdo de TH na SN. A mesma análise, no mesmo tempo (24 horas após a cirurgia) foi realizada no estriado (Figura 13), onde não se verificou depleção no conteúdo de TH para os grupos MPTP+salina e MPTP+parecoxib. Desta forma podemos sugerir que a dose de 10 mg/kg de parecoxib não foi capaz de preservar o conteúdo de TH presente na SN, ao passo que o MPTP não gerou depleção no conteúdo de TH no estriado 24 horas após a cirurgia.

A primeira vista tal fato pode gerar uma opinião controversa, pois estudos já citados de nosso grupo apontam para uma redução significativa nos

níveis de DA, HVA e DOPAC no estriado de animais tratados com MPTP (PERRY *et al.*, 2004; DA CUNHA *et al.*, 2001). Entretanto podemos inferir que o MPTP gerou pequena morte neuronal na SN, sendo que este fato não afetou significativamente o conteúdo de TH presente no estriado, 24 horas após a cirurgia. Seja por um mecanismo compensatório dos neurônios dopaminérgicos, ou por uma falta de disseminação da lesão até o estriado, neste tempo observado, verificou-se que nem o MPTP e nem o parecoxib afetaram de forma significativa o conteúdo da enzima TH, 24 horas após a cirurgia.

Sete dias após a cirurgia (Figura 14) verificou-se uma redução significativa de 20% no conteúdo de TH, referente ao grupo MPTP+salina na SN. Ao passo que, o grupo MPTP+parecoxib não diferiu do grupo controle+salina. Sugere-se que o parecoxib apresentou evidente efeito nos neurônios dopaminérgicos. Este efeito pode ser em decorrência de uma neuroproteção pura, ou seja, simplesmente por evitar a morte neuronal através de algum mecanismo que bloqueie a ação do MPTP, como por exemplo, o aumento de ROS, ou até mesmo em processos de apoptose/necrose (que são desencadeados pelo MPTP). Ou então, este efeito pode ser em virtude de uma modulação na expressão protéica da TH, ou seja, uma *up-regulation* (TEISMANN *et al.*, 2003).

No entanto ambos os mecanismos gerariam como resultado final um efeito maior que deve ser classificado como neuroproteção, haja vista os demais efeitos comportamentais causados pelo parecoxib. Por outro lado, a resposta obtida no estriado, sete dias após a cirurgia (Figura 15), não mostrou alterações no conteúdo de TH, tanto para o grupo MPTP+salina quanto para o grupo MPTP+parecoxib. Este fato reforça a idéia da presença de um mecanismo compensatório envolvendo a resposta dopaminérgica no estriado, frente à lesão por MPTP. No entanto não devemos descartar a possibilidade de haver uma falta de disseminação da lesão até o estriado. Novamente observamos que o parecoxib não foi capaz de proteger de forma significativa a redução do conteúdo da enzima TH, 7 dias após a cirurgia no estriado.

Quatorze dias após a cirurgia o grupo MPTP+salina apresentou uma redução significativa de 26% no conteúdo de TH presente na SN (Figura 16). Já o grupo MPTP+parecoxib mostrou-se igual ao grupo controle+salina.

Novamente observamos que o parecoxib produziu efeitos no sistema dopaminérgico, sendo compatíveis com uma neuroproteção.

Surpreendentemente, neste mesmo tempo de observação (14 dias), o grupo MPTP+salina apresentou uma redução significativa de 24% no conteúdo de TH presente no estriado (Figura 17). Este resultado indica a hipótese da disseminação da lesão, e mais, podemos sugerir que há um novo componente implicado na lesão por MPTP, que é o tempo necessário para que os efeitos tóxicos dessa substância, aplicada diretamente na SNpc, leva até atingir o estriado, de forma significativa. Porém, independentemente desse tempo e dos fatores que o medeiam, o tratamento com parecoxib impediu que o conteúdo de TH fosse significativamente depletado. Ou seja, estamos provavelmente diante de um efeito neuroprotetor mediado através de um mecanismo de preservação da enzima, e conseqüentemente do neurônio dopaminérgico como um todo, do que um mecanismo de indução da expressão de TH, pura e simplesmente dito.

Vinte e um dias após a cirurgia o grupo MPTP+salina apresentou uma redução significativa de 28% no conteúdo de TH presente na SN (Figura 18). Já o grupo MPTP+parecoxib não apresentou diferença em comparação ao grupo controle+salina. Novamente observamos que o parecoxib gerou efeitos no sistema dopaminérgico, sendo compatíveis com uma neuroproteção. A Figura 19 vem corroborar as evidências do efeito neuroprotetor do parecoxib, possivelmente mediado pela sua capacidade de manter a integridade do conteúdo de TH. Nesta figura o grupo MPTP+salina apresenta redução significativa de 20% no conteúdo de TH presente no estriado, enquanto que o grupo MPTP+parecoxib não diferiu em relação ao grupo controle+salina.

Tomados em conjunto, os resultados do presente estudo indicaram que a administração do parecoxib preveniu a neurotoxicidade do MPTP neste modelo animal da DP. É fundamental, em futuros estudos, investigar o efeito neuroprotetor dos inibidores da COX-2, e dessa forma desenvolver novas possibilidades terapêuticas para a DP.

## 6. CONCLUSÕES

- O parecoxib (10 mg/kg) foi capaz de preservar o comportamento motor (medido no campo aberto) de animais 24 horas após infusão bilateral de MPTP (100 µg) intranigral.
- O tratamento prolongado com parecoxib (2 mg/kg) preservou a função motora (verificado no campo aberto) de animais 7 (não diferiu do controle+salina), 14 (redução no tempo de imobilidade em comparação ao controle+salina) e 21 dias (aumento na frequência de locomoção em comparação ao controle+salina) após infusão bilateral de MPTP (100 µg) intranigral.
- O tratamento com parecoxib preservou a habilidade dos animais lesados em realizar a tarefa do labirinto aquático de Morris – versão *cued test*, indicando um efeito restaurador na memória não-declarativa de hábito, avaliados neste teste.
- Sugere-se, através dos resultados da imunodeteção de TH por western blotting, que o parecoxib apresentou efeito neuroprotetor observado na SN nos tempos de 7, 14 e 21 dias após a cirurgia estereotáxica, ao passo que este efeito neuroprotetor foi visto no estriado apenas nos tempos de 14 e 21 dias.
- Sugere-se que o MPTP produziu uma redução no conteúdo de TH no estriado de forma tardia em relação à SN. É possível que este efeito seja em decorrência do pequeno tamanho da lesão na SN, que assim levaria certo tempo até manifestar seus efeitos no estriado.
- O retardo no aparecimento da depleção de TH no estriado sugere que o parecoxib apresente um efeito neuroprotetor por preservar, de alguma forma, o conteúdo de TH dos neurônios. Portanto, esse efeito não se deve a uma possível indução, *per se*, da expressão de TH nos neurônios estriatais.

## 7. BIBLIOGRAFIA

Aubin, N., Curet, O., *et al.*, 1998. Aspirin and salicylate protect against MPTP-induced dopamine depletion in mice. *J. Neurochem* 71, 1635-1642.

Almer, G., Guegan, C., Teismann, P., Naini, A., Rosoklija, G., Hays, A. P., Chen, C., Przedborski, S., 2001. Increased expression of the pro-inflammatory enzyme cyclooxygenase-2 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.*, 49, 176-185.

Andrade, L.A.F, Ferraz H.B., 1996. Quadro clínico. In: Meneses, M.S., Teive, H.A.G. (Ed.). *Doença de Parkinson: aspectos clínicos e cirúrgicos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 51-68.

Andreasson, K. I., Savonenko, A., Vidensky, S., Goellner, J. J., Zhang, Y., Kaufmann, W. E., 2001. Age-Dependent cognitive deficits and neuronal apoptosis in cyclooxygenase-2 transgenic mice. *J. Neurosci.* 21, 8198-8209.

Ballard, P. A., 1985. Permanent human parkinsonism due to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): seven cases. *Neurology.* 35, 949-956.

Birkmayer, W., Riederer, P., 1985. *Die Parkinson-krankheit: biochemie, klinic, therapie*, 2. Aufl. Springer, Wien, 60 -101.

Braga, R., *et al.*, 2005. Lesion of the substantia nigra pars compacta impairs delayed alternation in Y-maze in rats. *Exp. Neurol* 192, 134-141.

Bellísimo, M.I., *et al.*, 2004. Is the unilateral lesion of the left substantia nigra pars compacta sufficient to induce working memory impairment in rats? *Neurobiol. Learn Mem.* 82, 150-158.

Burch, D., Sheerin, F., 2005. Parkinson's disease. *Lancet* 365, 622-627.

Calne, B. D., 2001. Parkinson's disease is not one disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 7, 3-7.

Chandra, S. *et al.*, 2004. Double-Knockout mice for  $\alpha$  - and  $\beta$ -synucleins: effect on synaptic functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 14966-14971.

Chandrasekharan, N. V. *et al.*, 2002. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 13926- 13931.

Chen, H., *et al.*, 2003. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of parkinson's disease. *Arch. Neurol.* 60, 1059-1064.

Da Cunha, C., *et al.*, 2001. Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. *Behav. Brain Res.* 124, 9-18.

Da Cunha, C., *et al.*, 2002. The lesion of the rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons as a model for Parkinson's disease memory disabilities. *Cell. Mol. Neurobiol.* 22, 227-237.

Da Cunha, C., *et al.*, 2003. Evidence for the substantia nigra pars compacta as an essential component of memory system independent of hippocampal memory system. *Neurobiol. Learn. Mem.* 79, 236-242.

Danion, J. M., *et al.*, 2001. Intact implicit learning in schizophrenia. *American Journal of Psychiatry* 158, 944-948.

Dauer, W., *et al.*, 2002. Resistance of  $\alpha$ -synuclein null mice to the Parkinsonian neurotoxin MPTP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 14524-14529.

Dauer, W., Przedborski, S., 2003. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron* 39, 889-909.

Dawson, T.M., Dawson, V.L., 2003. Rare genetic mutations shed light on the pathogenesis of Parkinson disease. *J. Clin. Invest.* 111, 145-151.

Devan, B.D., Mc Donald, R.J., 1999. Effects of medial and lateral caudate-putamen lesions on place- and cue-guided behaviors in the water maze: relation to thigmotaxis. *Behav. Brain Res.* 100, 5-14.

Eberhardt, O., Schulz, J. B., 2003. Apoptotic mechanisms and antiapoptotic therapy in the MPTP model of Parkinson's disease. *Toxicol. Letters* 139, 135-151.

Eriksen, J.L., Przedborski, S., Petrucelli, L., 2005. Gene dosage and pathogenesis of Parkinson's disease. *TRENDS in Mol. Medicine* 11, 91-96.

Fahn, S., Przedborski, S., 2000. Parkinsonism. In: Rowland LP, editor. *Merritt's neurology*. New York: Lippincott Williams and Wilkins. 679-693.

Feng, Z-H., Wang, T-G., Li, D-D., Fung, P., *et al.*, 2002. Cyclooxygenase-2-deficient mice are resistant to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced damage of dopaminergic neurons in the substantia nigra. *Neurosci. Lett.* 329, 354-358.

Ferger, B., Teismann, P., 2001. Inhibition of the Cyclooxygenase Isoenzymes COX-1 and COX-2 provide neuroprotection in the MPTP-mouse model of Parkinson's Disease. *Synapse.* 39, 167-174.

Ferro, M. M., Bellissimo, M. I., Anselmo-Franci, J. A., Angellucci, M. E. M., *et al.*, 2005. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of early phase of Parkinson's disease: Histological, neurochemical, motor and memory alterations. *Journal of Neuroscience Methods* 148, 78-87.

Gao, H., Liu, B., Wanggin, Z., Jau-Shyong, H., 2003. Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. *Trends in Pharmacological Sciences* 24, 395-400.

Gelb, D.J., Oliver, E., Gilman, S., 1999. Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch. Neurol.* 56, 33-39.

Gevaerd, M.S., Miyoshi, E., Silveira, R., Canteras, N.S., Takahashi, R.N., Da Cunha, C., 2001. L-DOPA restores striatal dopamine level but fails to reverse MPTP-induced memory deficits in rats. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 4 361–370.

Gorell, M. *et al.*, 2004. Multiple risk factors for Parkinson's disease. *J. Neurol. Sciences.* 217, 169-174.

Hald, A., Lotharius, J., 2005. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: Is there a casual link? *Experim. Neurol.* xx, xxx-xxx.

Hay, J. F., Moscovitch, M., Levine, B., 2002. Dissociating habit and recollection: evidence from Parkinson's disease, amnesia and focal lesion patients. *Neuropsychologia* 40, 1324-1334.

Hernan, M. A., Takkouche, B., Caamano-Isoma, F., Gestal-Otero, J. J., 2002. A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 52, 276-284.

Horstink, M. W., Morrish, P. K., 1999. Preclinical diagnosis of Parkinson's disease. *Adv. Neurol.* 80, 327-333.

Hunot, S., Hartmann, A., Hirsch, E., 2001. The inflammatory response in Parkinson brain. *Clin. Neuroscience Research.* 1, 434-443.

Izquierdo, I., 2002. Os tipos e formas de memória. In: Izquierdo, I (Ed.); Memória. Porto Alegre: Artmed 19-34.

Kurkowska-Jastrzebska, I. *et al.* 1999. The inflammatory reaction following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3, 6-tetrahydropyridine intoxication in mouse. *Exp. Neurol.* 150, 50-61.

Lang, A., Lozano, A.M., 1998. Parkinson's disease. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 339, 1044-1053.

Langston, J. W., Ballard, P., Irwin, I., 1983. Chronic parkinsonism in humans due to o product of meperidine-analog synthesis. *Science.* 219, 979-980.

Lev, N., Melamed, E., Offen, D., 2003. Apoptosis and Parkinson's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiatry.* 27, 245-250.

Li, Z., Jansen, M, Pierre, S-R., Figueiredo-Pereira, M.E., 2003. Neurodegeneration: linking ubiquitin/proteasome pathway impairment with inflammation. 35, 547-552.

Lima, M. M. S., Braga, A., Zanata, S. M., Machado, H. B., Tufik, S., Vital, M. A. B. F., 2005. Different parkinsonism models induce a time dependent overexpression of COX-2 in the brain. *Behav. Brain Res.* Submitted.

Linder, M. D., Cain, C. K., *et al.*, 1999. Incomplete nigrostriatal dopaminergic cell loss and partial reductions in striatal dopamine produce akinesia, rigidity, tremor and cognitive deficits in middle-aged rats. *Behavioural Brain Research.* 102, 1-16.

Lowry *et al.*, 1951. Protein measurement with the Folin protein reagent. *J. Bio. Chem.* 193, 265-275.

McGeer, P.L., McGeer, E.G., 2001. Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease. *Neurobiol. Aging* 22, 799-809.

McRae-Degueurce A., Gottfries, C. G., *et al.*, 1986. Antibodies in the CSF of a Parkinson patients recognizes neurons in rat mesencephalic regions. *Acta. Physiol. Scand.* 126, 313-315.

Meneses, M.S., Teive, H.A.G., 2003. Introdução. In: Meneses, M.S., Teive, H.A.G. (Ed.). *Doença de Parkinson: aspectos clínicos e cirúrgicos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1-3.

Miyoshi, E., Wietzikoski, S., Camplessei, M., Silveira, R., *et al.*, 2002. Impaired learning in a spatial working memory version and in a cued version of the water maze in rats with MPTP-induced nigral lesion. *Brain Res Bull* 58 (1), 41-47.

Nagatsu, T., Mogi, M., *et al.*, 2000. Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J. Neural. Transm. [Suppl]* 60, 277-290.

Nakayama, M., Uchimura, K., Zhu, R.L., Nagayama, T., Rose, M.E., Stetle, R.A., Isakson, P.C., Chen, J., Graham, S.H., 1998. Cyclooxygenase-2 inhibition prevents delayed death of CA1 hippocampal neurons following global ischemia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 10954– 10959.

Orr, C.F., Rowe, D. B., Halliday, G.M., 2002. An inflammatory review of Parkinson's disease. *Progress in Neurobiol.* 68, 325-340.

Packard, M.G., McGaug, J.L., 1992. Double dissociation of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: further evidence for multiple memory systems. *Behav. Neurosci.* 106, 439-446.

Periquet, M. *et al.*, 2003. *Parkin* mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism. *Brain* 126, 1271-1278.

Perry, J. C., Da Cunha, C., Anselmo-Franci, J., Andreatini, R., *et al.*, 2004. Behavioural and neurochemical effects of phosphatidylserine in MPTP lesion of the substantia nigra in rats. *European Journal of Pharmacology* 484, 225-233.

Perry, J. C., *et al.*, 2005. Intra-nigral MPTP lesion in rats: Behavioral and autoradiography studies. *Exp. Neurol.* 195, 322-329.

Przedborski, S., Lewis, V., Naini, A. B., Jakowec, M., Petzinger, G., Miller, R., Akram, M., 2001. The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. *Journal of Neurochemistry*. 76, 1265-1274.

Przedborski, S., 2005. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*. 11, 3-7.

Przybylkowski, A., *et al.*, 2004. Cyclooxygenases mRNA and protein expression in striata in the experimental mouse model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration to mouse. *Brain Research* 1019, 144-151.

Reynolds, G. P., Garrett N. J., 1986. Striatal dopamine and homovalinic acid in Huntington's disease. *J. Neural Transm.* 65, 151-155.

Sánchez-Pernaute, R., Ferree, A., Cooper, O. Y. M., Brownell, A., Isacson, O., 2004. Selective COX-2 inhibition prevents progressive dopamine neuron degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroinflammation* 1.

Sairam, K., Saravanan, K., Banerjee, R., Mohanakumar, K., 2003. Non-steroidal anti-inflammatory drug sodium salicylate, but not diclofenac or celecoxib, protects against 1-methyl-4-phenylpyridinium – induced dopaminergic neurotoxicity in rats. *Brain Research*. 966, 245-252.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, *et al.* Molecular cloning a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press., v.2.ed. 1989.

Satyanarayana, S. V., *et al.*, 2004. Pharmacological profile of parecoxib: a novel, potent injectable selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *European Journal of Pharmacology*, v.491, p.69-76.

Scali, C., Prosperi, C., Vannucchi, M.G., Pepeu, G., Casamenti, F., 2000. Brain inflammatory reaction in animal model of neuronal degeneration and its modulation by an anti-inflammatory drug: implication for Alzheimer's disease, *Eur. J. Neurosci.* 12, 1900 – 1912.

Shimohama, S., Sawada, H., Kitamura, Y., Taniguchi, T., 2003. Disease model: Parkinson's disease. *TRENDS in Molecular Medicine.* 9, 360-365.

Stebbins, G. T., *et al.*, 1999. Delayed recognition memory in Parkinson's disease: a role for working memory?. *Neuropsychologia* 37, 503-510.

Tanner, C. M., 1992. Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol. Clin.* 10, 317-329.

Teismann, P., Ferger, B., 2001. Inhibition of the cyclooxygenase isoenzymes COX-1 and COX-2 provide neuroprotection in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Synapse* 167–174. 2001.

Teismann, P., Tieu, K., Choi, D., Wu, D., Naini, A., Hunot, S., Vila, M., Jackson-Lewis, V., Przedborski, S., 2003. Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *PNAS* 100, 5473-5478.

Teive, H.A.G., Meneses, M.S., 2003. Histórico. In: Meneses, M.S., Teive, H.A.G. (Ed.). *Doença de Parkinson: aspectos clínicos e cirúrgicos.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 4-14.

Togo, T., Iseki, E., Marui, W., Akiyama, H., Ueda, K., Kosaka, K., 2001. Glial involvement in the degeneration process of Lewy body-bearing neurons and the degradation process of Lewy bodies in brains of dementia with Lewy bodies. *J. Neurol. Sci.* 184, 71-75.

Valdeoriola, F., Nobbe, F. A., Tolosa, E., 1997. Treatment of behavioural disturbances in Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* 51, 175-204.

Vila, M., Przedborski, S., 2003. Targeting Programmed Cell Death in Neurodegenerative diseases. *Nat. Reviews Neuroscience.* 4,1-11.

Vila, M., Przedborski, S., 2004. Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Nat. Med.* 10, 58-62.

Zang, M.Z., Yao, B., McKanna, J.A., Harris, R.C., 2005. Cross talk between the intrarenal dopaminergic and cyclooxygenase-2 systems. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 288, 840-845.