

**IVANA KOUZMINE**

**ESTUDO DOS EFEITOS DA LESÃO DA SUBSTÂNCIA NEGRA  
COMPACTA DIREITA E ESQUERDA SOBRE A MEMÓRIA DE RATOS**

**Monografia apresentada à disciplina de  
Estágio em Farmacologia como requisito  
parcial à conclusão do Curso de Ciências  
Biológicas, Setor de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Paraná.**

**Orientador: Prof. Dr. Cláudio da Cunha**

**Co-orientadora: Dra. Maria Ines Bellissimo**

**CURITIBA**

**2002**

## RESUMO

O cérebro está dividido em dois hemisférios que apresentam uma certa especialização para algumas funções. A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa que afeta principalmente pessoas com mais de 50 anos. A depleção de dopamina (DA) no estriado, causada pela degeneração de neurônios dopaminérgicos na substância negra parte compacta (SNc), provoca os principais sintomas motores e cognitivos da doença. Essa depleção ocorre com mais de 70% dos neurônios dopaminérgicos da SNc. A infusão de MPTP intracraniana provoca lesões na SNc, causando a depleção de neurônios dopaminérgicos. Neste estudo foi utilizado o modelo do MPTP em ratos, sendo os animais divididos em quatro grupos para a cirurgia e os testes: lesão bilateral, lesão da SNc direita, lesão da SNc esquerda e sham (sem lesão). A lesão bilateral em ratos causa um déficit na memória operacional e na memória de hábito, sem afetar a memória espacial. Neste estudo observou-se que animais com lesão bilateral da SNc apresentaram prejuízo de memória operacional em relação ao grupo sham em todas as tentativas, no teste do labirinto aquático – versão memória operacional, e os animais com lesão unilateral direita ou esquerda da SNc apresentaram prejuízo significativo em relação ao grupo sham em dois dias de treino no mesmo teste. Os animais com lesão bilateral da SNc apresentaram ambulação significativamente alta no teste do campo aberto em relação ao grupo sham, sem apresentarem diferenças significativas no tempo parado, levantar e bolos fecais. Este comportamento pode indicar problemas cognitivos. A rotação no sentido horário foi significativamente maior, em relação aos demais grupos, em ratos com lesão na SNc direita, enquanto que animais com lesão na SNc esquerda apresentaram significativamente maior rotação no sentido anti-horário, em relação aos demais grupos. Para que ocorra déficit cognitivo significativo no modelo do MPTP é necessário o efeito somatório da lesão bilateral. A lesão unilateral pode servir como modelo para um déficit incipiente de memória operacional e sintomas motores.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	iii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	3
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	10
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	11
3.1 ANIMAIS .....	11
3.2 CIRURGIAS .....	11
3.3 TESTE DO CAMPO ABERTO .....	12
3.4 LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS – VERSÃO MEMÓRIA OPERACIONAL .....	13
3.5 ROTAÇÃO INDUZIDA COM APOMORFINA .....	14
3.6 ESTATÍSTICA .....	14
<b>4 RESULTADOS</b> .....	15
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	18
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	22

## 1 INTRODUÇÃO

O cérebro está dividido em dois hemisférios que apresentam uma certa especialização para algumas funções. Muitos trabalhos têm demonstrado a dominância do hemisfério esquerdo nas tarefas lingüísticas, conceituais e classificadoras, e do hemisfério direito sobre atividades espaciais, intuitivas e de reconhecimento de informações familiares (ZIGMOND et al., 1999).

A participação do córtex cerebral no comando dos movimentos é conhecida desde o século XIX, quando experimentos com eletrochoques na superfície cortical de um cão mostraram movimentos discretos com a estimulação de pontos específicos do lobo frontal. Outros experimentos desenvolvidos mostraram a existência de quatro grandes áreas motoras no córtex cerebral: a área motora primária, que ocupa o giro pré central do lobo frontal e está relacionada com o comando dos movimentos voluntários; a área motora suplementar, localizada rostral e dorsalmente a área motora primária; a área pré-motora, situada rostral e lateralmente a área motora primária, e a área motora cingulada, posicionada na face medial do córtex, logo acima do corpo caloso (LENT, 2001). As áreas motora suplementar e pré-motora encontram-se relacionadas com o planejamento dos movimentos voluntários, e a área motora cingulada parece estar ligada aos movimentos que sofrem influência emocional. Atualmente, a área motora primária é considerada a sede do “alto comando motor” (LENT, 2001). As áreas motoras do córtex apresentam inúmeras conexões umas com as outras; um único músculo é ativado por diferentes pontos da área motora primária, princípio denominado de convergência, e a estimulação de um único neurônio motor pode produzir uma resposta em diversos músculos, indicando que um axônio pode inervar vários motoneurônios de diferentes músculos (divergência). O córtex motor também apresenta uma grande plasticidade, sendo esta importante para a recuperação da motricidade que ocorre em alguns pacientes com lesão neurológica. (LENT, 2001)

O cerebelo e os núcleos da base são responsáveis pelo sistema de controle que funciona com precisão e refinamento, atuando no controle dos movimentos desde o início até o final dos mesmos. Estas estruturas elaboram a preparação do movimento e do controle “on line” da combinação dos movimentos executados ao mesmo tempo ou em seqüência (LENT, 2001). O cerebelo e os núcleos da base possuem conexões com as regiões motoras, embora não apresentem ligação direta com os motoneurônios. Os núcleos da base são um conjunto de núcleos situados em diferentes partes do sistema nervoso que apresentam conexões entre si e participam do sistema funcional de controle motor (LENT, 2001). Estes núcleos encontram-se localizados no telencéfalo (globo pálido, núcleo caudado e putamem), no diencéfalo (núcleo subtalâmico) e no mesencéfalo (substância negra). Os núcleos da base recebem apenas eferências corticais; emitem eferências ao tálamo e seus eferentes são inibitórios (LENT, 2001). A seqüência de operações em um indivíduo normal é: as regiões motoras e sensoriais do córtex cerebral ativam os neurônios espinhosos médios do corpo estriado; estes inibem os neurônios do globo pálido interno, que liberam a atividade excitatória do tálamo sobre o córtex motor para iniciar o movimento desejado (LENT, 2001). A substância negra, um dos núcleos da base, recebe este nome devido a presença do pigmento neuromelanina (polímero do precursor catecolaminérgico di-hidroxifenilalanina) (AIRES, 1999) e apresenta-se dividida em duas partes: a parte reticulada e a parte compacta (SNc). A SNc encontra-se localizada entre o tegmento e a base do pedúnculo cerebral (Machado, 1993), e é formada por neurônios dopaminérgicos que se projetam para o estriado formando a via nigroestriatal. A SNc também recebe projeções da amígdala (motivação e emoções) e da formação reticular (despertar) (MARTIN, 1998). A degeneração dos neurônios dopaminérgicos da SNc provoca uma diminuição da quantidade de dopamina no estriado, o que resulta em sintomas parkinsonianos.

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa que afeta principalmente pessoas com mais de 50 anos. A depleção de dopamina (DA) no estriado causa uma interrupção no sistema de transmissão de sinais entre os centros

de “alto comando motor” e o córtex (YOUDIM & RIEDERER, 1997). É normal que certa quantidade de neurônios (em torno de 4%) morra durante o processo de envelhecimento. Porém na DP ocorre a perda de mais de 70% dos neurônios da substância negra. Não foram elucidados os mecanismos que levam a esta grande perda neuronal, porém pesquisas indicam que fatores genéticos e ambientais, ou uma combinação de ambos cause esta perda (YOUDIM & RIEDERER, 1997). A DP apresenta uma evolução lenta e progressiva, sendo que distúrbios na memória e no processo de aprendizado aparecem cedo. Esta doença leva o paciente a uma incapacidade física nas fases mais avançadas, com uma combinação de sintomas que inclui, em diversos graus de intensidade, tremor, rigidez, acinesia, bradicinesia e perda dos reflexos do ajuste postural, além de alterações da motricidade automática (MACHADO, 1993; AIRES, 1999). Sintomas não motores podem surgir antes ou junto com os sintomas motores. Esses sintomas incluem a sudorese ou outros distúrbios do sistema nervoso autônomo e problemas psicológicos como a depressão em estágios mais avançados da doença (YOUDIN & RIEDERER, 1997). O tremor é predominantemente o de repouso e ocorre principalmente nas mãos, parando com o movimento do membro. Este tremor tem início, geralmente em uma das mãos ou pés e vai se espalhando gradualmente. Ocorre a perda dos reflexos de ajuste postural, que é causada pela alteração do tônus muscular, causando dificuldade de equilíbrio (MACHADO, 1993). A postura do indivíduo parkinsoniano fica alterada, com a cabeça e o tronco fletidos, e o antebraço e o joelho permanecem ligeiramente flexionados. Devido a estas alterações, ocorre um deslocamento do centro de gravidade para frente ocasionando uma dificuldade em manter-se de pé e uma tendência a uma propulsão durante a marcha, sendo que, os passos se aceleram. Esta alteração no modo de andar é causada pela combinação da acinesia, rigidez e anormalidade posturais. A acinesia, bradicinesia e hipocinesia descrevem o grau de incapacidade de realização de movimentos e provocam lentidão no início e na execução dos mesmos, além de indicar uma falta de atos motores automáticos (MACHADO, 1993). A acinesia provoca a paralisação dos movimentos, e,

manifestando-se durante a marcha como uma dificuldade de iniciar movimentos ou por paradas bruscas do movimento dos membros inferiores. O indivíduo com DP caminha com dificuldade, caminhando em pequenos passos e apresenta perda dos movimentos dos membros superiores. Esta perda de movimentos na qual o membro superior direito não avança juntamente com o membro inferior esquerdo, e vice-versa, pode ser o primeiro sinal da doença que se pode observar (YOU DIN & RIEDERER, 1997).

Déficits cognitivos aparecem em muitos pacientes com DP. Estes efeitos são observados já no início da doença, sendo os mais evidentes os efeitos na memória, na função visoespacial e na execução de tarefas, (DUBOIS & PILLON, 1997). Estes déficits são percebidos em pessoas sem a demência que aparece em fases mais avançadas da doença. A função visoespacial apresenta este déficit principalmente pela alteração dos processos de “pesquisa” e não por uma alteração da função visoespacial. A memória operacional, sofre um decréscimo da capacidade de processamento; e a memória episódica de longa duração pode estar normal, dependendo do que é requerido (DUBOIS & PILLON, 1997). Em testes de memória explícita, os portadores de DP tiveram um desempenho inferior ao de pessoas normais na ordenação de materiais mostrados em seqüência. Algumas evidências indicam que a memória procedural está diminuída pela doença. Os pacientes apresentam um diminuição do controle interno da atenção, o que resulta em dificuldades motoras e de aprendizado (DUBOIS & PILLON, 1997). As funções executivas também aparecem alteradas na DP, sendo suas funções “processos mentais que exigem uma elaboração do comportamento em resposta a mudanças ambientais” (DUBOIS & PILLON, 1997).

Existem diferentes tipos de memórias que podem ser classificadas de acordo com o seu conteúdo em memórias declarativas e procedurais. A memória que registra fatos, eventos ou conhecimentos é a memória declarativa, que é dividida em episódicas (referente a eventos aos quais assistimos ou participamos) e semânticas

(conhecimentos gerais). A memória procedural ou memória de procedimento é aquela na qual capacidades ou habilidades motoras são tomadas automaticamente o que é chamado de hábito. As memórias declarativas e procedurais podem ser divididas em memória explícita e implícita. As principais estruturas nervosas responsáveis pelas memórias episódicas e semânticas são o hipocampo e o córtex entorrinal. Estas estruturas trabalham associadas entre si e comunicam-se com outras regiões do córtex, como o córtex cingulado e o córtex parietal (IZQUIERDO, 2002). Em animais, este sistema é a memória espacial. O'Keefe e Nadel, em 1978, propuseram que a formação hipocampal fornece para o restante do sistema nervoso, um mapa do ambiente. Segundo O'Keefe e Nadel, existiria um outro sistema espacial independente do hipocampo e das relações espaciais entre objetos e o ambiente (XAVIER, 1999).

Os circuitos responsáveis pelas memórias de procedimento envolvem o núcleo caudado (inervado pela substância negra) e o cerebelo. O *priming* é um fenômeno essencialmente neocortical (córtex pré-frontal e as áreas associativas), no qual uma dica extensa (parte de um mapa ou pontos dele) auxiliam o indivíduo a evocar uma memória. As memórias ainda podem ser classificadas de acordo com seu tempo de duração: memórias declarativas de longa duração, que levam tempo para serem consolidadas; memórias de curta duração, que duram poucas horas (IZQUIERDO, 2002).

A memória operacional ou de trabalho mantém, por um curto período de tempo, a informação que está sendo processada naquele momento. Esta memória é diferente das outras por não produzir traços bioquímicos. Esta memória é acompanhada de poucas alterações bioquímicas e é processada no córtex pré frontal (porção mais anterior do lobo frontal), dependendo da atividade elétrica dos neurônios desta região (neurônios que enviam sinais elétricos no início, outros no meio e outros no fim dos acontecimentos). O córtex pré-frontal atua junto com o córtex entorrinal, parietal superior, e cingulado anterior e com o hipocampo através



de conexões com estas áreas (IZQUIERDO, 2002). Como já foi citado, o córtex pré frontal recebe axônios de regiões vinculadas à regulação dos estados de ânimo, dos níveis de consciência e emoções. Estes axônios modulam intensamente as células do lobo frontal que se encarregam da memória operacional, interferindo nesta memória de acordo com o estado emocional e de atenção. A memória operacional não é considerada como um tipo de memória por muitos, mas sim como um sistema no qual a informação fica o tempo suficiente para se saber se esta é uma nova informação (se é útil para o organismo e se é necessário aprender) ou se é uma informação que já consta em nossa memória. Para realizar esta busca, a memória operacional deve ter acesso rápido às demais memórias. Estas buscas são feitas através de conexões do córtex pré-frontal, via córtex entorrinal, com o hipocampo e com as demais áreas envolvidas nos processos de memória (IZQUIERDO, 2002).

Trabalhos anteriores mostraram que é possível estudar alterações de memória em um modelo animal de DP (GERLACH & RIEDERER, 1996, DA CUNHA *et al*, 2001). No modelo em estudo ratos são lesados na SNc com 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) uma substância neurotóxica. Este modelo é citado por Gerlach e Riederer como o modelo de DP mais amplamente usado e estudado. O MPTP é uma pró-droga, que ao ser metabolizada pela enzima monoamina-oxidase B nos astrócitos, produz o metabólito  $MPP^+$ , um potente oxidante. Esta substância apresenta uma grande afinidade pelos neurônios da SNc, não afetando significativamente os demais neurônios dopaminérgicos (GANONG, 1995). O processo pelo qual o MPTP provoca a morte de neurônios dopaminérgicos não está completamente elucidada, sendo as teorias seguintes as mais aceitas: O  $MPP^+$  provoca a inibição do complexo I mitocondrial; os neurônios são expostos a um intenso estresse oxidativo provocado indiretamente pelo MPTP; e modifica as quantidades de cálcio intracelular provocando um funcionamento anormal da célula (GERLACH & RIEDERER, 1996). Já se sabe que lesões bilaterais da SNc com MPTP produzem, em ratos, efeitos na memória equivalentes aos observados na doença de Parkinson em humanos ( DA CUNHA *et al*, 2001, GEVAERD *et al*, 2001

a, 2002 b; MYIOSHI *et al*, 2002). Ratos com lesão bilateral da substância negra compacta (SNc) apresentam deficiências no aprendizado da memória operacional e com dicas visuais no labirinto aquático de Morris, mas não apresentam deficiência para aprender tarefas espaciais (MIYOSHI *et al.*, 2002).

Os modelos animais são importantes nos estudos clínicos de doenças por possibilitarem um maior entendimento da doença e seus mecanismos. Com o maior conhecimento da doença, a busca por tratamentos que previnam, curem ou amenizem seus sintomas é facilitada. Quanto maior o conhecimento sobre a DP e seus mecanismos, melhores as chances de se encontrar um tratamento que não prejudique o paciente. Neste trabalho são estudadas as possíveis diferenças produzidas pela lesão da SNc esquerda, direita e bilateral da SNc sobre a memória operacional de ratos. Sabe-se que lesões bilaterais na SNc provocam déficits na memória operacional, porém não se sabe se lesões unilaterais podem afetar a memória do mesmo modo. As diferenças que existem nos dois hemisférios cerebrais não foram elucidadas completamente, sendo que estudos como este envolvendo regiões que projetam separadamente para um ou outro hemisfério cerebral que auxiliem esta compreensão são importantes. Com a observação do comportamento dos ratos nos testes aplicados, pode-se gerar uma base que venha a auxiliar a compreensão dos mecanismos motores e de memória cerebrais.

## **2 OBJETIVOS**

- Estudar os efeitos da lesão unilateral (esquerda e direita) sobre a memória operacional de ratos.
- Comparar os efeitos destas lesões com os efeitos da lesão bilateral da SNc.
- Estudar a memória operacional e alterações motoras em ratos com lesão unilateral da SNc direita e esquerda.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Foram estudados 80 ratos machos Wistar pesando entre 250 g à 300 g no começo do experimento. Os animais foram mantidos a temperatura constante ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e ciclo de claro/escuro de 12 h, iniciando às 7:00 horas, com alimento e água a vontade. Os testes comportamentais foram realizados no período da manhã. Os animais foram divididos em 4 grupos de 20 ratos por grupo: sham, lesão bilateral, lesão do lado direito e lesão do lado esquerdo.

#### 3.2 CIRURGIAS

Os ratos foram submetidos a cirurgia estereotáxica, sendo que os ratos com lesão bilateral, do lado direito e do lado esquerdo receberam infusão de MPTP diretamente na substância negra. Os ratos sham passaram por todo o processo, porém não receberam MPTP. Antes da cirurgia aplicou-se sulfato de atropina ( $0,4 \text{ mg/ml} = 0,1 \text{ ml}/100\text{g}$ ) e tiopental ( $25\text{mg/ml} = 0,16 \text{ ml}/100\text{g}$ ) intraperitonealmente. Com o animal anestesiado fez-se a tricotomia da parte superior da cabeça e a assepsia com álcool iodado. Após este procedimento colocou-se o animal no estereotáxico e com um bisturi fez-se uma incisão na região superior da cabeça do animal, e afastou-se os músculos expondo o osso. O crânio foi perfurado com uma broca dentária e uma agulha (30 gauge) foi introduzida na SNc nas seguintes coordenadas estereotáxicas: anteroposterior (AP),  $-5,0 \text{ mm}$  do bregma; latero-lateral (LL)  $\pm 2,1 \text{ mm}$  da linha média; dorsoventral (DV),  $-7,7 \text{ mm}$  do osso. Esta agulha estava ligada por um tubo de polietileno a uma bomba de microinfusão que injetou  $1 \mu\text{mol}$  de MPTP em  $1 \mu\text{l}$  de solução salina com um fluxo de  $0,35 \mu\text{l}/\text{min}$ , esperou-se dois minutos depois da infusão antes de se retirar a agulha. Após a retirada da agulha

suturou-se o rato e após, colocou-se cloranfenicol sobre a sutura. Depois o animal ser retirado do estereotáxico, o rato foi colocado individualmente em uma caixa de plástico branco sob luz vermelha para controlar a hipotermia. O tiopental foi substituído depois pelo equitesin (1 g de tiopental; 4,25 g de hidrato de cloral; 42,8 ml de propileno glicol; 11,5 ml de álcool 90%; 45,7 ml de água destilada; e 2,13 g de sulfato de magnésio), sendo que antes de se proceder a mudança foram testados (mesmos testes comportamentais que os animais anestesiados com tiopental) animais que receberam equitesin, sendo que os grupos anestesiados com um desses dois anestésicos não apresentaram diferenças nos testes. Além da mudança do anestésico, foi implantada a colocação de cera de osso para fechar a perfuração óssea antes da sutura, e não utilizou-se mais o cloranfenicol. Durante cinco dias após a cirurgia o animal recebeu em lugar da dieta sólida padrão uma dieta líquida (16,6% de Sustacal e 10% de açúcar), que foi modificada depois para farelo de ração com água. Esta mudança só foi realizada após a dieta ter sido testada em outros animais que passaram pelos mesmos testes comportamentais que o grupo com dieta de Sustacal e açúcar, e verificar-se que não houve diferença entre os grupos com dietas diferentes. Após os cinco dias de dieta os animais eram reagrupados em caixas contendo cinco animais.

### 3.3 TESTE DO CAMPO ABERTO

O Campo Aberto consiste de uma arena circular branca de 49 cm de raio, com 3 círculos concêntricos e 12 raios (entre o círculo mais externo e o do meio) e 6 raios (entre o círculo do meio e o central) pretos, cercado por cortinas para evitar que movimentos do observador interfiram nos movimentos do rato. Este teste foi realizado, pela manhã do 16º dia após a cirurgia. Todos os ratos foram levados para a sala de teste em suas gaiolas, e o rato que era testado era retirado de sua gaiola e colocado no centro do Campo Aberto de costas para o experimentador. Cada animal

foi observado por 5 min., sendo as características: número de cruzamentos, levantar, tempo parado, número de bolos fecais (XAVIER, 1999). Este teste tem a função de avaliar as atividades exploratórias dos animais em pesquisas relacionadas com comportamento, ou seja, as atividades relacionadas à obtenção de informações sobre o ambiente no qual o animal se encontra. Estas atividades englobam as respostas reflexas atencionais imediatas e respostas involuntárias típicas. O teste do campo aberto facilita a observação de comportamentos que são de difícil visualização quando o animal se encontra em seu ambiente natural (XAVIER, 1999). Neste trabalho, este teste também poderia identificar problemas motores nos ratos, como o comportamento rotatório espontâneo.

#### 3.4 LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS – VERSÃO MEMÓRIA OPERACIONAL

Após 21 dias da cirurgia os animais foram testados no labirinto aquático (50 cm de altura e 80 cm de raio). O teste realizado foi o de memória operacional, que consiste em quatro tentativas do rato achar a plataforma (transparente e 2 cm abaixo do nível da água colocada no meio de um dos quadrantes do tanque). Para cada tentativa o animal tinha 60 s para achar a plataforma, e caso não a encontrasse neste tempo, era conduzido até ela. Após chegar à plataforma, o rato permanecia 20 s sobre ela sendo em seguida colocado aleatoriamente em outra borda do labirinto para repetir o teste. O teste foi repetido por 5 dias sendo que a posição da plataforma mudava de lugar a cada dia. Desta forma o animal não podia usar a memória que indica a localização da plataforma no dia anterior, sendo forçado a se localizar pela sua memória operacional, a memória de curta duração desenvolvida sobre a posição da plataforma naquele dia de treino (XAVIER, 1999). Os testes realizados em labirintos partem do pressuposto de que o animal aprende determinadas localizações na qual vai ter segurança, comida ou outra situação ou ainda objeto desejado,

devendo aprender tarefas e armazenar estas informações por tempos variados. Isto é feito, no caso do labirinto aquático de Morris – versão memória operacional, quando o rato busca localizar a plataforma submersa (segurança), sobre a qual terá menor contato com a água.

### 3.5 ROTAÇÃO INDUZIDA COM APOMORFINA

Depois de 28 dias da cirurgia foi realizado o teste da rotação induzida com apomorfina. Os ratos receberam doses de 1 mg/kg de apomorfina por massa. Após 15 min. os ratos foram colocados em um recipiente de vidro redondo com 28 cm de diâmetro e as rotação no sentido horário e anti-horário foram contadas por quinze minutos (HIEMKE et al, 2002; STANFORD et al, 2002). A rotação induzida com apomorfina mostra comportamentos estereotipados e as respostas da injeção deste agonista dopaminérgico sobre os ratos com lesões unilaterais, bilaterais e ratos sham. É importante para diferenciar as respostas de cada grupo, mostrando diferenças no comportamento rotatório.

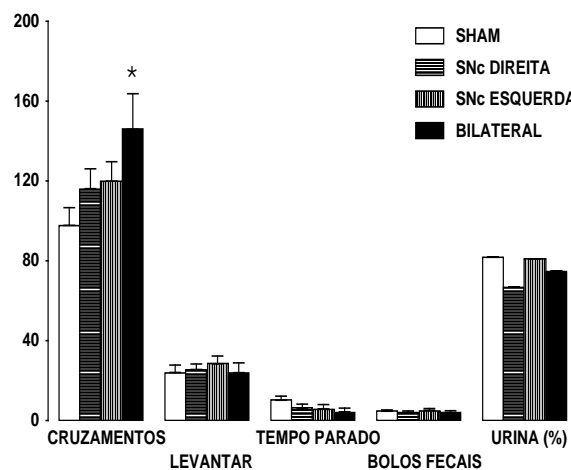
### 3.5 ESTATÍSTICA

Os resultados dos testes comportamentais foram analisados com o teste ANOVA com *post-hoc* de Duncan, e teste  $\chi^2$ .

## 4 RESULTADOS

Dos 80 animais operados, dois morreram em decorrência da anestesia e quatro em decorrência de infecções. Outros ratos apresentaram lateralização (movimentos rotatórios espontâneos e compulsivos sempre no mesmo sentido) e/ou outras alterações comportamentais e foram excluídos da estatística. No total o número de animais utilizados nos testes foi de 58, bem próximo ao N inicial proposto (N = 60).

Como pode ser visto na Figura 1, os animais com lesão bilateral apresentaram uma maior atividade ambulatoria no teste do campo aberto - maior número de cruzamentos:  $F(3,50) = 2,76$ ,  $p = 0,05$  ANOVA de uma via;  $p \leq 0,05$  teste *post-hoc* de Duncan. Os demais parâmetros avaliados neste teste não apresentaram diferenças significantes entre os grupos: tempo parado ( $F(3,51) = 1,46$ ,  $p = 0,23$ ); levantar ( $F(3,51) = 0,28$ ,  $p = 0,83$ ); número de bolos fecais ( $F(3,52) = 0,45$ ,  $p = 0,71$ ); e urina (teste  $\chi^2$ ,  $p \geq 0,28$ ) (Fig. 1).

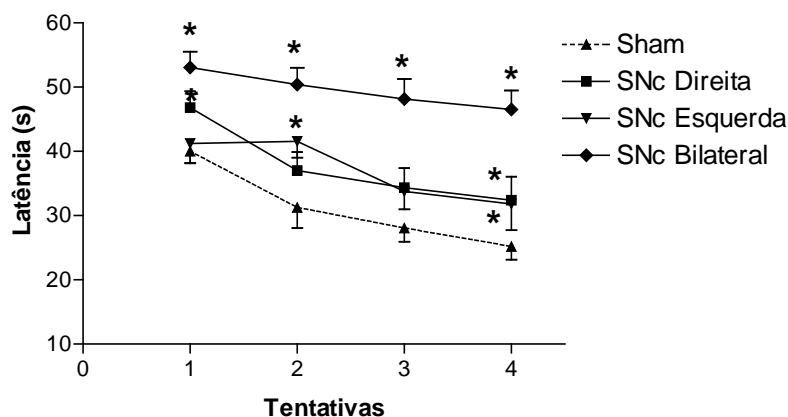


**FIGURA 1.** Campo aberto. ANOVA de uma via, teste *post-hoc* de Duncan. Cruzamentos  $p \leq 0,05$ ; levantar, tempo parado e bolos fecais  $p \geq 0,20$ . Teste  $\chi^2$ , urina  $p \geq 0,28$ .

Os ratos com lesão bilateral da SNc apresentaram uma memória operacional pior no teste do labirinto aquático quando comparados com o grupo sham ( $F(3,52)$ )



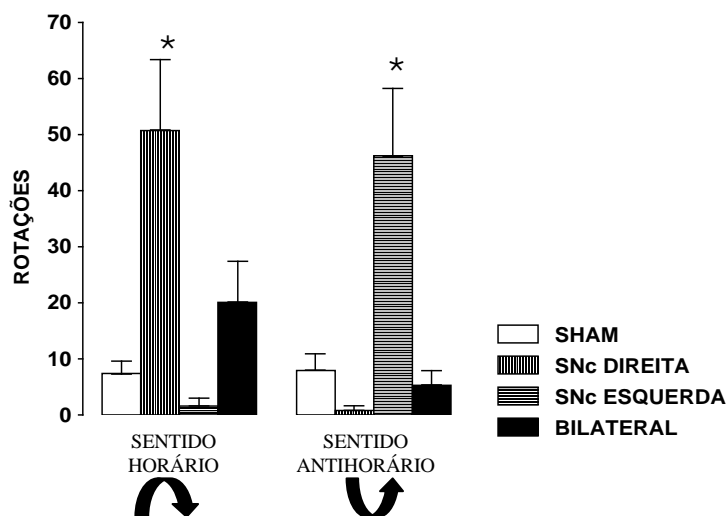
= 12,66,  $p \leq 0,001$  ANOVA de duas vias;  $p \leq 0,05$ , teste *post-hoc* de Duncan). Os ratos com lesão unilateral na SNc tiveram um prejuízo menor de sua memória operacional que os animais com lesão bilateral, sendo que os animais com lesão do lado direito apresentaram escores significativamente piores que o grupo sham só na primeira e na quarta tentativas, e os ratos lesionados do lado esquerdo só apresentaram escores significativamente piores ao grupo sham na segunda e na quarta tentativas (Fig. 2). Todos os grupos reduziram de forma significativa seu tempo de latência para encontrar a plataforma ao longo das sucessivas tentativas ( $F(3,156) = 21,15$ ,  $p \leq 0,001$  teste *post-hoc* de Duncan). Não houve interação significativa entre grupos e medidas repetidas ( $F(9,156) = 1,18$ ,  $p = 0,30$ ).



**FIGURA 2.** Labirinto aquático de Morris – versão memória operacional. ANOVA de duas vias, teste *post-hoc* de Duncan,  $p \leq 0,05$ .

Quando desafiados com uma dose de apomorfina subcutânea de 1,0 mg/kg, os animais com lesão na SNc direita apresentaram um comportamento rotatório mais acentuado no sentido horário, sendo este diferente em relação aos demais grupos ( $F(3,48) = 9,54$ ,  $p \leq 0,001$  ANOVA;  $p \leq 0,01$  teste *post-hoc* de Duncan). Já os animais lesionados na SNc do lado esquerdo apresentaram um comportamento rotatório maior no sentido anti-horário comparado com os demais grupos ( $F(3,45) = 9,03$ ,  $p \leq 0,001$ ;  $p \leq 0,01$  teste *post-hoc* de Duncan). Por outro lado, os ratos com lesão bilateral não apresentaram alterações significativas no comportamento rotatório, tanto horário como anti-horário, em relação ao grupo sham ( $p \geq 0,20$  teste *post-hoc*).

de Duncan). Da mesma forma, os animais com lesão da SNc esquerda não apresentaram alterações significantes no comportamento rotatório horário, bem como os com lesão na SNc direita não apresentaram alterações significantes no comportamento rotatório anti-horário, quando comparados ao grupo sham ( $p \geq 0,20$  teste *post-hoc* de Duncan). Portanto, observamos que a lesão com MPTP induziu rotações ipsilaterais à lesão quando os animais foram desafiados com apomorfina. (Fig. 3)



**FIGURA 3.** Rotação induzida com apomorfina. ANOVA de uma via, teste post-hoc de Duncan,  $p \leq 0,01$ .

## 5 DISCUSSÃO

O número de animais inicialmente operado foi reduzido para a realização de alguns dos testes devido a mortalidade, que foi baixa, e principalmente a problemas motores tais como comportamento rotatório espontâneo, o que impediu que alguns ratos fossem submetidos ao teste do labirinto aquático. Nos próximos meses teremos os resultados da histologia da SNc e da dosagem de monoaminas do estriado que vão possibilitar que apenas os animais que apresentaram lesões corretas (bilateral, no caso dos bilaterais, unilateral direita ou esquerda no caso dos animais unilaterais, e animais sem lesão, no caso dos sham) sejam colocados na estatística, resultando em conclusões mais consistentes.

O MPTP como modelo animal de DP vem sendo muito utilizado e estudado (GERLACH & RIEDERE, 1996). Já se sabe que lesões bilaterais na SNc provocam déficits de memória (DA CUNHA *et al*, 2001, GEVAERD *et al*, 2002a; 2002b; MIYOSHI *et al*, 2002), sendo a memória operacional, uma das prejudicadas (DUBOIS & PILLON, 1997, MIYOSHI *et al*, 2002). Neste sentido, os presentes resultados validam este modelo no qual o rato foi lesionado apenas de um lado com MPTP e se observaram alterações motoras (rotações). Isto tem uma grande importância, pois modelos de lesão unilateral com 6-OHDA são bastante utilizados como um modelo de déficits motores associados à DP (GERLACH & RIEDERER, 1996).

A 6-hidroxidopamina (6-OHDA) é utilizada como um modelo animal para a DP. É injetada diretamente no cérebro, pois não ultrapassa a barreira hematoencefálica (GERLACH & RIEDERER, 1996). A injeção bilateral de 6-OHDA na substância negra ou em outras regiões cerebrais, provoca uma elevada mortalidade neuronal, principalmente de neurônios catecolaminérgicos (GERLACH & RIEDERER, 1996). Esta droga apresenta similaridade estrutural com as catecolaminas e tem alta afinidade pelo sistema de transporte das mesmas,

mostrando assim a sua seletividade por neurônios catecolaminérgicos (GERLACH & RIEDERER, 1996). Esta droga produz lesões na SNc pela indução da produção de radicais livres como o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil, e é mais tóxica que o MPP<sup>+</sup> para o complexo I mitocondrial (GERLACH & RIEDERER, 1996).

A injeção unilateral de 6-OHDA na SNc provoca a morte neuronal no lado aplicado e a diminuição de dopamina no lado correspondente do estriado, gerando um modelo válido para estudos do papel destes neurônios em funções motoras (GERLACH & RIEDERER, 1996). Esses animais apresentam comportamento motor assimétrico quando submetidos a um forte estresse ou com a aplicação de agonistas de receptores da dopamina (GERLACH & RIEDERER, 1996). Os agonistas diretos, como apomorfina e bromocriptina, provocam rotações contralaterais, enquanto que agonistas indiretos, tais como a anfetamina, que induz a liberação de catecolaminas, produzem rotações ipsilaterais (GERLACH & RIEDERER, 1996). Esse comportamento pode ser explicado pela hiperexpressão dos receptores dopaminérgicos na porção lesada do estriado. Ou seja, as drogas agonistas terão seu efeito potencializado pela hipersensibilização dos receptores (GERLACH & RIEDERER, 1996).

Em experimentos anteriores, MIYOSHI *et al.* (2002) realizaram testes no labirinto aquático em três versões: memória de hábito, memória operacional e memória espacial de longa duração. O teste de memória operacional foi realizado com 4 tentativas por dia para o animal encontrar a plataforma e quatro dias de treino, sendo que a plataforma foi mudada de lugar em cada dia de forma que o animal não poderia usar sua memória de longa duração para encontrar a posição da plataforma. No teste de memória espacial, os animais foram submetidos a quatro dias de treino, no qual a plataforma não mudava de lugar. No teste de memória de hábito, a plataforma era sinalizada com uma bola branca sobre ela, acima do nível da água. Neste trabalho os autores encontraram que nos testes do labirinto aquático versões memória operacional e memória de hábito, os animais com lesão bilateral da SNc

apresentaram dificuldades em encontrar a plataforma em relação ao grupo sham. O déficit de memória foi mais acentuado na tarefa de memória operacional, que na versão da memória de hábito, não apresentando diferenças na memória espacial (MIYOSHI *et al*, 2002).

Neste trabalho, os animais de todos os grupos foram submetidos ao teste de memória operacional com quatro tentativas e com cinco dias de treino, sendo que a plataforma variou de posição de acordo com os dias. Animais com lesão bilateral da SNc apresentaram déficits de memória em relação ao grupo sham no teste do labirinto aquático – versão memória operacional. Este resultado corrobora os resultados encontrados por MIYOSHI e colaboradores (2002). Já os animais com lesão unilateral, apresentaram um déficit de memória operacional menos severo, que se mostrou significativo apenas em algumas das tentativas. Este resultado sugere que o déficit de memória operacional observado após a lesão da SNc esquerda e direita é aditivo e que é necessário o efeito somatório da lesão bilateral da SNc com MPTP para que se observe um prejuízo mais consistente da memória operacional do rato.

No teste do Campo aberto, os animais com lesão bilateral da SNc apresentaram um aumento da ambulação. Aparentemente os grupos com lesão unilateral apresentaram uma tendência intermediária do número de cruzamentos, porém esta não foi estatisticamente significativa. Este fato também sugere que o efeito das lesões unilaterais sobre funções motoras dos ratos é menor que o efeito da lesão bilateral. Os demais dados do campo aberto, como levantar (que também indica um comportamento exploratório) e o tempo parado, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. O fato de que animais com lesão bilateral da SNc terem uma atividade locomotora maior indica que estes não apresentaram problemas motores que atrapalhassem a ambulação, o que também sugere que isto não seja um problema que pudesse interferir na natação no labirinto aquático. Este comportamento exploratório, sem alterações nos demais comportamentos pode indicar problemas cognitivos e a busca pela fuga (HAAREN, 1993).

Sabe-se que doses elevadas de apomorfina em ratos provocam comportamentos estereotipados (HIEMKE *et al*, 2002), como uma acentuada rotação quando lesionados unilateralmente (GERLACH & RIEDERER, 1996). No modelo da 6-hidroxi-dopamina, no qual o animal sofre uma lesão unilateral, injeções de agonistas diretos como a apomorfina, apresentam rotações contra-laterais (GERLACH & RIEDERER, 1996). Nos animais lesados unilateralmente com MPTP neste trabalho, a rotação com uma dose de 1 mg/kg de apomorfina, provoca rotações ipsilaterais, semelhante à administração de agonistas indiretos em ratos com lesão por 6-OHDA (GERLACH & RIEDERER, 1996). O motivo desta diferença no sentido de rotação induzida por um mesmo agonista dopaminérgico (apomorfina) entre animais lesionados com diferentes substâncias neurotóxicas não está claro, e será estudado posteriormente. Os comportamentos estereotipados como olhos semicerrados, cheirar e outros (HAAREN, 1993) não foram computados pelo estudo. Porém observações gerais mostraram que alguns animais apresentaram estes comportamento estereotipados, mas de forma eventual.

Estes resultados indicam que é necessário o efeito somatório da lesão bilateral para produzir um déficit de memória operacional expressivo neste modelo de DP. As lesões unilaterais podem servir como modelo déficit incipiente de memória operacional, mimetizando o início dos problemas cognitivos. Além disto, este estudo mostra que a lesão da SNc com MPTP também pode produzir alterações motoras tais como o aumento da ambulação e rotações ipsilaterais induzidas por apomorfina. Neste sentido poder-se-ia também pensar em estudos de sintomas motores da DP usando este modelo animal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRES, M. M. **Fisiologia**. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 1999. 2. Edição. 934p.
- BERNE, R. M., LEVY, M. N. **Fisiologia**. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 1993. 3. Edição. 988p.
- DA CUNHA, C., GEVAERD, M. S., VITAL, M.A.B.F., MIYOSHI, E., ANDREATINI, R., SILVEIRA, R., TAKAHASHI, R. N., CANTERAS, N.S. Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. **Behavioural Brain Research**, n. 124; p. 9-18, 2001.
- DUBOIS, B., PILLON, B. Cognitive deficits in Parkinson's disease. **J Neurol**, n. 244, p. 2-8, 1997.
- GANONG, W.F. **Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro. Editora Prentice-Hall do Brasil Ltda, 1995. 17. Edição. 578p.
- GERLACH, M., RIEDERER, P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of disease in man. **Journal of Neural Transmission**, n. 103, p. 987-1041, 1996.
- GEVAERD, M. S., TAKAHASHI, R. N., SILVEIRA, R., DA CUNHA, C. Caffeine reverses the memory disruption induced by intra-nigral MPTP-injection in rats. **Brain Research Bulletin**, n. 1, v. 55, p. 101-106, 2002. (a)
- GEVAERD, M. S., MIYOSHI, E., SILVEIRA, R., CANTERAS, N. S., TAKAHASHI, R. N., DA CUNHA, C. L-Dopa restores striatal dopamine level but fails to reverse MPTP-induced memory deficits in rats. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, n. 4, p. 361-367, 2002. (b)
- HAAREN, F. V. **Techniques in the Behavioural and Neural Sciences - Methods in Behavioural Pharmacology**. Amsterdã, Holanda. Editora Elsevier, 1993. v. 10, 667p.
- HLENKE, C., GERMEYER, S., BIRKE, A., SCHMITT, U., DAHMEN, N., HAVEMANN-REINECKE, U. New dopamine D2 receptor polymorphisms in rats and association with apomorphine-induced stereotypies. **Brain Research**, n. 926, p. 1-9, 2002.
- IZQUIERDO, I. **Memória**. Porto Alegre. Editora ArtMed, 2002. 95 p.

LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios – Conceitos fundamentais de Neurociência.** São Paulo. Editora Atheneu, 2001. 698p.

MACHADO, A. P. M. **Neuroanatomia Funcional.** São Paulo. Editora Art Med, 1993. 2.Edição. 359p.

MARTIN, J. H. **Neuroanatomia – Texto e Atlas.** Porto Alegre. Editora Artes Médicas, 1998. 2. Edição. 574p.

MIYOSHI, E.; CAMPLESSEI, M.; SILVEIRA, R.; CANTERAS, N.S.; TAKAHASHI, R. N.; Da CUNHA, C. Impaired learning in a spatial working memory version and in a cued version of the water maze in rats with MPTP-induced mesencephalic dopaminergic lesions. **Brain Research Bulletin**, 58, 2002.

STANFORD, J.A.; GASH, C.R.; GERHARDT, G.A. Aged F344 rats exhibit an increased proportion of dopamine agonist-excited striatal neurons. **Neurobiology of Aging**, v. 23; 263-270, 2002.

XAVIER, G.F. **Técnicas para o Estudo do Sistema Nervoso.** São Paulo: Editora Plêiade, 1999. 241p.

YOU DIM, M. B. H., RIEDERER, P. Understanding Parkinson's Disease. **Scientific American**, janeiro 2002.

ZIGMOND, M.J.; BLOOM, F.E.; LANDIS, S.C.; ROBERTS, J.L.; SQUIRE, L.R. **Fundamental Neuroscience.** London: Academic Press, 1999.