

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TAYSA BERVIAN BASSANI

EFEITOS NEUROPROTETOR E TIPO-ANTIDEPRESSIVO
DA MELATONINA EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE
PARKINSON INDUZIDO POR ROTENONA EM RATOS

CURITIBA
2013

TAYSA BERVIAN BASSANI

EFEITOS NEUROPROTETOR E TIPO-ANTIDEPRESSIVO
DA MELATONINA EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE
PARKINSON INDUZIDO POR ROTENONA EM RATOS

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em
Farmacologia, no Curso de Pós-Graduação em
Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria A. B. F. Vital

CURITIBA
2013



1 **ATA DO JULGAMENTO DA 85ª DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

2 Ao vigésimo sétimo dia do mês de junho do ano de dois mil e treze, às quatorze
3 horas, no Anfiteatro nº 01 do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do
4 Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado de autoria da pós-
5 graduanda **TAYSA BERVIAN BASSANI**, intitulada "Efeitos neuroprotetor e tipo
6 antidepressivo da melatonina em modelo animal de doença de Parkinson induzido por
7 rotenona em ratos", sob orientação da Prof.ª Dr.ª Maria Aparecida Barbatto Frazão Vital e
8 composta pelos professores: Prof.ª Dr.ª Maria Aparecida Barbatto Frazão Vital (Presidente -
9 Farmacologia - UFPR); Prof.ª Dr.ª Ana Lúcia Severo Rodrigues (Bioquímica – UFSC) e
10 Prof. Dr. Roberto Andreatini (Farmacologia - UFPR). A Banca Examinadora iniciou os
11 trabalhos. A candidata teve quarenta e cinco minutos para expor oralmente seu trabalho,
12 sendo em seguida arguida durante trinta minutos por cada um dos membros da Banca e
13 tendo trinta minutos para responder a cada uma das arguições. No final a Comissão
14 Examinadora emitiu o seguinte parecer: APROVADA. De acordo com o
15 Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi
16 aprovada. Para a publicação, o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão
17 conferidas por sua orientadora. Nada mais havendo a tratar, a Presidente deu por encerrada
18 a sessão, da qual foi lavrada a presente ata, que será assinada pela Presidente e pelos
19 demais Membros da Banca Examinadora em Curitiba, 27 de junho de 2013.

Prof.ª Dr.ª Maria Aparecida Barbatto Frazão Vital (Presidente - Farmacologia - UFPR)

Prof.ª Dr.ª Ana Lúcia Severo Rodrigues (Bioquímica – UFSC)

Prof. Dr. Roberto Andreatini (Farmacologia - UFPR)



PARECER

A Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado “Efeitos neuroprotetor e tipo antidepressivo da melatonina em modelo animal de doença de Parkinson induzido por rotenona em ratos”, de autoria da pós-graduanda **TAYSA BERVIAN BASSANI**, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida Barbato Frazão Vital e composta pelos professores: Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida Barbato Frazão Vital (Presidente - Farmacologia - UFPR); Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia Severo Rodrigues (Bioquímica – UFSC) e Prof. Dr. Roberto Andreatini (Farmacologia - UFPR), reuniu-se e, de acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi APROVADA. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pela sua orientadora. Em Curitiba, 27 de junho de 2013.

Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida Barbato Frazão Vital (Presidente - Farmacologia - UFPR)

Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia Severo Rodrigues (Bioquímica – UFSC)

Prof. Dr. Roberto Andreatini (Farmacologia - UFPR)

**Aos meus pais, Elaine Bervian Bassani e Antonio Bassani, à minha avó
Willita Irena Bervian e ao meu irmão Eduardo Bassani.**

Por todo o amor, dedicação, sacrifício, apoio e incentivo em todos os
momentos da minha vida.

Essa conquista é de todos nós!

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e inspiração.

A minha orientadora Prof^a Dr^a. Maria A. B. F. Vital, pelo apoio, conselhos, amizade, compreensão, sabedoria e amor à ciência.

Aos membros da banca pelo aceite e disponibilidade.

Ao departamento de Farmacologia da UFPR pela oportunidade de concretizar este sonho, aos professores em especial ao professor Dr. Marcelo Lima pelo auxílio em vários momentos.

A toda a minha família, especialmente aos meus pais, Elaine Bervian Bassani e Antonio Bassani, à minha avó Willita Irena Bervian, ao meu irmão Eduardo Bassani e à minha tia Elsi Bervian por sempre me apoiarem principalmente nos momentos mais difíceis, por serem o meu alicerce, por todas as orações, ensinamentos, sabedoria, amor e incentivo, pelas conversas animadoras que tornaram esta jornada mais suave.

Aos meus amigos especialmente à Jonica Caetano, Talita Kaminski, Douglas Alexandro Siqueira, Nelson Tadashi, Priscila Hirawa, Suély Weiss, Alexandre Malinowski, Ana Paola Saravia, Bianca Hess, Lucas Rodrigues e Vanessa Nesi, pelas risadas, pelas conversas animadoras, pelo apoio, pelo carinho e por tudo mais que sempre me ajudou a superar todas as dificuldades e a tornar a vida mais doce!

Aos amigos e colegas da farmacologia, especialmente ao Tiago Zaminelli, Raísa Gradowski, Janaína Barbiero, Ronise Santiago, Suelen Boschen, Laura Pulido, pelo auxílio na realização de todos os experimentos, pelos ensinamentos, pela amizade, pelas conversas e pela companhia. Sem vocês este projeto jamais se realizaria.

Aos funcionários do departamento de farmacologia da UFPR, especialmente à Silvia Cordazzo Genari, pelo auxílio técnico, pelas conversas e risadas que tornaram os inúmeros dias de experimento e “trocas de turnos” menos difíceis.

A cada um dos animais utilizados nos experimentos.

Ao CNPq, CAPES e fundação araucária pelo apoio financeiro.

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) que afeta 1-2% da população acima de 65 anos, é a doença neurodegenerativa mais frequente depois da Doença de Alzheimer. Patologicamente, a DP é caracterizada pela morte lenta e progressiva de neurônios dopaminérgicos da substância negra parte compacta (SNpc) e pelo acúmulo citoplasmático de agregados proteicos denominados corpos de Lewy. Estas alterações patológicas levam a um quadro clínico caracterizado por muitos sinais motores típicos como tremor em repouso, rigidez muscular, bradicinesia e instabilidade postural. Apesar da etiologia da DP ser ainda desconhecida, vários fatores de risco ambientais têm sido implicados no seu desenvolvimento, incluindo a exposição ocupacional a pesticidas como a rotenona. A exposição experimental à rotenona em roedores reproduz muitas das características patológicas e comportamentais da DP e, por isso, vem sendo usada como modelo animal da doença. Até o momento, não há cura para a DP, sendo que os tratamentos disponíveis somente oferecem alívio sintomático sem, no entanto, evitar o progresso da neurodegeneração. Dessa forma, torna-se necessário pesquisar terapias neuroprotetoras capazes de modificar o curso desta doença do sistema nervoso central (SNC). A melatonina, um neuro-hormônio produzido e secretado pela glândula pineal, apresenta inúmeras funções fisiológicas importantes e vem sendo extensamente estudada devido ao seu potencial neuroprotetor. De fato, muitos estudos relatam que a melatonina protege os neurônios dopaminérgicos em modelos animais da DP. Porém, há também alguns relatos conflitantes que sugerem que a melatonina não é neuroprotetora e pode até mesmo exacerbar a degeneração neuronal e os sintomas da DP. O presente estudo investigou os efeitos do tratamento prolongado com melatonina em ratos previamente expostos à rotenona. Em nosso protocolo experimental, os animais foram tratados por 10 dias com rotenona (2,5 mg/kg) ou veículo por via intraperitoneal (i.p.) e, 24 horas depois, foram tratados com melatonina (10 mg/kg) ou veículo por via i.p. durante 28 dias. Um dia após a última exposição à rotenona, nós observamos que os animais apresentavam hipolocomoção no teste de campo aberto, a qual foi espontaneamente revertida até a última avaliação motora. No último dia experimental, a rotenona também mostrou comportamento tipo-depressivo no teste de natação forçada, diminuição de dopamina (DA) estriatal e reduziu a imunoreatividade à tirosina hidroxilase (TH) na SNpc. Nós verificamos que o tratamento prolongado com melatonina após a lesão dopaminérgica não alterou a função motora dos animais, produziu efeito tipo-antidepressivo, restabeleceu os níveis de DA estriatal e parcialmente restabeleceu a imunoreatividade à TH dos neurônios nigrais. Em conjunto, esses resultados indicam que a melatonina apresenta efeitos neuroprotetor e antidepressivo no modelo de rotenona da DP.

Palavras-chave: Doença de Parkinson. Rotenona. Melatonina. Neuroprotetor.

Antidepressivo.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) affects 1-2% of the population over 65 years and it is the most common neurodegenerative disease after Alzheimer's disease. Pathologically, the PD is characterized by the slow and progressive death of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc) and by cytoplasmic deposition of protein aggregates called Lewy bodies. These pathological alterations lead to several motor cardinal symptoms such as tremor at rest, muscular rigidity, bradikinesia and postural instability. Despite PD etiology is still unknown, many environmental risk factors have been implicated in its development, including occupational exposition to pesticides like rotenone. The experimental exposition to rotenone in rodents reproduces many of the pathological and behavioral features of PD and, thus, it has been used as an animal model of the disease. So far, there is not cure for PD and the treatments available only offer symptomatic relief, however, without altering the neurodegeneration progress. Therefore, it is necessary to search for neuroprotective therapies able to modify the course of this central nervous system disorder. Melatonin, a neurohormone produced and released by pineal gland, presents numerous physiological functions and it has been extensively studied due to its neuroprotective potential. Indeed, several studies have reported that melatonin protects dopaminergic neurons in animal models of PD. Nevertheless, there are also conflicting reports suggesting that melatonin is not neuroprotective and may even exacerbate the neuronal degeneration and PD symptoms. The present study investigated the effects of prolonged treatment with melatonin in rats previously exposed to rotenone. In our experimental design, the animals were treated for 10 days with rotenone (2.5 mg/kg) or its vehicle intraperitoneally and, after 24 hours, treated with melatonin (10 mg/kg) or its vehicle intraperitoneally for 28 days. One day after the last rotenone exposure, we observed that the animals presented hypolocomotion in the open field test, which was spontaneously reversed until the last motor evaluation. At the last experimental day, rotenone also caused depressive-like behaviors in the forced swimming test, decreased striatal dopamine content and reduced the tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons within the SNpc. We verified that prolonged treatment with melatonin after the dopaminergic lesion did not alter the motor function of animals, produced antidepressant-like effects, restored the rotenone-induced striatal dopamine reduction and partially restored the tyrosine hydroxylase immunoreactivity of nigral neurons. Taken together, these results indicate that melatonin presents neuroprotective and antidepressant-like effects in the rotenone model of PD.

Key-words: Parkinson's disease. Rotenone. Melatonin. Neuroprotective.
Antidepressant.

LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA - 6-hidroxidopamina
BHE – barreira hematencefálica
COMT – catecol-o-metiltransferase
COX-2 - Ciclooxygenase tipo 2
DA - Dopamina
DOPAC - Ácido 3,4-dihidroxi-fenilacético
DAT - Transportador de Dopamina
DP - Doença de Parkinson
GSH – glutathione reduzida
GSSG – dissulfeto de glutathione
IL - Interleucina
LPS - Lipopolissacarídeo
MAO-A - Monoamino Oxidase-A
MAO-B - Monoamino Oxidase-B
MPP⁺ - 1-Metil-4-Fenil-Piridínio
MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NF κ B – fator nuclear kappa B
NO – óxido nítrico
iNOS - Óxido nítrico sintase induzível
ROS - Espécies reativas do Oxigênio
RNS - Espécies reativas do Nitrogênio
SNC – Sistema nervoso central
SN – Substância negra
SNpc - Substância Negra parte compacta
SOD – superóxido dismutase
TH - Tirosina hidroxilase
TNF – Teste de natação forçada
TNF- α - Fator de necrose tumoral α
UPS - Sistema Ubiquitina-Proteassoma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO À DOENÇA DE PARKINSON	10
1.1	FISIOPATOLOGIA DA DP	10
1.2	MECANISMOS MOLECULARES DA NEURODEGENERAÇÃO NA DP	11
1.2.1	Evidências de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial	12
1.2.2	Disfunção proteassomal e agregação proteica	14
1.2.3	O papel da neuroinflamação	15
1.2.4	Exposição à toxinas ambientais	17
1.3	FUNÇÕES FISIOLÓGICAS DA MELATONINA	19
1.3.1	Melatonina em modelos experimentais da DP	22
1.3.2	Depressão na DP e efeito da melatonina	26
2	OBJETIVOS	29
2.1	OBJETIVO GERAL	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3	ARTIGO CIENTÍFICO	29
4	CONCLUSÕES	54
4.1	CONCLUSÃO GERAL	54
4.2	CONCLUSÕES ESPECÍFICAS	54
	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO À DOENÇA DE PARKINSON

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais freqüente, sendo que a primeira é a Doença de Alzheimer. Afeta em torno de 1-2% da população com mais de 65 anos de idade e o diagnóstico ocorre em média aos 55 anos (HALD e LOTHARIUS, 2005; REICHMANN *et al.*, 2009). Este transtorno do SNC provoca alterações motoras típicas como tremor em repouso, rigidez muscular, lentidão de movimentos (bradicinesia) e instabilidade postural (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003). Além dos sinais motores, um grande número de pacientes também sofre de sintomas não motores como distúrbios neuropsiquiátricos (ansiedade e depressão, principalmente), distúrbios autonômicos, alterações cognitivas como demência, apatia, dor, distúrbios do sono e problemas sensoriais (CHUDHURI *et al.*, 2006; REICHMANN *et al.*, 2009). Os sintomas não motores constituem um problema importante na DP, pois contribuem para a incapacitação e reduzem a qualidade de vida dos pacientes (REICHMANN *et al.*, 2009).

Atualmente, a DP permanece incurável. Os tratamentos farmacológicos e não farmacológicos disponíveis oferecem alívio sintomático. Contudo, não impedem a progressão da neurodegeneração. Os sintomas podem ser aliviados por diversas drogas que aumentam os níveis de DA no cérebro ou mimetizam os seus efeitos. A droga mais utilizada no tratamento da DP é a levodopa, a qual age como um precursor da DA. Outras drogas comumente prescritas incluem os agonistas dos receptores de DA, selegilina, amantadina, inibidores da catecol-o-metiltransferase (COMT) e anticolinérgicos (SINGH *et al.*, 2007).

1.1 FISIOPATOLOGIA DA DP

A fisiopatologia da DP inclui a perda de neurônios dopaminérgicos da SNpc que fornecem inervação ao estriado (caudado e putâmen). A morte de neurônios da via nigroestriatal gera deficiência de DA no estriado, o que provoca a perda de controle sobre os movimentos corporais voluntários. No início dos sinais motores, quando o paciente é diagnosticado com a DP, já existe depleção de aproximadamente 80% da DA no putâmen e cerca de 60%

dos neurônios da SNpc já estão degenerados. Por outro lado, os neurônios dopaminérgicos da via mesolímbica, cujos corpos celulares estão na área tegmental ventral, que é adjacente à SNpc, são muito menos afetados na DP. Como a via mesolímbica projeta os seus axônios para o caudado, há muito menos depleção de DA neste núcleo (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003; LONG-SMITH *et al.*, 2009).

O segundo critério fisiopatológico para caracterizar DP é a presença de inclusões citoplasmáticas de agregados protéicos chamados Corpos de Lewy na substância negra (SN), embora estas inclusões possam ser encontradas em outras regiões que não sofrem perda neuronal. Os Corpos de Lewy consistem em uma variedade de proteínas como a α -sinucleína, ubiquitina, neurofilamentos e elementos proteassomais. Acredita-se que a agregação de proteínas como α -sinucleína na SN contribui para o processo de morte neuronal (SINGH *et al.*, 2007; DOUBLE, 2012). Embora a morte de células dopaminérgicas nigrais seja a característica patológica primária da DP, morte neuronal difusa também é observada no *locus coeruleus*, no núcleo da rafe, no núcleo motor dorsal do vago e nervos glossofaríngeos, no núcleo basal de Meynert e, em estágios mais avançados, o neocórtex também é atingido (HALD e LOTHARIUS, 2005; LONG-SMITH *et al.*, 2009).

1.2 MECANISMOS MOLECULARES DA NEURODEGENERAÇÃO NA DP

A maior parte dos casos de DP, em torno de 95% deles, não parece ter envolvimento genético e por isso são referidos como DP esporádica ou idiopática. Entretanto, nos outros casos a doença é hereditária e mutações em vários genes já foram identificadas (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003).

A origem da neurodegeneração na DP é ainda desconhecida, mas assume-se que muitos eventos celulares e moleculares possam estar envolvidos, incluindo o envelhecimento, estresse oxidativo, acúmulo de agregados protéicos, excitotoxicidade mediada por glutamato, mecanismos pró-apoptóticos, disfunção mitocondrial e proteassomal e neuroinflamação (HIRSCH *et al.*, 2005; HIRSCH e HUNOT, 2009; DOUBLE, 2012). Além disso, a exposição a muitos fatores de risco ambientais tem sido implicada na etiologia da DP idiopática (SANDERS e GREENAMYRE, 2013). Algumas das

principais hipóteses que tentam explicar a patogênese da DP serão abordadas nos itens a seguir.

1.2.1 Evidências de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial

Numerosos estudos em tecidos cerebrais *post-mortem* de pacientes com DP tem demonstrado a presença de altos níveis de peroxidação lipídica, depleção de glutathiona reduzida (GSH) e elevada oxidação proteica. Dessa forma, sugeriu-se que espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) estão envolvidas na degeneração de neurônios dopaminérgicos (TSANG e CHUNG, 2009). Adicionalmente, em estudos *post-mortem* observou-se que as modificações carbonil, que são indicativas de oxidação protéica, estão duas vezes aumentadas, os níveis de 4-hidroxi-2,3-nonenal (HNE), um aldeído gerado durante a peroxidação lipídica, estão 6 vezes aumentados e a 8-hidroxi-guanosina, um produto da oxidação de nucleosídeos está aproximadamente 16 vezes aumentada na SN de pacientes com DP comparados aos controles (HALD e LOTHARIUS, 2005).

A neurodegeneração seletiva na DP parece sugerir que os neurônios dopaminérgicos da SNpc são mais vulneráveis aos ROS e RNS, mas este mecanismo não é completamente entendido. Uma das explicações potenciais é a oxidação da DA (TSANG e CHUNG, 2009). Dentro das células, a DA pode ser degradada pela monoamino oxidase A (MAO-A) e por auto-oxidação (FIGURA 1). O metabolismo da DA pela MAO-A gera o ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com consumo de H_2O e O_2 . Já a auto-oxidação intracelular da DA gera H_2O_2 e dopamina-quinona que pode modificar proteínas diretamente (HALD e LOTHARIUS, 2005; TSANG e CHUNG, 2009). O H_2O_2 , na presença de Fe^{2+} , por meio da reação de Fenton, pode ser convertido em radicais hidroxila ($OH\cdot$), os quais são radicais altamente reativos que podem reagir com praticamente qualquer macromolécula celular. Sabe-se que os níveis de ferro na SN são mais elevados do que em outras estruturas cerebrais e, além disso, são aproximadamente 35% maiores em pacientes com DP em comparação com controles de mesma idade. Assim, a catálise de radicais hidroxila mediada por

ferro pode ser crucial para a geração de estresse oxidativo na DP (HALD e LOTHARIUS, 2005).

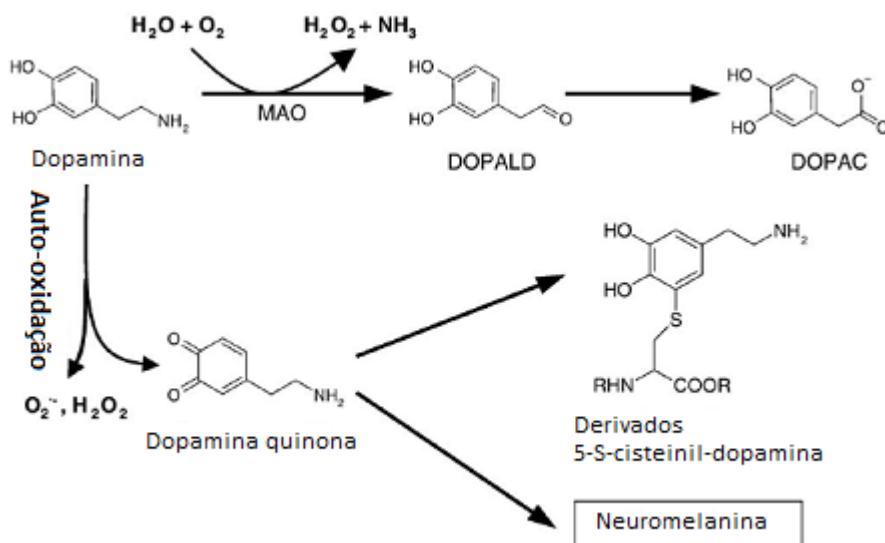


FIGURA 1 – Oxidação da dopamina. A oxidação da dopamina pela MAO ou por auto-oxidação gera H_2O_2 , que pode ser convertido a radicais OH^{\cdot} , os quais promovem a oxidação de proteínas, lipídeos e nucleosídeos. A auto-oxidação da dopamina também gera dopamina-quinona que pode se ligar covalentemente a proteínas ou ser convertida a neuromelanina. Adaptado de: HALD e LOTHARIUS (2005).

A disfunção mitocondrial tem sido considerada um importante mecanismo na patogênese da DP. Sabe-se que a atividade do complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (NADH-quinona oxidoreductase) está reduzida na SN de pacientes com DP (BÜELER, 2009). Diversos estudos epidemiológicos têm sugerido que certos pesticidas e outras toxinas ambientais podem estar envolvidos na patogênese da DP. O 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) e os pesticidas paraquat e rotenona são inibidores do complexo I mitocondrial, conduzindo à seletiva degeneração de neurônios dopaminérgicos e formação de agregados protéicos contendo α -sinucleína. O fato de que três inibidores do complexo I causam degeneração dopaminérgica, sugere que defeitos neste complexo podem ser cruciais para a morte neuronal na DP esporádica (DAWSON e DAWSON, 2003). Ao contrário do MPTP e paraquat, a rotenona administrada de forma sistêmica não se concentra apenas em neurônios dopaminérgicos, porém é capaz de induzir a sua morte celular seletiva, sugerindo que estes neurônios são especialmente sensíveis a prejuízos no complexo I mitocondrial (DAWSON e DAWSON, 2003).

A função mitocondrial também pode ser afetada por ROS, apesar de ser o principal sítio da sua formação. Estudos revelam que dano oxidativo do complexo I causado por S-nitrosilação pode inibir a sua atividade normal (TSANG e CHUNG, 2009). Além disso, estudos mostram que no cérebro parkinsoniano muitas subunidades catalíticas do complexo I apresentam níveis elevados de modificações carbonil, indicativas de oxidação proteica. Este dado se correlaciona com taxas reduzidas de transferência de elétrons, o que sugere que o dano oxidativo das subunidades do complexo I pode levar à sua disfunção (BÜELER, 2009).

A evidência mais relevante que demonstra o envolvimento causal do estresse oxidativo e da disfunção mitocondrial na patogênese da DP é oriunda da descoberta de mutações em genes relacionados à DP familiar, pois vários deles apresentam importantes funções nas mitocôndrias e/ou reduzem o estresse oxidativo devido à sua ação antioxidante (BÜELER, 2009). O primeiro gene identificado com ligação à DP Familiar é o da *α-sinucleína*. Além deste, os genes *parkin*, *DJ-1*, *PINK1* e *LRRK2* também foram relacionados à forma hereditária da doença. Mutações no *PINK1*, *DJ-1* e *parkin* causam a deflagração precoce da forma autossômica recessiva. Por outro lado, mutações em *LRRK2* e *α-sinucleína* causam a forma autossômica dominante (TSANG e CHUNG, 2009).

1.2.2 Disfunção proteassomal e agregação proteica

Sabe-se que ROS e RNS causam desnaturação e agregação proteica. Alguns estudos sugerem que proteínas oxidadas formam agregados tóxicos e podem induzir a neurodegeneração. A proteína *α-sinucleína* agregada é o principal componente dos Corpos de Lewy na DP, mas a razão pela qual é depositada nestes não é conhecida. Sugere-se que seja por dano oxidativo, visto que *α-sinucleína* nitrada é extensamente depositada nos corpos de Lewy (TSANG e CHUNG, 2009).

Há mecanismos celulares que protegem as células da alteração conformacional e agregação proteica, como o Sistema Ubiquitina-Proteassoma (UPS) ou os lisossomos (autofagia) que degradam proteínas desnaturadas ou

danificadas. Além disso, há três chaperonas como a HSP70 que ajudam a renaturar as proteínas. O estresse oxidativo, além de induzir a agregação proteica, também pode prejudicar os sistemas celulares que protegem contra a desnaturação e agregação proteica. Neste sentido, o envolvimento da disfunção do UPS foi sugerido quando se descobriu que a ubiquitina é um dos componentes dos corpos de Lewy. O UPS pode ser comprometido pelo estresse oxidativo, pois as proteínas oxidadas são mais resistentes à degradação proteossomal possivelmente através da formação de agregados. As proteínas agregadas, por sua vez, podem bloquear a entrada de outras proteínas para o proteassoma, comprometendo, assim, a função do UPS (TSANG e CHUNG, 2009).

1.2.3 O papel da neuroinflamação

Recentemente, sugeriu-se que mecanismos neuroinflamatórios provavelmente contribuem para a cascata de eventos que conduz à degeneração neuronal. A neuroinflamação pode ser consequência da morte neuronal, no entanto, algumas linhas de evidência sugerem que a inflamação pode estar envolvida no progresso da degeneração neuronal devido à produção de moléculas pró-inflamatórias deletérias (HIRSCH e HUNOT, 2009).

Fatores ambientais conhecidos por promover resposta neuroinflamatória têm sido relacionados com DP idiopática. A neuroinflamação pode ser desencadeada por infecções virais ou bacterianas, injúria neuronal (trauma cerebral ou acidente vascular encefálico) e outros fatores incluindo síndromes inflamatórias crônicas, exposição a metais pesados e compostos organofosforados, neurotoxinas como o MPTP, paraquat e rotenona (TANSEY *et al.*, 2007). Além disso, há muitos relatos epidemiológicos que correlacionam a neuroinflamação crônica da DP com infecções sistêmicas pelos vírus influenza A-H1N1, H5N1, coxsackie, encefalite japonesa-B, St. Louis, Oeste do Nilo e HIV (COLLINS *et al.*, 2012).

A teoria de que há um processo inflamatório subjacente contribuindo para a progressão da DP é apoiada por evidências relacionadas ao aumento de citocinas, ativação da microglia, ativação da via do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e dano oxidativo às proteínas no fluido cérebro espinhal de pacientes

diagnosticados com DP, cérebro *post-mortem* de pacientes com DP e também na maioria dos modelos experimentais da doença (TANSEY e GOLDBERG, 2010). A microglia é constituída pelas células residentes imunocompetentes do SNC e tem a função de monitorar o cérebro contra patógenos e injúrias. A maior parte dela fica em uma forma ramificada conhecida como estado de repouso no cérebro adulto. Mas, como consequência de mudanças patológicas, rapidamente se transforma no estado ativado em que assume uma forma amebóide (HALD e LOTHARIUS, 2005; LONG-SMITH *et al.*, 2009). A microglia pode ser ativada por muitos estímulos do ambiente extracelular, incluindo a endotoxina lipopolissacarídeo (LPS), citocinas, quimiocinas, proteínas desnaturadas e ATP que se ligam em receptores na sua superfície (LONG-SMITH *et al.*, 2009). Ao ser ativada pelos estímulos acima, a microglia libera moléculas pró-inflamatórias como interleucina 1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e NO, cuja superprodução pode ser neurotóxica (HALD e LOTHARIUS, 2005). Ativação microglial foi evidenciada principalmente na substância negra e putâmen, as áreas mais afetadas na DP, mas também no hipocampo e muitas áreas corticais (WITTE *et al.*, 2010; POLITIS *et al.*, 2012).

No nível de regulação da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, a DP parece necessitar, pelo menos em parte, da ativação de fatores de transcrição da família do fator nuclear κ B (NF- κ B) (WILMS *et al.*, 2003). Em condições normais, o NF- κ B encontra-se no citosol sequestrado por um inibidor. Sob ação de vários estímulos inflamatórios como o LPS, ele se torna ativado e é translocado para o núcleo, onde estimula a produção microglial de diversos fatores pró-inflamatórios incluindo o TNF- α , IL-1 β , IL-6, ciclooxigenase-2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (WILMS *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2010). Demonstrou-se que o NF- κ B está ativado na SNpc de pacientes com DP, em camundongos e em macacos expostos ao MPTP, sendo que a inibição seletiva do NF- κ B protege os neurônios dopaminérgicos da toxicidade pelo MPTP (GHOSH *et al.*, 2007; MONDAL *et al.*, 2012).

As citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α , IL-2 e IL-6 são expressas em níveis muito baixos no cérebro saudável. No entanto, alguns estudos demonstram que seus níveis estão significativamente aumentados em

pacientes com DP, tanto em tecidos *post-mortem* quanto no soro e fluido cérebro espinhal *in vivo* (LONG-SMITH *et al.*, 2009). A presença destas citocinas pró-inflamatórias contribui para o aumento da ativação da microglia. As citocinas derivadas da microglia podem ser diretamente tóxicas ao se ligarem nos seus receptores neuronais, mas também podem induzir enzimas microgliais como a iNOS, COX-2, NADPH oxidase e mieloperoxidase, enzimas que produzem espécies reativas tóxicas que medeiam o estresse oxidativo. Sabe-se que a redução da atividade destas enzimas oxidantes em modelos animais reduz a perda neuronal, a oxidação protéica e os sinais da doença (HIRSCH e HUNOT, 2009; WITTE *et al.*, 2010).

1.2.4 Exposição a toxinas ambientais

A teoria de que certas toxinas ambientais poderiam participar da patogênese da DP ganhou embasamento quando se descobriu que a administração intravenosa de uma droga ilícita contaminada com MPTP era capaz de causar em humanos um estado permanente de parkinsonismo (BÜELER, 2009). O MPTP em si não é tóxico, mas ao atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), é espontaneamente oxidado à MPP⁺ (1-Metil-4-Fenil-Piridínio) pela Monoamino Oxidase B (MAO-B), principalmente nas células gliais. O MPP⁺ é liberado no ambiente extracelular e entra ativamente nos neurônios dopaminérgicos pelo transportador de dopamina (DAT), onde inibe o complexo I mitocondrial da cadeia transportadora de elétrons, causando disfunção mitocondrial associado ao aumento na produção de ROS e depleção de ATP. Isto culmina em morte celular (LONG-SMITH *et al.*, 2009). Devido à sua atuação como toxina dopaminérgica, o MPTP passou a ser usado como modelo animal da DP (BÜELER, 2009).

Além disso, a exposição a muitos outros fatores de risco ambientais tem sido implicada na etiologia da DP idiopática. Dentre eles estão a exposição ocupacional a metais como o manganês e a diversos pesticidas, incluindo fumigantes, fungicidas, herbicidas, inseticidas e rodenticidas. De fato, estudos epidemiológicos apontam que a residência em ambiente rural e a exposição ocupacional presumida a pesticidas como rotenona e paraquat estão

relacionadas a um elevado risco de desenvolver a DP (SANDERS e GREENAMYRE, 2013).

A rotenona é um composto extraído de plantas leguminosas, amplamente utilizada como inseticida e para controlar populações de peixes. A rotenona é altamente lipofílica, o que a torna capaz de atravessar a BHE e todas as outras membranas celulares e também pode se acumular em organelas subcelulares como as mitocôndrias. Nestas, a rotenona prejudica a fosforilação oxidativa ao inibir o Complexo I da cadeia transportadora de elétrons (FIGURA 2) (BOVÉ e PERIER, 2012). Isto provoca a redução na síntese de ATP e a formação de ROS que danificam o próprio complexo I e outras macromoléculas celulares (SANDERS e GREENAMYRE, 2013). Paralela à sua ação na respiração mitocondrial, a rotenona também inibe a formação de microtúbulos a partir da tubulina. A inibição do proteassomo tem sido relatada após exposição crônica à rotenona *in vitro* e *in vivo*, mas sugeriu-se que isto é secundário ao estresse oxidativo e disfunção dos microtúbulos (BOVÉ e PERIER, 2012).

Durante a última década, a rotenona vem sendo empregada como modelo animal da DP em diversas abordagens experimentais. Inicialmente, a rotenona foi injetada por via intranigral. Por esta via, produziu degeneração seletiva de neurônios dopaminérgicos. Posteriormente, tentou-se administrar rotenona sistemicamente em altas doses. Porém, este protocolo resultou em lesões em áreas não específicas do cérebro e alta toxicidade sistêmica (SANDERS e GREENAMYRE, 2013). Um modelo mais adequado da DP surgiu quando BETARBET et al. (2000) realizaram administração sistêmica de rotenona em baixas doses (2-3 mg/kg/dia) ao longo de 5 semanas. Neste protocolo, a inibição parcial sistêmica do complexo I produziu degeneração nigroestriatal altamente seletiva e inclusões contendo α -sinucleína e ubiquitina nos neurônios sobreviventes, similares aos corpos de Lewy. Os animais também desenvolveram déficits motores e posturais como hipocinesia, rigidez e postura arqueada. A infusão crônica de rotenona inibiu o complexo I em todo o cérebro, no entanto, a morte neuronal ocorreu seletivamente no sistema dopaminérgico nigroestriatal. Isto sugere que estes neurônios apresentam uma sensibilidade intrínseca a prejuízos no complexo I (BETARBET et al., 2000).

A geração das inclusões positivas para α -sinucleína e ubiquitina é um ponto muito importante do uso crônico de rotenona em ratos para mimetizar a DP, pois em geral, estas inclusões não podem ser encontradas nos modelos MPTP e 6-OHDA (BOVÉ e PERIER, 2012). Embora os Corpos de Lewy não sejam específicos da DP e seu papel na morte celular permaneça controverso, a sua identificação no modelo da rotenona é uma vantagem competitiva inquestionável sobre outros modelos neurotóxicos da doença. Contudo, não se sabe se essas inclusões refletem diferenças nos mecanismos neurotóxicos ou meramente diferenças no modo de administração das toxinas (PERIER *et al.*, 2003).

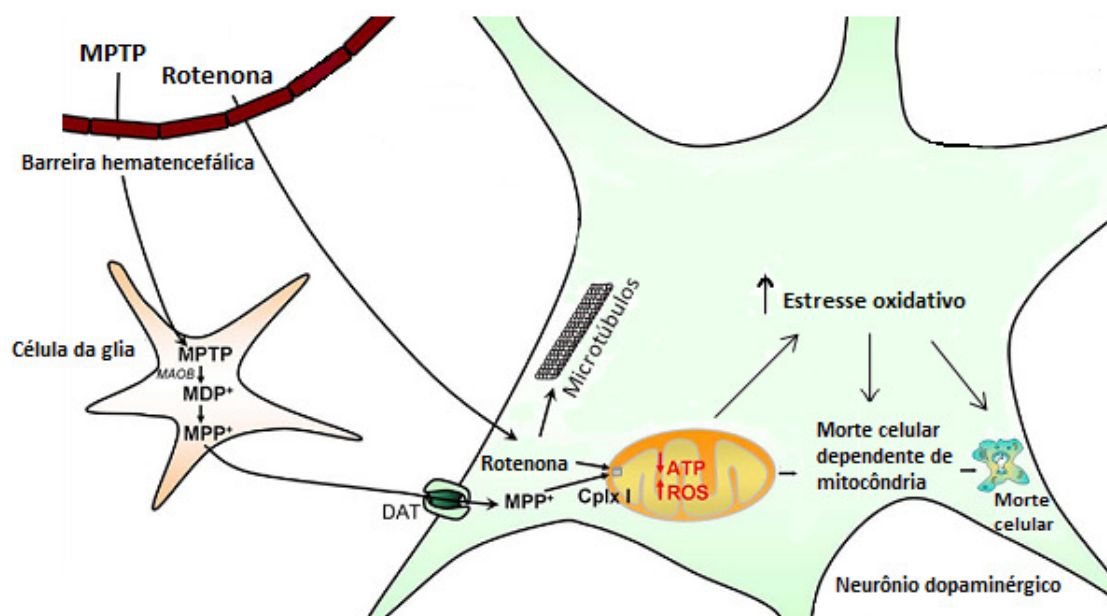


FIGURA 2 - Mecanismo de ação da rotenona. A rotenona é um composto lipofílico que pode atravessar a BHE e outras membranas biológicas. Acumula-se nas mitocôndrias, onde inibe o complexo I (Cplx I) da cadeia respiratória mitocondrial. A inibição do complexo I conduz à diminuição nos níveis de ATP, aumento na produção de ROS e à ativação da via de morte celular dependente de mitocôndria. A rotenona também pode induzir a despolimerização de microtúbulos celulares, o que pode contribuir no processo de morte celular. Adaptado de: BOVÉ e PERIER (2012).

1.3 FUNÇÕES FISIOLÓGICAS DA MELATONINA

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um neuro-hormônio indoleamina produzido pela glândula pineal a partir do aminoácido triptofano.

Este hormônio exibe um ritmo circadiano de liberação, apresentando altos níveis à noite e baixos níveis durante o dia, com pico de concentração plasmática entre 2h e 4h em humanos. A sua produção ocorre somente durante a fase escura e é agudamente suprimida pela luz, sendo rapidamente eliminada da circulação quando a sua produção cessa. Por isso, noites mais longas são associadas com maior duração da sua secreção (PANDI-PERUMAL *et al.*, 2008). Conseqüentemente, a síntese de melatonina pela pineal funciona como uma mensagem codificada para a duração da fase escura nos mamíferos (LEON *et al.*, 2004). Todavia, apresenta diferentes conseqüências funcionais dependendo da espécie. A melatonina está associada com atividade física e despertar em animais noturnos; e com sono e repouso em animais diurnos. Em conseqüência, a administração de melatonina promove o sono em humanos, mas não em ratos e camundongos (PANDI-PERUMAL *et al.*, 2008).

O relógio biológico que, em mamíferos, reside no Núcleo Supraquiasmático do Hipotálamo (SCN) é responsável pelo padrão circadiano de secreção de melatonina pela pineal. O ritmo de produção de melatonina por esta glândula é perturbado quando há lesões no SCN. A percepção de luz pela retina em um subgrupo de células ganglionares retiniais (RGCs) que contem o fotorreceptor melanopsina permite que o SCN seja sincronizado com o ciclo claro-escuro do ambiente e o trato retinohipotalâmico conecta as RGCs ao SCN (PANDI-PERUMAL *et al.*, 2008).

As principais funções fisiológicas da melatonina envolvem o controle da ritmicidade circadiana e sazonal (HARDELAND *et al.*, 2011). Além disso, há evidências demonstrando o complexo papel da melatonina em modular um grande número de outros processos fisiológicos, incluindo o controle da reprodução sazonal, fisiologia da retina, oncogênese e crescimento de tumores (LEON *et al.*, 2004), iniciação do sono, controle vaso motor, função adrenal, imunomodulação, propriedades antiinflamatórias, antioxidantes e anti-apoptóticas, modulação do metabolismo energético, biogênese e homeostase mitocondrial (HARDELAND *et al.*, 2011; SINGHAL *et al.*, 2012).

As múltiplas ações fisiológicas da melatonina são exercidas principalmente por interação com três receptores próprios pertencentes a duas classes de proteínas: os receptores de membrana MT1 e MT2, da superfamília de receptores acoplados à proteína G; e o receptor MT3 que é a enzima

quinona redutase 2 citosólica (QR2) (LEON et al., 2004; BOUTIN et al., 2005). Esta enzima pertence a um grupo de redutases que previne as reações de transferência de elétrons por quinonas, participando, dessa forma, na proteção contra o estresse oxidativo. A melatonina também se liga ao receptor órfão de hormônios nucleares relacionado aos retinóides (RZR/ROR α) (PANDI-PERUMAL et al., 2008). Os receptores MT1 e MT2 são expressos em muitos tecidos do corpo. Os receptores MT1 são encontrados no SCN, cerebelo, hipocampo, vias dopaminérgicas centrais (por exemplo, substância negra, caudado e putâmen, núcleo accumbens, área tegmental ventral), ovários, testículos, retina, glândulas mamárias, veias coronárias e aorta, pele, fígado, rins, vesícula biliar e no sistema imunológico. Já os receptores MT2 são expressos principalmente no cérebro, mas também são encontrados nos pulmões, tecidos das coronárias, aorta e cardíaco, miométrio, células granulosas, células do sistema imunológico, duodeno e adipócitos. O receptor MT3 (ou quinona redutase 2) é expresso no cérebro, rins, fígado, coração, pulmões, músculos e tecido adiposo marrom e, possivelmente, nos olhos (PANDI-PERUMAL et al., 2008).

A melatonina protege as células contra o estresse oxidativo em vários sistemas experimentais, sendo que as suas ações antioxidantes podem ser diretas ou indiretas. A melatonina consegue interagir e neutralizar diretamente ROS e RNS através de reações de transferência única de elétrons (HARDELAND, 2005). Ela reage com OH \bullet , oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), H $_2\text{O}_2$, ácido hipocloroso (HClO), óxido nítrico (NO \bullet), peroxinitrito (ONOO $^-$) e espécies derivadas do oxoferril (LEON et al., 2004). A doação de elétrons não é o único mecanismo de eliminação direta de radicais livres, mas representa a base para a produção de metabólitos protetores como o AFMK (N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina) e AMK (N1-acetil-5-metoxiquinuramina) que também exercem ação antioxidante (HARDELAND, 2005). Por outro lado, este neuro-hormônio exibe atividade antioxidante indireta ao aumentar a atividade e a expressão gênica de enzimas antioxidantes como glicose 6-fosfato desidrogenase, superóxido dismutase, catalase, glutathiona peroxidase e glutathiona redutase. Isto resulta na reciclagem de GSH e mantém uma alta proporção de GSH/GSSG (dissulfeto de glutathiona). A melatonina também promove a síntese de novo de GSH ao estimular a atividade da γ -

glutamilcisteína sintetase, sua enzima passo limitante. Paralelamente, promove também a infra-regulação de enzimas pró-oxidantes como as NOS e lipooxigenases (LEON *et al.*, 2004; HARDELAND, 2006).

Um grande número de estudos tem demonstrado que a melatonina desempenha um papel importante na regulação da homeostase mitocondrial. As mitocôndrias não somente geram ROS/RNS, mas também são o principal alvo das suas ações deletérias. Em consequência, ocorrem danos na cadeia respiratória mitocondrial, aumentando a produção de radicais livres, o que conduz a um ciclo vicioso (CARDINALI *et al.*, 2012). A melatonina aumenta a atividade dos complexos mitocondriais I e IV, melhorando a respiração mitocondrial, o fluxo de elétrons e a eficiência da fosforilação oxidativa e, com isso, aumentando a biossíntese de ATP. Além disso, aumenta os níveis de GSH, reduz a geração de NO na mitocôndria e evita a redução no seu potencial de membrana que pode desencadear a abertura do poro transitório de permeabilidade mitocondrial (mPTP) e, em consequência, a cascata apoptótica (SINGHAL *et al.*, 2012; CARDINALI *et al.*, 2012). A melatonina também inibe a ativação do NF- κ B induzida por estresse oxidativo e, com isso, reduz a expressão de moléculas de adesão e citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α (SINGHAL *et al.*, 2012). As suas propriedades antiinflamatórias também estão relacionadas à inibição dos efeitos da prostaglandina E2 e pela infra-regulação da COX-2 e da iNOS (HARDELAND *et al.*, 2006; CARDINALI *et al.*, 2012).

Envelhecimento e doenças neurodegenerativas tem sido propostas como consequências do desbalanço (fisiológico ou induzido por toxinas) entre a produção de oxidantes pelo organismo e o seu sistema de defesa antioxidante. Sabe-se que as concentrações de melatonina diminuem com o envelhecimento, consequentemente, reduzindo as defesas antioxidantes do organismo, enquanto que outros componentes do sistema antioxidante não sofrem redução com a idade. Isto sugere que a redução de melatonina pode contribuir para o aparecimento de neurodegeneração na idade avançada. (ANTOLÍN *et al.*, 2002).

1.3.1 Melatonina em modelos experimentais da DP

Em virtude dos seus múltiplos efeitos fisiológicos, a melatonina tem sido estudada pelo seu potencial neuroprotetor em muitos modelos de DP. De fato, tem sido mostrado que a administração aguda e crônica de melatonina protege os neurônios nigrais contra várias neurotoxinas dopaminérgicas. O grupo de ANTOLÍN *et al.* (2002), empregando um modelo de DP induzido por administração crônica de MPTP (35 dias) por via intraperitoneal em camundongos, mostrou que a coadministração de melatonina tem efeito neuroprotetor ao prevenir a morte de células nigrais e a redução na expressão de tirosina hidroxilase (TH – enzima passo limitante na síntese de dopamina). Em outro trabalho, mostrou-se que a administração aguda de melatonina preveniu a redução na imunoreatividade à TH e a hipolocomoção induzidas por injeção intranigral de MPTP em ratos. Contudo, o tratamento de curto prazo com o hormônio não protegeu contra os déficits cognitivos causados por esta neurotoxina (CAPITELLI *et al.*, 2008).

Os experimentos de MA *et al.* (2009) mostraram que a melatonina consegue evitar a perda de neurônios da SNpc em modelo de DP induzido por administração intraperitoneal de MPTP em camundongos. Segundo KHALDY *et al.* (2003), a co-administração de melatonina e deprenil, um inibidor da enzima MAO-B que bloqueia a conversão do MPTP a MPP⁺, tem efeito sinérgico na proteção contra danos mitocondriais e depleção de DA induzida por MPTP na via nigroestriatal. Adicionalmente, JIN *et al.* (1998) verificaram que a melatonina protege os neurônios nigrais da toxicidade induzida por MPTP ao protegê-los do estresse oxidativo por reduzir a peroxidação lipídica e por restaurar a atividade da enzima TH. PATKI e LAU (2011) também relataram que quando a melatonina é administrada por 18 semanas, a respiração mitocondrial, os níveis de ATP e enzimas antioxidantes em um modelo crônico de DP induzido com MPTP são mantidos normais. Ao mesmo tempo, os prejuízos motores são parcial e significativamente diminuídos. Estes resultados indicam que a melatonina usada continuamente não é somente um protetor mitocondrial, mas também um neuroprotetor. Dessa forma, sugere-se que a melatonina pode servir como terapia adjuvante efetiva para retardar a progressão da DP idiopática e também pode ser valiosa para modificar distúrbios mitocondriais nos quais o estresse oxidativo e inibição da cadeia respiratória são as causas.

O efeito antioxidante da melatonina também foi estudado no modelo de DP induzido por rotenona. Segundo SARAVANAN *et al.* (2007) a melatonina evitou a depleção de GSH e aumentou a atividade das enzimas SOD e catalase na SN de ratos tornados hemiparkinsonianos pela injeção intranigral unilateral de rotenona. Este hormônio também eliminou os radicais $\bullet\text{OH}$ induzidos pela rotenona em mitocôndrias isoladas. Em outro modelo de DP induzido por 14 dias de administração subcutânea de rotenona em ratos, LIN *et al.* (2008) verificaram o efeito neuroprotetor da melatonina ao prevenir a degeneração nigroestriatal e a agregação de α -sinucleína, sem afetar a hipocinesia e perda de peso induzidas pela rotenona. O hormônio também atenuou a redução no DAT e o aumento na expressão gênica do receptor D2 de dopamina após tratamento com rotenona. A melatonina também se mostrou neuroprotetora em um modelo de DP induzido por exposição crônica à rotenona em *Drosophila melanogaster* (COULOM e BIRMAN, 2004). Recentemente, ZHOU *et al.* (2012) propuseram um novo mecanismo para a atividade neuroprotetora da melatonina no modelo da rotenona. Em cultura de células Hela, a melatonina protege contra a injúria celular induzida por rotenona por meio da inibição da autofagia mediada por Omi e Bax. A melatonina inibe a expressão de Bax e a liberação de Omi/HtrA2 no citoplasma e, dessa forma, suprime a morte celular induzida pela rotenona.

Os experimentos de SHARMA *et al.* (2006) também evidenciaram neuroproteção por doses fisiológicas de melatonina em um modelo animal de DP induzido por 6-OHDA. Similarmente, demonstrou-se que a administração oral de L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina), que é considerada o padrão ouro para o tratamento sintomático da DP, aumentou a produção de 6-OHDA no estriado de ratos e camundongos. Por outro lado, o tratamento com melatonina atenuou a produção de 6-OHDA induzida pela L-DOPA (MAHARAJ *et al.*, 2005; BORAH e MOHANAKUMAR, 2009). Dessa forma, BORAH e MOHANAKUMAR (2012) formularam a hipótese de que a produção endógena de 6-OHDA induzida por L-DOPA pode agravar a degeneração dopaminérgica na DP e os autores sugerem que o uso concomitante de potentes antioxidantes como a melatonina ao longo da terapia com L-DOPA atenuaria a neurodegeneração induzida por 6-OHDA e retardaria a progressão da DP.

Apesar das evidências neuroprotetoras da melatonina em modelos animais da DP, alguns estudos tem mostrado resultados contraditórios. WILLIS e ARMSTRONG (1999) demonstraram que a exposição de ratos Sprague–Dawley a implantes intracerebroventriculares de liberação lenta de melatonina exacerbou o prejuízo motor e comportamental resultante da injeção de 6-OHDA intranigral ou MPTP intraperitoneal. Enquanto que a pinealectomia e exposição à luz constante reduziram significativamente a severidade da DP experimental e a mortalidade associada à degeneração dopaminérgica. Estes resultados são consistentes com trabalhos prévios, demonstrando que tratamentos que reduzem a biodisponibilidade da melatonina endógena podem melhorar a DP experimental. Corroborando com estes achados, Paus et al. (2007) verificaram que pacientes com DP submetidos à terapia de exposição à luz (bright light therapy) apresentaram significante melhora do tremor, da depressão e dos parâmetros I, II e IV do UPDRS (Unified Parkinson's Disease Rating Scale).

Em outro trabalho, WILLIS e ROBERTSON (2004) relataram que a administração dos antagonistas dos receptores de melatonina, ML-23 e S-20928, melhoraram significativamente a função motora em modelo de DP induzido por 6-OHDA em ratos e o ML-23 ainda aboliu a mortalidade associada à degeneração dopaminérgica, enquanto o S-20928 não teve efeito sobre a mortalidade. Os autores consideram que uma explicação possível para a melhora na função motora é que a melatonina pode prevenir o estresse oxidativo em estágios precoces da neurodegeneração, mas em estágios mais avançados pode exacerbar a degeneração dopaminérgica. Isto é apoiado por relatos de que a melatonina consegue reverter a DP experimental quando administrada no momento da injúria neurotóxica. Contudo, a supressão fisiológica da melatonina pode aliviar os sinais em estágios mais avançados da doença em animais e humanos.

Posteriormente, os mesmos autores, em um experimento utilizando sagüis como modelo animal de DP induzida por administração subcutânea de MPTP, mostraram que a administração oral de ML-23, um antagonista de receptores da melatonina, produziu uma remissão significativa de todos os sinais de parkinsonismo e este efeito não foi suprimido com a retirada do ML-23 (WILLIS e ROBERTSON, 2005). Adicionalmente, relatou-se que a

administração concomitante de melatonina em animais tratados com rotenona intraperitoneal exacerbou a depleção de DA estriatal, a degeneração terminal dopaminérgica e a perda de neurônios dopaminérgicos nigrais. Neste estudo, a melatonina isolada promoveu aumento da DA estriatal, sem alterar seu turnover. Assim, propõe-se que a melatonina potencializa a lesão induzida pela rotenona através do estresse oxidativo provocado tanto pelo aumento de DA pela melatonina quanto pela inibição do complexo I mitocondrial pela rotenona (TAPIAS *et al.*, 2010). Recentemente, LIN e colaboradores (2013) relataram um aumento nos níveis de melatonina no estriado de ratos lesados com 6-OHDA, o que se correlaciona com a redução de DA neste tecido e com o comportamento rotacional dos animais. Sugere-se neste estudo que o aumento compensatório nos níveis de melatonina no estriado danificado pode estar envolvido com o progresso da lesão neuronal neste modelo.

Diante destes dados controversos da literatura, evidencia-se a necessidade de investigar melhor os efeitos da melatonina na DP, especialmente depois da indução de parkinsonismo, pois a maioria dos estudos publicados avaliou o seu efeito quando utilizada previamente ou durante a administração de uma neurotoxina. Esta avaliação pós-lesão é importante, pois no início dos sintomas, quando o paciente é diagnosticado com a doença, aproximadamente 80% da DA estriatal já foi depletada e 60% dos neurônios dopaminérgicos nigrais já foram perdidos irreversivelmente (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003). Assim, é necessário estudar terapias que sejam efetivas quando uma lesão dopaminérgica já está instalada, o que mimetiza a condição clínica dos pacientes.

1.3.2 Depressão na DP e efeito da melatonina

Aproximadamente 90% de todos os pacientes com DP apresentam algum sintoma não motor e estima-se que 40% deles sofrem de depressão. A maioria dos casos apresenta intensidade leve a moderada. Embora a depressão seja o distúrbio neuropsiquiátrico mais comum nesta doença, frequentemente é sub diagnosticada. Diversos pesquisadores consideram a depressão como consequência do prejuízo motor. Entretanto, outros autores tem sugerido que a depressão resulta de um desequilíbrio nos sistemas

neurotransmissores e pode preceder os sinais motores (REICHMANN *et al.*, 2009). Neste contexto, HAWKES *et al.* (2010) ao proporem uma linha do tempo para a DP, estabelecem que a depressão é um sintoma pré motor que antecede o diagnóstico formal da doença em uma média de 2 a 10 anos. Assim, a depressão é considerada pelos autores como parte do estágio 2 de Braak (BRAAK *et al.*, 2003; HAWKES *et al.*, 2010).

Os mecanismos subjacentes que provocam a depressão em pacientes com DP são ainda desconhecidos. Sugere-se que muitos fatores podem contribuir para o seu desenvolvimento como processo inflamatório, alterações nos níveis de fatores neurotróficos, estresse psicossocial, dor e alterações nos sistemas dopaminérgico, noradrenérgico e serotoninérgico (AARSLAND *et al.*, 2012). A redução na atividade da via nigroestriatal e outras vias dopaminérgicas (como aquelas que inervam os circuitos límbicos e frontais), com a consequente redução nos níveis de DA é uma hipótese válida para explicar a depressão em pacientes com DP, considerando a forte associação entre a DA e a regulação dos sistemas de recompensa e do humor. De fato, a morte de neurônios dopaminérgicos na área tegmental ventral e a disfunção dos circuitos dopaminérgicos dos gânglios basais que se projetam ao lobo frontal parecem estar associados com a depressão na DP (AARSLAND *et al.*, 2012). Além disso, a degeneração em estruturas noradrenérgicas como o *locus coeruleus* e serotoninérgicas como o núcleo da rafe caudal também podem estar envolvidas (HAWKES *et al.*, 2010; AARSLAND *et al.*, 2012).

Distúrbios no perfil circadiano de secreção de melatonina foram evidenciados em pacientes deprimidos. Dessa forma, sugeriu-se que este hormônio pudesse ser benéfico para estes pacientes e, por isso, a melatonina tem sido estudada em humanos para uma possível aplicação em transtornos de humor. No entanto, estudos clínicos controlados em larga escala ainda são necessários para confirmar esta aplicabilidade. Em pacientes com transtornos depressivos, transtorno afetivo sazonal, distúrbios de sono e transtorno bipolar, tem sido relatado uma grande redução nos níveis séricos de melatonina à noite em comparação com pacientes não psiquiátricos. Por outro lado, outros estudos mostram elevação de melatonina durante o dia e a noite em pacientes com depressão maior e este padrão de secreção não está relacionado com a severidade da doença. Dessa forma, ainda não há certeza sobre qual padrão

de secreção de melatonina pode ter relação com os sintomas depressivos (MICALE *et al.*, 2006).

Em diversos estudos pré-clínicos, a melatonina mostrou efeito tipo-antidepressivo. Um dos principais modelos animais de depressão é o Teste de Natação Forçada (TNF). Neste teste, os roedores são forçados a nadar em uma situação em que não podem escapar. Dessa forma, os animais rapidamente permanecem imóveis, flutuando e fazendo somente leves movimentos para manter a sua cabeça sobre a água. O TNF é um teste validado de atividade antidepressiva, visto que a imobilidade dos animais pode ser revertida por muitas classes diferentes de antidepressivos (BOURIN *et al.*, 2004). Neste modelo, a melatonina mostrou reduzir o tempo de imobilidade dos animais, o caracteriza o seu efeito do tipo-antidepressivo (SHAJI e KULKARNI 1998; RAGHAVENDRA *et al.*, 2000; MICALE *et al.*, 2006). Além do TNF, a melatonina também mostrou efeito tipo-antidepressivo em outros modelos animais de depressão como o estresse crônico moderado (PAPP *et al.*, 2003; DETANICO *et al.*, 2009) e no teste de suspensão pela cauda em camundongos (MANTOVANI *et al.*, 2002; MANTOVANI *et al.*, 2003; BINFARÉ *et al.*, 2010).

Considerando as evidências da literatura, o presente estudo investigou os efeitos da melatonina em um modelo precoce de DP induzido por administração sistêmica de rotenona em ratos, o qual mimetiza os estágios iniciais da doença em humanos, que foi previamente desenvolvido por nosso grupo (MORAIS *et al.*, 2012). Para isso, nós fizemos um tratamento prolongado com melatonina após a última exposição à rotenona para avaliar os seus possíveis efeitos neuroprotetor e tipo-antidepressivo depois que uma lesão neuronal já está instalada.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos tipo antidepressivo e neuroprotetor da melatonina no modelo animal de DP induzido por administração sistêmica de rotenona em ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da melatonina sobre a atividade motora dos animais expostos à rotenona empregando o teste de campo aberto;
- Avaliar o efeito tipo-antidepressivo da melatonina através do teste de natação forçada modificado nos animais previamente expostos à rotenona;
- Verificar os efeitos da melatonina sobre os níveis de monoaminas no estriado e hipocampo através de HPLC após a lesão com rotenona;
- Estudar o potencial neuroprotetor da melatonina após a lesão com rotenona através da quantificação de neurônios imunoreativos à TH (TH-ir) na SNpc.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Os materiais e métodos, resultados e discussão do trabalho encontram-se no artigo científico a seguir.

**Neuroprotective and antidepressant-like effects of melatonin in a
rotenone-induced Parkinson's disease model in rats**

**Taysa Bervian Bassani,¹ Raisa W. Gradowski,¹ Tiago Zaminelli,¹ Janaína
K. Barbiero,¹ Ronise M. Santiago,¹ Suelen L. Boschen,¹ Marcelo M. S.
Lima,² Maria A. B. F. Vital¹✉**

¹Pharmacology Department, Federal University of Paraná, Brazil

²Physiology Department, Federal University of Paraná, Brazil

✉ **Corresponding author:**

Maria Aparecida Barbato Frazão Vital

Departamento de Farmacologia

Universidade Federal do Paraná

Phone: +55 41 3361 1717

Fax: +55 41 3266-2042

Email: vital@ufpr.br

Abstract Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by a progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc). Systemic and intranigral exposure to rotenone in rodents reproduces many of the pathological and behavioral features of PD in humans and thus has been used as an animal model of the disease. Melatonin is a neurohormone secreted by the pineal gland, which has several important physiological functions. It has been reported to be neuroprotective in some animal models of PD. The present study investigated the effects of prolonged melatonin treatment in rats previously exposed to rotenone. The animals were intraperitoneally treated for 10 days with rotenone (2.5 mg/kg) or its vehicle. Twenty-four hours later, they were intraperitoneally treated with melatonin (10 mg/kg) or its vehicle for 28 days. One day after the last rotenone exposure, the animals exhibited hypolocomotion in the open field test, which spontaneously reversed at the last motor evaluation. We verified that prolonged melatonin treatment after dopaminergic lesion did not alter motor function but produced antidepressant-like effects in the forced swim test, restored the rotenone-induced reduction of striatal dopamine, and partially restored tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the SNpc. Our results indicate that melatonin exerts neuroprotective and antidepressant-like effects in the rotenone model of PD.

Keywords: Parkinson's disease, melatonin, rotenone, neuroprotective, antidepressant

Abbreviations: DA, dopamine; DOPAC, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; DHPG, dihydroxyphenylglycol; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; FST, forced swim test; HVA, homovanillic acid; HPLC, high-performance liquid chromatography; 5-HIAA, 5-hydroxyindoleacetic acid; NA, noradrenaline; MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; OFT, open field test; 6-OHDA, 6-hydroxydopamine; PD, Parkinson's disease; 5-HT, 5-hydroxytryptamine (serotonin); SNpc, substantia nigra pars compacta; TH, tyrosine hydroxylase.

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease, affecting 1% of the population over 60 years of age. The disease is characterized by the progressive degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc), loss of their ascending projections to the striatum, and consequent reduction of striatal dopamine content, leading to several motor impairments (Long-Smith et al., 2009). In addition to neuronal damage, PD is characterized by the presence of proteinaceous inclusions called Lewy bodies and Lewy neurites. The cause of PD is still unknown, but many factors appear to be important for the neurodegenerative process, including abnormal protein handling, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, excitotoxicity, neuroinflammation, and apoptosis (Hirsch and Hunot, 2009). Several environmental risk factors have also been implicated in the etiology of idiopathic PD, including exposure to pesticides, such as rotenone (Sanders and Greenamyre, 2013).

Rotenone is a natural compound extracted from plants. It is commonly used as an insecticide and to control nuisance fish populations. It easily crosses the blood-brain barrier and other biological membranes and acts as a potent mitochondrial complex I inhibitor (Büeler, 2009). Intranigral and systemic exposure to rotenone in rats reproduces many of the key pathological features of PD, including selective nigrostriatal loss, striatal dopamine (DA) depletion, cytosolic inclusions that contain α -synuclein, and behavioral deficits, such as hypokinesia, rigidity, hunched posture, and cognitive deficits (Betarbet et al., 2000; Moreira et al., 2012).

Melatonin is an indoleamine neurohormone produced by the pineal gland during the dark hours. This hormone exhibits a circadian pattern of secretion (Pandi-Perumal et al., 2008), and the control of circadian and seasonal rhythmicity appears to be its main physiological function. Melatonin has important immunomodulatory, antiinflammatory, and antioxidant properties (Hardeland et al., 2011) and has been implicated in mitochondrial homeostasis (Cardinali et al., 2013). Because of these physiological functions, melatonin has been studied for its neuroprotective potential in several PD models. Many studies have reported that both acute and chronic melatonin administration protects dopaminergic neurons against neurotoxicity induced by 1-methyl-4-

phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP; Jin et al., 1998; Antolín et al., 2002; Capiteli et al., 2008; Ma et al., 2009; Patki and Lau, 2011), rotenone (Lin et al., 2008; Coulom and Birman, 2004; Saravanan et al., 2007; Zhou et al., 2012), and 6-hydroxydopamine (6-OHDA; Sharma et al., 2006).

However, conflicting data have been reported. Pinealectomy or constant light may relieve motor impairment in animal models of PD (Willis and Armstrong, 1999). Bright light therapy has also been shown to improve some aspects of motor function and other nonmotor symptoms, such as depression and daytime sleepiness in PD patients (Paus et al., 2007). Melatonin receptor antagonists have been shown to improve motor function and decrease mortality associated with dopaminergic degeneration in rats and marmosets (Willis and Robertson, 2004, 2005). Melatonin administration potentiated striatal catecholamine depletion and nigral DA cell loss in a systemic rotenone-induced PD model (Tapias et al., 2010). Given these controversial data, the effects of melatonin in PD need to be better investigated, especially after dopaminergic lesions, because most studies have evaluated the effects of this hormone by administering it either before or concomitantly with neurotoxin administration. This is important because when symptoms are initially manifested, usually around the time of diagnosis, approximately 80% of striatal DA is depleted and 60% of nigral dopaminergic neurons have already been irreversibly lost (Dauer and Przedborski, 2003).

Almost 90% of all PD patients present nonmotor symptoms during the course of the disease. Depression is one of the most common symptoms, affecting approximately 40% of patients. Parkinson's disease-related depression should be treated because it results in a decreased quality of life and further exacerbates motor symptoms (Reichmann et al., 2009). Disturbances in the circadian profile of melatonin were found in depressed patients. Therefore, melatonin has been studied in humans for its possible use in mood disorders, but extensive controlled clinical trials are still necessary to confirm its beneficial effects (Micale et al., 2006). Preclinical studies showed that melatonin has antidepressant-like effects in several animal models of depression, such as the forced swim test (FST; Shaji and Kulkarni, 1998; Raghavendra et al., 2000; Micale et al., 2006), chronic mild stress paradigm

(Papp et al., 2003; Detanico et al., 2009), and tail suspension test (Mantovani et al., 2002, 2003; Binfaré et al., 2010).

The present study investigated the effects of melatonin in a rotenone-induced PD model in rats previously developed by our laboratory (Morais et al., 2012). This model mimics the early phase of PD in patients. We performed prolonged melatonin treatment after the last rotenone exposure to characterize its possible post-lesion neuroprotective and antidepressant-like effects.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Male Wistar rats from our breeding colony were used, weighing 260-340 g at the beginning of the experiments. The animals were randomly housed in groups of four to five in polypropylene cages with wood shavings as bedding and maintained in a temperature-controlled room ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) on a 12 h/12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 AM). The animals had free access to water and food throughout the experiment. The studies were performed in accordance with the guidelines of the Committee on the Care and Use of Laboratory Animals, United States National Institutes of Health. The experimental protocol complied with the recommendations of Universidade Federal do Paraná and was approved by the University Ethics Committee (no. 579).

2.2. Drugs

Rotenone was purchased from Sigma-Aldrich (Germany) and dissolved in sunflower oil at a final concentration of 2.5 mg/ml. This solution was injected intraperitoneally (i.p.) at a dose of 2.5 mg/kg. The control group received the rotenone vehicle at 1 ml/kg, i.p. Melatonin was purchased from Sigma-Aldrich (Germany), dissolved in propylene glycol, and diluted in saline solution at a final proportion of 5:95. The final concentration of the melatonin suspension was 10 mg/ml, which was injected i.p. at a dose of 10 mg/kg. The melatonin vehicle (1 ml/kg; a mixture of propylene glycol and saline solution at a proportion of 5:95) was injected in the control groups.

2.3. Experimental protocol

The rats ($n = 60$) were randomly divided into two groups: control (rotenone vehicle) and rotenone. The rotenone solution was administered i.p. at a dose of 2.5 mg/kg for 10 consecutive days as described by Morais et al. (2012). After the last rotenone exposure, the animals were divided into four groups ($n = 14-16$ /group): vehicle+vehicle (control), rotenone+vehicle (rotenone), vehicle+melatonin (melatonin), and rotenone+melatonin (rot+Mel).

Melatonin was injected i.p. at a dose of 10 mg/kg (Papp et al., 2003) for 28 days at 5:30-6:30 PM to better reproduce the physiological profile of melatonin release. The open field test was performed 1 and 28 days after the last rotenone or vehicle exposure (experimental days 11 and 38, respectively). The same animals were also tested in the modified FST 28 days (training session) and 29 days (test session) after the last rotenone exposure (experimental days 38 and 39, respectively). Immediately at the end of these tests, a subset of rats ($n = 8-12$ /group) was euthanized by decapitation, followed by dissection of the striatum and hippocampus. These structures were stored at -70°C until processed for neurochemical analysis. Another subset of rats ($n = 5-6$ /group) were intracardially perfused, and the brains were removed for subsequent histological analysis.

2.4. *Experimental procedures*

2.4.1. Open field test

This test was used to determine motor alterations 1 and 28 days after the last rotenone injection. The apparatus consisted of a circular arena (97 cm diameter, 42 cm wall height) divided into three concentric circles and subdivided into 19 quadrants. The animals were gently placed in the center of the open field and allowed to freely explore the area for 5 min. Locomotion frequency (i.e., the number of crossings from one quadrant to another) and rearing frequency (i.e., the number of times the animals stood on their hind paws) were determined. A chronometer was used to score immobility time (i.e., the number of seconds of lack of movement during the test). The open field apparatus was washed with a 5% water-alcohol solution before and between behavioral testing to eliminate possible bias caused by odors left by previous rats.

2.4.2. Modified forced swim test

The procedure was a modification of the method proposed by Porsolt et al. (1978) and Reneric et al. (2002). The test was conducted in two sessions. In the training session, the rats were placed in a cylindrical tank that contained water at a temperature of $24 \pm 1^\circ\text{C}$ at a depth of at least 30 cm for 15 min. Twenty-four hours after the training session, the rats were subjected to the forced swim test for 5 min, which was videotaped for subsequent quantification of the following parameters: immobility (i.e., the lack of motion of the entire body with the exception of small movements necessary to keep the animal's head above the water), climbing (i.e., vigorous movements of the forepaws in and out of the water, usually directed against the wall of the tank), and swimming (i.e., large forepaw movements that displaced water and moved the body around the cylinder, movements that were more than necessary to merely keep the head above the water). The water was changed after each animal to avoid possible bias. This test was performed 29 days after the last neurotoxin injection to allow a complete recovery from hypolocomotion.

2.4.3. Determination of dopamine, noradrenaline, serotonin, and metabolite concentrations

The striatum and hippocampus were rapidly dissected and stored at -70°C until neurochemical quantification. The endogenous concentrations of DA, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA), noradrenaline (NA), dihydroxyphenylglycol (DHPG), 5-hydroxytryptamine (5-HT), and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) were assayed using reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) with electrochemical detection. The system consisted of a Synergi Fusion-RP C-18 reverse-phase column (150×4.6 mm inner diameter, $4 \mu\text{m}$ particle size) fitted with a 4×3.0 mm pre-column (Security Guard Cartridges Fusion-RP), an electrochemical detector (ESA Coulochem III Electrochemical Detector) equipped with a guard cell (ESA 5020) with the electrode set at 350 mV and a dual electrode analytical cell (ESA 5011A), and an LC-20AT pump (Shimadzu) equipped with a manual Rheodyne 7725 injector with a $20 \mu\text{l}$ loop. The internal column temperature was maintained at 25°C (Shimadzu). The cell contained two chambers in series. Each chamber included a porous graphite coulometric electrode, a double counter electrode, and a double reference electrode. Oxidizing potentials were

set at 100 mV for the first electrode and 450 mV for the second electrode. The tissue samples were homogenized with an ultrasonic cell disrupter (Sonics) in 0.1 M perchloric acid that contained 0.02% sodium metabissulfite and an internal standard. After centrifugation at $10,000 \times g$ for 30 min at 4°C, 20 μ l of the supernatant was injected into the chromatograph. The mobile phase, with a flow rate of 1 ml/min, had the following composition: 20 g citric acid monohydrate (Merck), 200 mg octane-1-sulfonic acid sodium salt (Merck), 40 mg ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Sigma), and 900 ml HPLC-grade water. The pH of the buffer running solution was adjusted to 4.0 and then filtered through a 0.45 μ m filter. Methanol (Merck) was added to give a final composition of 10% methanol (v/v). The neurotransmitter and metabolite concentrations were calculated using standard curves that were generated by determining the ratios between three different known amounts of the internal standard in triplicate. The units are expressed as ng/g of wet weight.

2.4.4. Tyrosine hydroxylase immunohistochemistry

For the immunohistochemical study, the rats were deeply anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (20 mg/kg) immediately after the behavioral test and intracardially perfused with saline, followed by 4% of the fixative solution (formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4). The brains were removed from the skull and immersed in the fixative solution for 1 week at 4°C. The brains were then placed in a 30% sucrose solution until the block sank, and then it was frozen at -70°C before sectioning. Four series of 40- μ m-thick sections were cut with a cryostat in the frontal plane and collected from the caudal diencephalon to caudal midbrain. The other tissue sections were incubated with primary anti-tyrosine hydroxylase (TH) antibody raised in mouse and diluted in phosphate-buffered saline (PBS) that contained 0.3% Triton X-100 (1:500; cat no. AB152, Chemicon, Temecula, CA, USA) overnight at room temperature. The slides were then incubated with the biotin-conjugated secondary antibody (1:200; cat no. S-1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 2 h at room temperature. After several washes in PBS, the antibody complex was detected using a modification of the ABC system (cat no. PK6101, Vectastain ABC Elite kit, Vector Laboratories), followed by reacting

with 3,3'-diaminobenzidine with nickel enhancement. The slides were then dehydrated in ascending ethanol concentrations, cleared in xylene, and coverslipped. To estimate the extent of neuronal loss in the midbrain caused by rotenone, we first assessed the dopaminergic cell group in the SNpc in control and melatonin animals, which showed preserved cytoarchitecture and normal TH immunostaining. We then compared these observations to the same dopaminergic cell groups in the rotenone groups. The selected areas were digitized with a DP71 Olympus Optical digital camera using a BX50 Olympus microscope. Unbiased quantification of TH-labeled neurons in the SNpc was performed using ImageJ software based on optical density. Counts were obtained from 17-22 tissue sections per group.

2.5. Statistical analysis

The data from the OFT were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA), with group as the between-subjects factor and time as the within-subjects factor, followed by the Newman-Keuls test for multiple comparisons. The forced swim test, neurochemical data, and histological data were analyzed using one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test for multiple comparisons. The results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). The level of significance was set at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Open field test

Locomotion frequency was significantly reduced in the rotenone groups 1 day after the last rotenone exposure compared with controls ($P < 0.01$; Fig. 1A), as indicated by the group factor [$F(3.114) = 5.042$; $P = 0.0026$], not by the time [$F(3.114) = 0.02884$; $P = 0.8655$] and interaction [$F(3.114) = 2.699$; $P = 0.0491$] factors. Rearing frequency was reduced in the rotenone groups only at the day 1 time-point compared with controls ($P < 0.01$; Fig. 1B), as demonstrated by the group factor [$F(3.114) = 3.985$; $P = 0.0097$], but not by the time [$F(3.114) = 0.5292$; $P = 0.4684$] and interaction [$F(3.114) = 2.268$; $P = 0.0843$] factors. A significant increase in immobility was detected in the rotenone groups only at the day 1 time-point compared with controls ($P < 0.01$; Fig. 1C), as revealed by

the group [$F(3.114) = 4.812$; $P = 0.0034$] and time [$F(3.114) = 5.548$; $P = 0.0202$] factors but not by the interaction [$F(3.114) = 1.925$; $P = 0.1295$] factor.

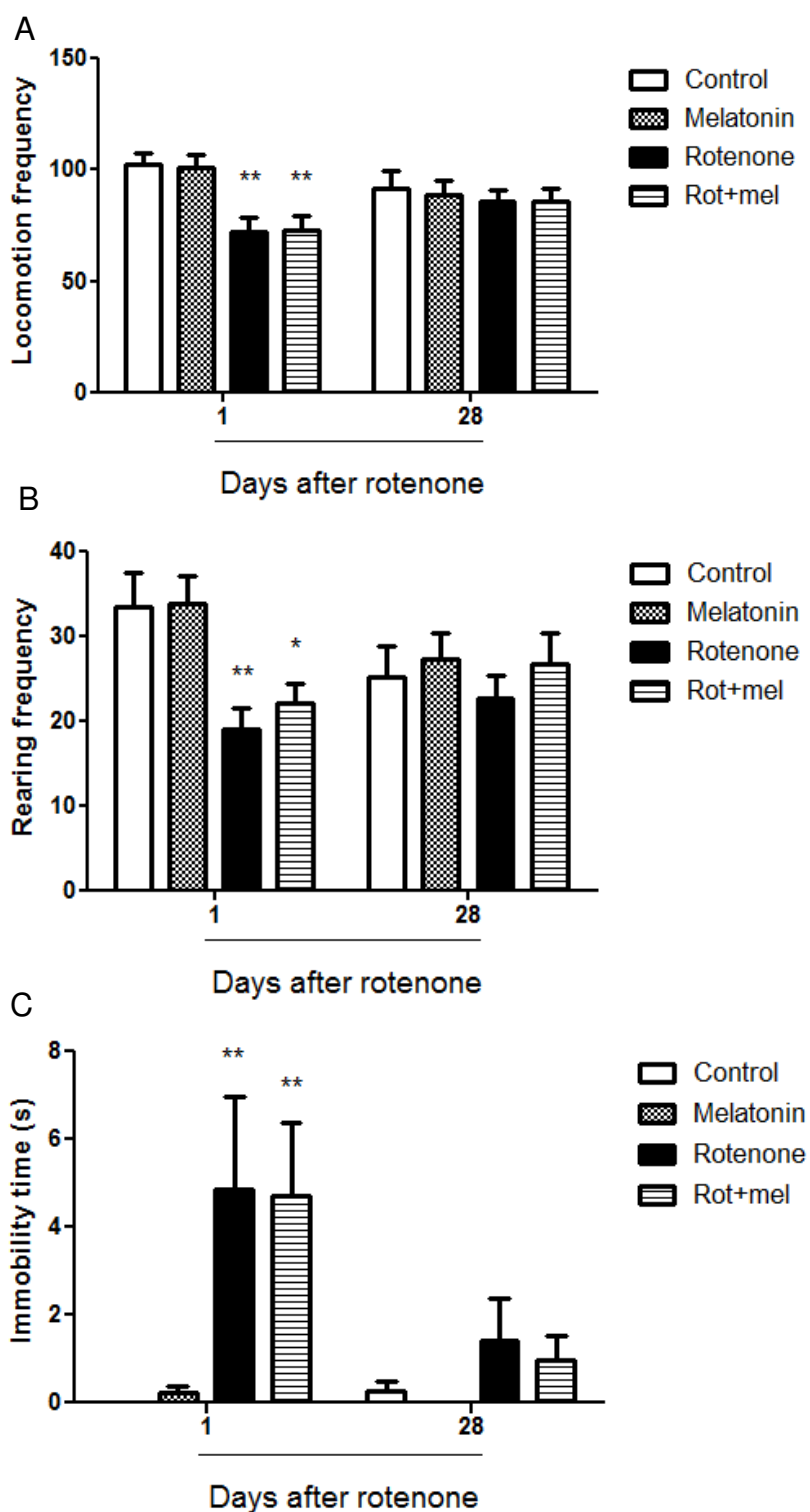
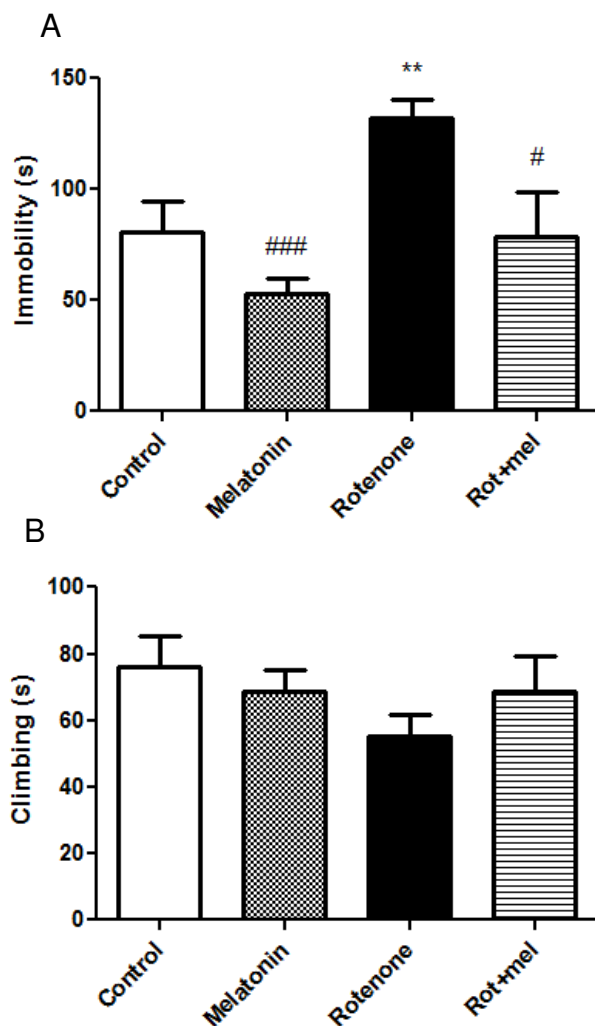


Figure 1. Effect of melatonin (10 mg/kg) on locomotor activity in the open field test in rats previously exposed to rotenone (2.5 mg/kg). The data were obtained 1 and 28 days after the last rotenone exposure. (A) Locomotion frequency. (B) Rearing frequency. (C) Immobility time. The data are expressed as mean \pm

SEM ($n = 14-16/\text{group}$). * $P < 0.05$, compared to control and melatonin; ** $P < 0.01$, compared to control and melatonin (two-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).

3.2. Modified forced swim test

A significant increase in immobility time was observed in the rotenone group compared with the control group ($P < 0.01$) and melatonin group ($P < 0.001$; Fig. 2A). Immobility time was similar in the rot+mel and control groups but decreased in the rot+mel group compared with the rotenone group ($P < 0.05$) [$F(3.57) = 6.194$; $P = 0.0010$]. No significant difference in climbing was observed between groups [$F(3.57) = 1.093$; $P = 0.3593$] (Fig. 2B). Rotenone did not alter swimming time compared with control, but melatonin increased swimming time compared with the control group ($P < 0.05$) and rotenone group ($P < 0.01$). The rot+mel group exhibited increased swimming time compared with the rotenone group ($P < 0.05$) [$F(3.57) = 5.354$; $P = 0.0026$] (Fig. 2C).



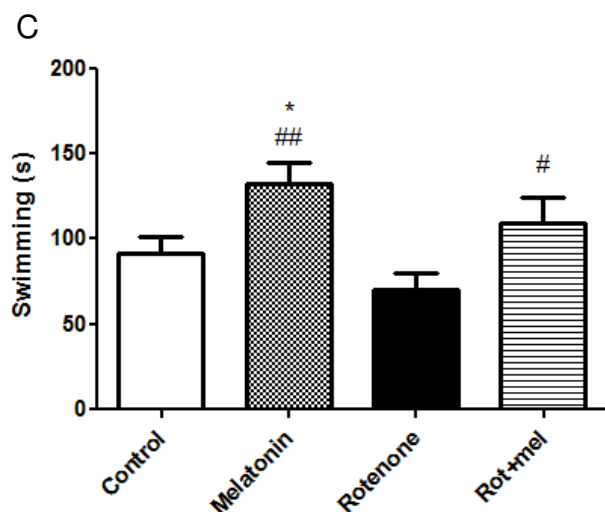


Figure 2. Effect of melatonin (10 mg/kg) in the modified forced swim test in rats previously exposed to rotenone (2.5 mg/kg). The data were obtained 29 days after the last rotenone exposure. (A) Immobility. (B) Climbing. (C) Swimming. The data are expressed as mean \pm SEM ($n = 14-16/\text{group}$). * $P < 0.05$, compared with control group; ** $P < 0.01$, compared with control group; # $P < 0.05$, compared with rotenone group; ## $P < 0.01$, compared with rotenone group; ### $P < 0.001$, compared with rotenone group (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).

3.3. Determination of striatal and hippocampal dopamine, noradrenaline, serotonin, and metabolite concentrations

Fig. 3A shows DA concentrations in the striatum. A significant 25% decrease in DA content was observed in the rotenone group compared with the control group ($P < 0.05$). The rot+mel group had a DA concentration that was similar to the control group and increased compared with the rotenone group ($P < 0.05$) [$F(3.34) = 4.826$; $P = 0.0066$]. Striatal DOPAC levels in the rotenone group did not differ from the control group, but melatonin reduced DOPAC levels in the melatonin group ($P < 0.05$) and rot+mel group ($P < 0.05$) compared with the control and rotenone groups [$F(3.34) = 4.898$; $P = 0.0062$] (Fig. 3B). Striatal HVA levels in the rotenone group did not differ from controls, but the melatonin ($P < 0.05$) and rot+mel ($P < 0.05$) groups exhibited a decrease in HVA levels compared with the control and rotenone groups [$F(3.35) = 5.071$; $P = 0.0051$] (Fig. 3C). No differences in hippocampal NA concentrations were found between groups [$F(3.35) = 0.7940$; $P = 0.5055$] (Fig. 4A). A decrease in the NA metabolite DHPG in the hippocampus was observed in the melatonin group compared with the rotenone group ($P < 0.05$; Fig. 4B) [$F(3.34) = 2.601$; $P = 0.0680$]. Rotenone did not alter the 5-HT concentrations compared with the

control. Interestingly, melatonin increased 5-HT levels in the melatonin group ($P < 0.01$) and rot+mel group ($P < 0.01$) compared with the control group. The content of 5-HT was significantly higher in the rot+mel group ($P < 0.05$) compared with the rotenone group [$F(3.34) = 6.274$; $P = 0.0017$] (Fig. 4C). No differences in 5-HIAA concentrations were found between groups [$F(3.35) = 0.4864$; $P = 0.6939$] (Fig. 4D).

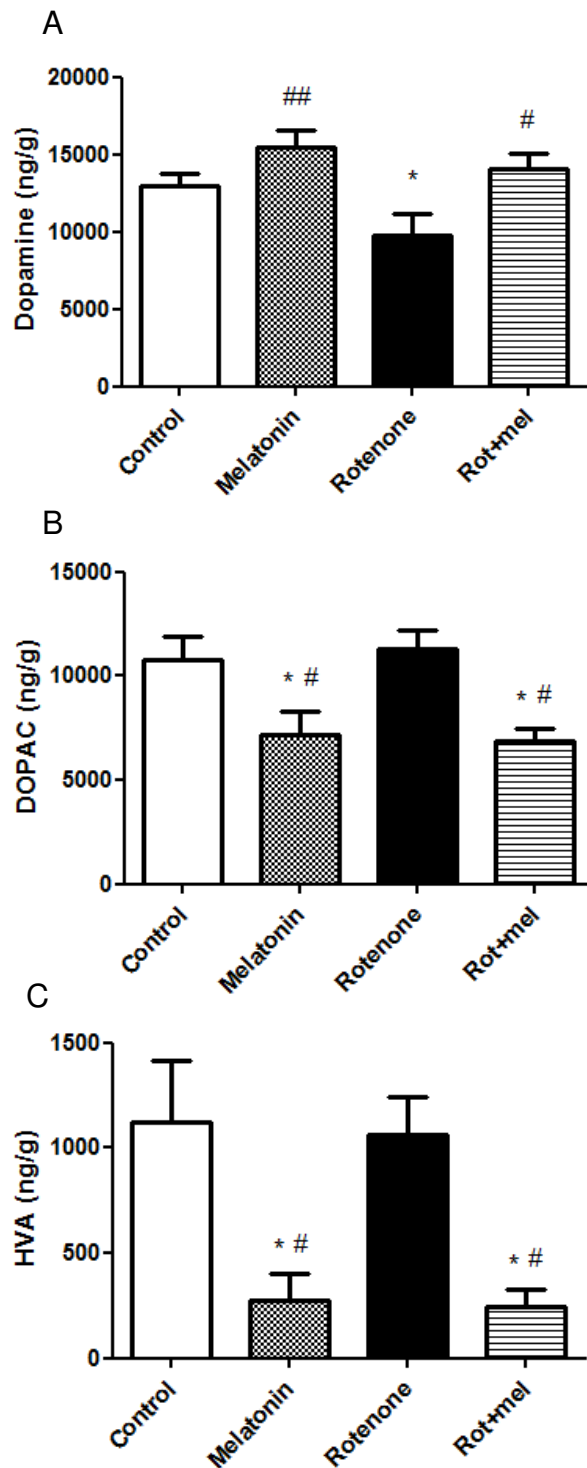


Figure 3. Effects of melatonin (10 mg/kg) on striatal concentrations of DA, DOPAC, and HVA in rats previously exposed to rotenone (2.5 mg/kg). (A) Dopamine concentrations. (B) DOPAC concentrations. (C) HVA concentrations. The data are expressed as mean \pm SEM ($n = 8-12/\text{group}$). * $P < 0.05$, compared with control group; # $P < 0.05$, compared with rotenone group; ## $P < 0.01$, compared with rotenone group (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).

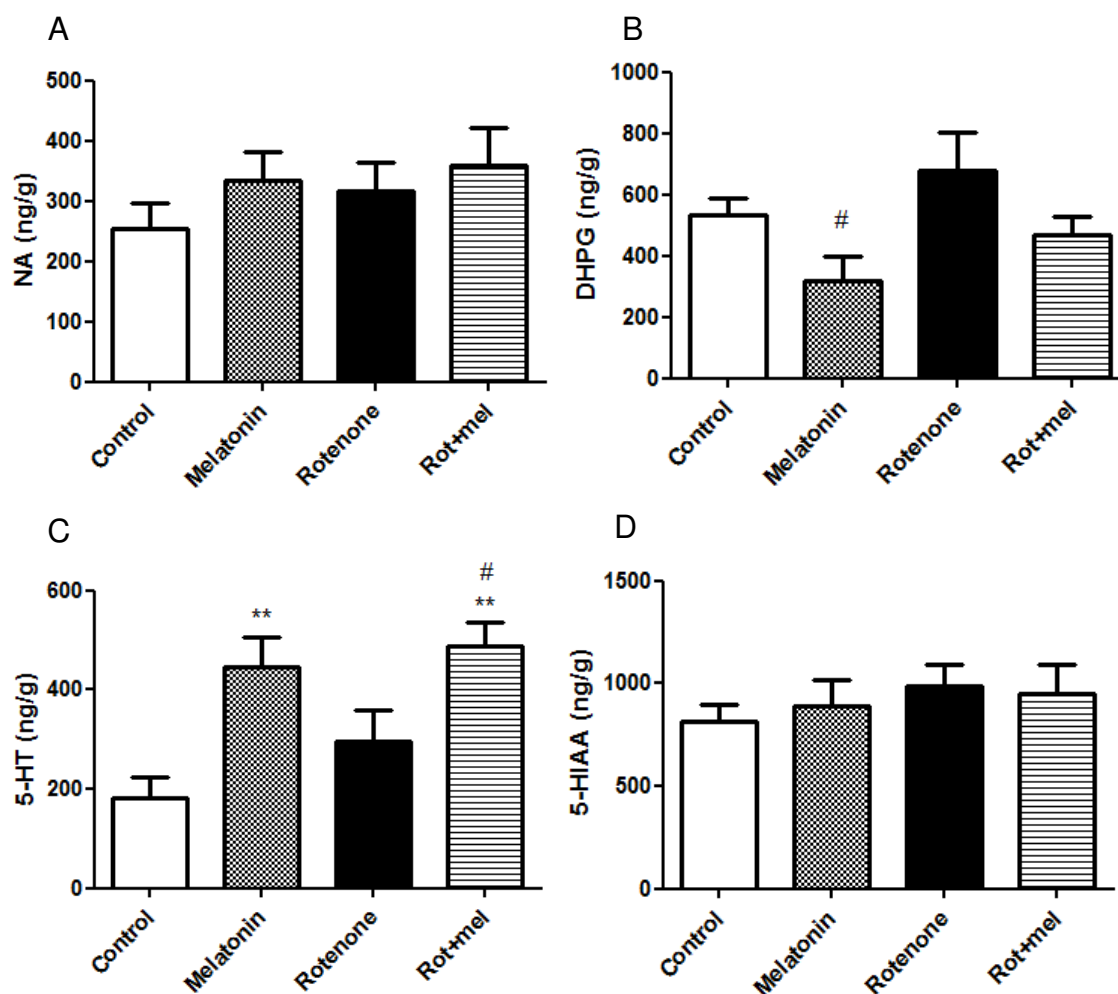


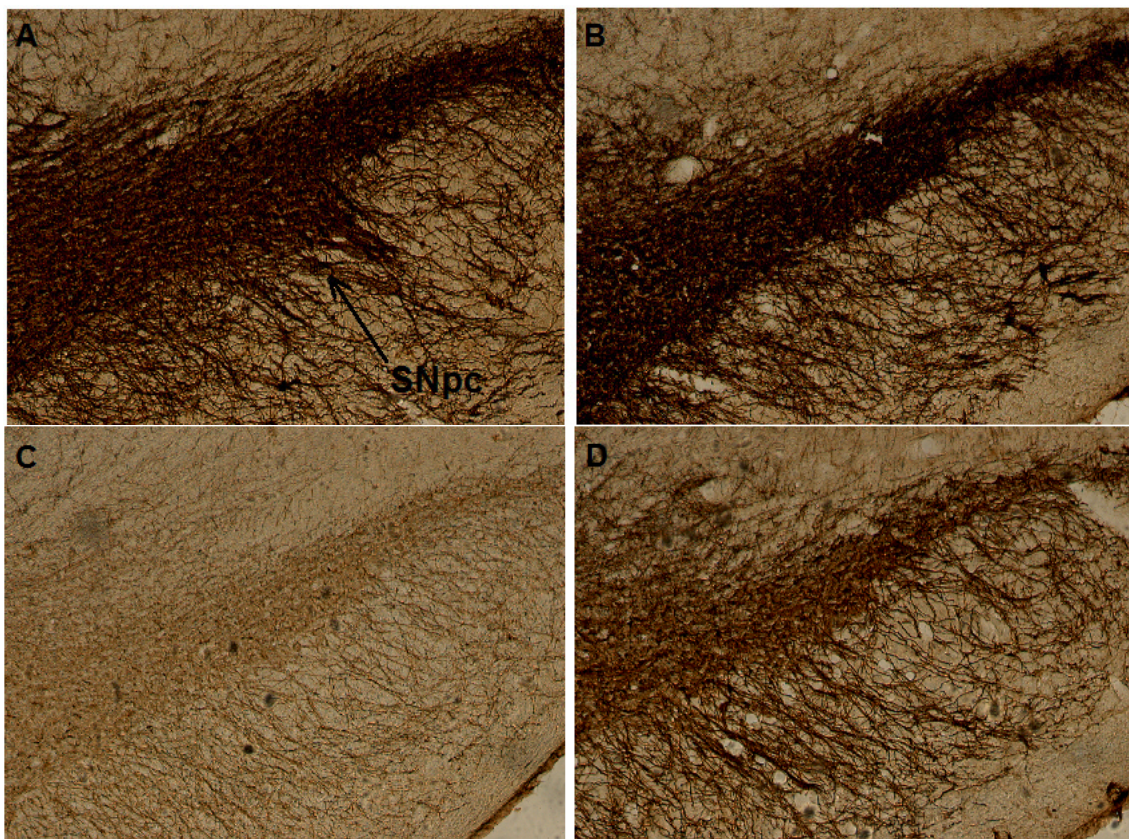
Figure 4. Effects of melatonin on hippocampal concentrations of NA, DHPG, 5-HT, and 5-HIAA in rats previously exposed to rotenone (2.5 mg/kg). (A) NA concentrations. (B) DHPG concentrations. (C) 5-HT concentrations. (D) 5-HIAA concentrations. The data are expressed as mean \pm SEM ($n = 8-12/\text{group}$). ** $P < 0.01$, compared with control group; # $P < 0.05$, compared with rotenone group (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).

3.4. Tyrosine hydroxylase immunohistochemistry

The neuroprotective effects of melatonin on TH-immunoreactive neurons were examined by immunohistochemistry. Systemic rotenone administration

caused a moderate loss of TH-immunoreactive neurons in the SNpc compared with the control group ($P < 0.05$; Fig. 5). The rotenone group exhibited a 21.7% reduction of TH-immunoreactive neurons. The rot+mel group exhibited only a 9.2% reduction, which was not statistically different from the control group, indicating that chronic melatonin treatment partially restored the TH immunoreactivity of SNpc neurons [$F(3.71) = 4.267$; $P = 0.0079$] (Fig. 5B).

A



B

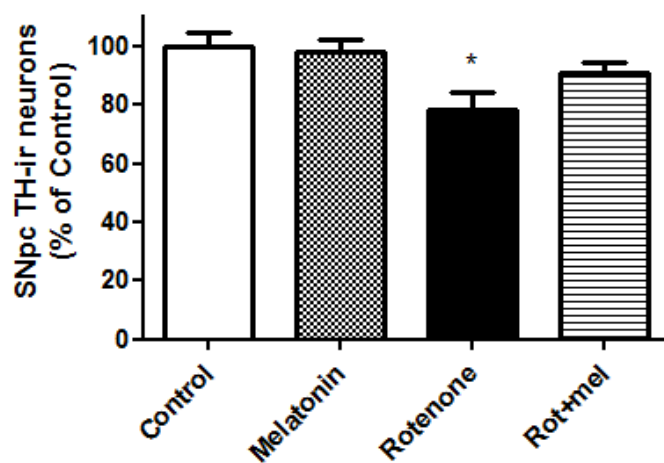


Figure 5. Immunohistochemical analysis of the SNpc at the end of the experiment (i.e., 29 days after the last rotenone exposure). (A) Photomicrographs of representative sections of tyrosine hydroxylase immunoreactive (TH-ir) neurons in the following groups: (A) control, (B) melatonin, (C) rotenone, (D) rot+mel. (B) Quantification of TH-ir neurons in the SNpc in each group (10× magnification). The data are expressed as a percentage of the control group. * $P < 0.05$, compared with control and melatonin groups (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).

4. Discussion

The present study investigated the antidepressant-like and neuroprotective effects of prolonged melatonin treatment in an animal model of PD induced by systemic rotenone injection developed by our laboratory. In this protocol, rotenone led to motor and nonmotor deficits, thus modeling the early clinical phase of PD (Morais et al., 2012). Rotenone caused hypolocomotion in the OFT on the first day after the last neurotoxin injection (Fig. 1). However, this hypolocomotion was spontaneously reversed after a short period of time. In the last motor evaluation (i.e., 28 days after rotenone exposure), no differences in motor parameters were found between groups. This motor improvement can be explained by a possible compensatory neurochemical effect in the rotenone group. This effect occurred possibly because of plasticity events that balance neuronal death. Such adaptation is a feature that has already been described in early-phase models of PD, such as with short-term induction by rotenone (Morais et al., 2012). Despite the plasticity-induced reversal of motor impairment, the rotenone group exhibited a marked reduction of striatal DA content (Fig. 3A) associated with a significant reduction of TH-immunoreactive neurons in the SNpc (Fig. 5) on the final experimental day. No significant differences in motor parameters were observed between groups at the last evaluation, and prolonged treatment with melatonin did not appear to influence motor function.

The FST indicated that rotenone promoted depressive-like behavior because an increase in immobility time (i.e., "behavioral despair"; Porsolt et al., 1978) was observed in the rotenone group compared with the control (Fig. 2A). In contrast, prolonged treatment with melatonin at a dose of 10 mg/kg prevented the emergence of this depressive-like behavior in animals treated

with rotenone. Apparently, the antidepressant-like effect of melatonin is related to an elevation of DA content in the striatum. Melatonin treatment restored rotenone-induced DA depletion in this structure (Fig. 3A). The reduction of DA levels and reduction of activity of nigrostriatal and other dopaminergic pathways (e.g., those that innervate limbic and frontal circuits) may be a mechanism that underlies depression in PD patients, considering the association between dopamine and the regulation of mood and reward systems. Indeed, the death of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area and dysfunction of basal ganglia dopaminergic circuits that project to the frontal lobe have been suggested to be associated with depression in PD patients (Aarsland et al., 2012).

Clinical reports strongly associate lesions in the basal ganglia with mood changes. The basal ganglia receive dopaminergic innervations from the SNpc, a structure that is damaged in PD patients. This reinforces the hypothesis that the nigrostriatal circuit is involved in the etiology of depression in PD (Santiago et al., 2010). In addition, it was demonstrated that the antidepressant-like effect of melatonin in the mouse tail suspension test may be mediated by an interaction with DA D₁ and D₂ receptors (Binfaré et al., 2010), suggesting that this effect of melatonin may be related to an interaction with dopaminergic transmission. In the present study, melatonin also increased swimming time in the rot+mel and melatonin groups (Fig. 2C), which is probably related to an increase in hippocampal 5-HT in these groups (Fig. 4C). These results are consistent with previous studies that found an association between increases in serotonergic transmission and swimming behavior and an association between increases in noradrenergic transmission and climbing behavior in the FST (Santiago et al., 2010).

With regard to the neurochemical results, rotenone elicited a moderate reduction of DA in the striatum (about 25%) compared with the control as a result of its neurotoxicity in the nigrostriatal pathway. Melatonin treatment restored the rotenone-induced decrease in striatal DA. The elevation of DA caused by melatonin appears to be related to a reduction of the enzymatic degradation of this monoamine, because the DA metabolites DOPAC and HVA were decreased in the melatonin and rot+mel groups (Fig. 3). Melatonin may have caused these effects possibly because of its monoamine oxidase inhibition

activity (Maurizi, 1990). This hormone has also been reported to increase 5-HT and NA levels in the brain (Maurizi, 1990). This is consistent with the hippocampal monoamine measurements in the present study. Melatonin increased 5-HT concentrations but did not reduce its metabolite 5-HIAA (Fig. 4).

The increase in DA in the striatum by melatonin may also be attributable to the higher production of this monoamine. Melatonin induces the expression of TH (i.e., the rate-limiting enzyme for DA synthesis) in human SH-SY5Y neuroblastoma cells differentiated into dopaminergic neurons after retinoic acid stimulation (McMillan et al., 2007). We observed the partially recovery of TH-immunoreactive neurons in the SNpc in the rot+mel group (Fig. 5), possibly reflecting the induction of TH expression in the surviving dopaminergic neurons. Additionally, the neuroprotection promoted by melatonin might be indirectly mediated through the upregulation of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). GDNF is a potent surviving factor for dopaminergic neurons in the nigrostriatal pathway (Saavedra et al., 2008). Physiological or higher concentrations of melatonin can concentration-dependently increase GDNF mRNA and protein levels, and melatonin receptor 1 (MT1) has been implicated in this effect (Saavedra et al., 2008). Previous studies reported a GDNF-induced increase in TH gene expression and enzymatic activity in several human neuroblastoma cell lines. Therefore, melatonin may induce TH expression through GDNF upregulation (McMillan et al., 2007).

Despite the evidence of the neuroprotective properties of melatonin in this and other preclinical work, clinical trials that have tested melatonin in patients who suffer from PD did not find significant therapeutic efficacy. This may have occurred because PD is characterized by the irreversible degeneration of dopaminergic neurons. Similar to other drugs tested and used to treat the disease, melatonin does not regenerate damaged neurons in the nigrostriatal pathway. Therefore, a definitive cure for the disease in the advanced stage will not likely occur with melatonin treatment or any other known therapies. The major limitations of the use of neuroprotective agents, such as melatonin, in the treatment of PD involve the lack of suitable markers for early diagnosis (Singhal et al., 2012).

Braak et al. (2003) challenged the traditional concept that PD begins with the death of nigral dopaminergic neurons by introducing the idea of a six-stage

pathological process (Chaudhuri et al., 2006). Based on the Braak staging of sporadic PD, Hawkes et al. (2010) proposed a timeline for PD that has a prodromal period of approximately 20 years. This prodromal phase is characterized by many nonmotor symptoms, such as olfactory problems, constipation, depression, and rapid eye movement disorder that are suggestive of premotor (preclinical) features of the disease (Chaudhuri et al., 2006). Considering that sporadic PD has slow and progressive development, improvements in early diagnosis by considering nonmotor symptoms and other appropriate markers may allow neuroprotective agents, such as melatonin, to slow or halt disease progression and avoid the more advanced and debilitating stages of the disease.

In conclusion, the present study found a neuroprotective effect of melatonin in an early-phase model of PD induced by short-term rotenone exposure. Melatonin restored the decrease in striatal DA content and partially restored TH-immunoreactive neurons after neuronal damage already occurred. Melatonin also exerted an antidepressant-like effect in the FST, without affecting motor function in the open field test. These results indicate that melatonin may have neuroprotective and antidepressant effects in the rotenone model of PD.

Acknowledgements

This work was supported by grants from CNPq and CAPES, which had no further role in the study design; collection, analysis, and interpretation of the data; writing the report; and decision to submit the paper for publication. MABFV is a recipient of a CNPq fellowship. MMSL is a recipient of Fundação Araucária - Governo do Estado do Paraná fellowship.

References

- Aarsland, D., Pålhagen, S., Ballard, C.G., Ehrt, U., Svenningsson, P., 2012. Depression in Parkinson disease - epidemiology, mechanisms and management. *Nat. Rev. Neurol.* 8, 35-47.

- Antolín, I., Mayo, J.C., Sainz, R.M., Del Brío, M.A., Herrera, F., Martínez, V., Rodríguez, C., 2002. Protective effect of melatonin in a chronic experimental model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 943, 163-173.
- Betarbet, R., Sherer, T.B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A.V., Greenamyre, J.T., 2000. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* 3(12): 1301-1306.
- Binfaré, R.W., Mantovani, M., Budni, J., Santos, A.R.S., Rodrigues, A.L.S., 2010. Involvement of dopamine receptors in the antidepressant-like effect of melatonin in the tail suspension test. *Eur. J. Pharmacol.* 638, 78-83.
- Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., de Vos, R.A.I., Jansen Steur, E.N.H., Braak, E., 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 24, 197-211.
- Büeler, H., 2009. Impaired mitochondrial dynamics and function in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 218, 235-246.
- Capitelli, C., Sereniki, A., Lima, M.M.S., Reksidler, A.B., Tufik, S., Vital, M.A.B.F., 2008. Melatonin attenuates tyrosine hydroxylase loss and hypolocomotion in MPTP-lesioned rats. *Eur. J. Pharmacol.* 594, 101-108.
- Cardinali, D.P., Pagano, E.S., Scacchi Bernasconi, P.A., Reynoso, R., Scacchi, P., 2013. Melatonin and mitochondrial dysfunction in the central nervous system. *Horm. Behav.* 63, 322-330.
- Chaudhuri, K.R., Healy, D.G., Schapira, A.H.V., 2006. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol.* 5, 235-245.
- Coulom, H., Birman, S., 2004. Chronic Exposure to Rotenone Models Sporadic Parkinson's Disease in *Drosophila melanogaster*. *J. Neurosci.* 24(48), 10993-10998.
- Dauer, W., Przedborski, S., 2003. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron* 39, 889-909.
- Detanico, B.C., Piato, A.L., Freitas, J.J., Lhullier, F.L., Hidalgo, M.P., Caumo, W., Elisabetsky, E., 2009. Antidepressant-like effects of melatonin in the mouse chronic mild stress model. *Eur. J. Pharmacol.* 607, 121-125.
- Hardeland, R., Cardinali, D.P., Srinivasan, V., Spence, D.W., Brown, G.M., Pandi-Perumal, S.R., 2011. Melatonin - A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog. Neurobiol.* 9, 350-384.

- Hawkes, C.H., Del Tredici, K., Braak, H., 2010. A timeline for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 16, 79-84.
- Hirsch, E.C., Hunot, S., 2009. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol.* 8, 382-397.
- Jin, B., Shin, D.Y., Jeon, M.Y., Gwag, M.R., Baik, H.W., Yoo, K.S., Cho, Y.H., Joo, W.S., Kim, Y.S., Baik, H.H., 1998. Melatonin protects nigral dopaminergic neurons from 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) neurotoxicity in rats. *Neurosci. Lett.* 245, 61-64.
- Lin, C.H., Huang, J.Y., Ching, C.H., Chuang, J.I., 2008. Melatonin reduces the neuronal loss, downregulation of dopamine transporter, and upregulation of D2 receptor in rotenone-induced parkinsonian rats. *J. Pineal Res.* 44, 205-213.
- Long-Smith, C.M., Sullivan, A.M., Nolan, Y.M., 2009. The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 89, 277-287.
- Ma, J., Shaw, V.E., Mitrofanis, J., 2009. Does melatonin help save dopaminergic cells in MPTP-treated mice?. *Parkinsonism Relat. Disord.* 15, 307-314.
- Mantovani, M., Bonetti, K.M., Calixto, J.B., Santos, A.R., Rodrigues, A.L.S., 2002. Antidepressant-like effect of melatonin in the tail suspension test in mice. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 12 (3), 224.
- Mantovani, M., Pértile, R., Calixto, J.B., Santos, A.R., Rodrigues, A.L.S., 2003. Melatonin exerts an antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and the L-arginine-nitric oxide pathway. *Neurosci. Lett.* 343, 1-4.
- Maurizi, C.P., 1990. The Therapeutic Potential for Tryptophan and Melatonin: Possible Roles in Depression, Sleep, Alzheimer's Disease and Abnormal Aging. *Med. Hypotheses* 31, 233-242.
- McMillan, C.R., Sharma, R., Ottenhof, T., Niles, L.P., 2007. Modulation of tyrosine hydroxylase expression by melatonin in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurosci. Lett.* 419, 202-206.
- Micale, V., Arezzi, A., Rampello, L., Drago, F., 2006. Melatonin affects the immobility time of rats in the forced swim test: The role of serotonin neurotransmission. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 16, 538-545.

- Morais, L.H., Lima, M.M.S., Martynhak, B.J., Santiago, R., Takahashi, T.T., Ariza, D., Barbiero, J.K., Andreatini, R., Vital, M.A.B.F., 2012. Characterization of motor, depressive-like and neurochemical alterations induced by a short-term rotenone administration. *Pharmacol. Rep.* 64, 1081-1090.
- Moreira, C.G., Barbiero, J.K., Ariza, D., Dombrowski, P.A., Sabioni, P., Bortolanza, M., Da Cunha, C., Vital, M.A.B.F., Lima, M.M.S., 2012. Behavioral, Neurochemical and Histological Alterations Promoted by Bilateral Intranigral Rotenone Administration: A New Approach for an Old Neurotoxin. *Neurotox. Res.* 21, 291-301.
- Pandi-Perumal, S.R., Trakht, I., Srinivasan, V., Spence, D.W., Maestroni, G.J.M., Zisapel, N., Cardinali, D.P., 2008. Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog. Neurobiol.* 85, 335-353.
- Papp, M., Gruca, P., Boyer, P.A., Mocaer, E., 2003. Effect of Agomelatine in the Chronic Mild Stress Model of Depression in the Rat. *Neuropsychopharmacology* 28, 694-703.
- Patki, G., Lau, Y., 2011. Melatonin protects against neurobehavioral and mitochondrial deficits in a chronic mouse model of Parkinson's disease. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 99, 704-711.
- Paus, S., Schmitz-Hübsch, T., Wüllner, U., Vogel, A., Klockgether, T., Abele, M., 2007. Bright light therapy in Parkinson's disease: a pilot study. *Mov. Disord.* 22, 1495-1498.
- Porsolt, R.D., Anton, G., Blavet, N., Jalfre, M., 1978. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur. J. Pharmacol.* 47, 379-391.
- Raghavendra, V., Kaur, G., Kulkarni, S.K., 2000. Anti-depressant action of melatonin in chronic forced swimming-induced behavioral despair in mice, role of peripheral benzodiazepine receptor modulation. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 10, 473-481.
- Reichmann, H., Schneider, C., Lohle, M., 2009. Non-motor features of Parkinson's disease: depression and dementia. *Parkinsonism Relat. Disord.* 15(Suppl. 3), S87-S92.

- Reneric, J.P., Bouvard, M., Stinus, L., 2002. In the rat forced swimming test, chronic but not subacute administration of dual 5-HT/NA antidepressant treatments may produce greater effects than selective drugs. *Behav. Brain Res.* 136, 521-532.
- Saavedra, A., Baltazar, G., Duarte, E.P., 2008. Driving GDNF expression: The green and the red traffic lights. *Prog. Neurobiol.* 86, 186-215.
- Sanders, L.H., Greenamyre, J.T., 2013. Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. *Free Radic. Biol. Med.* in press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.003i>
- Santiago, R.M., Barbieiro, J., Lima, M.M.S., Dombrowski, P.A., Andreatini, R., Vital, M.A.B.F., 2010. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 34, 1104-1114.
- Saravanan, K.S., Sindhu, K.M., Mohanakumar, K.P., 2007. Melatonin protects against rotenone-induced oxidative stress in a hemiparkinsonian rat model. *J. Pineal Res.* 42, 247-253.
- Shaji, A.V., Kulkarni, S.K., 1998. Central nervous system depressant activities of melatonin in rats and mice. *Indian J. Exp. Biol.* 36(3), 257-263.
- Sharma, R., McMillan, C.R., Tenn, C.C., Niles, L.P., 2006. Physiological neuroprotection by melatonin in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 1068, 230-236.
- Singhal, N.K., Srivastava, G., Agrawal, S., Jain, S.K., Singh, M.P., 2012. Melatonin as a Neuroprotective Agent in the Rodent Models of Parkinson's Disease: Is it All Set to Irrefutable Clinical Translation? *Mol. Neurobiol.* 45, 186-199.
- Tapias, V., Cannon, J.R., Greenamyre, J.T., 2010. Melatonin Treatment Potentiates Neurodegeneration in a Rat Rotenone Parkinson's Disease Model. *J. Neurosci. Res.* 88, 420-427.
- Willis, G.L., Armstrong, S.M., 1999. A Therapeutic Role for Melatonin Antagonism in Experimental Models of Parkinson's Disease. *Physiol. Behav.* 66(5), 785-795.
- Willis, G.L., Robertson, A.D., 2004. Recovery of experimental Parkinson's disease with the melatonin analogues ML-23 and S-20928 in a chronic,

bilateral 6-OHDA model: a new mechanism involving antagonism of the melatonin receptor. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 79, 413-429.

Willis, G.L., Robertson, A.D., 2005. Recovery from experimental Parkinson's disease in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine hydrochloride treated marmoset with the melatonin analogue ML-23. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 80, 9-26.

Zhou, H., Chen, J., Lu, X., Shen, C., Zeng, J., Chen, L., Pei, Z., 2012. Melatonin protects against rotenone-induced cell injury via inhibition of Omi and Bax-mediated autophagy in Hela cells. *J. Pineal Res.* 52, 120-127.

4 CONCLUSÕES

4.1 CONCLUSÃO GERAL

O tratamento prolongado com melatonina na dose de 10 mg/kg exerceu efeitos neuroprotetor e tipo-antidepressivo no modelo da DP induzido por rotenona em ratos.

4.2 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

A exposição à rotenona 2,5 mg/kg i.p. por 10 dias causou hipolocomoção nos animais, verificado pelo teste de campo aberto no primeiro dia após a última aplicação de rotenona.

A hipolocomoção foi espontaneamente revertida no último dia de avaliação motora (28º dia após a rotenona).

O tratamento prolongado com melatonina (10 mg/kg i.p. por 28 dias) não alterou a atividade motora dos animais no campo aberto.

A exposição à rotenona provocou redução de DA (25%) no estriado e redução na imunoreatividade à TH na SNpc (21,7%).

O tratamento prolongado com melatonina mostrou efeito neuroprotetor nos animais previamente expostos à rotenona ao restabelecer a concentração de DA estriatal e parcialmente restabelecer a imunoreatividade à TH na SNpc.

Os animais expostos à rotenona apresentaram comportamento tipo-depressivo no TNF versão modificada realizado no 29º dia após a última aplicação de rotenona.

O tratamento prolongado com melatonina exerceu efeito tipo-antidepressivo no TNF versão modificada nos ratos previamente expostos à rotenona provavelmente por interação com o sistema dopaminérgico.

REFERÊNCIAS

- AARSLAND, D., PÅHLHAGEN, S., BALLARD, C.G., EHRT, U., SVENNINGSSON, P. Depression in Parkinson disease - epidemiology, mechanisms and management. *Nat. Rev. Neurol.* 8: 35–47, 2012.
- ANTOLÍN, I., MAYO, J.C., SAINZ, R.M., DEL BRÍO, M.A., HERRERA, F., MARTÍNA, V., RODRÍGUEZ, C. Protective effect of melatonin in a chronic experimental model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 943: 163-173, 2002.
- BETARBET, R., SHERER, T.B., MACKENZIE, G., GARCIA-OSUNA, M., PANOV, A.V., GREENAMYRE, J.T. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* 3(12): 1301-1306, 2000.
- BINFARÉ, R.W., MANTOVANI, M., BUDNI, J., SANTOS, A.R.S., RODRIGUES, A.L.S. Involvement of dopamine receptors in the antidepressant-like effect of melatonin in the tail suspension test. *Eur. J. Pharmacol.* 638: 78–83, 2010.
- BORAH, A., MOHANAKUMAR, K.P. Melatonin inhibits 6-hydroxydopamine production in the brain to protect against experimental parkinsonism in rodents. *J. Pineal Res.* 47: 293–300, 2009.
- BORAH, A., MOHANAKUMAR, K.P. L-DOPA induced-endogenous 6-hydroxydopamine is the cause of aggravated dopaminergic neurodegeneration in Parkinson's disease patients. *Med. Hypotheses* 79: 271–273, 2012.
- BOURIN, M., MOCAËR, E., PORSOLT, R. Antidepressant-like activity of S 20098 (agomelatine) in the forced swimming test in rodents: involvement of melatonin and serotonin receptors. *J Psychiatry Neurosci* 29(2): 126-33, 2004.
- BOUTIN, J. A., AUDINOT, V., FERRY, G., DELAGRANG, P. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends Pharmacol. Sci.* 26 (8): 412-419, 2005.
- BOVÉ, J., PERIER, C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience* 211: 51–76, 2012.

BRAAK, H., DEL TREDICI, K., RUB, U., DE VOS RA, JANSEN STEUR, E.N., BRAAK, E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24: 197–211, 2003.

BÜELER, H. Impaired mitochondrial dynamics and function in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 218: 235–246, 2009.

CAPITELLI, C., SERENIKI, A., LIMA, M.M.S., REKSIDLER, A.B., TUFİK, S., VITAL, M.A.B.F. Melatonin attenuates tyrosine hydroxylase loss and hypolocomotion in MPTP-lesioned rats. *Eur. J. Pharmacol.* 594: 101-108, 2008.

CARDINALI, D.P., PAGANO, E.S., BERNASCONI, P.A.S, REYNOSO, R., SCACCHI, P. Melatonin and mitochondrial dysfunction in the central nervous system. *Horm. Behav.* (2012), doi:10.1016/j.yhbeh.2012.02.020

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

COLLINS, L.M., TOULOUSE, A., CONNOR, T.J., NOLAN, Y.M. Contributions of central and systemic inflammation to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Neuropharmacology* 62: 2154-2168, 2012.

COULOM, H., BIRMAN, S. Chronic Exposure to Rotenone Models Sporadic Parkinson's Disease in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Neuroscience* 24(48): 10993–10998, 2004.

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

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

DETANICO, B.C., PIATO, A.L., FREITAS, J.J., LHULLIER, F.L., HIDALGO, M.P., CAUMO, W., ELISABETSKY, E. Antidepressant-like effects of melatonin in the mouse chronic mild stress model. *Eur. J. Pharmacol.* 607: 121–125, 2009.

DOUBLE, K.L. Neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 18S1: S52–S54, 2012.

GHOSH, A., ROY, A., LIU, X., KORDOWER, J.H., MUFSON, E.J., HARTLEY, D.M., GHOSH, S., MOSLEY, R.L., GENDELMAN, H.E., PAHAN, K. Selective inhibition of NF- κ B activation prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson's disease. *PNAS* 104(47): 18754–18759, 2007.

HALD, A., LOTHARIUS, J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: Is there a causal link? *Exp Neurol* 193: 279-290, 2005.

HARDELAND, R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* 27 (2): 119–130, 2005.

HARDELAND, R., PANDI-PERUMAL, S.R., CARDINALI, D.P. Melatonin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38: 313–316, 2006.

HARDELAND, R., CARDINALI, D.P., SRINIVASAN, V., SPENCE, D.W., BROWN, G.M., PANDI-PERUMAL, S.R. Melatonin - A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog Neurobiol* 9: 350–384, 2011.

HAWKES, C.H., DEL TREDICI, K., BRAAK, H. A timeline for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 16: 79–84, 2010.

HIRSCH, E.C., HUNOT, S., HARTMANN, A. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 11: S9–S15, 2005.

HIRSCH, E.C., HUNOT, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol* 8: 382–97, 2009.

JIN, B., SHIN, D.Y., JEON, M.Y., GWAG, M.R., BAIK, H.W., YOO, K.S., CHO, Y.H., JOO, W.S., KIM, Y.S., BAIK, H.H. Melatonin protects nigral dopaminergic neurons from 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) neurotoxicity in rats. *Neurosci. Lett.* 245: 61–64, 1998.

KHALDY, H., ESCAMES, G., LEÓN, J., BIKJDAOUENE, L., ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Synergistic effects of melatonin and deprenyl against MPTP-induced mitochondrial damage and DA depletion. *Neurobiol Aging* 24: 491-500, 2003.

LEON, J., ACUÑA-CASTROVIEJO, D., SAINZ, R.M., MAYO, J.C., TAN, D.X., REITER, R.J. Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci* 75: 765-790, 2004.

LIN, C.H., HUANG, J.Y., CHING, C.H., CHUANG, J.I. Melatonin reduces the neuronal loss, downregulation of dopamine transporter, and upregulation of D2 receptor in rotenone-induced parkinsonian rats. *J. Pineal Res.* 44: 205–213, 2008.

LIN, L., MENG, T., LIU, T., ZHENG, Z. Increased melatonin may play dual roles in the striata of a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Life Sci.* 92: 311–316, 2013.

LONG-SMITH, C.M., SULLIVAN, A.M., NOLAN, Y.M. The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 89: 277-287, 2009.

MA, J., SHAW, V.E., MITROFANIS, J. Does melatonin help save dopaminergic cells in MPTP-treated mice? *Parkinsonism Relat. Disord.* 15: 307–314, 2009.

MAHARAJ, H., MAHARAJ, D.S., SCHEEPERS, M., MOKOKONG, R., DAYA, S. L-DOPA administration enhances 6-hydroxydopamine generation. *Brain Res.* 1063: 180-186, 2005.

MANTOVANI, M., BONETTI, K.M., CALIXTO, J.B., SANTOS, A.R., RODRIGUES, A.L.S. Antidepressant-like effect of melatonin in the tail suspension test in mice. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 12 (3): 224, 2002.

MANTOVANI, M., PÉRTILE, R., CALIXTO, J.B., SANTOS, A.R., RODRIGUES, A.L.S. Melatonin exerts an antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for involvement of N-methyl-d-aspartate receptors and the l-arginine-nitric oxide pathway. *Neurosci. Lett.* 343: 1– 4, 2003.

MICALE, V., AREZZI, A., RAMPELLO, L., DRAGO, F. Melatonin affects the immobility time of rats in the forced swim test: The role of serotonin Neurotransmission. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 16: 538-545, 2006.

MONDAL, S., ROY, A., JANA, A., GHOSH, S., KORDOWER, J.H., PAHAN, K. Testing NF- κ B-based Therapy in Hemiparkinsonian Monkeys. *J Neuroimmune Pharmacol.* (2012) DOI 10.1007/s11481-012-9377-9.

MORAIS, L.H., LIMA, M.M.S., MARTYNHAK, B.J., SANTIAGO, R., TAKAHASHI, T.T., ARIZA, D., BARBIERO, J.K., ANDREATINI, R., VITAL,

M.A.B.F. Characterization of motor, depressive-like and neurochemical alterations induced by a short-term rotenone administration. *Pharmacol. Rep.* 64: 1081-1090, 2012.

PANDI-PERUMAL, S.R., TRAKHT, I., SRINIVASAN, V., SPENCE, D.W., MAESTRONI, G.J.M., ZISAPEL, N., CARDINALI, D.P. Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog. Neurobiol.* 85: 335–353, 2008.

PAPP, M., GRUCA, P., BOYER, P.A., MOCAER, E. Effect of Agomelatine in the Chronic Mild Stress Model of Depression in the Rat. *Neuropsychopharmacology* 28: 694–703, 2003.

PATKI, G., LAU, Y. Melatonin protects against neurobehavioral and mitochondrial deficits in a chronic mouse model of Parkinson's disease. *Pharmacol Biochem Behav* 99: 704-711, 2011.

PAUS, S., SCHMITZ-HÜBSCH, T., WÜLLNER, U., VOGEL, A., KLOCKGETHER, T., ABELE, M. Bright light therapy in Parkinson's disease: a pilot study. *Mov. Disord.* 22: 1495–1498, 2007.

PERIER, C., BOVÉ, J., VILA, M., PRZEDBORSKI, S. The rotenone model of Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 26(7): 345-346, 2003.

POLITIS, M., SU, P., PICCINI, P. Imaging of microglia in patients with neurodegenerative disorders. *Frontiers Pharmacol* 3(96): 1-10, 2012.

RAGHAVENDRA, V., KAUR, G., KULKARNI, S.K. Antidepressant action of melatonin in chronic forced swimming-induced behavioral despair in mice, role of peripheral benzodiazepine receptor modulation. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 10: 473–481, 2000.

REICHMANN, H., SCHNEIDER, C., LOHLE, M. Non-motor features of Parkinson's disease: depression and dementia. *Parkinsonism Relat. Disord.* 15(3): 87-92, 2009.

SARAVANAN, S.K., SINDHU, K.M., MOHANAKUMAR, K.P. Melatonin protects against rotenone-induced oxidative stress in a hemiparkinsonian rat model. *J. Pineal Res* 42: 247–253, 2007.

SANDERS, L.H., TIMOTHY GREENAMYRE, J. Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. *Free Radic. Biol. Med.* in press.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.003i>

SHARMA, R., MCMILLAN, C.R., TENN, C.C., NILES, L.P. Physiological neuroprotection by melatonin in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 1068: 230–236, 2006.

SHAJI, A.V. KULKARNI, S.K. Central nervous system depressant activities of melatonin in rats and mice. *Indian J Exp Biol.* 36(3): 257-63, 1998.

SINGH, N., PILLAY, V., CHOONARA, Y.E. Advances in the treatment of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 81: 29-44, 2007.

SINGHAL, N.K., SRIVASTAVA, G., AGRAWAL, S., JAIN, S.K., SINGH, M.P. Melatonin as a Neuroprotective Agent in the Rodent Models of Parkinson's Disease: Is it All Set to Irrefutable Clinical Translation? *Mol Neurobiol* 45: 186–199, 2012.

TANSEY, M.G., MCCOY, M.K., FRANK-CANNON, T.C. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: Potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Exp Neurol* 208: 1–25, 2007.

TANSEY, M.G., GOLDBERG, M.S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: Its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol Disease* 37: 510–518, 2010.

TAPIAS, V., CANNON, J.R., GREENAMYRE, J.T. Melatonin Treatment Potentiates Neurodegeneration in a Rat Rotenone Parkinson's Disease Model. *J Neurosci Res* 88: 420–427, 2010.

TSANG, A.H.K., CHUNG, K.K.K. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1792: 643–650, 2009.

WILLIS, G.L., ARMSTRONG, S.M. A Therapeutic Role For Melatonin Antagonism in Experimental Models of Parkinson's Disease. *Physiol Behav* 66 (5): 785–795, 1999.

WILLIS, G.L., ROBERTSON, A.D. Recovery of experimental Parkinson's disease with the melatonin analogues ML-23 and S-20928 in a chronic, bilateral 6-OHDA model: a new mechanism involving antagonism of the melatonin receptor. *Pharmacol Biochem Be* 79: 413–429, 2004.

WILLIS, G.L., ROBERTSON, A.D. Recovery from experimental Parkinson's disease in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine hydrochloride treated marmoset with the melatonin analogue ML-23. *Pharmacol Biochem Be* 80: 9–26, 2005.

WILMS, H., ROSENSTIEL, P., SIEVERS, J., DEUSCHL, G., ZECCA, L., LUCIUS, R. Activation of microglia by human neuromelanin is NF-kappaB dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase: implications for Parkinson's disease. *FASEB J.* 17: 500–502, 2003.

WITTE, M.E., GEURTS, J.J.G., DE VRIES, H.E., VAN DER VALK, P., VAN HORSSSEN, J. Mitochondrial dysfunction: A potential link between neuroinflammation and neurodegeneration? *Mitochondrion* 10: 411–418, 2010.

ZHANG, F., QIAN, L., FLOOD, P.M., SHI, J.S., HONG, J.S., GAO, H.M. Inhibition of I κ B Kinase- β Protects Dopamine Neurons Against Lipopolysaccharide-Induced Neurotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 333(3): 822–833, 2010.

ZHOU, H., CHEN, J., LU, X., SHEN, C., ZENG, J., CHEN, L., PEI, Z. Melatonin protects against rotenone-induced cell injury via inhibition of Omi and Bax-mediated autophagy in Hela cells. *J. Pineal Res* 52: 120–127, 2012.