

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FELIPE FERNANDES FERREIRA

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES MOTORAS E COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS
POR ROTÊNONA EM RATOS MACHOS E FÊMEAS

CURITIBA

2015

FELIPE FERNANDES FERREIRA

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES MOTORAS E COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS
POR ROTÊNONA EM RATOS MACHOS E FÊMEAS

Projeto apresentado à disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II como requisito parcial à conclusão do Curso de Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

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

CURITIBA

2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me concedido essa oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

A toda minha família, em especial aos meus pais, Marcia e Ruberlei, à minha irmã Maria Fernanda e à minha avó Joani pelo amor incondicional, compreensão, amizade e apoio durante toda a minha formação acadêmica.

À minha namorada Maria Fernanda, por todo o amor, dedicação, conselhos e companheirismo.

À minha orientadora Prof.^a Dr^a Maria Aparecida Barbato Frazão Vital, pela orientação, confiança, amizade e pela oportunidade de poder desenvolver este trabalho.

A todos os meus amigos, pela amizade e apoio.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Farmacologia da UFPR pela colaboração e ajuda na execução dos experimentos.

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais frequente, afetando cerca de 3% da população com mais de 65 anos de idade. É caracterizada pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos na substância negra *pars compacta* (SNpc) e pela presença de inclusões citoplasmáticas (corpos de Lewy) nos neurônios dopaminérgicos. A degeneração neuronal parece envolver vários eventos celulares e moleculares, incluindo a neuroinflamação, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial. A DP se manifesta clinicamente por disfunção motora, incluindo tremor em repouso, rigidez, bradicinesia e instabilidade postural. Além dos sintomas motores, os pacientes podem apresentar sintomas não motores como ansiedade e depressão. A rotenona é um pesticida orgânico extraído de raízes de plantas pertencentes ao gênero *Lonchocarpus* e *Derris*, que inibe o complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Esta toxina tem sido empregada como um modelo animal de DP, visto que é capaz de reproduzir tanto os sintomas motores quanto os não motores. Assim, o objetivo do presente estudo foi o de investigar os efeitos comportamentais de ratos machos e fêmeas submetidos a um tratamento com rotenona. O estudo foi dividido em duas etapas: no experimento I foram utilizados ratos Wistar fêmeas, os quais foram distribuídos randomicamente em dois grupos: veículo (óleo de girassol) (n=15) e rotenona (2,5 mg/kg) (n=25), sendo administrados via i.p. por 3 dias. 24 horas após o término do tratamento, foi realizado um teste de campo aberto para avaliar a função motora dos animais. No 20º dia pós-tratamento foi realizado um pré-teste de natação forçada e no 21º dia foi realizado o teste de natação forçada para avaliar o comportamento tipo-depressivo. Já no experimento II foram utilizados ratos Wistar machos, os quais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: veículo (óleo de girassol) (n=10) e rotenona (2,5 mg/kg) (n=20), sendo administrados via i.p. por 10 dias consecutivos. O teste de campo aberto foi realizado nos dias 1 e 21 após o término do tratamento. Similarmente ao experimento I, no 20º dia pós-tratamento foi realizado um pré-teste de natação forçada e no 21º dia foi realizado o teste de natação forçada. No experimento I, os resultados do teste de campo aberto mostraram que a rotenona causou um prejuízo na função motora das ratas fêmeas. Além disso, no teste de natação forçada foi verificado que o tratamento com rotenona foi capaz de induzir um comportamento depressivo. Por outro lado, no experimento II, não foram encontradas diferenças significativas tanto no teste de campo aberto quanto no teste de natação forçada, demonstrando que o tratamento com rotenona não causou prejuízos na atividade locomotora dos ratos machos e nem foi capaz de induzir um comportamento depressivo.

Palavras-chave: Rotenona, depressão, Parkinson.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	- Serotonina
6-OHDA	- 6-hidroxidopamina
BNDF	- Fator neurotrófico derivado do cérebro
COX	- Ciclooxygenase
DA	- Dopamina
DBS	- <i>Deep brain stimulation</i>
DP	- Doença de Parkinson
GSH	- Glutathiona
H ₂ O ₂	- Peróxido de hidrogênio
HNE	- 4-hidroxinonenal
IFN- γ	- Interferon gama
IGF-1	- Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL-1 β	- Interleucina 1- β
IL-10	- Interleucina 10
I.P.	- Intraperitoneal
LPS	- Lipopolissacarídeo
MAO	- Monoamina oxidase
MPTP	- 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidroperidina
NA	- Noradrenalina
NF-K β	- Fator nuclear kappa B
O ₂ ⁻	- Radical superóxido

OH [•]	- Radical hidroxila
ONOO ⁻	- Peroxinitrito
RNS	- Espécies reativas de nitrogênio
ROS	- Espécies reativas de oxigênio
SNC	- Sistema nervoso central
SNM	- Sintomas não motores
SNpc	- Substância negra <i>pars compacta</i>
SOD	- Superóxido dismutase
TNF- α	- Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVO GERAL	1
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
1.3 JUSTIFICATIVA	2
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA DP	3
2.2 FISIOPATOLOGIA	3
2.2.1 Estresse oxidativo	4
2.2.2 Disfunção mitocondrial	6
2.2.3 Neuroinflamação	6
2.3 DEPRESSÃO E DOENÇA DE PARKINSON	8
2.4 MODELOS ANIMAIS	10
2.4.1 Rotenona	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 ANIMAIS	12
3.2 DROGAS	12
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	12
3.3.1 Experimento I	12
3.3.2 Experimento II	13
3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS	13
3.4.1 Teste do campo aberto	13
3.4.2 Teste de natação forçada	14
3.4.3 Análise estatística.....	14
4 RESULTADOS	15
4.1 EXPERIMENTO I: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE ROTENONA POR 3 DIAS EM RATOS WISTAR FÊMEAS	15
4.1.1 Teste do campo aberto	15

4.1.2 Teste de natação forçada	16
4.1.3 Curva de sobrevivência	17
4.2 EXPERIMENTO II – EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE ROTENONA POR 10 DIAS CONSECUTIVOS EM RATOS WISTAR MACHOS	17
4.2.1 Teste do campo aberto	17
4.2.2 Teste de natação forçada	18
5 DISCUSSÃO	19
6 CONCLUSÃO	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

1 INTRODUÇÃO

Considerada a segunda doença neurodegenerativa mais comum relacionado à idade depois da doença de Alzheimer, a doença de Parkinson (DP) foi descrita primeiramente por James Parkinson em 1817, através de sua monografia "*Essay on the Shaking Palsy*" (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003). A DP acomete principalmente o sistema motor, no entanto, sintomas não motores (SNM), incluindo disautonomia, constipação intestinal, distúrbios no sono e depressão, ocorrem frequentemente durante o progresso da doença. Estes sintomas não motores podem surgir concomitantemente com os sintomas motores (rigidez muscular, tremor em repouso, entre outros) ou até mesmo precedê-los por vários anos (CHEN *et al.*, 2012).

A DP atinge cerca de 3% da população com mais de 65 anos de idade (LANG & LOZANO, 1998, *apud* MORAIS *et al.*, 2012). O número estimado de pessoas com DP em 2005 era de 4.1 milhões e, para o ano de 2030, a prevalência mundial de DP está projetado para atingir 8.7 milhões de pessoas (DORSEY *et al.*, 2007).

O desenvolvimento de agregados intracelulares, denominados corpos de Lewy, e a perda progressiva de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais estão associados à DP. A etiologia desta doença ainda é desconhecida, no entanto, considera-se que a DP seja resultado de interações complexas de vários fatores, incluindo exposição a pesticidas e outras toxinas ambientais, estresse oxidativo, inflamação crônica, disfunção mitocondrial, localização geográfica, trauma craniano, idade, raça, gênero e predisposição genética (MORAIS *et al.*, 2012; MULCAHY *et al.*, 2013).

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito neurodegenerativo no modelo animal da DP induzido pela rotenona em ratos Wistar machos e fêmeas.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se a administração de rotenona 2,5 mg/kg é capaz de alterar a função motora dos animais através do teste de campo aberto.
- Avaliar o comportamento depressivo de animais previamente expostos à rotenona através do teste de natação forçada.

1.3 JUSTIFICATIVA

Apesar do modelo da DP induzido pela rotenona já estar bastante elucidado na literatura, sua utilização está relacionada predominantemente com roedores machos. A administração de rotenona com posterior avaliação comportamental e neuroquímica em fêmeas ainda é bastante discreta. Dessa forma, ainda que estudos epidemiológicos apontem uma maior prevalência de Doença de Parkinson em homens do que em mulheres, é necessário que haja estudos com ambos os sexos, a fim de compreender o papel que o gênero sexual desempenha no processo de neurodegeneração.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA DOENÇA DE PARKINSON

Doença de Parkinson é uma doença progressiva tendo início em média aos 55 anos, com um aumento de incidência com a idade (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003). Apenas uma pequena porcentagem dos casos de DP são causados por mutações genéticas e, dessa forma, 90% dos casos são considerados esporádicos (DE LAU & BRETELER, 2006, *apud* RADAD *et al.*, 2008).

As três características principais da doença são tremor em repouso, rigidez e bradicinesia. Instabilidade postural não é específica e geralmente encontra-se ausente no início da doença. O tremor em repouso é o principal sintoma em 70% dos pacientes, começando usualmente nas mãos, que tende a diminuir durante a atividade voluntária. A rigidez é detectável como o aumento na resistência ao movimento do membro. A bradicinesia é caracterizada por um atraso em iniciar os movimentos voluntários. Além disso, são observados sinais de hipocinesia (redução na amplitude de movimentos), acinesia (ausência de movimentos inconscientes), hipomimia (diminuição da expressão facial normal), hipofonia (diminuição do volume da voz) e diminuição do tamanho (micrografia) e velocidade da escrita. Sintomas autonômicos são manifestados por constipação intestinal, distúrbios urinários e hipotensão ortostática. Depressão é comum, e demência é frequente em pacientes mais velhos (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003; SAMII *et al.*, 2004).

2.2 FISIOPATOLOGIA

O achado patológico característico da DP é a perda progressiva dos neurônios dopaminérgicos na substância negra *pars compacta* (SNpc), resultando em uma diminuição nos níveis de dopamina (DA) no estriado. A presença de inclusões no citoplasma de neurônios dopaminérgicos, conhecidas como corpos de Lewy, são as marcas citopatológicas da doença. Os corpos de Lewy não estão

limitados à substância negra e podem ser vistos em outras regiões, como córtex, amígdala, *locus coeruleus*, núcleo vagal e no sistema nervoso periférico (SAMII *et al.*, 2004). Quando ocorre a manifestação das disfunções motoras, cerca de 58-64% dos neurônios dopaminérgicos da SNpc já foram comprometidos e o conteúdo de DA no estriado reduzido em torno de 60-80% (TADAIESKY *et al.*, 2008).

Os corpos de Lewy consistem, na sua maior parte, em α -sinucleína, uma proteína sináptica presente em grandes quantidades nos cérebros normais, em conjunto com outras proteínas, como ubiquitina e proteínas de neurofilamentos. Raros tipos de DP hereditária estão ligados à mutações no gene da α -sinucleína, onde os corpos de Lewy também estão presentes. Evidências sugerem que a proteína parkina tem um papel importante no desenvolvimento dos corpos de Lewy visto que mutações nesta proteína resultaram em síndrome parkinsoniana sem a presença de corpos de Lewy (DAVIE, 2008). A função fisiológica da α -sinucleína parece estar relacionada com a reciclagem de vesículas sinápticas e, mutações nesta proteína acabam prejudicando o armazenamento vesicular da DA, o que leva à um acúmulo deste neurotransmissor no citosol. O metabolismo da DA produz espécies reativas de oxigênio, resultando em danos celulares (LOTHARIUS & BRUNDIN, 2002).

Uma série de fatores desempenham papéis importantes na DP, tais como envelhecimento, estresse oxidativo, inflamação crônica, disfunção mitocondrial e toxinas ambientais (MORAIS *et al.*, 2012).

2.2.1 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é caracterizado por uma produção excessiva intracelular ou acúmulo de ROS em conjunto com uma redução da atividade do sistema de defesa antioxidante (BARNHAM *et al.*, 2004; PERFEITO *et al.*, 2013). As espécies mais comuns de ROS incluem os radicais superóxido $O_2^{\cdot-}$, hidroxila OH^{\cdot} e peróxido de hidrogênio H_2O_2 . Além disso, o H_2O_2 está associado com a produção de espécies reativas de nitrogênio (RNS), que pode também reagir com $O_2^{\cdot-}$ para formar peroxinitrito $ONOO^-$, o qual apresenta um grande potencial reativo (CHINTA & ANDERSEN, 2011 *apud* TAYLOR *et al.*, 2013).

Altos níveis de ROS e RNS acarretam em danos a biomoléculas, como proteínas, DNA e lipídeos. Tais danos, como carbonilação de proteína, quebra de DNA e peroxidação lipídica contribuem para o surgimento de manifestações patológicas, incluindo doenças neurodegenerativas como a DP (DIAS *et al.*, 2013). As ROS podem ser produzidas no cérebro por diferentes vias, sendo a cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria a principal fonte geradora de EROs (STARKOV *et al.*, 2008). Outras fontes de EROs incluem a monoamina oxidase (MAO), NADPH oxidase e flavoenzimas, juntamente com óxido nítrico, que é abundante no cérebro (JOHNSON *et al.*, 2012 *apud* DIAS *et al.*, 2013).

Há um grande número de evidências correlacionando estresse oxidativo e DP. Em amostras de tecidos *post-mortem* de pacientes com DP, foram encontrados um aumento dos níveis de peroxidação lipídica e altos níveis de malondialdeído (DEXTER *et al.*, 1989 *apud* PERFEITO *et al.*, 2013). De acordo com estudos de YORITAKA *et al.*, (1996), os neurônios dopaminérgicos da substância negra apresentam uma reatividade aumentada para 4-hidroxinonenal (HNE). Tal evidência merece destaque, uma vez que HNE é um produto altamente reativo da peroxidação lipídica que é capaz de reagir com várias moléculas de proteína. Adutos de HNE estão presentes em corpos de Lewy na DP (CASTELLANI *et al.*, 2002 *apud* JENNER, 2007). Foram detectados níveis aumentados de 3-nitrotirosina, um marcador de estresse oxidativo, após a administração sistêmica da toxina MPTP em camundongos (PENNATHUR *et al.*, 1999). Além disso, foram detectados em amostras *post mortem* de cérebros de pacientes parkinsonianos baixos níveis da molécula antioxidante glutathiona (GSH), uma diminuição da atividade do complexo I mitocondrial, um aumento da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e níveis elevados de ferro (FAHN & COHEN, 1992 *apud* TAYLOR *et al.*, 2013). A interação do íon Fe^{2+} com H_2O_2 gera radicais hidroxila (OH^{\bullet}), altamente reativos, prejudiciais para a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos (WEINREB *et al.*, 2010 *apud* HAUSER & HASTINGS, 2013).

2.2.2 Disfunção mitocondrial

As mitocôndrias são organelas intracelulares que apresentam funções diversas, em especial, a produção de energia primária para a célula. No entanto, disfunções nesta organela podem resultar além de uma diminuição na produção de energia, a geração de espécies reativas de oxigênio, indução de morte celular por apoptose e alterações na homeostase do cálcio intracelular (SAUERBECK *et al.*, 2011; SUBRAMANIAM & CHESSELET, 2013).

Desde que SCHAPIRA *et al.*, (1989) identificaram em amostras *post mortem* da substância negra de pacientes com DP uma deficiência no complexo I mitocondrial, vários trabalhos tem sido realizados relacionando a disfunção mitocondrial com a patogênese da DP (SHULTS, 2004; FUKAE *et al.*, 2007; WINKLHOFER & HAASS, 2010; GAUTIER *et al.*, 2014).

Além da substância negra, tem sido evidenciado uma redução da atividade do complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial no córtex frontal de paciente com DP (PARKER *et al.*, 2008), no estriado (MIZUNO *et al.*, 1989), em fibroblastos (MYTILINEOU *et al.*, 1994) e em linfócitos (HAAS *et al.*, 1995) de pacientes com DP.

Evidências sugerem que a substancia negra é mais vulnerável a disfunções no complexo I comparado com outras regiões cerebrais devido à geração de ROS pelo neurônios dopaminérgicos durante o metabolismo de dopamina (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003; CHINTA & ANDERSEN, 2008), uma vez que os metabólitos da dopamina podem inibir os complexos da cadeia respiratória mitocondrial, contribuindo para a susceptibilidade dos neurônios dopaminérgicos na DP (GAUTAM & ZEEVALK, 2011).

2.2.3 Neuroinflamação

Vários estudos na literatura têm documentado a relação da inflamação crônica com diferentes doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer e doença de Parkinson (MCGEER *et al.*, 2005; TANSEY & GOLDBERG, 2010;

TAYLOR *et al.*, 2013). Um dos principais mecanismos neuroinflamatórios associado à morte neuronal é a ativação de células gliais (HIRSCH *et al.*, 2005; HIRSCH & HUNOT, 2009; ROCHA *et al.*, 2014). As células da glia, também conhecidas como neurógliia, fornecem proteção, nutrição e isolamento para os neurônios do SNC. As células gliais podem ser subdivididas em duas categorias principais: a micrógliia, que compreende de 5 a 10% da população glial; e a macrógliia que consiste nos astrócitos e oligodendrócitos (VALLEJO *et al.*, 2010).

As células da micrógliia são as células do sistema imune residentes no cérebro, promovendo imunidade inata (TANSEY *et al.*, 2007). A homeostase do SNC é mantida pela micrógliia através da produção de neurotrofinas como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) e citocinas anti-inflamatórias (IL-10). No cérebro saudável, a micrógliia se encontra tipicamente em um estado de repouso. Em condições de estresse, como lesão, invasão de patógenos, acúmulo de proteínas tóxicas ou morte neuronal, a micrógliia acaba sendo ativada, iniciando uma resposta imune a fim de destruir os patógenos, remover fragmentos teciduais e reparar os tecidos (ALOISI, 1999 *apud* TAYLOR *et al.*, 2013). No entanto, uma ativação crônica da micrógliia pode causar morte neuronal devido à secreção de fatores pró-inflamatórios e neurotóxicos, dentre eles, ROS, espécies reativas de nitrogênio, enzimas ciclooxigenases (COXs) e citocinas pró-inflamatórias, tais como, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gama (IFN- γ), interleucina 1- β (IL-1 β) (MOSLEY *et al.*, 2006; ROCHA *et al.*, 2014).

O papel da neuroinflamação no surgimento e progressão da DP tem sido reconhecido em diversos trabalhos. MCGEER *et al.*, (1988) observaram, através de estudos *post-mortem*, a presença de células da micrógliia ativadas na SNpc de pacientes com DP. Além disso, foi verificado um aumento da micrógliia reativa fagocitando neurônios dopaminérgicos, correlacionando-se com o acúmulo de α -sinucleína (CROISIER *et al.*, 2005). Ainda neste trabalho, os autores sugerem que a micrógliia reativa pode ser utilizada como um biomarcador da DP, visto que se encontra fortemente associada com a morte de neurônios dopaminérgicos. CHEN *et al.*, (2003) realizaram um estudo epidemiológico que demonstra que a utilização de agentes anti-inflamatórios não-esteroidais pode retardar ou prevenir o surgimento de DP. Além disso, foram encontrados níveis elevados de IFN- γ na substância negra de pacientes com DP na presença de linfócitos. Tal fato sugere que a infiltração de

células do sistema imune através da barreira hematoencefálica pode atuar nos eventos neuroinflamatórios (HIRSCH *et al.*, 2005 *apud* TAYLOR *et al.*, 2013). Estudos com modelos animais de DP como 6-OHDA, MPTP e rotenona demonstraram uma forte ativação da micróglia juntamente com liberação de citocinas inflamatórias (AKIYAMA & MCGEER, 1989; SUGAMA *et al.*, 2003; SHERER *et al.*, 2003).

Além disso, numerosos estudos tem destacado o papel do fator nuclear kappa B (NF- κ B) na progressão da DP, uma vez que, a ativação deste fator de transcrição é necessária para que as células da micróglia consigam produzir os diversos mediadores pró-inflamatórios (FLOOD *et al.*, 2011). A ativação de NF- κ B é o ponto-chave em muitas doenças inflamatórias crônicas, como a asma, doenças cardiovasculares (VAN DER HEIDEN *et al.*, 2010) e artrite reumatoide (CRISWELL, 2010).

Existem duas vias descritas para a ativação do NF- κ B: clássica (via canônica) e alternativa (via não-canônica). A via clássica está associada à expressão de genes relacionados à inflamação (LAWRENCE, 2009). Já a via alternativa desempenha um papel na ativação e diferenciação celular (POMERANTZ & BALTIMORE, 2002). Através de estudos *post-mortem* do cérebro de pacientes com DP e de animais submetidos à neurodegeneração dopaminérgica, verificou-se que a via clássica está altamente expressa dentro da SNpc (MOGI *et al.*, 2007). Por outro lado, GHOSH *et al.*, (2007) observaram que a inibição seletiva do NF- κ B pode atenuar a resposta das células gliais e prevenir a morte de neurônios dopaminérgicos no modelo do MPTP.

2.3 DEPRESSÃO E DOENÇA DE PARKINSON

A depressão é o principal sintoma não motor associado à DP, afetando em torno de 35% dos pacientes (NILSSON *et al.*, 2002 *apud* AARSLAND *et al.*, 2012).

Os sintomas-chave da depressão são o humor deprimido, anedonia e sentimentos de culpa e inutilidade. Já os sintomas somáticos são a perda de apetite, retardo psicomotor, alteração da expressão facial e distúrbios do sono, todavia esses sintomas são evidentes em pacientes com DP não deprimidos (AARSLAND *et al.*, 2012).

RIEDEL *et al.*, (2010) realizaram um estudo com mais de 1400 pacientes com DP e verificaram que a depressão é mais comum em mulheres do que em homens, além de estar associado à estágios avançados da DP e demência. Foi identificado em oito de nove estudos revisados uma relação entre o histórico de depressão e o aumento do risco de desenvolver DP posteriormente (ISHIHARA & BRAYNE, 2006). Foi realizado um estudo com 371 pacientes para averiguar se a depressão é uma condição associada à DP ou um fator de risco para a doença. Os resultados mostraram que a depressão é um sintoma prodrômico da DP (JACOB *et al.*, 2010).

A etiologia da depressão em DP é complexa e envolve fatores biológicos, psicossociais e terapêuticos. O mecanismo biológico parece estar envolvido com alterações no sistema monoaminérgico, principalmente o sistema serotoninérgico, no qual uma diminuição de serotonina (5-HT) na fenda sináptica é considerado a causa da depressão (SHARMA *et al.*, 2013). TAN *et al.*, (2011) relataram que os neurônios dopaminérgicos mesencefálicos e neurônios serotoninérgicos estão envolvidos com a depressão. Apesar de ainda não estar estabelecido os eventos fisiológicos por trás da especificidade e diferenciação dessas subpopulações neuronais, sabe-se que ocorre uma diminuição da atividade e do número de neurônios serotoninérgicos no núcleo dorsal da rafe. Diversos estudos têm demonstrado uma associação dos sintomas depressivos em humanos com uma diminuição da ligação do transportador de dopamina (DA) na porção ventral do estriado. Além disso, tem sido relacionado uma diminuição nos níveis dos transportadores de DA e noradrenalina (NA) com um aumento da incidência de depressão (REMY *et al.*, 2005). Existe outra hipótese que destaca a interação entre os gânglios basais e o sistema serotoninérgico, tanto nas funções motoras quanto nas funções límbicas. Os resultados mostram que a depressão é um efeito colateral da estimulação cerebral profunda (*Deep Brain Stimulation* - DBS) do núcleo subtalâmico. Também foi verificado que DBS em modelos animais inibe a neurotransmissão serotoninérgica, resultando em efeitos tipo-depressivo (SHABBIR *et al.*, 2013 *apud* SHARMA *et al.*, 2013).

A neuroinflamação presente na DP parece ser um fator desencadeante no surgimento da depressão. Vários estudos sugerem que um aumento na síntese de citocinas pró-inflamatórias está associado com um comportamento depressivo (MILLER *et al.*, 2009). De acordo com DE LA GARZA, (2005) a administração sistêmica de LPS ou de citocinas induziram um comportamento tipo-depressivo nos modelos animais de depressão. Além disso, foi verificado que antidepressivos

atenuam a inflamação induzida pelas citocinas pró-inflamatórias, reduzindo sintomas tipo-depressivo (YIRMINA *et al.*, 2001).

2.4 MODELOS ANIMAIS

O uso de modelos animais no estudo da DP tem proporcionado uma melhor compreensão de sua patogênese e permitiu o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Drogas como rotenona, 6-OHDA, MPTP, Paraquat e LPS têm sido utilizados para reproduzir características específicas da DP em roedores (BETARBET *et al.*, 2002).

2.4.1 Rotenona

A rotenona é um pesticida orgânico e piscicida que é extraído de raízes de plantas tropicais pertencentes ao gênero *Lonchocarpus* e *Derris* (SOLOWAY, 1976, *apud* MULCAHY *et al.*, 2011).

É um composto altamente lipossolúvel que atravessa facilmente a barreira hematoencefálica e não depende de transportadores específicos para acessar as membranas celulares de neurônios dopaminérgicos (SANDERS & GREENAMYRE, 2013).

Uma vez dentro da célula, a rotenona inibe o complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (THIFFAULT *et al.*, 2000 *apud* RADAD *et al.*, 2008). O complexo I mitocondrial oxida NADH transferindo elétrons para a coenzima Q10 (Ubiquinona) e transloca prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, promovendo um gradiente eletroquímico para a formação de ATP. A rotenona se liga ao término do complexo I favorecendo o estado de redução eletroquímica, o que resulta em perda de elétrons, que se combinam com O₂ para gerar superóxido. A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) resulta em estresse oxidativo, causando danos à diferentes biomoléculas, como proteínas, DNA e lipídios. Além disso, a inibição do complexo I pode sensibilizar neurônios

dopaminérgicos à uma crise energética mediada pelos receptores NMDA. Também pode ocorrer um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial devido a formação de poros transitórios, promovendo uma despolarização e morte celular por apoptose. A inibição do complexo I pela rotenona pode também aumentar a concentração de Ca^{2+} e glutamato no citoplasma de neurônios dopaminérgicos, culminando em morte celular (MARTINEZ & GREENAMYRE, 2012). Além do complexo I mitocondrial, a rotenona tem ação sobre os microtúbulos causando sua despolimerização e contribuindo para sua toxicidade em neurônios dopaminérgicos (FENG, 2006 *apud* SANDERS & GREENAMYRE, 2013).

BETARBET *et al.*, (2000) demonstraram que a rotenona induz neurodegeneração seletiva de neurônios nigroestriatais progressiva em ratos quando administradas de forma crônica e em baixas doses. Além disso, houve a formação de inclusões citoplasmáticas de α -sinucleína e os animais apresentaram hipocinesia e alterações posturais e motoras característicos da DP.

O modelo animal da rotenona tem sido utilizado pois, além de reproduzir os sintomas motores da DP, observou-se diversas alterações neuropatológicas e comportamentais após a administração sistêmica desta droga em ratos, tais como: acumulação de ferro (MASTROBERARDINO *et al.*, 2009), alterações gastrointestinais (DROLET *et al.*, 2009) e distúrbios do sono (GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 2005). No nosso grupo de pesquisa, foi verificado que a administração de rotenona é capaz de induzir um déficit motor (hipolocomoção), comportamento tipo-depressivo (SANTIAGO *et al.*, 2010), depleção dos níveis de GSH na região do hipocampo e uma diminuição da atividade da catalase no hipocampo e estriado (ZAMINELLI *et al.*, 2014). Também observou-se que o tratamento com rotenona, além do prejuízo motor e comportamental, resultou em alterações neuroquímicas, com uma diminuição dos níveis de DA no estriado (MORAIS *et al.*, 2012; BASSANI *et al.*, 2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Neste trabalho foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas (280-320g), provenientes do Biotério Central do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Todos mantidos em sala com temperatura controlada (aproximadamente 22° C), com ciclo claro-escuro de 12 horas (7:00-19:00 hrs). Água e comida foram fornecidas à vontade aos animais. Todos os experimentos e procedimentos passaram previamente pela aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).

3.2 DROGAS

- Rotenona 2,5 mg/kg (Sigma-Aldrich, Germany) (BETARBET *et al.*, 2000)
- Óleo de girassol

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.3.1 Experimento I

As ratas Wistar fêmeas foram distribuídas em dois grupos: veículo (n=15) e rotenona (n=25). Os animais receberam rotenona (2,5 mg/kg) ou óleo de girassol (veículo da rotenona), administrados via i.p., por 3 dias consecutivos.

24 horas após o término do tratamento foi realizado uma sessão do teste do campo aberto (dia 1) para averiguar os efeitos neurotóxicos da rotenona.

A sessão treino do teste de natação forçada foi realizada no dia 21 e 24 horas depois foi realizada uma segunda sessão (dia 22) (Figura 1).

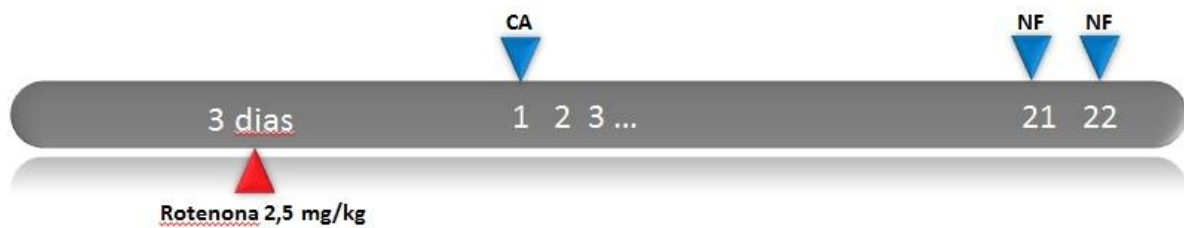


Figura 1 – Representação do delineamento experimental I. Fonte: Produção do próprio autor.

3.3.2 Experimento II

Os ratos Wistar machos foram distribuídos em dois grupos: veículo (n=10) e rotenona (n=20). Os animais receberam rotenona (2,5 mg/kg) ou óleo de girassol (veículo da rotenona), administrados via i.p., por 10 dias consecutivos.

Os animais foram submetidos ao teste de campo aberto nos dias 1 e 21 após a última administração de rotenona. O teste de natação forçada foi realizado nos dias 21 (sessão treino) e 22 (Figura 2).

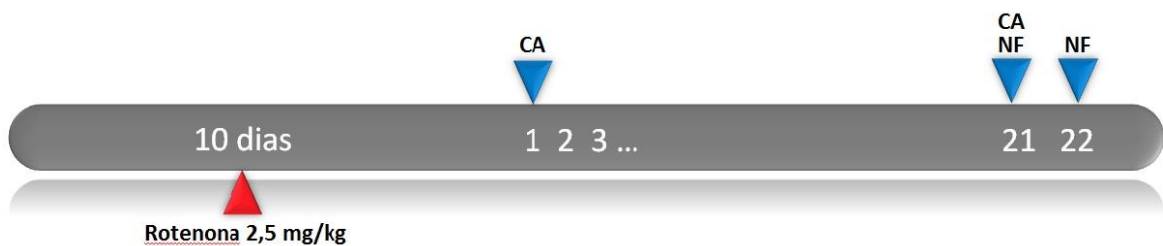


Figura 2 – Representação do delineamento experimental II. Fonte: Produção do próprio autor.

3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.4.1 Teste do campo aberto

O teste do campo aberto (*open field test*) foi utilizado para avaliar a função motora dos animais. Trata-se de uma arena circular com a base dividida em quadrantes. Os animais são colocados, individualmente, no centro do campo aberto e observados por 5 minutos. Os seguintes parâmetros são avaliados: frequência de

locomoção (número de quadrantes cruzados pelo animal), frequência de levantar e tempo de imobilidade. A limpeza do aparelho foi efetuada entre um animal e outro com álcool 5%.

3.4.2 Teste de natação forçada

O teste de natação forçada foi utilizado como um modelo experimental para o estudo da depressão. O procedimento empregado foi uma modificação do método proposto por PORSOLT e colaboradores em 1978.

O teste foi dividido em duas sessões: primeiramente foi realizado uma sessão treino, no qual os animais foram colocados em um tanque cilíndrico contendo água a uma temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, a uma profundidade de 25 cm durante 15 minutos. 24 horas após a sessão treino, os animais foram submetidos novamente ao teste por 5 minutos avaliando-se os seguintes parâmetros: tempo de natação, tempo de imobilidade e o tempo de escalada. A cada observação, a água dos tanques foi trocada, a fim de evitar interferência de odores dos outros animais e temperatura.

3.4.3 Análise estatística

Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os resultados do teste de natação forçada foram submetidos à análise pelo Teste *t* de Student para amostras independentes. Já os resultados do teste do campo aberto foram analisados pelo Teste *t* de Student para amostras relacionadas (pareadas). O nível de significância foi de $P \leq 0,05$. Todas as análises foram realizadas no programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software).

4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO I – EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE ROTENONA POR 3 DIAS EM RATOS WISTAR FÊMEAS

4.1.1 Teste do campo aberto

Os resultados ilustrados na Figura 1 mostram o efeito da administração de rotenona (2,5 mg/kg) por 3 dias sobre a atividade locomotora de ratos Wistar fêmeas. O número de quadrantes percorridos pelos animais tratados com rotenona foi significativamente menor quando comparado com o grupo controle (Fig. 1A). Além disso, esses mesmos animais apresentaram um aumento significativo no tempo de imobilidade quando comparados aos animais do grupo controle (Fig. 1B). Por fim, em relação ao parâmetro frequência de levantar, os animais do grupo rotenona apresentaram uma diminuição significativa (Fig. 1C).

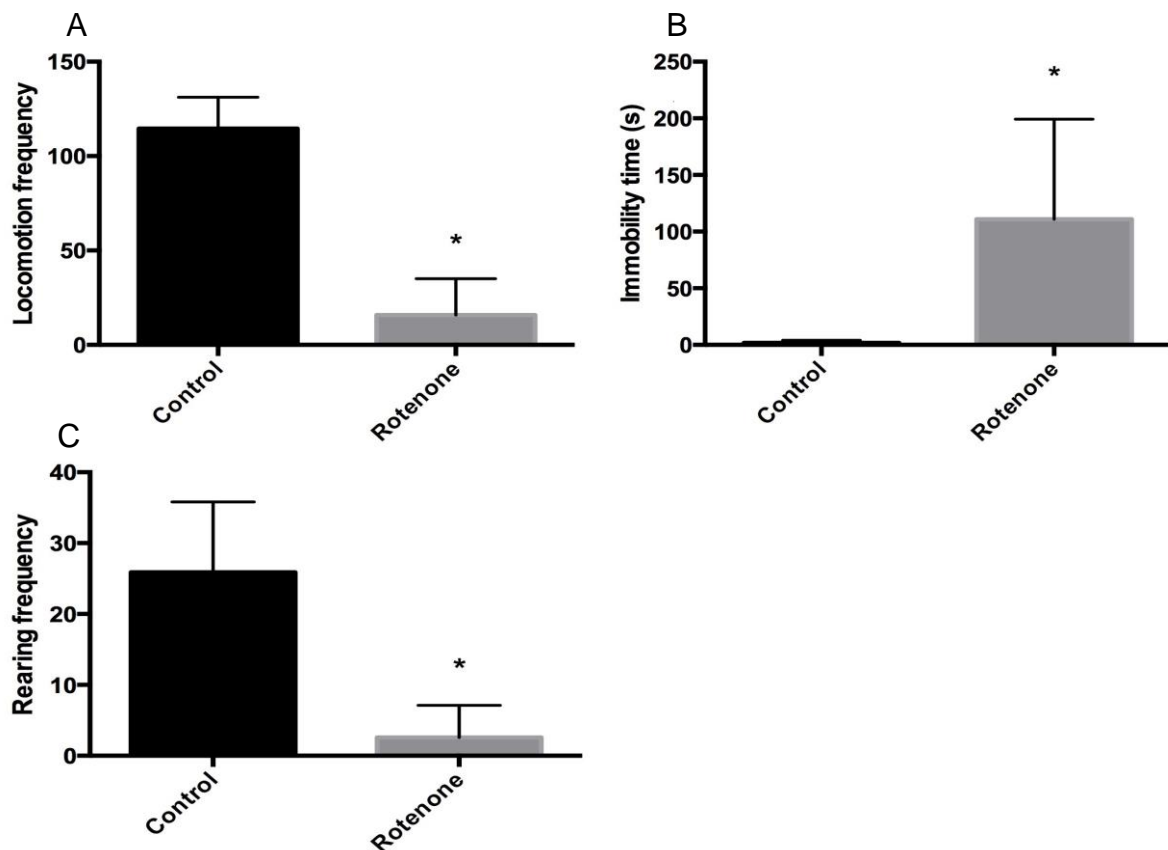


Figura 1. Efeito da rotenona sobre ratas fêmeas no teste de campo aberto. (A) Frequência de locomoção. (B) Tempo de imobilidade. (C) Frequência de levantar. Os animais foram tratados com rotenona ou óleo de girassol (veículo) por 3 dias consecutivos na dose de 2,5 mg/kg. *P<0.05 comparado ao grupo controle. Valores expressos como média ± SEM (n=15-6). Teste *t* de Student não pareado.

4.1.2 Teste de natação forçada

A figura 2 representa os efeitos da rotenona no teste de natação forçada. Ratos Wistar fêmeas do grupo rotenona mostraram uma redução significativa do tempo de natação em comparação aos animais do grupo controle (Fig. 2A). Por outro lado, com relação aos parâmetros tempo de imobilidade e de escalada não houve diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo rotenona (Fig. 2B e 2C).

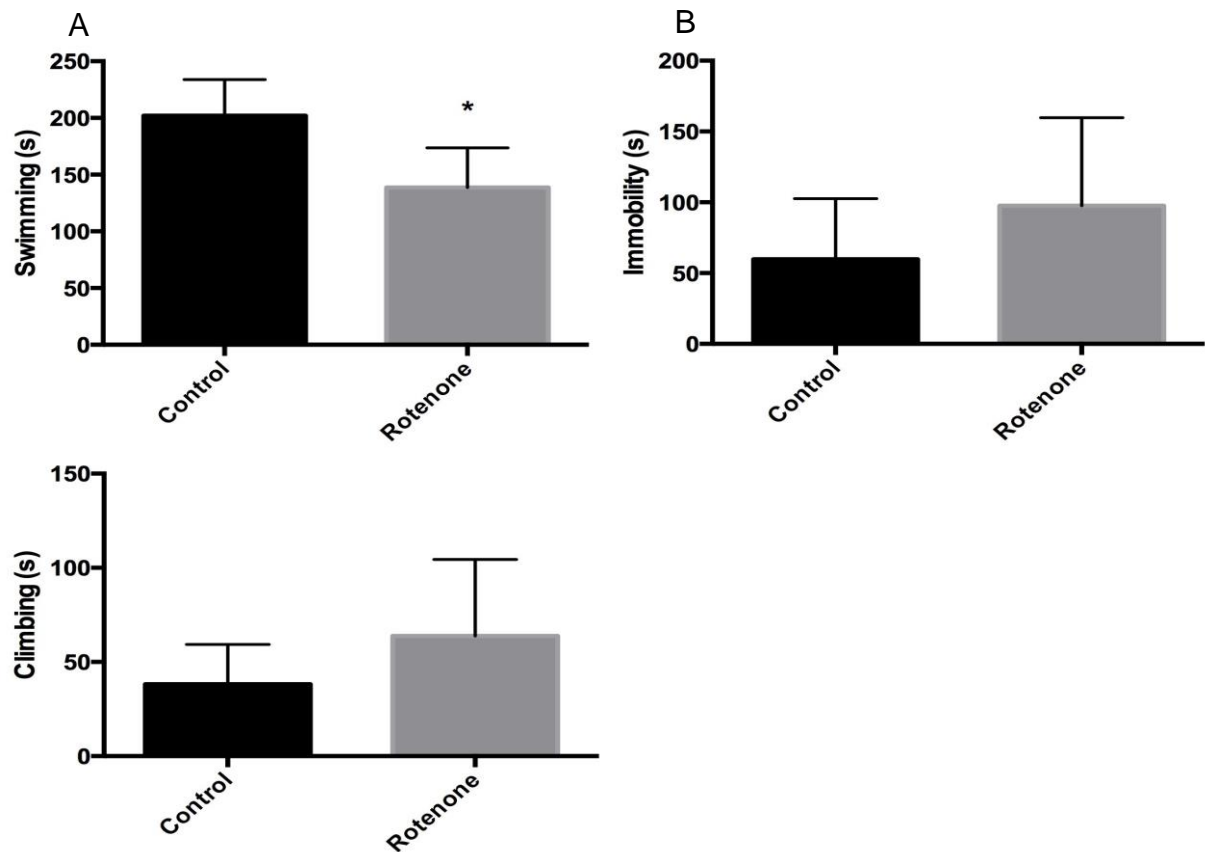


Figura 2. Efeito da rotenona no teste de natação forçada. (A) Tempo de natação. (B) Tempo de imobilidade. (C) Tempo de escalada. Os animais foram tratados com rotenona ou óleo de girassol (veículo) por 3 dias consecutivos na dose de 2,5 mg/kg. * $P < 0.05$ comparado ao grupo controle. Valores expressos como média \pm SEM (n=15-6). Teste *t* de Student não pareado.

4.1.3 Curva de sobrevivência

Na figura 3 está representada a curva de sobrevivência dos ratos Wistar fêmeas durante o tratamento com rotenona. 24 horas após a primeira administração 9 animais foram a óbito. No 2º e 3º dia de aplicação da neurotoxina morreram 6 e 4 animais, respectivamente. Apenas 24% dos animais permaneceram vivos.

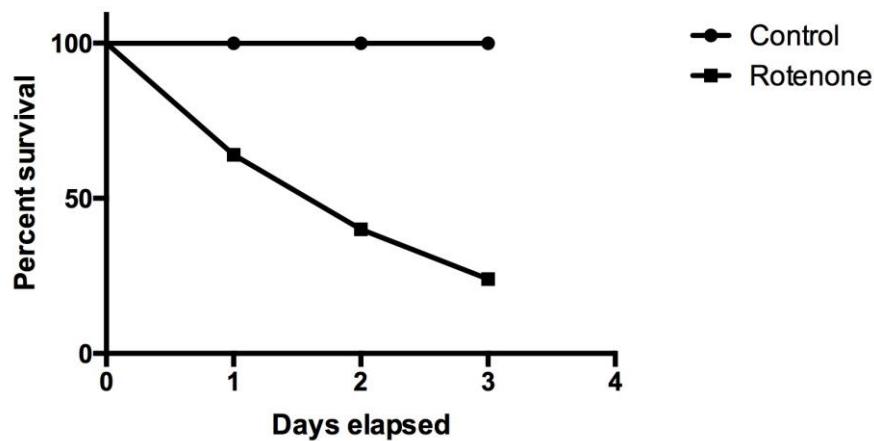


Figura 3. Avaliação do percentual de sobrevivência dos animais dos grupos controle e rotenona.

4.2 EXPERIMENTO II – EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE ROTENONA POR 10 DIAS CONSECUTIVOS EM RATOS WISTAR MACHOS

4.2.1 Teste do campo aberto

Na Figura 4 estão representados os efeitos da rotenona (2,5 mg/kg – 10 dias) sobre a função motora de ratos Wistar machos. Com relação aos diferentes parâmetros analisados, não houve diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo rotenona tanto 24 horas após o término do tratamento quanto no dia 21 (Fig. 4A, 4B e 4C).

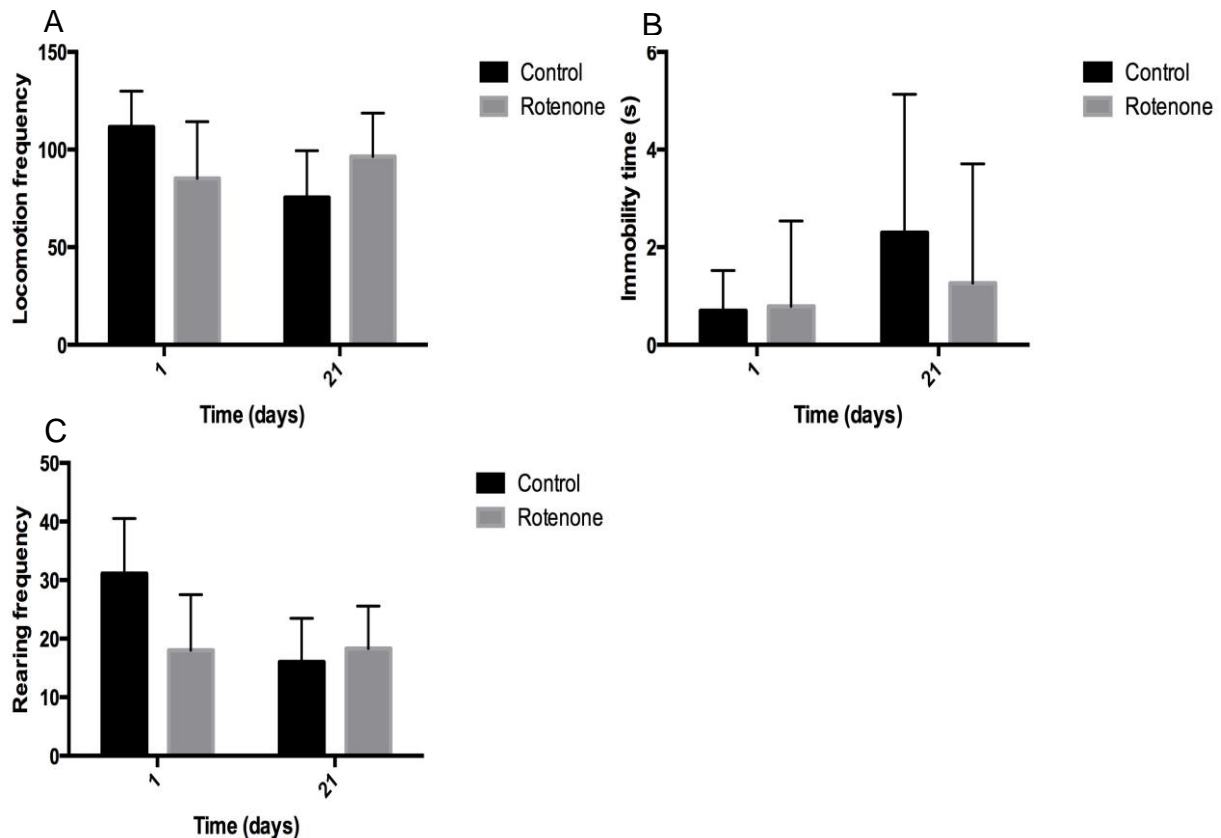


Figura 4. Efeitos da rotenona em ratos Wistar machos no teste de campo aberto. (A) Frequência de locomoção. (B) Tempo de imobilidade. (C) Frequência de levantar. Os animais foram tratados com rotenona ou óleo de girassol (veículo) por 10 dias consecutivos na dose de 2,5 mg/kg. Valores expressos como média \pm SEM (n=10-19). Teste *t* de Student pareado.

4.2.2 Teste de natação forçada

A figura 5 ilustra os efeitos da administração de rotenona por 10 dias consecutivos sobre os comportamentos do tipo-depressivo em ratos Wistar machos avaliados no teste de natação forçada. Neste teste os grupos não apresentaram diferenças significativas para os três parâmetros avaliados: tempo de natação, imobilidade e escalada (Fig. 5A, 5B e 5C).

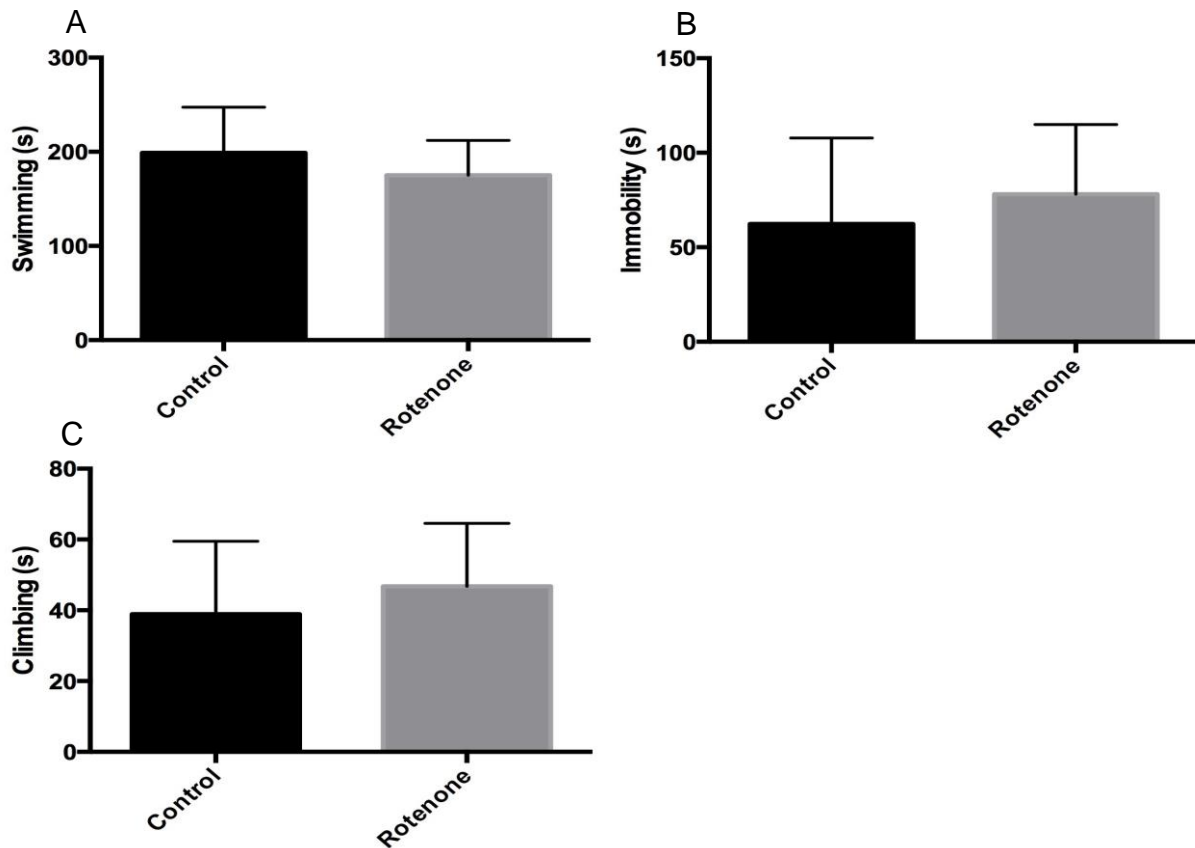


Figura 5. Efeitos da rotenona em ratos Wistar machos no teste de natação forçada. (A) Tempo de natação. (B) Tempo de imobilidade. (C) Tempo de escalada. Os animais foram tratados com rotenona ou óleo de girassol (veículo) por 10 dias consecutivos na dose de 2,5 mg/kg. Valores expressos como média \pm SEM (n=10-19). Teste *t* de Student não pareado.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, utilizamos o modelo animal da rotenona a fim de reproduzir os sintomas motores e não motores da DP, verificados por outros autores (BETARBET *et al.*, 2000; SANTIAGO *et al.*, 2010). No experimento I, os resultados obtidos no teste de campo aberto mostraram que a administração de rotenona por 3 dias em ratos Wistar fêmeas causaram um prejuízo motor significativo, visto que o grupo tratado apresentou hipolocomoção, mostrada através dos parâmetros frequência de locomoção e de levantar. Somado à isso, a lesão pela neurotoxina provocou um aumento significativo no tempo de imobilidade.

Além dos sintomas motores, foi observado no experimento I que os animais tratados com rotenona apresentaram um possível comportamento tipo-depressivo no teste de natação forçada, visto que o tempo de natação do grupo rotenona foi significativamente menor que o grupo controle. No experimento I, o protocolo inicial era a administração de rotenona por 10 dias consecutivos em ratos Wistar fêmeas. No entanto, o tratamento por 3 dias resultou numa mortalidade de 76% (Fig. 3) das ratas, obrigando-nos a suspender a aplicação da droga e realizar os testes comportamentais.

Diversos autores têm relatado que o estrogênio apresenta efeitos neuroprotetores, podendo atuar como um antioxidante, agente modulador neurotrófico ou como agente antiapoptótico.(SAUNDERS-PULLMAN, 2003; MORALE *et al.*, 2006). Paradoxalmente, no nosso experimento, as fêmeas tratadas com rotenona apresentaram uma grande sensibilidade ao efeito tóxico da droga. Na literatura, a utilização do modelo animal de DP com rotenona está relacionada predominantemente com roedores machos, sendo que não está elucidado o porquê da diferença de gênero sexual resultar em diferente sensibilidade à neurotoxicidade da rotenona.

Já no experimento II, os resultados do teste de campo mostraram que a administração de rotenona por 10 dias consecutivos em ratos Wistar machos não foi capaz de reduzir a função motora. Não houve diferença significativa entre os dois grupos nos diferentes parâmetros analisados. Esperávamos que a função locomotora destes animais reduzisse progressivamente. Os dados obtidos contrariam os resultados do estudo de BETARBET *et al.*, (2000) no qual foi verificado que a administração de rotenona de forma crônica e em baixas doses induz neurodegeneração específica e progressiva de neurônios dopaminérgicos, afetando a capacidade locomotora dos animais. Em relação ao teste de natação forçada, a administração da droga não foi capaz de induzir um comportamento tipo-depressivo nos ratos machos, visto que as respostas comportamentais dos dois grupos não diferiram de forma significativa. Outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa utilizaram o mesmo protocolo experimental e observaram que a administração de rotenona causou déficit motor e induziu um comportamento tipo-depressivo. As divergências nos resultados do presente estudo podem estar relacionado com o fator idade, visto que os ratos Wistar machos provenientes do Biotério Central do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná

eram muito novos (5-6 semanas) quando começaram a receber o tratamento com rotenona. Acreditamos que a lesão causada pela neurotoxina em organismos mais novos seja menos intensa quando comparado com os mais velhos, a ponto de não causar prejuízo motor e alterações comportamentais.

A complexidade da DP somado às grandes variações de resultados do modelo animal da rotenona exige que trabalhos futuros sejam conduzidos a fim de elucidar os mecanismos envolvidos no processo de neurodegeneração e sua relação com os sintomas motores e não motores, como a depressão.

6 CONCLUSÃO

- Neste estudo a administração de rotenona via i.p. na dose de 2,5 mg/kg foi eficaz em provocar uma redução significativa na função motora de ratos Wistar fêmeas submetidas ao teste de campo aberto.
- O tratamento com rotenona por 3 dias foi capaz de reproduzir um comportamento tipo-depressivo nas fêmeas, como apresentado no teste de natação forçada.
- O tratamento prolongado com a neurotoxina por 10 dias não provocou alterações sobre a atividade locomotora dos ratos machos e nem induziu um comportamento tipo depressivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARSLAND, D.; PÅHLHAGEN, S.; BALLARD, C. G.; EHRT, U.; SVENNINGSSON, P. Depression in Parkinson disease--epidemiology, mechanisms and management. **Nature reviews. Neurology**, v. 8, n. 1, p. 35–47, 2012.

AKIYAMA, H.; MCGEER, P.L.; Microglial response to 6-hydroxydopamine induced substantia nigra lesions. **Brain research**, v. 489, n. 2, p. 247-253, 1989.

ALOISI, F. The role of microglia and astrocytes in CNS immune surveillance and immunopathology. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 468, p. 123-133, 1999.

BARNHAM, K. J.; MASTERS, C. L.; BUSH, A. L. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 3, n. 3, p. 205-214, 2004.

BASSANI, T. B.; GRADOWSKI, R. W.; ZAMINELLI, T.; BARBIERO, J. K.; SANTIAGO, R. M.; BOSCHEN, S. L.; DA CUNHA, C.; LIMA, M. M.; ANDREATINI, R.; VITAL, M. A. Neuroprotective and antidepressant-like effects of melatonin in a rotenone-induced Parkinson's disease model in rats. **Brain Res**, v. 1593, p. 95-105, 2014.

BETARBET, R.; SHERER, T. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. **Nature neuroscience**, v. 26, p. 1301–1306, 2000.

BETARBET, R.; SHERER, T. B.; GREENAMYRE, J. T. Animal models of Parkinson's disease. **BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 24, n. 4, p. 308–18, 2002.

CASTELLANI, R. J.; PERRY, G.; SIEDLAK, S. L.; NUNOMURA, A.; SHIMOHAMA, S.; ZHANG, J.; MONTINE, T.; SAYRE, L. M.; SMITH, M. A. Hydroxynonenal adducts indicate a role for lipid peroxidation in neocortical and brainstem Lewy bodies in humans. **Neuroscience letters**, v. 319, n. 1, p. 25-28, 2002.

CHEN, H.; ZHANG, S. M.; HERNAN, M. A.; SCHWARZSCHILD, M.A.; WILLET, W. C.; COLDITZ, G. A.; SPEIZER, F. E.; ASCHERIO, A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. **Arch Neurol**, v. 60, p. 1059-64, 2003.

CHEN, W.; XU, Z.-M.; WANG, G.; CHEN, S.-D. Non-motor symptoms of Parkinson's disease in China: a review of the literature. **Parkinsonism & related disorders**, v. 18, n. 5, p. 446–52, 2012.

CHINTA, S. J.; ANDERSEN, J. K. Redox imbalance in Parkinson's disease. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1780, n. 11, p. 1362-1367, 2008.

CHINTA, S. J.; ANDERSEN, J. K. Nitrosylation and nitration of mitochondrial complex I in Parkinson's disease. **Free radical research**, v. 45, n. 1, p. 53-58, 2011.

CRISWELL, L. A. Gene discovery in rheumatoid arthritis highlights the CD40/NF- κ B signaling pathway in disease pathogenesis. **Immunological reviews**, v. 233, n. 1, p. 55-61, 2010.

CROISIER, E.; MORAN, L. B.; DEXTER, D. T.; PEARCE, R. K.; GRAEBER, M. B. Microglial inflammation in the parkinsonian substantia nigra: relationship to alpha-synuclein deposition. **Journal of neuroinflammation**, v.2, p. 14, 2005.

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

DAVIE, C. A. A review of Parkinson's disease. **British medical bulletin**, v. 86, p. 109–27, 2008.

DE LA GARZA, R. Endotoxin-or pro-inflammatory cytokine-induced sickness behavior as an animal model of depression: Focus on anhedonia. **Neurosci biobehav Rev**, v. 29, p. 761-770, 2005.

DE LAU, L. M.; BRETELER, M. M. Epidemiology of Parkinson's disease. **Lancet neurology**, v. 5, n. 6, p. 525-35, 2006.

DEXTER, D. T.; CARTER, C. J.; WELLS, F. R.; JAVOY-AGID, F.; AGID, Y.; LEES, A.; JENNER, P.; MARSDEN, C. D. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 52, n. 2, p. 381-389, 1989.

DIAS, V.; JUNN, E.; MOURADIAN, M. M. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. **Journal of Parkinson's disease**, v. 3, n. 4, p. 461–91, 2013.

DORSEY, E. R.; CONSTANTINESCU, R.; THOMPSON, J. P.; BIGLAN, K. M.; HOLLOWAY, R. G.; KIEBURTZ, K.; MARSHALL, F. J.; RAVINA, B. M.; SCHIFITTO, G.; SIDEROWF, A.; TANNER, C. M. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. **Neurology**, v. 68, n. 5, p. 384-6, 2007.

DROLET, R. E.; CANNON, J. R.; MONTERO, L.; GREENAMYRE, J. T. Chronic rotenone exposure reproduces Parkinson's disease gastrointestinal neuropathology. **Neurobiology of disease**, v. 36, n. 1, p. 96-102, 2009.

FAHN, S.; COHEN, G. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. **Annals of neurology**, v. 32, n. 6, p. 804-812, 1992.

FENG, J. Microtubule: a common target for parkin and Parkinson's disease toxins. **Neuroscientist**, v. 12, n. 6, p. 469-76, 2006.

FLOOD, P. M.; QIAN, L.; PETERSON, L. J.; et al. Transcriptional Factor NF- κ B as a Target for Therapy in Parkinson's Disease. **Parkinson's disease**, v. 2011, p. 216298, 2011.

FUKAE, J.; MIZUNO, Y.; HATTORI, N. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Mitochondrion**, v. 7, n. 1-2, p. 58–62, 2007.

GARCÍA-GARCÍA, F.; PONCE, S.; BROWN, R.; CUSSEN, V.; KRUEGER, J. M. Sleep disturbances in the rotenone animal model of Parkinson disease. **Brain research**, v. 1042, n. 2, p. 160-8, 2005.

GAUTAM, A. H.; ZEEVALK, G. D. Characterization of reduced and oxidized dopamine and 3,4-dihydrophenylacetic acid, on brain mitochondrial electron transport chain activities. **Biochimica et piophysica acta**, v. 1807, n. 7, p. 819-828, 2011.

GAUTIER, C. A.; CORTI, O.; BRICE, A. Mitochondrial dysfunctions in Parkinson's disease. **Revue neurologique**, v. 170, n. 5, p. 339–43, 2014.

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-kappaB activation prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson's disease. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, n. 47, p. 18754-18759, 2007.

HAAS, R. H.; NASIRIAN, F.; NAKANO, K.; WARD, D.; PAY, M.; HILL, R.; SHULTS, C. W. Low platelet mitochondrial complex I and complex II/III activity in early untreated parkinson's disease. **Annals of neurology**, v. 37, n. 6, p. 714-722, 1995.

HAUSER, D. N.; HASTINGS, T. G. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism. **Neurobiology of disease**, v. 51, p. 35–42, 2013.

HIRSCH, E. C.; HUNOT, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? **Lancet neurology**, v. 8, n. 4, p. 382–97, 2009.

HIRSCH, E. C.; HUNOT, S.; HARTMANN, A. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. **Parkinsonism & related disorders**, v. 11 Suppl 1, p. S9–S15, 2005.

ISHIHARA, L.; BRAYNE, C. A systematic review of depression and mental illness preceding Parkinson's disease. **Acta neurologica Scandinavica**, v. 113, n. 4, p. 211-20, 2006.

JACOB, E. L.; GATTO, N. M.; THOMPSON, A.; BORDELON, Y.; RITZ, B. Occurrence of depression and anxiety before Parkinson's disease. **Parkinsonism & related disorders**, v. 16, n. 9, p. 576-81, 2010.

JENNER, P. Oxidative stress and Parkinson's disease. **Handbook of clinical neurology**, v. 83, p. 507–20, 2007.

JOHNSON, W. M.; WILSON-DELFOSSÉ, A. L.; MIEYAL, J. J. Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases. **Nutrients**, v. 4, n. 10, p. 1399-1440, 2012.

LANG, A. E.; LOZANO, A. M. Parkinson's disease. First of two parts. **The New England journal of medicine**, v. 339, n. 15, p. 1044–53, 1998.

LAWRENCE, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. **Cold spring harbor perspectives in biology**, v. 1, n. 6, 2009.

LOTHARIUS, J.; BRUNDIN, P. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 3, n. 12, p. 932–42, 2002.

MARTINEZ, T. N.; GREENAMYRE, J. T. Toxin models of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Antioxidants & redox signaling**, v. 16, n. 9, p. 920–34, 2012.

MASTROBERARDINO, P. G.; HOFFMAN, E. K.; HOROWITZ, M. P.; BETARBET, R.; TAYLOR, G.; CHENG, D.; NA, H. M.; GUTEKUNST, C. A.; GEARING, M.; TROJANOWSKI, J. Q.; ANDERSON, M.; CHU, C. T.; PENQ, J.; GREENAMYRE, J. T. A novel transferrin/TfR2-mediated mitochondrial iron transport system is disrupted in Parkinson's disease. **Neurobiology of disease**, v. 34, n. 3, p. 417-31, 2009.

MCGEER, P. L.; ITAGAKI, S.; BOYES, B. E.; MCGEER, E. G. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. **Neurology**, v. 38, n. 8, p. 1285-1291, 1988.

MCGEER, E. G.; KLEGERIS, A.; MCGEER, P. L. Inflammation, the complement system and the diseases of aging. **Neurobiology of aging**, v. 26, p. 94-97, 2005.

MILLER, A. H.; MALETIC, V.; RAISON, C. L. Inflammation and its discontents: The role of cytokines in the pathophysiology of major depression. **Biol Psychiatry**, v. 65, p. 732-74, 2009.

MOGI, M.; KONDO, T.; MIZUNO, Y.; NAGATSU, T. p53 protein, interferon- γ , and NF- κ B levels are elevated in the parkinsonian brain. **Neuroscience letters**, v. 414, n. 1, p. 94-97, 2007.

MORAIS, L. H.; LIMA, M. M.; MARTYNHAK, B. J.; SANTIAGO, R.; TAKAHASHI, T. T.; ARIZA, D.; BARBIERO, J. K.; ANDREATINI, R.; VITAL, M. A. Characterization of motor, depressive-like and neurochemical alterations induced by a short-term rotenone administration. **Pharmacol Rep**, v. 64, n. 5, p. 1081-90, 2012.

MORALE, M. C.; SERRA, P. A.; L'EPISCOPO, F.; TIROLO, C.; CANIGLIA, S.; TESTA, N.; GENNUSO, F.; GIAQUINTA, G.; ROCCHITTA, G.; DESOLE, M. S.; MIELE, E.; MARCHETTI, B. Estrogen, neuroinflammation and neuroprotection in Parkinson's disease: glia dictates resistance versus vulnerability to neurodegeneration. **Neuroscience**, v. 138, n. 3, p. 869-78, 2006.

MIZUNO, Y.; OHTA, S.; TANAKA, M.; TAKAMIYA, S.; SUZUKI, K.; SATO, T.; OYA, H.; OZAWA, T.; KAGAWA, Y. Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. **Biochemical and Biophysical research communications**, v. 163, n. 3, p. 1450-1455, 1989.

MYTILINEOU, C.; WERNER, P.; MOLINARI, S.; DI ROCCO, A.; COHEN, G.; YAHR, M. D. Impaired oxidative decarboxylation of pyruvate in fibroblasts from patients with

Parkinson's disease. **Journal of neural transmission. Parkinson's disease and dementia section**, v. 8, n. 3, p. 223-228, 1994.

MORAIS, L. H.; LIMA, M. M. S.; MARTYNHAK, B. J.; et al. Characterization of motor, depressive-like and neurochemical alterations induced by a short-term rotenone administration. **Pharmacological reports : PR**, v. 64, n. 5, p. 1081–90, 2012.

MOSLEY, R. L.; BENNER, E. J.; KADIU, I.; et al. Neuroinflammation, Oxidative Stress and the Pathogenesis of Parkinson's Disease. **Clinical neuroscience research**, v. 6, n. 5, p. 261–281, 2006.

MULCAHY, P.; O'DOHERTY, A.; PAUCARD, A.; et al. The behavioural and neuropathological impact of intranigral AAV- α -synuclein is exacerbated by systemic infusion of the Parkinson's disease-associated pesticide, rotenone, in rats. **Behavioural brain research**, v. 243, p. 6–15, 2013.

MULCAHY, P.; WALSH, S.; PAUCARD, A; REA, K.; DOWD, E. Characterisation of a novel model of Parkinson's disease by intra-striatal infusion of the pesticide rotenone. **Neuroscience**, v. 181, p. 234–42, 2011.

NILSSON, F. M.; KESSING, L. V.; SORENSEN, T. M.; ANDERSEN, P. K.; BOLWIG, T. G. Major depressive disorder in Parkinson's disease: a register-based study. **Acta psychiatrica Scandinavica**, v. 106, n. 3, p. 202-11, 2002.

PARKER JR, W. D.; PARKS, J. K.; SWERDLOW, R. H. Complex I deficiency in Parkinson's disease frontal cortex. **Brain research**, v. 1189, p. 215-218, 2008.

PENNATHUR, S.; JACKSON-LEWIS, V.; PRZEDBORSKI, S.; HEINECKE, J. W. Mass spectrometric quantification of 3-nitrotyrosine, ortho-tyrosine, and o,o'-dityrosine in brain tissue of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3, 6-tetrahydropyridine-treated mice, a model of oxidative stress in Parkinson's disease. **The journal of biological chemistry**, v. 274, n. 49, p. 34621-34628, 1999.

PERFEITO, R.; CUNHA-OLIVEIRA, T.; REGO, A. C. Reprint of: revisiting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson disease-resemblance to the effect of amphetamine drugs of abuse. **Free radical biology & medicine**, v. 62, p. 186–201, 2013.

PESSOA ROCHA, N.; REIS, H. J.; VANDEN BERGHE, P.; CIRILLO, C. Depression and cognitive impairment in Parkinson's disease: a role for inflammation and immunomodulation? **Neuroimmunomodulation**, v. 21, n. 2-3, p. 88–94, 2014.

POMERANTZ, J. L.; BALTIMORE, D. Two pathways to NF- κ B. **Molecular cell**, v. 10, n. 4, p. 693-695, 2002.

PORSOLT, R. D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioral despair in rats, a new model sensitive to antidepressant treatments. **Eur J Pharmacology**, v. 47, p. 379-391, 1978.

RADAD, K.; GILLE, G.; RAUSCH, W.-D. Dopaminergic neurons are preferentially sensitive to long-term rotenone toxicity in primary cell culture. **Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA**, v. 22, n. 1, p. 68–74, 2008.

REMY, P.; DODER, M.; LEES, A.; TURJANSKI, N.; BROOKS, D. Depression in Parkinson's disease: Loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system. **Brain**, v. 128, p. 1314-1322, 2005.

RIEDEL, O.; HEUSER, I.; KLOTSCH, J.; DODEL, R.; WITTCHEN, H. U. Occurrence risk and structure of depression in Parkinson disease with and without dementia: results from the GEPAD Study. **Journal of geriatric psychiatry and neurology**, v.23, n. 1, p. 27-34, 2010.

SAMII, A.; NUTT, J. G.; RANSOM, B. R. Parkinson's disease. **Lancet**, v. 363, n. 9423, p. 1783–93, 2004.

SANDERS, L. H.; TIMOTHY GREENAMYRE, J. Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. **Free radical biology & medicine**, v. 62, p. 111–20, 2013.

SANTIAGO, R. M.; BARBIEIRO, J.; LIMA, M. M. S.; DOMBROWSKI, P. A.; ANDREATINI, R.; VITAL, M. A. B. F. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 34, n. 6, p. 1104–14, 2010.

SAUERBECK, A.; GAO, J.; READNOWER, R.; et al. Pioglitazone attenuates mitochondrial dysfunction, cognitive impairment, cortical tissue loss, and inflammation following traumatic brain injury. **Experimental neurology**, v. 227, n. 1, p. 128–35, 2011.

SAUNDERS-PULLMAN, R. Estrogens and Parkinson Disease: neuroprotective, symptomatic, neither, or both?. **Endocrine**, v. 21, n. 1, p. 81-87, 2003.

SCHAPIRA, A. H. V.; COOPER, J. M.; DEXTER, D.; JENNER, P.; CLARK, J. B.; MARSDEN, C. D. Mitochondrial complex I deficiency in parkinson's disease. **Lancet**, v. 333, n. 8649, p. 1269, 1989.

SHABBIR, F.; PATEL, A.; MATTISON, C.; BOSE, S.; KRISHNAMOHAN, R.; SWEENEY, E.; SANDHU, S.; NEL, W.; RAIS, A.; SANDHU, R.; NGU, N.; SHARMA, S. Effect of diet on serotonergic neurotransmission in depression. **Neurochemistry international**, v. 62, n. 3, p. 324-9, 2013.

SHARMA, S.; MOON, C. S.; KHOGALI, A.; et al. Biomarkers in Parkinson's disease (recent update). **Neurochemistry international**, v. 63, n. 3, p. 201–29, 2013.

SHERER, T. B.; BETARBET, R.; TESTA, C. M.; SEO, B. B.; RICHARDSON, J. R.; KIM, J. H.; MILLER, G. W.; YAGI, T.; MATSUNO-YAGI, A.; GREENAMYRE, J. T.

Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. **Journal of neuroscience**, v. 23, n. 34, p. 10756-64, 2003.

SHULTS, C. W. Mitochondrial dysfunction and possible treatments in Parkinson's disease--a review. **Mitochondrion**, v. 4, n. 5-6, p. 641-8, 2004.

SOLOWAY, S. B. Naturally occurring insecticides. **Environ Health Perspect**, v. 14, p. 109-117, 1976.

STARKOV, A. A. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1147, p. 37-52, 2008.

SUBRAMANIAM, S. R.; CHESSELET, M.-F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. **Progress in neurobiology**, v. 106-107, p. 17-32, 2013.

SUGAMA, S.; YANG, L.; CHO, B. P.; DEGIORGIO, L. A.; LORENZL, S.; ALBERS, D. S.; BEAL, M. F.; VOLPE, B. T.; JOH, T. H. Age-related microglial activation in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurodegeneration in C57BL/6 mice. **Brain research**, v. 964, n. 2, p. 288-294, 2003.

TADAIESKY, M. T.; DOMBROWSKI, P. A.; FIGUEIREDO, C. P.; et al. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 156, n. 4, p. 830-40, 2008.

TAN, S. K.; HARTUNG, H.; SHARP, T.; TEMEL, Y. Serotonin-dependent depression in Parkinson's disease: a role for the subthalamic nucleus?. **Neuropharmacology**, v. 61, n. 3, p. 387-99, 2011.

TANSEY, M. G.; GOLDBERG, M. S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. **Neurobiology of disease**, v. 37, n. 3, p. 510-8, 2010.

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. **Experimental neurology**, v. 208, n. 1, p. 1-25, 2007.

TAYLOR, J. M.; MAIN, B. S.; CRACK, P. J. Neuroinflammation and oxidative stress: co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. **Neurochemistry international**, v. 62, n. 5, p. 803-19, 2013.

THIFFAULT, C.; LANGSTON, J. W.; DI MONTE, D. A. Increased striatal dopamine turnover following acute administration of rotenone to mice. **Brain Research**, v. 885, n. 2, p. 283-8, 2000.

VAN DER HEIDEN, K.; CUHLMANN, S.; LUONG, A.; ZAKKAR, M.; EVANS, P. C. Role of nuclear factor kappaB in cardiovascular health and disease. **Clinical science**, v. 118, n. 10, p. 593-605, 2010.

WEINREB, O.; AMIT, T.; MANDEL, S.; KUPERSHMIDT, L.; YODIM, M. B. Neuroprotective multifunctional iron chelators: from redox-sensitive process to novel therapeutic opportunities. **Antioxidants & redox signaling**, v. 13, n. 6, p. 919-949, 2010.

WINKLHOFER, K. F.; HAASS, C. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1802, n. 1, p. 29-44, 2010.

YIRMINA, R.; POLLAK, Y.; BARAK, O.; AVITSUR, R.; OVADIA, H.; BETTE, M.; WEIHE, E.; WEIDENFELD, J. Effects of antidepressant drugs on the behavioral and physiological responses to lipopolysaccharide (LPS) in rodents. **Neuropsychopharmacology**, v. 24, p. 531-544, 2001.

YORITAKA, A.; HATTORI, N.; UCHIDA, K.; TANAKA, M.; STADTMAN, E. R.; MIZUNO, Y. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 93, n. 7, p. 2696-2701, 1996.

ZAMINELLI, T.; GRADOWSKI, R. W.; BASSANI, T. B.; BARBIERO, J. K.; SANTIAGO, R. M.; MARIA-FERREIRA, D.; BAGGIO, C. H.; VITAL, M. A. B. F. Antidepressant and antioxidative effect of ibuprofen in the rotenone model of Parkinson's disease. **Neurotox Res**, v. 26, p. 351-362, 2014.