

LÍVIA HECKE MORAIS

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS DA
ROTENONA COMO UM MODELO ANIMAL DE PARKINSONISMO**

CURITIBA

2011

LÍVIA HECKE MORAIS

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS DA
ROTENONA COMO UM MODELO ANIMAL DE PARKINSONISMO**

Monografia de Conclusão de Curso de Graduação
apresentado à disciplina Estágio em Farmacologia como
requisito parcial para obtenção de título de Bacharel em
Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a .Dr^a. Maria Aparecida Barbato Frazão
Vital

Co-orientador: Prof^o.Dr. Marcelo de Meira Santos Lima

CURITIBA

2011

À Mildred, minha mãe e a tia Vera (*in memoriam*) por toda dedicação e amor que sempre recebi.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe e a tia Vera (*in memoriam*) pelo amor incondicional, amizade e apoio que recebi desde pequena. Ao meu pai pelo carinho, confiança e amizade durante esta etapa final. A Otilia por toda compreensão e carinho no dia-a-dia. Aos meus familiares por sempre me apoiarem nos estudos e vibrarem com cada passo da minha evolução.

À Professora Mildred Ballin Hecke que me apresentou o mundo da pesquisa enquanto escrevia sua tese de doutorado e me carregava na barriga, em 1987. Obrigada por me mostrar o quanto o mundo da pesquisa pode ser curioso, brilhante e tão possível quanto for o tamanho dos meus sonhos. Foi no brilho dos seus olhos e nos seus exemplos que nasceu a minha curiosidade pela ciência.

À Professora Maria Aparecida Barbato Frazão Vital por ter me dado muitas oportunidades de aprendizado. Sou muito grata por esses três anos de convivência, amizade, pelos bons exemplos de uma profissional ética, orientadora-educadora, pesquisadora e pessoa maravilhosa.

Ao Professor Marcelo de Meira Santos Lima por toda a disponibilidade em ajudar, ensinar, estimular e aconselhar.

Ao professor Roberto Andreatini pela oportunidade de trabalhar em sua linha de pesquisa, por indicar leituras, pelos bons exemplos enquanto educador e pesquisador, com sua maneira sutil de apontar caminhos, sem mostrar as respostas.

Ao Professor Herbert Arlindo Trebien pela oportunidade de participar do seu projeto de extensão “Riscos da Automedicação” para tentar contribuir diretamente à sociedade com os conhecimentos que adquirimos ao longo da graduação. Também agradeço por sua amizade e a sua grande compreensão.

À Professora Marta Luciane Fischer, minha primeira orientadora na graduação. Obrigada por acreditar em mim, me estimular a começar e pelos ensinamentos dos quais sempre me lembro.

Aos meus colegas e amigos do Departamento de Farmacologia da UFPR em especial Bruno, Janaína, Tatiane, Camila e Ronise pela amizade, pela ajuda nos experimentos, pela disposição em ajudar, pela amizade, conversas e companheirismo em viagens.

Aos meus amigos da Biologia pela amizade sincera e pelos momentos de descontração Em especial: Ingrid, Maíra, Marcelo, Fábio-Padre, Débora, Carol, Cami, Fer, Yuli, Luis Renato, Júlio, Flávio-bandido, Adri e Mari.

Aos meus amigos de cursos de inverno, Lenyta, Leandro e Gregório por terem compartilhado comigo o final desta etapa e terem me apoiado a iniciar a outra que se segue.

Aos meus grandes amigos da vida, Lívia Tiemi, Danuza, Ana Beatriz e Marcos por sempre estarem comigo.

À Silvia Genarri, Lindacir e a Rosane por sempre estarem dispostas a ajudar, com muita paciência, durante os anos de estágio e graduação.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

“O cientista não estuda a natureza porque é útil fazê-lo. Ele a estuda porque tem prazer nisso, e ele tem prazer porque ela é bela. Se a natureza não fosse bela, não valeria a pena conhecê-la, e a vida não valeria a pena ser vivida...”
Henri Poincaré

“Ninguém não educa ninguém, ninguém se educa a si mesmo, os homens se educam entre si mediatizados pelo mundo”.
Paulo Freire

RESUMO

A Doença de Parkinson idiopática é caracterizada, principalmente, pela morte progressiva dos neurônios dopaminérgicos. Esta patologia não apresenta causa conhecida porém disfunções mitocondriais associadas a fatores ambientais e ao envelhecimento vêm sendo propostos como agentes etiológicos para explicar a neurodegeneração progressiva. Dentro desse contexto, o uso da rotenona, um pesticida, altamente lipofílico e potente inibidor do complexo I tem sido estudado como possível modelo animal para o estudo desta patologia. O objetivo deste trabalho foi investigar a viabilidade da rotenona como um possível modelo animal de parkinsonismo. Para isso avaliamos as possíveis alterações motoras, afetivas, cognitivas e neuroquímicas induzidas pela administração da rotenona, em experimento agudo e prolongado. As alterações motoras foram observadas no teste do campo aberto realizado 24 horas após a administração de duas doses diferentes de rotenona (2,5 mg/kg e 5 mg/kg) e após a administração prolongada da menor dose, 24 horas e 7 dias após o início do tratamento. No 21º dia do experimento encontramos hipercinesia (aumento do número de levantamentos e diminuição da imobilidade) do grupo tratado, o que pode estar relacionado a mecanismos compensatórios. O prejuízo motor também foi verificado no teste da pata, com o aumento do tempo para retração das patas dianteiras e traseiras. Os ratos que receberam rotenona por 10 dias apresentaram comportamento tipo-depressivo em dois testes diferentes: teste da natação forçada e teste da preferência por sacarose. Também foram encontradas alterações neuroquímicas nos níveis de monoaminas no estriado e no hipocampo; Foi observada a diminuição dos níveis de DA e aumento do turnover de DA e da 5-HT no estriado; e, aumento do turnover de NA e 5-HT no hipocampo, 23 dias após o início do tratamento prolongado. Não foram encontradas diferenças significativas no teste da esQUIVA de duas-vias, demonstrando que o tratamento prolongado com rotenona não causou prejuízos cognitivos. Estes resultados ressaltam a importância dos estudos com rotenona como um modelo animal de parkinsonismo que em nosso estudo foi capaz de mimetizar alterações comportamentais, neuroquímicas e fisiológicas semelhantes as que ocorrem na Doença de Parkinson podendo, dessa maneira, contribuir para melhor compreensão da etiologia desta patologia e para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, Rotenona, Comportamento, Neurodegeneração, Dopamina, Alterações neuroquímicas.

LISTA DE ABREVIATURAS

α -sinucleína- alfa-sinucleína

5-HT- 5-hidroxitriptamina

5-HIAA- Hidroxi-3-Indolacético

6-OHDA- 6-hidroxi-dopamina

DA- Dopamina

DHPG-3,4-Dihidroxi-fenilglicol

DP – Doença de Parkinson

DOPAC-3,4-dihidroxi-fenilacetico

EROS-Espécies reativas de Oxigênio

HVA- ácido homovanílico

I.P.- intraperitoneal

MPP+ (1- metil-4-fenilpiridínio),

MPTP- 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidroperidina

NA- Noradrenalina

SNpc- Substância Negra *pars compacta*

RNS- reativas de nitrogênio

TH- Tirosina-hidroxilase

PARAQUAT- paraquat (1-1'-dimetil-4,4'-biperidínio)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	CARACTERIZAÇÃO DA DOENÇA DE PARKINSON	15
3.1.1	Histórico da Doença de Parkinson.....	15
3.1.2	Aspectos etiológicos.....	16
3.1.3	Estresse Oxidativo.....	18
3.1.4	Neuroinflamação.....	19
3.1.5	Hipótese ambiental da Doença de Parkinson	20
3.1.6	Sinais e sintomas.....	21
3.2	Modelos animais de Parkinsonismo	25
3.2.1	O modelo da Rotenona.....	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1	ANIMAIS	31
4.2	Droga e veículo	31
4.3	Procedimentos experimentais	31
4.3.1	Experimento 1: Efeitos administração rotenona nas alterações motoras em ratos Wistar	31

4.3.2	Experimento 2: Efeitos da administração prolongada de rotenona nas alterações comportamentais em ratos Wistar	34
4.4	Análise dos Dados e Estatística	40
5	RESULTADOS	42
5.1	Experimento 1: Efeitos da administração aguda de rotenona nas alterações motoras em ratos Wistar	42
5.1.1	Teste do campo aberto	42
5.1.2	Teste da pata	44
5.2	Experimento 2: Efeitos da administração prolongada de rotenona em ratos Wistar	45
5.2.1	Pesos	45
5.2.2	Alterações motoras	45
5.2.3	Teste do campo aberto no 21º dia	47
5.2.4	Comportamento tipo depressivo	48
5.2.5	Teste da Preferência por sacarose (1%)	49
5.2.6	Alterações cognitivas: teste da esquiva ativa de duas vias	49
5.3	Dosagem de monoaminas através da Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC)	50
5.3.1	Estriado	50
5.3.2	Hipocampo	52
6	DISCUSSÃO	55
7	CONCLUSÃO	61

8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
---	----------------------------------	----

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Parkinson (DP) foi inicialmente descrita por James Parkinson, em 1817, como “Ensaio da Paralisia agitante”. A DP é o segundo transtorno neurodegenerativo relacionado à idade mais comum em humanos, atrás apenas da doença de Alzheimer. A DP é a mais comum das Doenças neurodegenerativas do movimento sendo que apenas 10% dos casos são associados a fatores genéticos e os outros 90% correspondem a DP idiopática (GREEMEYER *et al.*, 2003). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (CENSO 2000), há aproximadamente 222 mil parkinsonianos no Brasil. Com o aumento da expectativa de vida da população mundial e a melhora na medicina diagnóstica esse número deve aumentar.

O diagnóstico da DP é clínico, feito por sinais e sintomas os quais podem ser: motores (bradicinesia, tremores em repouso e rigidez muscular), cognitivos, distúrbios de sono, gastrointestinais e do humor. Apesar das constantes investigações a respeito das suas causas, elas ainda são desconhecidas bem como os mecanismos pelos quais ocorre a patologia, mas, acredita-se que ela envolva a interação genética e ambiental.

A principal característica patológica da DP é uma morte dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais. No entanto, ao longo do desenvolvimento da patologia ocorrem outras perdas de células não dopaminérgicas. Outra característica marcante associada à patologia inclui o acúmulo de proteínas insolúveis, como a alfa-sinucleína (α -sinucleína) em inclusões denominadas corpos de Lewy, nos neurônios dopaminérgicos e em alguns casos em neurônios não-dopaminérgicos. (MEREDITH *et al.*, 2008).

O estudo da DP por meio de modelos animais tem possibilitado uma maior compreensão do mecanismo da doença. Os modelos animais mais usados, criados nas últimas décadas, utilizam-se de toxinas tais como 6-hidroxidopamina (6-OHDA), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiperidina (MPTP), Paraquat e Rotenona (DRECHSEL e PATEL, 2007; MEREDITH *et al.*, 2008; ALAM e SCHMIDT, 2002).

O modelo da Rotenona foi proposto por Alam e Schmidt (2002) considerando que deficiências mitocondriais, estresse oxidativo e toxinas ambientais estejam relacionadas à etiologia da DP. A Rotenona é comumente utilizada como pesticida e é um inibidor do Complexo I da cadeia respiratória. É uma substância altamente lipofílica e facilmente atravessa a barreira hematocefálica produzindo uma progressiva degeneração dos neurônios dopaminérgicos (MEREDITH *et al.*, 2008).

Dentro desse contexto o modelo da Rotenona vem sendo implementado no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Sistema Nervoso Central da Universidade Federal do Paraná (UFPR) para o estudo da DP. O presente estudo buscou atingir uma maior compreensão do modelo e seus efeitos comportamentais e neuroquímicos em ratos Wistar

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi investigar os efeitos da administração sistêmica de rotenona (aguda e prolongada) para testar sua viabilidade como um modelo animal da parkinsonismo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar alterações motoras induzidas pela rotenona nos testes do campo aberto e teste da pata.
- Investigar os efeitos da rotenona no comportamento tipo-depressivo em dois testes comportamentais por meio do teste da natação forçada e no teste da sacarose.
- Estudar as alterações cognitivas da rotenona na esquiwa ativa de duas vias.
- Investigar os danos neuroquímicos induzidos pela rotenona por meio da Cromatografia Líquida de Alta Pressão com detecção Eletroquímica (HPLC-ED)

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA DOENÇA DE PARKINSON

3.1.1 Histórico da Doença de Parkinson

James Parkinson descreveu pela primeira vez a Doença de Parkinson em um ensaio intitulado “An Essay on the Shaking Palsy”, publicado em 1817. Sua descrição baseou-se na observação de um caso clínico e nos tremores apresentados. Ele distinguiu os tremores característicos do parkinsonismo dos demais tipos de tremores.



FIGURA 1- “O bom Samaritano”, obra de Rembrandt (1633). Fonte: French engravings.

Não é possível saber por meio de registros médicos se já havia casos de parkinsonismo antes do século XIX, porém, Giuseppe Longui (1830) e Goethe (1831), ao comentarem sobre a obra de Rembrandt “O Bom Samaritano” (FIGURA 1) afirmam que o hoteleiro idoso, desenhado por Rembrandt, apresenta um tipo de tremor ao contar as moedas recebidas (DUVOISIN, 1987).

Após James Parkinson, a descrição da patologia foi atribuída a diversos autores, no século XIX, incluindo, Elliotson (1839), Marshall-Hall (1841), Graves (1843), Blasius (1851), Basedow (1851) e Romberg (1851) (DUVOISIN, 1987).

Posteriormente, Charcot (1880) descreveu e detalhou os principais sinais e sintomas clínicos que reconhecemos hoje: tremor em repouso, rigidez muscular, postura rígida e arqueada. Paul Richer, um dos estudantes de Charcot, ilustrou a evolução do parkinsonismo em um dos pacientes (FIGURA 2).

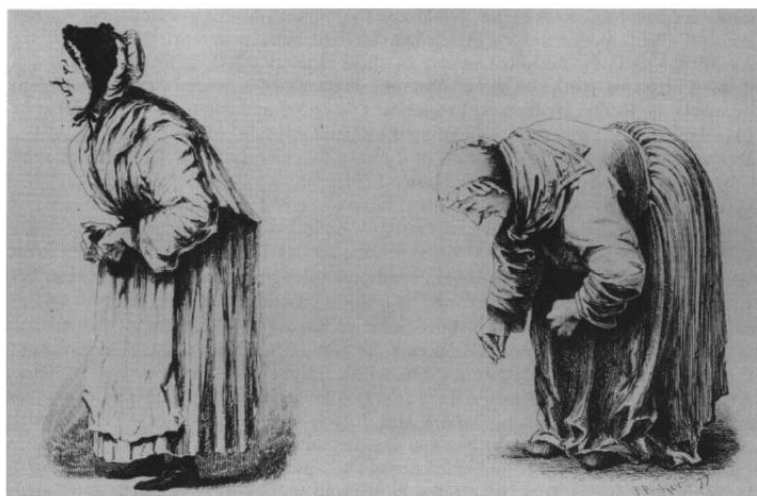


FIGURA 2: Paciente de Charcot ilustrada por Paul Richard. A figura ilustra a evolução da doença em apenas 4 anos. Essa ilustração consta no primeiro volume de Charcot “Evret completes” (1886).

3.1.2 Aspectos etiológicos

A DP é uma patologia degenerativa dos gânglios da base caracterizada pela progressiva e seletiva degeneração dos neurônios dopaminérgicos da Substância

Negra *pars compacta* (SNpc). Essa degeneração resulta em um decréscimo das projeções nigroestriatais do sistema dopaminérgico resultando na diminuição da DA no Estriado (GÖREN *et al.*, 2009). Além da DA, outros sistemas neurais são afetados, como núcleos catecolaminérgicos.

A hipótese majoritária para o desenvolvimento da DP é que a doença seja resultado de causas genéticas ou ambientais, ou ainda, da combinação das duas associadas com o processo de envelhecimento, o que culminaria em disfunções mitocondriais e/ou proteossômicas e no aumento do estresse oxidativo. Estudos com modelos animais e observações de manifestações clínicas em humanos indicam que a perda dos terminais pré-sinápticos da conexão nigro-estriatal precede a morte do corpo-celular (SHI *et al.*, 2009). Lotharius & Brundin (2002) ainda sugerem que o primeiro sinal de neurodegeneração ocorre com a perda dos terminais e em seguida a deposição de agregados protéicos, chamados Corpos de Lewy .

Os corpos de Lewy parecem ser importantes na Doença de Parkinson idiopática e consistem em inclusões eosinofílicas. Eles são encontrados em células nervosas principalmente da substância negra em cérebros normais, com envelhecimento; ou, em cérebros de portadores da DP. Os corpos de Lewy são formados por proteínas como α -sinucleína, ubiquitina, sub-unidades proteossômicas e neurofilamentos. Um importante componente dos corpos de Lewy são os filamentos de α -sinucleína, uma proteína pré-sináptica de função desconhecida (LOTHARIUS e BRUNDIN, 2002). O potencial patológico dos corpos de Lewy está relacionado a oligomerização das α -sinucleína em protofibrilas citotóxicas e insolúveis (HASEGAWA *et al.*, 2006). O mecanismo pelo qual a α -sinucleína está relacionada à DP e a morte de neurônios dopaminérgicos ainda não foi completamente elucidado, porém evidências de estudos prévios indicam que a

vulnerabilidade destes tipo de célula pode estar relacionada ao potencial oxidativo e citotóxico da DA. A α -sinucleína está envolvida na regulação da biossíntese de DA pela interação com a Tirosina-hidroxilase (TH), pode regular a função do transportador de monoaminas, e regular o número de vesículas (apud PEREZ *et al.*, 2002). Mutações da expressão α -sinucleína podem levar ao acúmulo de DA citoplasmática. Portanto, o mecanismo patológico de α -sinucleína deve estar relacionado à morte dos neurônios dopaminérgicos (FIGURA 3).

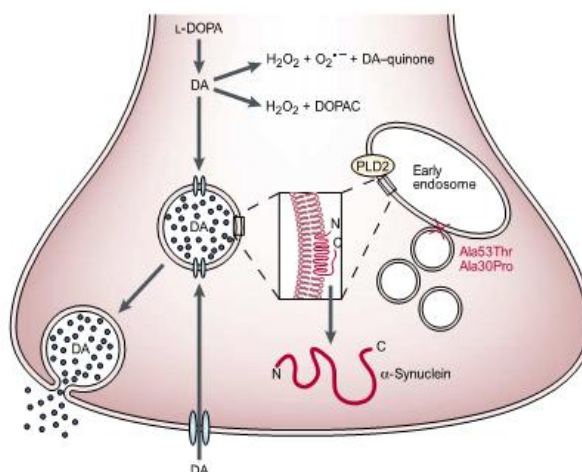


FIGURA 3: Um terminal pré-sináptico de um neurônio dopaminérgico e a função da α -S no estoque da Dopamina em visículas (FONTE: LOTHARIUS e BRUNDIN, 2002).

3.1.3 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é uma das principais causas de morte celular (EMERIT *et al.*, 2004). Normalmente, as espécies reativas de oxigênio (EROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) são eliminadas por sistemas antioxidantes. Com o envelhecimento, os indivíduos apresentam uma disfunção neste sistema protetor. Em algumas condições neurodegenerativas, o envelhecimento aumenta o estresse

oxidativo. Por exemplo, na Doença de Alzheimer, o produto da oxidação de lipídios, DNA e proteína mostram-se elevados nas regiões do cérebro danificadas.

Os neurônios dopaminérgicos da substância negra são particularmente sensíveis ao estresse oxidativo devido ao metabolismo da DA. A DA pode auto-oxidar em pH normal, na forma de dopamina-quinona, espécies radicais superóxido e peróxido de hidrogênio. Alternativamente, a DA pode ser convertida em metabólitos não tóxicos como o ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC).

As EROS podem alterar lipídios, proteínas e DNA. O dano aos lipídios pode alterar a permeabilidade da membrana celular ao Cálcio que, por sua vez, pode ser excitotóxico (EMERIT *et al.* 2004).

Na DP, as células da substância negra apresentam elevado estresse oxidativo e alterações genéticas e exposição a toxinas ambientais podem estar envolvidas nesta condição (LOTHARIUS e BRUNDIN, 2002).

3.1.4 Neuroinflamação

Muitos estudos em animais e humanos têm demonstrado que a inflamação também é um importante aspecto na fisiopatologia da DP. A expressão da ciclooxigenase-2 aparece alterada tanto em parkinsonianos (*post-mortem*) em animais expostos ao MPTP (REKSIDLER *et al.*, 2007).

A resposta imune local no sistema nervoso central envolve a síntese de componentes inflamatórios pelos neurônios, glia e micróglia (Mc GEER e McGEER, 2004). Portadores da DP podem ter a ativação da micróglia até 6 vezes mais comparado com não-parkinsonianos. A Micróglia torna-se ativada após um dano cerebral ou a exposição aos mediadores interleucina -1 β ou fator de necrose tumoral

alfa. Além de produzir citocinas, proteases e prostanóides, a ativação da micróglia também produz superóxido e Óxido Nítrico.

A ativação da micróglia na substância negra é encontrada em diversos modelos animais de parkinsonismo, incluindo a exposição ao MPTP, Rotenona, e metanfetamina. Em muitas das circunstâncias esta ativação é concomitante a geração de EROS e alterações neuroquímicas. As alterações neuroquímicas encontradas em alguns estudos sugerem que um estímulo inflamatório pode levar a neurodegeneração dopaminérgica progressiva (MILLER *et al.*, 2008).

3.1.5 Hipótese ambiental da Doença de Parkinson

Em 1983, Langston e colaboradores identificaram que pessoas intoxicadas por MPTP desenvolveram uma síndrome aguda de parkinsonismo. Este fato levou a hipótese de que a exposição a toxinas ambientais poderia levar ao desenvolvimento da DP.

Estudos epidemiológicos relacionam a exposição a fatores ambientais com o risco de desenvolver DP. Entre esses fatores estão o trabalho rural, água contaminada e exposição a pesticidas (DRECHEL e PATEL, 2008). Os estudos epidemiológicos não possibilitam identificar um único pesticida, um grupo de pesticidas ou substâncias correlatas que possa contribuir com o aumento da DP na população.

Alguns dos pesticidas relacionados com o aumento da DP, hoje são considerados como ferramenta no estudo do desenvolvimento da DP. O paraquat (1-1'-dimetil-4,4'-biperidínio) é um importante herbicida e é estruturalmente semelhante ao MPP⁺ (1- metil-4-fenilpiridínio), metabólito ativo do MPTP. Muitos estudos observaram que a neurotoxicidade do paraquat leva a degeneração de neurônios

dopaminérgicos (KUTER *et al.*, 2007). Ratos tratados sistemicamente com paraquat apresentam diminuição da atividade do complexo I mitocondrial (NADH-desidrogenase) e apresentam aumento do estresse oxidativo.

A rotenona também é um inibidor do complexo I e um inseticida de ocorrência natural. A rotenona é extremamente lipofílica e atravessa a barreira hematocefálica causando degeneração dopaminérgica e acúmulo de inclusões citoplasmáticas (Betarbet *et al.*, 2000). Atualmente é uma ferramenta utilizada no estudo DP e será tratada mais detalhadamente no item 3.2.1.

Em 1989, Mizuno e colaboradores e Schapira e colaboradores independentemente detectaram defeitos no Complexo I no cérebro de portadores de DP. A natureza desse defeito no Complexo I observada permanece incerta, no entanto os inibidores do complexo I vêm sendo utilizados como forte ferramenta para a compreensão dessa patologia (MARELLA *et al.*, 2007).

O Maneb é um fungicida muito utilizado na lavoura há 50 anos. A intoxicação por Maneb tem sido relacionada a efeitos comportamentais em animais de laboratório tais como: diminuição da locomoção e da coordenação motora (DRECHEL E PATEL, 2008 e BROWN *et al.*, 2006). Quando em associação com paraquat apresentou uma neurodegeneração dopaminérgica progressiva em camundongos com idade avançada.

3.1.6 Sinais e sintomas

Os sinais mais clínicos da DP são os motores: tremores durante o repouso, bradicinesia, instabilidade postural e rigidez muscular. Muitos pacientes sofrem de sintomas não-motores, incluindo distúrbios do sono, constipação, depressão, prejuízos cognitivos e ansiedade (SHI *et al.*, 2009; OWEN *et al.*, 1995). Os sinais

clínicos podem ser observados quando a taxa de degeneração dos neurônios dopaminérgicos chega a 50% na substância negra e 80% no estriado (TOULOSSE, 2008). O diagnóstico da DP ainda é feito com base dos sinais clínicos e a maioria dos sintomas parkinsonianos não são exclusivos a essa patologia (ISHIHARA *et al.*, 2005).

Atualmente, uma questão levantada por muitos pesquisadores envolve o estudo da seqüência do aparecimento de sinais e sintomas da doença bem como a seqüência de degeneração de sítios nigrais e extranigrais. Algumas alterações não-motoras ocorrem antes do aparecimento dos sinais motores e do diagnóstico da DP sugerindo que alterações cerebrais na fase inicial da doença levariam a alterações pré-motoras. Apesar da depleção de DA estar mais relacionada ao aparecimento dos sinais motores característicos, sugere-se que a depleção de outros neurotransmissores como Noradrenalina (NA), 5-hidroxitriptamina (5-HT) e acetilcolina estejam associadas a variedade de sintomas na DP (TADAIESKY *et al.* 2008, SANTIAGO *et al.* 2010).

Braak e colaboradores (2003), em estudos clínicos, demonstraram que as primeiras mudanças patológicas ocorrem nas estruturas olfativas e no núcleo olfatório. Na seqüência, outras áreas próximas são danificadas como tubérculo olfativo e regiões corticais relacionadas ao olfato. Conseqüentemente, a disfunção olfativa deve estar relacionada aos primeiros sinais da DP (PREDIGER *et al.*, 2006). Observando os sinais da doença, Braak e colaboradores descreveram estágios para o seu desenvolvimento que incluem os sinais motores e não-motores sendo que os estágios um e dois são caracterizados por disfunções olfativas, autonômicas e somato-motoras. A deterioração da substância negra ocorre principalmente nos

estágios 3 e 4 e é exacerbada por danos específicos do núcleo talâmico e áreas do neo-córtex nos estágios 5 e 6.

3.1.6.1 Depressão e Doença de Parkinson

A depressão é o transtorno emocional mais comum na DP e parece ser mais comum em portadores da DP do que em outros grupos. Cerca de 35% dos portadores da DP apresentam depressão, muitas vezes precedendo os sinais motores. A depressão é um dos fatores mais importantes que pode afetar a qualidade de vida desses pacientes (ROJO *et al.*, 2003).

A depressão pode variar desde distímia leve, episódios depressivos e depressão maior entre os portadores da DP (ROJO *et al.*, 2003; LEENTJENS *et al.*, 2003). Alguns fatores podem estar envolvidos com o desenvolvimento da depressão na DP, entre eles: episódios depressivos e déficit cognitivo, ansiedade, acinesia, bradicinesia e psicose (ROJO *et al.*, 2003; LEENTJENS *et al.*, 1981; TANDELBERG, 1996).

A relação entre a depressão e o desenvolvimento da DP ainda não está elucidada. Porém, de acordo com Silberman (2004), a depressão pode ocorrer tanto nos estágios iniciais quanto finais da DP. Ainda, de acordo com o mesmo autor, a depressão antecede os sintomas motores em cerca de 25% dos parkinsonianos deprimidos e há uma associação positiva entre depressão e subsequente risco de DP, portanto, o reconhecimento da sintomatologia depressiva poderia contribuir para a melhora dos pacientes parkinsonianos. Silberman *et al.* (2004) e Camargo *et al.* (2004) realizaram estudos clínicos em pacientes portadores da DP e correlacionaram a incidência da sintomatologia depressiva ao declínio cognitivo e uma diminuição das atividades diárias.

Duas hipóteses relacionam a depressão a DP (SANTIAGO, 2010; SILBERMAN, 2004): na primeira, a depressão pode estar associada a fatores psicológicos em consequência das delimitações da doença, como os fatores motores que limitam a independência do indivíduo e sua qualidade de vida. A outra hipótese está relacionada à neurodegeneração progressiva, que levaria a deficiência de neurotransmissores como DA, 5-HT e NA.

Na DP, além da considerável degeneração dos neurônios dopaminérgicos da substância negra e suas redes neurais de conexões no *putamen*, *globus pallidus*, tálamo e algumas áreas corticais, ocorrem alterações morfológicas no *locus coeruleus* (BALOYANNI *et al.*, 2006), o que demonstra a diminuição da população de neurônios noradrenérgicos (FIGURA 4).

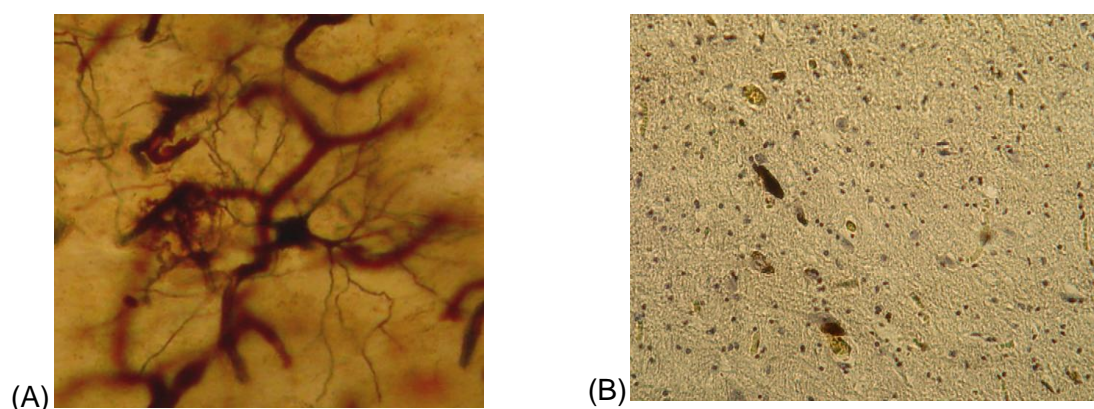


FIGURA 4- Populações de células noradrenérgicas no *locus coeruleus*. (A) Células de um paciente normal coradas com Nitrato de Prata (ampliado 1200 vezes). (B) Células de um paciente parkinsoniano coradas com Nitrato de Prata (ampliado 1200 vezes).

(FONTE: BALOYANNIS, *et al.* 2006)

Outros estudos abordam alterações na neurotransmissão serotoninérgica com a incidência da Doença de Parkinson (SANTIAGO *et al.* 2010 e SILBERMAN *et al.* 2004). A serotonina tem função inibitória da liberação de DA no estriado, o que pode

ser um mecanismo compensatório para a redução da atividade dopaminérgica. A redução da atividade de 5-HT aumenta o risco de depressão, o que favorece a relação entre DP e depressão.

Temel e colaboradores (2007) verificaram que a estimulação elétrica de alta frequência do núcleo sub-talâmico, que possui alto valor terapêutico, pode gerar agravar nos sintomas depressivos. O estudo realizado com ratos, no modelo da natação forçada sugere uma interação entre o núcleo sub-talâmico e os neurônios serotoninérgicos.

De acordo com Schrag (2006), os mecanismos que afetam a depressão na DP incluem anormalidades do sistema dopaminérgico, noradrenérgico e serotoninérgico. Estudos com imagens revelaram a diminuição da expressão cortical do receptor 5-HT_{1A}, bem como a redução do transportados de monoaminas no *locus coeruleus* e em várias regiões do sistema límbico.

3.2 MODELOS ANIMAIS DE PARKINSONISMO

Os modelos animais de Parkinsonismo mais utilizados incluem toxinas tais como 6-hidroxidopamina (6-OHDA), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropirididina (MPTP), Paraquat, Maneb, Rotenona, LPS (DRECHSEL e PATEL, 2007; MEREDITH *et al.*, 2008). Além desses, o modelo da 6-OHDA e do MPTP são atualmente os mais bem caracterizados enquanto Paraquat, Rotenona, Dieldrin e Maneb são substâncias químicas utilizadas na agricultura e que estão sendo estudados mais recentemente (DRECHSEL e PATEL, 2007).

Meredith e colaboradores (2008) realizaram uma revisão dos modelos animais de parkinsonismo mais utilizados e suas principais características estão demonstradas na TABELA 1.

Tabela 1 – Características dos modelos animais de parkinsonismo

Toxina	Tempo de maior morte neuronal	Perda de DA no estriado	Vantagens	Desvantagens
6-OHDA intranigral	42 h	↓ DA dose-dependente	-Alta morte neuronal -mimetiza os estágios terminais e iniciais da DP	-Não progressiva -Não apresenta inclusões -Não mostra patologia extranigral
6-OHDA intraestriado	16 semanas	↓ TH-lugar administrado	-Progressiva DA	-Não apresenta inclusões -Não mostra patologia extranigral
MPTP, agudo	24 h	↓ DA- estriado dorsal	-Inibe Complexo I - ↓ TH no estriado	-Não progressiva -Não apresenta inclusões
MPTP, crônico	3 semanas	↓ DA-Estriado dorsal	-Inibe Complexo I -Patologia extranigral	-Rápida morte neuronal -Não apresenta inclusões -Não mostra patologia extranigral
Paraquat e Maneb	7 dias	pouca alteração	↓ DA	Resultados inconsistentes
Rotenona, crônico	36 dias ou +	↓ DA dose-dependente	-Inibe Complexo I -Progressiva ↓ DA -Patologia extranigral (i.p.)	-Grande variação entre os animais
MPP+, crônico	42 dias ou +	↓ DA dose-dependente	-Inibe Complexo I -Progressiva ↓ DA -Danos mitocondriais	-Não apresenta inclusões
LPS, agudo	21 dias	Não há dados	-Ativação microglial -Progressiva ↓ DA	-Não progressivo
LPS, crônico	10 semanas	Não há dados	-Ativação microglial -Progressiva ↓ DA	- Não há dados

FONTE: adaptada de Meredith *et al.* 2008

Enquanto os diferentes modelos possuem semelhanças e diferenças o estudo de cada um tem contribuído para a maior compreensão de como ocorre a neurodegeneração na DP.

3.2.1 O modelo da Rotenona

A rotenona é um composto pertencente à classe dos rotenóides extraído das raízes de diversas plantas. Foi obtida primeiramente da espécie *Lonchocarpus nicou*, planta nativa do sudeste da Ásia e da América do Sul. Tradicionalmente a Rotenona foi muito utilizada na piscicultura e subsistência indígena. Ela também é utilizada com um inseticida orgânico na agricultura ou de uso doméstico, nos Estados Unidos. Nos países onde é muito utilizada estão sendo criadas leis que regulamentam o uso (ROBERTSON e SMITH-VANIZ, 2008). A rotenona é um clássico inibidor do complexo I da Cadeia respiratória muito utilizada como marcador da atividade específica desse complexo (TAHARA, *et. al.*, 2009). Devido ao seu forte

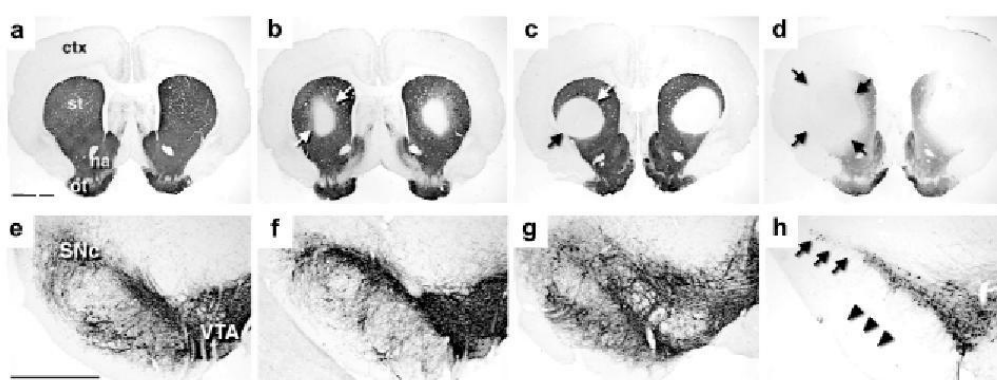


FIGURA 5: Lesões progressivas da substância negra e estriado em ratos tratados com Rotenona (2,5 mg/kg). Imunohistoquímica para TH em ratos controle (a, e); tratados com rotenona durante 7 dias (b, f); tratados com rotenona durante 36 dias (c,g) e tratados com rotenona durante 33 dias (d, h).

(Fonte: Betarbet *et al.* (2000))

caráter lipofílico, atravessa rapidamente a barreira hematocefálica, sem necessitar de nenhum transportador, ao contrário do MPTP, atingindo os neurônios dopaminérgicos e formando inclusões tipo Corpos de Lewy (GREENAMYRE *et al.*, 2003).

Betarbet e colaboradores (2000) demonstraram que a administração sistêmica de Rotenona resulta em degeneração progressiva da substância negra e do estriado (FIGURA 5). Eles também demonstraram a presença de α -sinucleína nos neurônios dopaminérgicos (FIGURA 6). Estudos recentes (DROLET *et al.*, 2009) demonstraram que ocorre expressão de α -sinucleína nos corpos celulares e axônios de neurônios do sistema nervoso entérico e que ela aumenta progressivamente mesmo após finalizar as administrações em roedores (FIGURA 7). Outras alterações gastro-intestinais como diminuição da motilidade e da absorção também são encontrados em animais tratados sistemicamente com rotenona (DROLET *et al.*, 2009 e GREENE *et al.*, 2009).

A diminuição da expressão da TH na substância negra e no estriado foi detectada por Betarbet *et al.* (2000) e Sherer *et al.* (2003a). A mesma redução não foi observada no hipocampo e cerebelo (SHERER *et al.*, 2003a), o que está de acordo com as características encontradas nos casos de parkinsonismo idiopático.

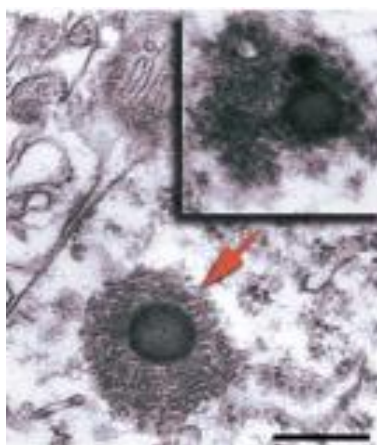


FIGURA 6: Expressão de α -sinucleína na substância negra de ratos tratados com rotenona.

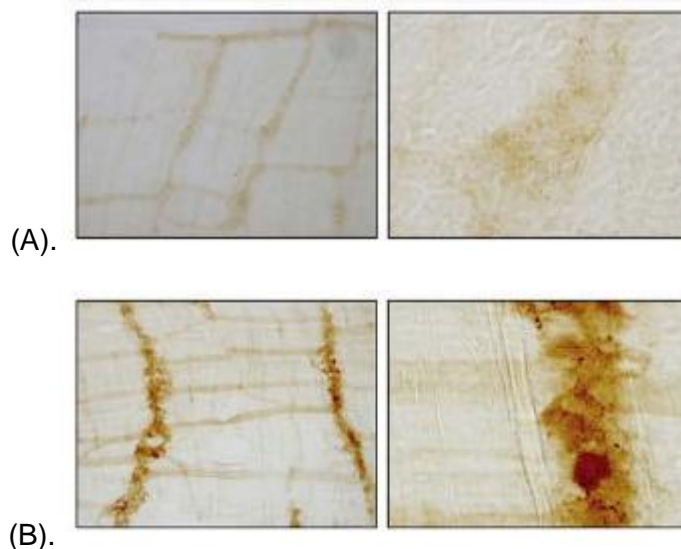


FIGURA 7: Expressão de α -sinucleína nos corpos celulares e axônios de neurônios do Sistema Nervoso Entérico 6 meses após o término do tratamento. (A) Controle. (B) Rotenona. (DROLET *et al.*, 2009).

Segundo Ahmadi e colaboradores (2007) a morte dos neurônios dopaminérgicos também ocorre via caspase-3. De acordo com os autores, a exposição crônica a rotenona pode levar a danos mitocondriais e déficit na produção de ATP, prejudicando o armazenamento da DA em vesículas. Portanto, um dos primeiros eventos que ocorre é um aumento da DA no estriado e substância negra pars compacta. Em seguida ocorre um aumento de Óxido Nítrico, da peroxidação lipídica no estriado, levando ao aumento do estresse oxidativo que é uma das causas da morte neuronal. Sherer e colaboradores (2003b) também verificaram a ativação microglial em ratos tratados com rotenona.

Além das alterações neuroquímicas, Alam e Schmidt (2002); Feng *et al.* (2006) e Drolet *et al.* (2009) demonstraram que a rotenona administrada cronicamente em ratos reproduz sinais da DP como bradicinesia, postura curvada, rigidez. Santiago *et al.* (2010) demonstrou recentemente que a administração

intranigral de rotenona pode ocasionar a um comportamento tipo- depressivo em roedores.

Betarbet e colaboradores (2000) sugerem que doses subcrônicas e intraperitoniais de rotenona em ratos são comparáveis a exposição crônica ao meio-ambiente e a uma situação real de desenvolvimento de parkinsonismo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar de 200-250g, cedidos pelo biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram mantidos em grupos de 5 animais por caixa em uma sala com umidade e temperatura controladas ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), em um ciclo de claro-escuro de 12h (7:00-19:00 h). Os animais tiveram livre acesso a alimentação e água até o momento do experimento. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA- UFPR).

4.2 DROGA E VEÍCULO

Nos experimentos realizados a rotenona (Sigma, EUA) foi administrada em duas doses diferentes: 2,5 mg/kg e 5,0 mg/kg. A rotenona foi previamente diluída em Óleo de Girassol, utilizado como veículo. Os animais controle receberam 1ml/kg do veículo. A rotenona e o veículo serão administrados via intraperitoneal (i.p.).

4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.3.1 Experimento 1: Efeitos administração rotenona nas alterações motoras em ratos Wistar

Os animais foram distribuídos em três grupos: Rotenona 2,5 mg/kg (n=10 para cada experimento); Rotenona 5 mg/kg (n=10 para cada experimento) e o grupo Controle 1 ml/kg (n=10 para cada experimento). Após uma única administração

intraperitoneal os animais serão submetidos ao teste da pata e ao teste do campo aberto. O teste da pata foi realizado 1h após a administração e o teste do campo aberto foi realizado 24 horas após a administração da droga e veículo.

4.3.1.1 Teste do campo aberto

Esse teste consiste na avaliação da atividade locomotora dos animais. O teste foi realizado 24 horas após a administração da droga e do veículo, em uma arena retangular com 51 cm de largura, 41cm de comprimento e 60cm de altura, dividido em 20 quadrados, cada um com 10 cm de lado (FIGURA 8). Neste teste os animais foram distribuídos em 3 grupos: controle (n=9); rotenona 2,5 mg/kg (n=9) e rotenona 5,0 mg/kg (n=8). Cada animal permaneceu 5 minutos na arena e terá seu comportamento avaliado nos seguintes parâmetros: tempo de imobilidade (s), número de levantamentos número de quadrantes percorridos. Após a sessão teste de cada animal a arena foi limpa com álcool 5%.



FIGURA 8: Imagem representativa do teste do campo aberto.

4.3.1.2 Teste da pata

O teste da pata, descrito por Ellenbroek e colaboradores (1988), é um modelo utilizado para a discriminação entre drogas tipo antipsicóticos típicos e tipo atípicos,

porém foi pela primeira vez utilizado pelo nosso grupo de pesquisa como um possível teste para modelos animais de parkinsonismo. Esse teste mede o tempo que os animais levam para retirarem as patas dianteiras e traseiras de um buraco (40 mm). Os animais foram isolados 24h antes do teste, com comida e água *ad libitum*. Cada animal será testado 60, 70 e 80 minutos após a administração da droga ou veículo. Os tempos de latência para retirada das patas dianteiras e traseiras foram mensurados nos 3 tempos e calculado a média. Devido a imprecisão para o tempo de início a latência mínima será registrada como 1 segundo, quando os animais imediatamente retirarem as patas ou não permitirem que as coloque e o tempo de 30 segundos foi considerado máximo (ELLENBROEK *et al.*, 1988). Os animais foram distribuídos em três grupos experimentais: controle (n=9); rotenona 2,5 mg/kg (n=9) e rotenona 5,0 mg/kg (n=9). Após o término do teste, os ratos foram decapitados, os cérebros removidos e as concentrações de DA e seus metabólitos, além de NA e 5-HT, para a análise no corpo estriado através da HPLC- ED (resultados não analisados). A figura 9 mostra o protocolo experimental do teste da pata e a figura 10 é uma representação da plataforma utilizada par ao teste.

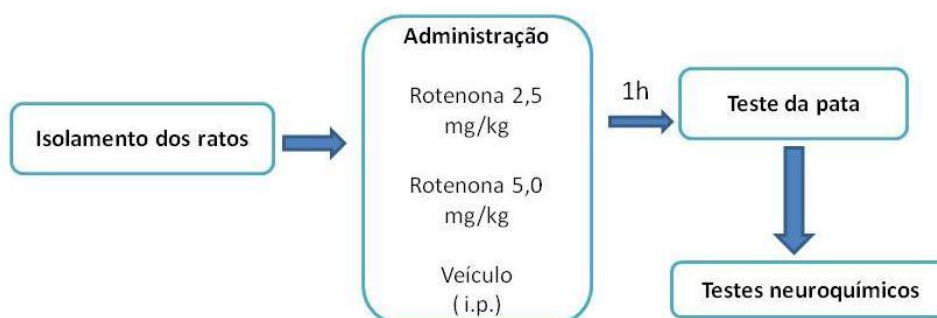


FIGURA 9: Protocolo experimental do teste da pata.



FIGURA 10: Imagem da plataforma utilizada para o teste da pata.

4.3.2 Experimento 2: Efeitos da administração prolongada de rotenona nas alterações comportamentais em ratos Wistar

4.3.2.1 Teste do campo aberto em diferentes tempos

Os animais foram distribuídos em dois grupos: rotenona 2,5 mg/kg (n=10) e grupo Controle 1ml/kg (n=15). Os animais foram tratados via intraperitoneal por dez dias consecutivos e submetidos ao teste do campo aberto em diferentes tempos: 24 horas, 7 dias, 14 dias e 21 dias após a primeira administração. Os mesmos animais foram testados nos diferentes dias. A figura 11 ilustra o protocolo experimental do segundo experimento. Todos os animais foram pesados durante os 10 dias de administração.

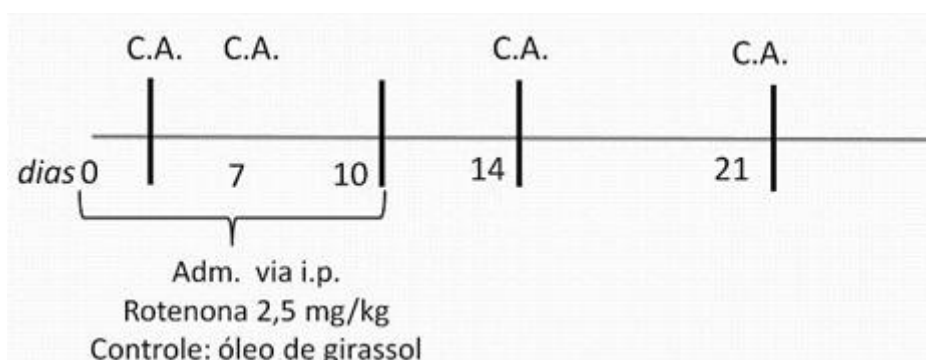


FIGURA 11: Protocolo experimental realizado no teste do campo aberto (C.A.).

4.3.2.2 Teste do campo aberto no 21º dia

O experimento do campo aberto foi repetido com novos animais no 21º dia ($n_{\text{controle}}=10$; $n_{\text{rotenona}}=9$) após o início do tratamento, para descartar o efeito da habituação na posterior interpretação dos resultados. A figura 11 representa este experimento.

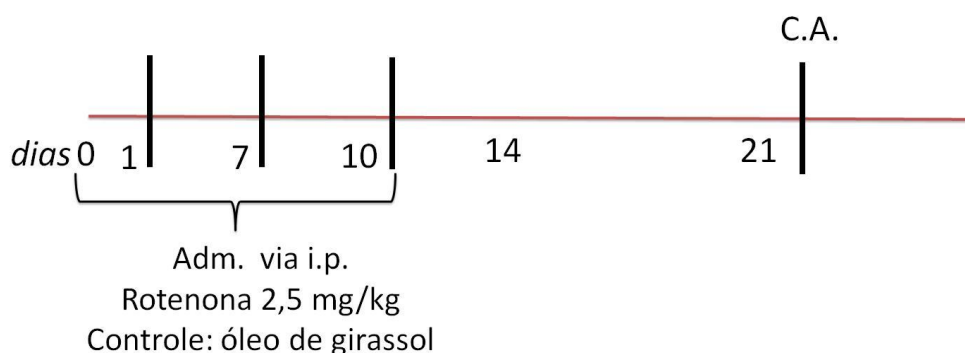


FIGURA 12: Protocolo experimental do campo aberto realizado com animais apenas no 21º dia.

4.3.2.3 Teste da natação forçada

O teste da natação forçada foi descrito previamente por Porsolt *et al.* (1978). Os animais foram distribuídos em dois grupos experimentais: controle ($n=9$); rotenona 2,5 mg/kg ($n=9$) e rotenona 5,0 mg/kg ($n=9$). Neste trabalho os ratos foram colocados em cilindros de PVC (21x 46 cm), preenchidos com água (21- 25°C) e com a profundidade de 30 cm. Foram realizadas duas sessões: uma sessão inicial de 15 minutos (no 21º dia após o início da administração) e 24 horas depois foi realizada uma sessão teste de 5 minutos (no 22º dia após o início da administração). As sessões foram gravadas e posteriormente os animais foram avaliados durante os 5 minutos da segunda sessão. Os parâmetros comportamentais quantificados foram: tempo de natação, tempo de imobilidade e tempo de escalada. A imobilidade foi

definida como flutuação sem movimento, exceto aqueles necessários para manter a cabeça do rato fora da água. Após cada animal, a água do cilindro foi trocada. Após o teste os animais foram decapitados para a determinação dos níveis cerebrais de DA, NA, 5-HT e seus metabólitos por HPLC. A figura 13 ilustra o teste da natação forçada.



FIGURA 13: Imagem representativa do teste da natação forçada.

4.3.2.4 Teste da Preferência por Sacarose

O teste de preferência por sacarose é freqüentemente utilizado como medida de anedonia em roedores (CRAFT e DE VRIES, 2006; SANTIAGO *et al.*, 2010). Os animais foram distribuídos em dois grupos experimentais: controle (n=11) e rotenona 2,5 mg/kg (n=14). Primeiramente, os animais são isolados e mantidos com livre acesso a comida. Cada rato recebeu duas garrafas com água, durante 3 dias, para habitarem a beber das duas garrafas. Após, uma garrafa foi escolhida aleatoriamente para conter uma solução de sacarose de 1% para medir consumo basal. A porcentagem do consumo de sacarose foi calculada para 1h de exposição ao teste, usando a seguinte equação: % preferência por sacarose= consumo de sacarose x 100/consumo total.

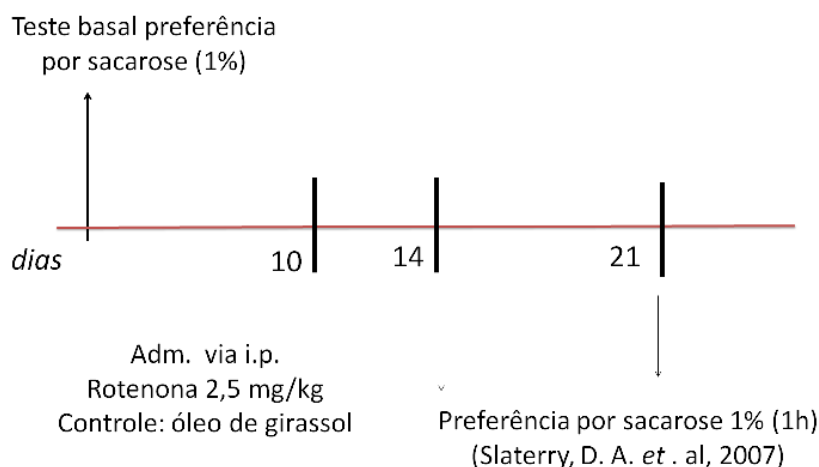


FIGURA 14: Protocolo experimental do teste de preferência por sacarose.

Os ratos cuja preferência foi inferior a 60 % foram descartados do teste. Os animais foram distribuídos em dois grupos: rotenona 2,5 mg/kg e grupo controle 1ml/kg. Os animais foram tratados via i.p. por dez dias consecutivos e submetidos a sessão teste da preferência por sacarose 14 e 21 dias após o início do tratamento prolongado. A figura 14 ilustra o esquema do teste de preferência por sacarose (1,0%).

4.3.2.5 Esquiva ativa de duas vias

A esquiva ativa de duas vias é um modelo animal usado para estudar comportamentos motivados que envolvem os condicionamentos clássico e instrumental. O condicionamento clássico ou Pavloviano (PAVLOV, 1987), ocorre quando o animal antecipa a apresentação de um estímulo reforçador ou aversivo. O aprendizado instrumental ou operante resulta na tomada de decisões reforçadoras evitando conseqüências aversivas (apud DOMJAM e BURKAHARD, 1982 , WIETZINKOSKI, 2009). Essas escolhas resultam em respostas motoras.

Na esquivas de duas vias o animal aprende a emitir uma resposta de esquivas (resposta condicionada) ou a antecipar a resposta de fuga (resposta incondicionada) sob apresentação de um estímulo condicionado que pode ser auditivo ou visual. Este estímulo condicionado é sempre pareado a um estímulo incondicionado, usualmente um choque nas patas. Quando a resposta ao estímulo condicionado não é emitida no tempo estipulado, o estímulo incondicionado é aplicado. De maneira contrária, se esse for emitido, os estímulos são finalizados. O animal aprende a antecipar a fuga do choque por condicionamento clássico e a se esquivar por condicionamento instrumental (WANDENBERG e HICKS, 1999).

A esquivas ativa consiste em uma caixa automatizada (GEMINI Avoidance System, San Diego Instruments, San Diego, CA) de 23 cm x 50 cm x 23 cm, com vidros escuros e com o chão constituído por barras paralelas espaçadas com calibre de 5 mm e o espaço entre as barras de aproximadamente 15 mm. A caixa é dividida em dois compartimentos separados por uma porta que permanece aberta durante o teste. Na sessão treino, após 3 minutos de habituação, foram pareadas 30 pistas de som (estímulo condicionado, 1,5 kHz, 60 dB, duração máxima de 5 s) com subsequente choque nas patas (estímulo incondicionado, com duração de máxima de 5 s) até o animal atravessar para o compartimento oposto ou o tempo de máximo de 5s de choque for atingido. O animal pode esquivar do choque, ao atravessar para o lado oposto durante a apresentação do estímulo condicionado. O tempo entre cada apresentação do estímulo condicionado varia randomicamente de 10s a 50s. O número de esquivas, tempo de latência e o tempo de choque nas patas de cada animal foram automaticamente registrados pelo aparelho. A sessão teste foi realizada 24h após a sessão treino seguindo os mesmos parâmetros da sessão treino, exceto para o tempo de habituação que será de 2 minutos. A figura 15

representa o aparato utilizado para Esquiva ativa de duas vias. Este foi lavado com álcool (5%) entre um animal e outro. A sessão treino foi realizada do 21º dia e a sessão teste no 22º dia após o início do tratamento prolongado. Três dias após a sessão teste foi realizada a perfusão intracardíaca nos animais para análises neuroquímicas (dados não analisados). Os animais foram distribuídos em dois grupos experimentais: controle (n=10) e rotenona 2,5 mg/kg (n=8).



FIGURA 15: Imagem do aparato utilizado para esquiva ativa de duas vias (GEMINI Avoidance System, San Diego Instruments, San Diego, CA)

4.3.2.6 Dosagem de monoaminas através da Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC)

Para a determinação dos níveis de DA, ácido 3,4- dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), NA, 3,4-Dihidroxifenilglicol (DHPG), 5-HT, 5-Hidroxi-3-Indolacético (5-HIAA) no cérebro, os ratos (n=17) foram sacrificados por decapitação no experimento agudo (1h após a administração) e no experimento prolongado (23 dias após o início do tratamento), ao término dos testes comportamentais. Os cérebros foram removidos imediatamente e as estruturas do corpo estriado e hipocampo foram dissecados e armazenados a -80º C. Estas estruturas foram escolhidas para o estudo devido a seu envolvimento com as alterações motoras, cognitivas e afetivas. As concentrações de DA, NA, 5-HT e seus metabólitos foram analisados por HPLC-ED de fase reversa. O sistema é composto

de uma coluna de fase reversa Synergi Fusion-RP C-18 (150 x 4,6 mm de diâmetro interno, diâmetro da partícula 4 µm) equipada com uma pré-coluna de 4 x 3 µm (SecurityGuard Cartridges Fusion-RP); um detector eletroquímico (ESA Colocuem III) com o eletrodo ajustado a 350mV e uma bomba LC 20 AT (Shimadzu). Os potenciais de oxidação foram ajustados a 100 mV para o primeiro eletrodo e a 450 mV para o segundo eletrodo. A quantificação das monoaminas e seus metabólitos ocorreram no segundo eletrodo. As amostras de tecido foram homogeneizadas por uma caneta sonicadora em 0,1 M de ácido perclórico contendo metabissulfito de sódio a 0,02% e padrão interno. Após centrifugação a 10000 G durante 30 min, 4° C, 20 µl do sobrenadante foram injetados no cromatógrafo. A fase móvel, utilizada a uma taxa de 1 ml/min, possuía a seguinte composição: 20 g de ácido cítrico monohidratado (Merck), 200mg de ácido octano-1-sulfônico (Merck), 40 mg de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Sigma), 900 ml de água. O pH da solução tampão foi ajustado para 4,0 e em seguida de forma a obter uma composição final de metanol a 10% (v/v). As áreas de pico dos padrões externos foram utilizados para quantificar os picos das amostras.

4.4 ANÁLISE DOS DADOS E ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada pelo software GraphPadPrisma (Versão 5). Os seguintes testes estatísticos foram realizados:

- No teste do campo aberto do experimento agudo foi usada ANOVA de uma via seguida do pós- teste de Tukey; no teste da pata a ANOVA Kruskal-Wallis;
- No teste de preferência por sacarose foi realizada ANOVA de duas vias seguida de pós- teste de Bonferroni;

- Na esquia ativa de duas vias foi utilizada ANOVA de medidas repetidas.
- O teste t-student foi utilizado para avaliar os resultados do campo aberto 21^o dias, da natação forçada e do HPLC.

5 RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO 1: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE ROTENONA NAS ALTERAÇÕES MOTORAS EM RATOS WISTAR

5.1.1 Teste do campo aberto

A figura 16 representa os resultados encontrados no teste do campo aberto 24h após a administração de rotenona. O número de quadrantes percorridos foi significativamente menor no grupo que recebeu a maior dose de rotenona ($F_{2,26}=16,71$; $p=0,0001$) quando comparados com o controle. O grupo rotenona 2,5 mg/kg também apresentou significativa diminuição dos levantamentos ($F_{2,26}=5,819$; $p=0,009$). Ambos os grupos apresentaram aumento do tempo de imobilidade significativamente aumentado em relação ao controle ($F_{2,26}=13,77$; $p=0,0001$).

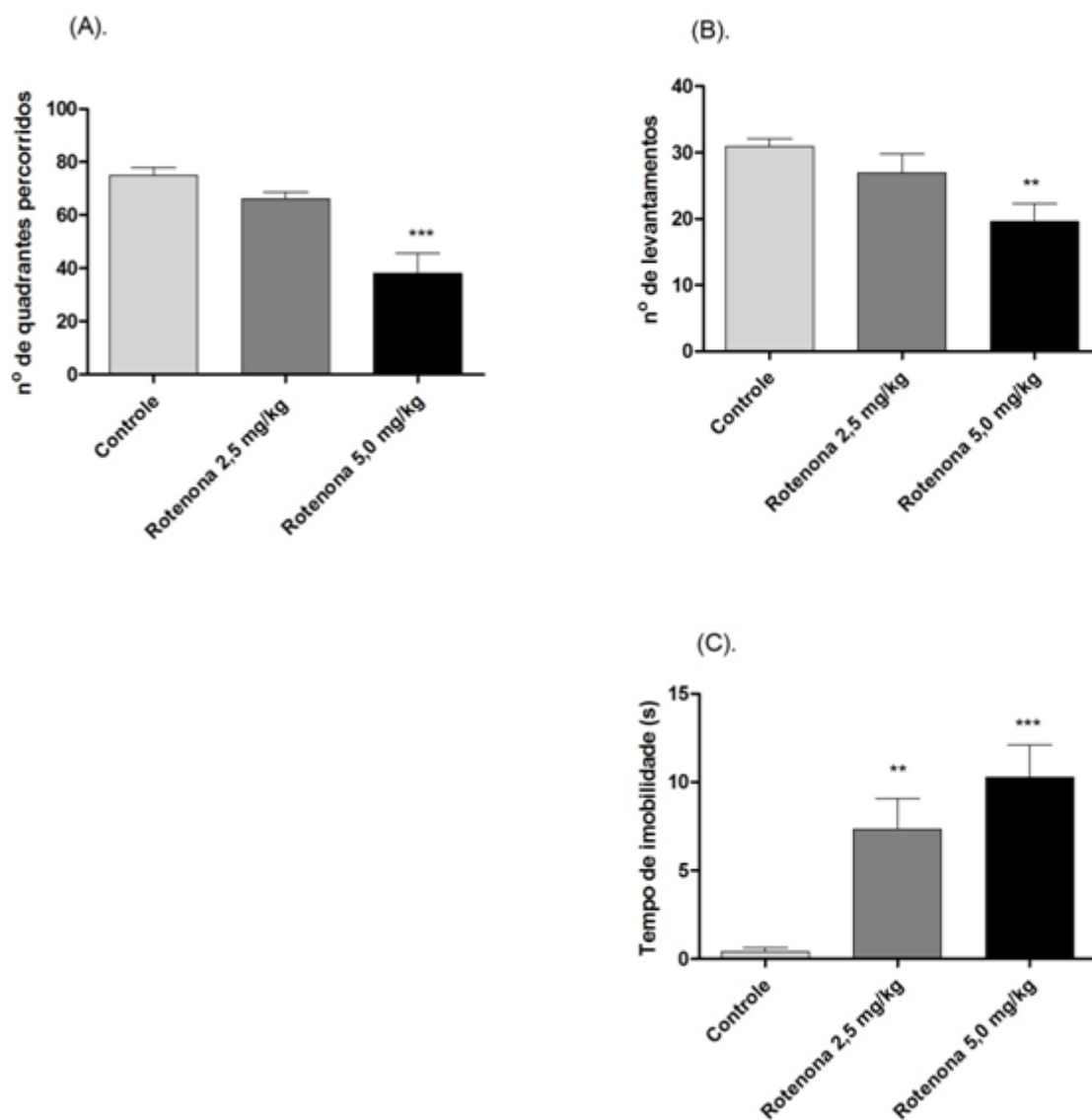


FIGURA 16: Resultados do teste do campo aberto 24h após a administração de Rotenona nas doses de 2,5 mg/kg (n=9) e 5,0 mg/kg (n=8). (A). Número de quadrantes percorridos. (B) Número de levantamentos. (C) Tempo de Imobilidade (s). Os valores estão representados pelas médias \pm erro padrão da média. ANOVA de uma via seguido do Teste de Tukey: ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo Controle (n=9).

5.1.2 Teste da pata

A figura 17 ilustra os efeitos da rotenona no teste da pata. A figura 17 (A) ilustra o tempo de retração das patas dianteiras ($H=19,05$; $p<0,0001$). Os grupos tratados com rotenona (2,5 mg/kg) e rotenona (5,0 mg/kg) apresentaram um aumento significativo no tempo de retração das patas dianteiras, respectivamente $p<0,05$ e $p<0,001$. A figura 16 (B) ilustra os resultados do teste da pata para as patas traseiras ($H=7,257$; $p<0,0266$). Apenas o grupo Rotenona 5,0 mg/kg difere do controle significativamente ($p<0,05$).

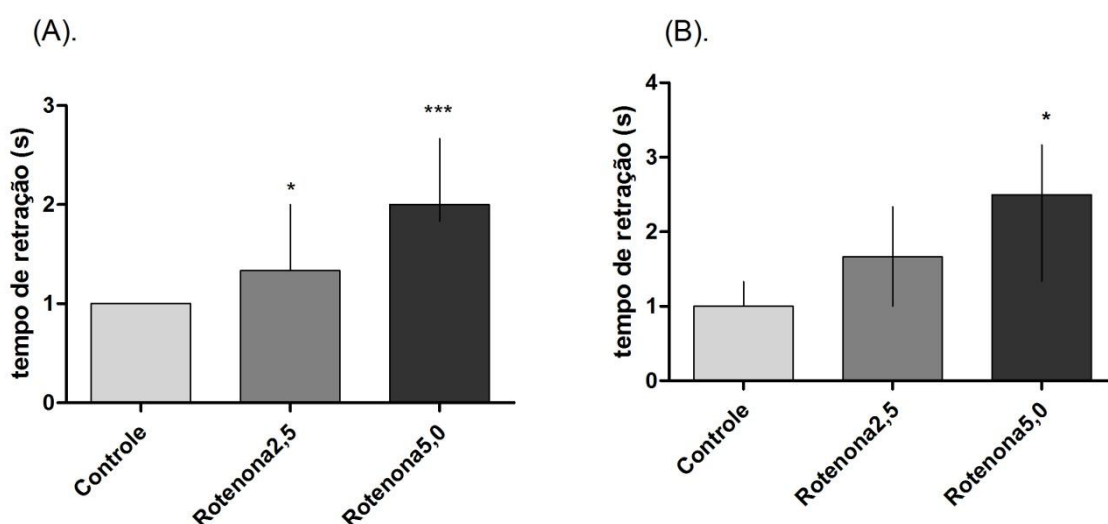


FIGURA 17: Tempo de retração das patas (s) para os grupos controle (n=9), rotenona 2,5 mg/kg (n=9) e rotenona 5,0 (n=8). (A) Tempo de retração das patas dianteiras (s). (B) tempo de retração das patas traseiras. Os valores estão representados pelas medianas \pm intervalo interquartil. ANOVA Kruskal- Wallis seguida de múltiplas comparações. * $p<0,05$ vs grupo controle. *** $p<0,001$ vs grupo controle. Teste do campo aberto 24h

5.2 EXPERIMENTO 2: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO PROLONGADA DE ROTENONA EM RATOS WISTAR

5.2.1 Pesos

Os animais de ambos grupos experimentais foram pesados durante os 10 dias de tratamento (FIGURA 18). O grupo Rotenona teve o seu peso diminuído significativamente ao longo dos 10 dias ($p < 0,05$) em relação ao grupo Controle ($t = 2,78$; $p = 0,0214$).

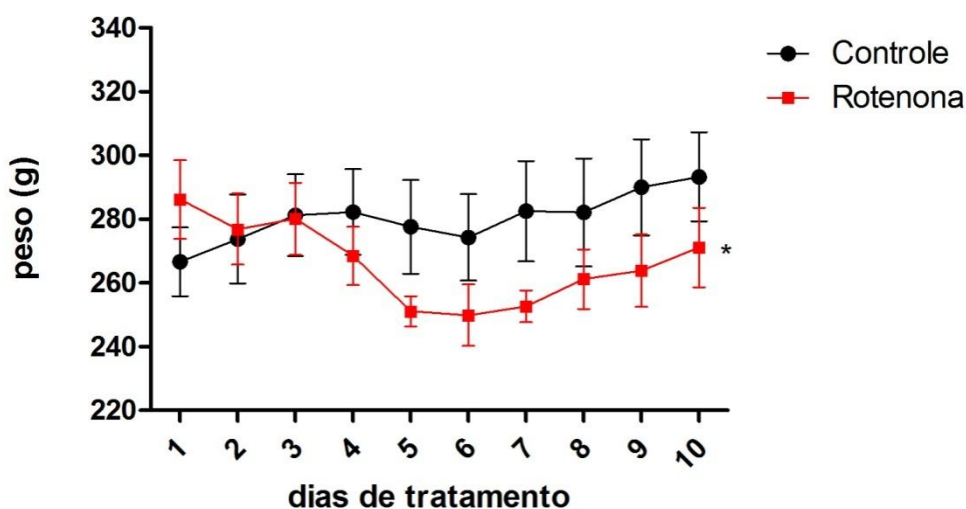


FIGURA 18: Peso (g) dos animais durante os 10 dias de tratamento ($n = 10$ por grupo). Dados representados por médias \pm erro padrão da média. Paired t-test: * $p < 0,05$ comparação com o grupo controle nos diferentes tempos.

5.2.2 Alterações motoras

5.2.2.1 Teste do campo aberto em diferentes tempos

A figura 19 mostra os resultados obtidos no teste do campo aberto realizado em diferentes tempos durante e após o tratamento prolongado. Nos parâmetros

observados, o grupo rotenona percorreu menor número de quadrantes (FIG. 19 A) quando comparado ao Controle 24 horas ($p < 0,05$) e 7 dias ($p < 0,01$) após o início do tratamento. O grupo rotenona também apresentou número de levantamentos significativamente diminuído quando comparado com o Controle nos tempos de 24h ($p < 0,05$) e 7 dias ($p < 0,05$) após o início das administrações. O grupo que recebeu rotenona também apresentou maior tempo de imobilidade (s) comparado com o controle nos tempos de 24h ($p < 0,05$) e 7 dias ($p < 0,01$).

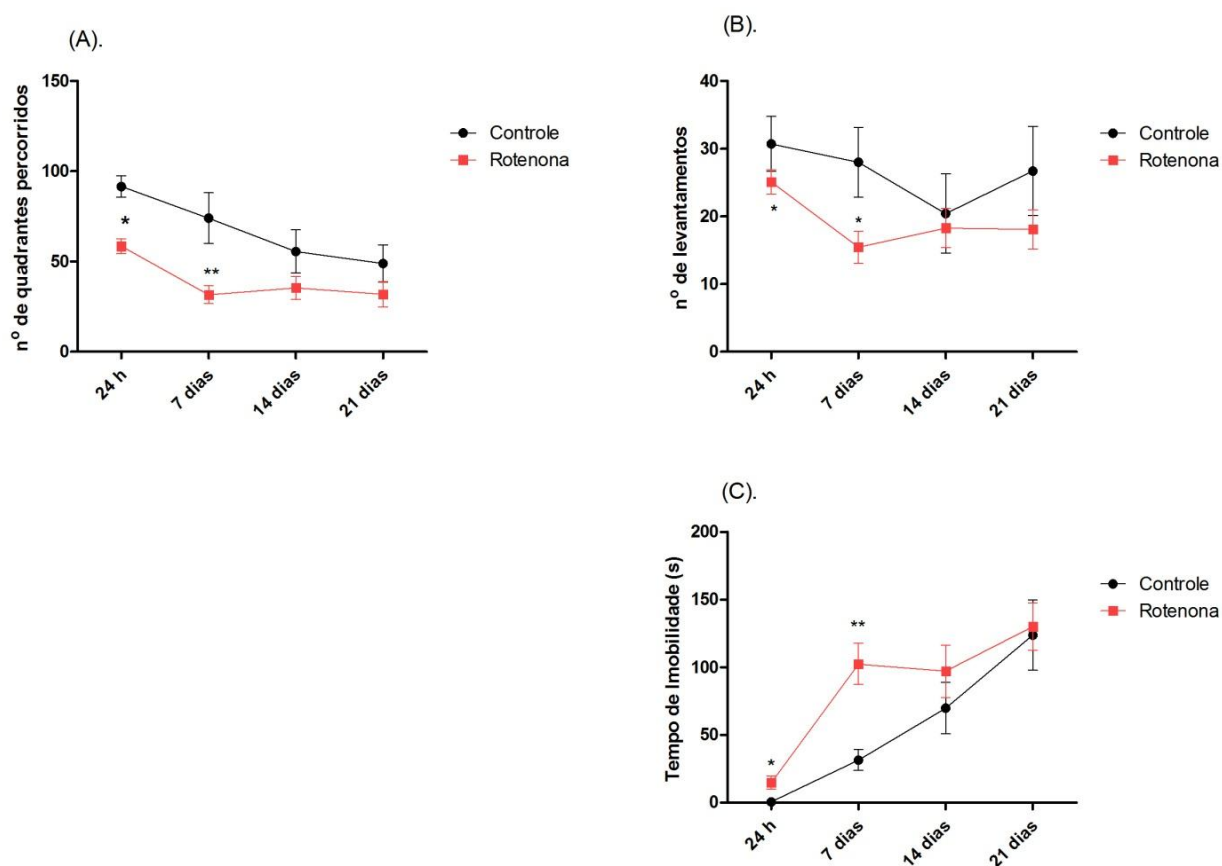


FIGURA 19: Resultados do Campo aberto em diferentes tempos no tratamento prolongado para os grupos controle ($n=10$) e rotenona ($n=15$). (A) Número de levantamentos. (B) Número de levantamentos. (C) Tempo de Imobilidade (s). Os resultados estão representados por médias \pm erro padrão da média. ANOVA de duas vias: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em comparação com o grupo controle.

5.2.3 Teste do campo aberto no 21º dia

O teste do campo aberto com animais apenas expostos a esse teste no 21º dia após o início do tratamento (FIGURA 20) demonstrou que no 21º dia não havia diferenças significativas entre os grupos para o número de quadrantes percorridos ($t=1,695$; $p=0,0541$), porém o grupo rotenona apresentou número de levantamentos significativamente maior ($t=2,470$, $p=0,02$) e menor tempo de imobilidade ($t=2,59$, $p=0,037$) comparando com o controle.

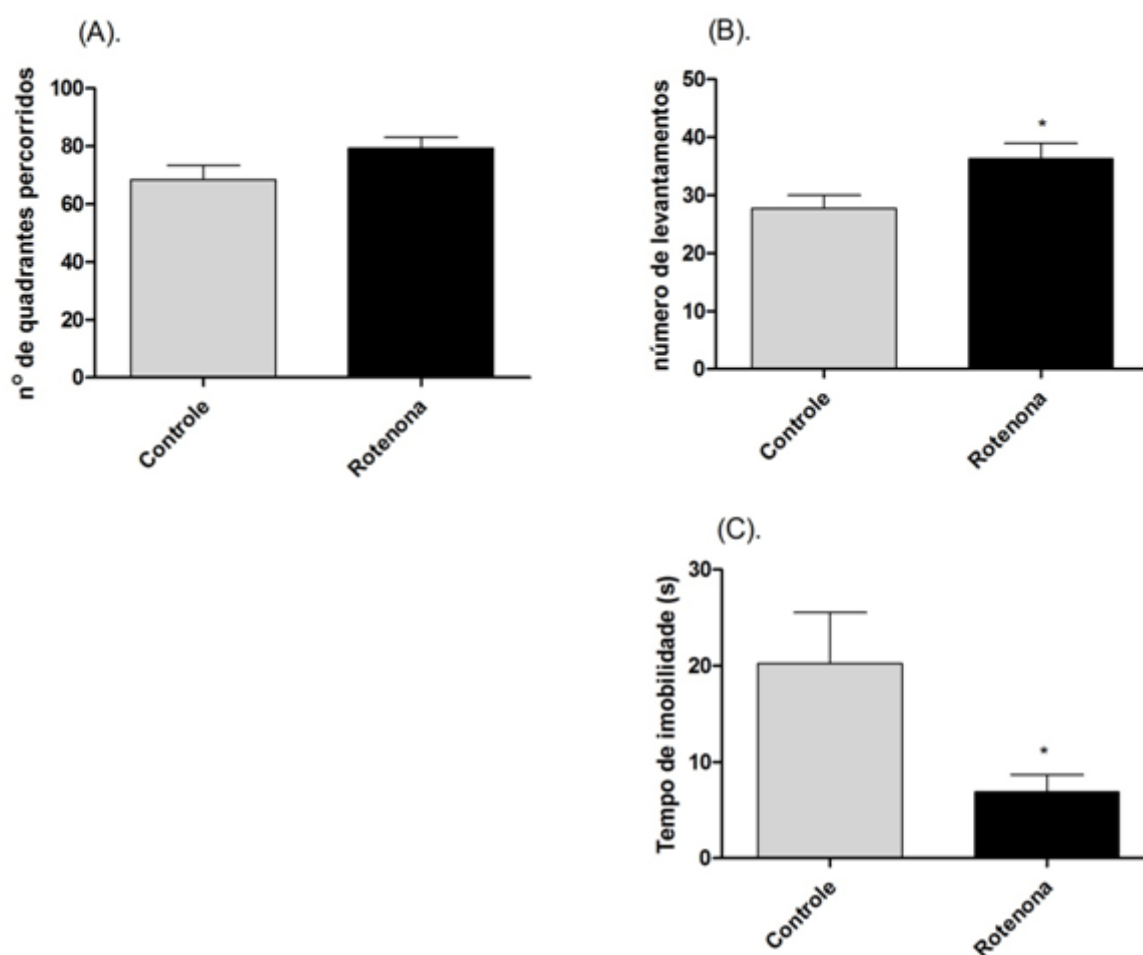


FIGURA 20: Teste do Campo aberto no 21º dia para os grupos controle (n=10) e rotenona (n=9). (A). Número de quadrantes percorridos. (B) Número de levantamentos. (C) Tempo de Imobilidade (s). Os valores estão representados pelas médias \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ do grupo rotenona vs controle. Teste t-student

5.2.4 Comportamento tipo depressivo

5.2.4.1 Teste da natação forçada

Os resultados do Teste da Natação Forçada estão representados na figura 21. Os animais tratados com rotenona apresentaram tempo de nado diminuído significativamente ($p < 0,01$) em relação ao controle ($t = 0,2871$; $p = 0,044$). O grupo rotenona ainda apresentou maior tempo de imobilidade ($p < 0,01$) em relação ao controle ($t = 2,755$; $p = 0,0058$), na sessão teste. Os grupos não apresentaram diferença significativa para o parâmetro escalada ($t = 0,9837$; $p = 0,1680$)

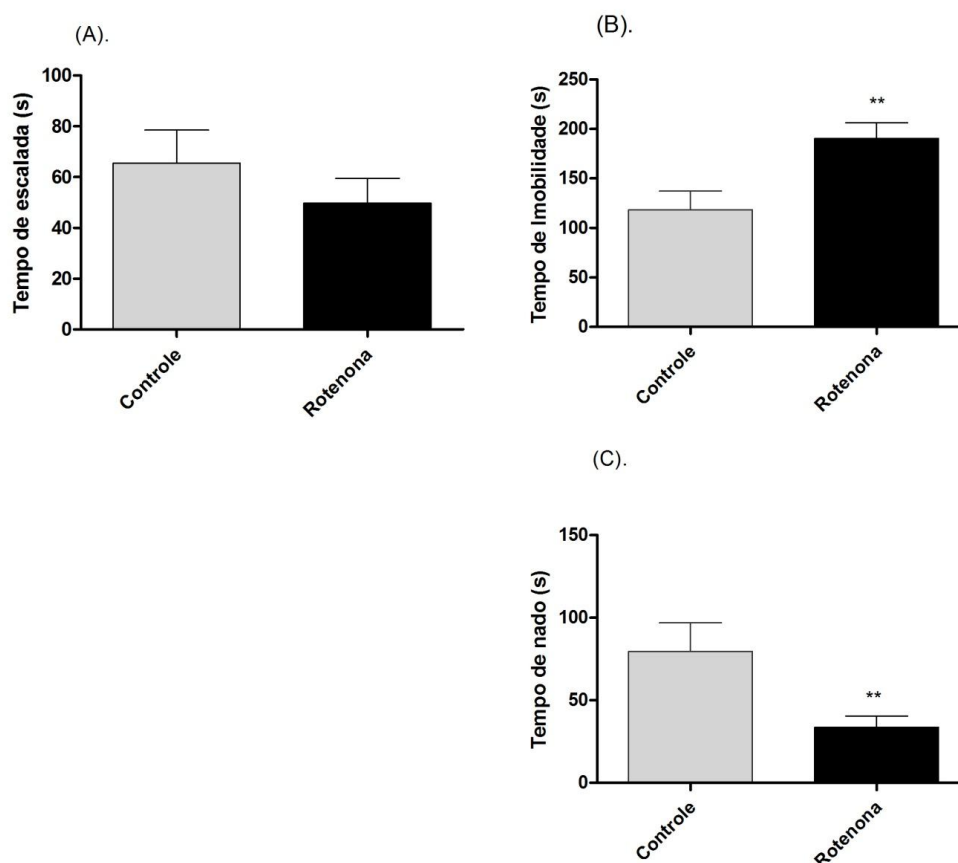


FIGURA 21: Teste da Natação forçada. (A) Tempo de escalada (s). (B) Tempo de imobilidade (s). (C)

Tempo de nado (s) para os grupos controle (n=10) e rotenona (n=14). Os resultados estão

representados por médias \pm erro padrão da média. Teste t-student. ** $p < 0,01$ em comparação com o grupo controle.

5.2.5 Teste da Preferência por sacarose (1%)

Neste teste os animais apresentados tratados com rotenona apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$), diminuindo o consumo de sacarose no 21º dia após o início do tratamento (FIGURA 22).

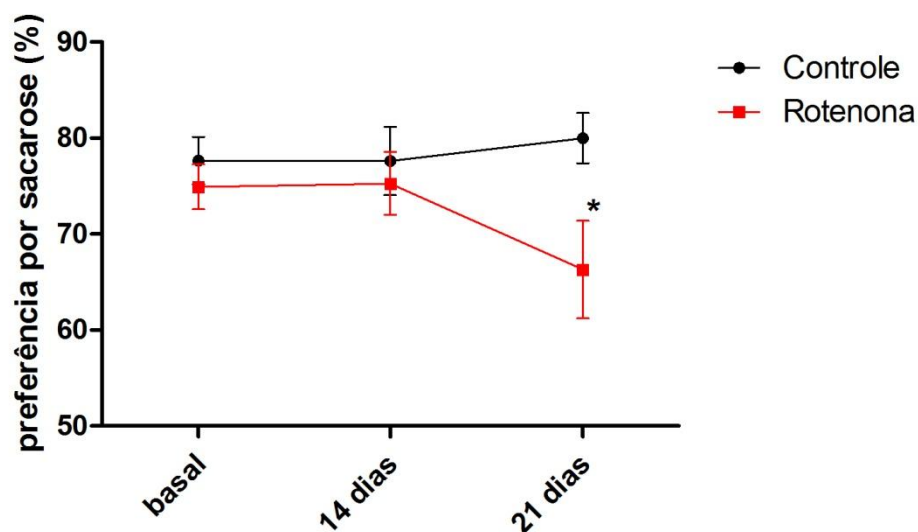


FIGURA 22: Preferência por sacarose (1%) para os grupos controle (n=11) e rotenona (n=14).. Dados representados por médias \pm erro padrão da média. ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ comparado com o controle no 21º dia.

5.2.6 Alterações cognitivas: teste da esquiva ativa de duas vias

No teste da esquiva ativa de duas vias não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos nas sessões de treino e teste para os parâmetros testados: número de esquivas, latência média para esquiva(s), número de travessias e latência média para fuga (FIGURA 23).

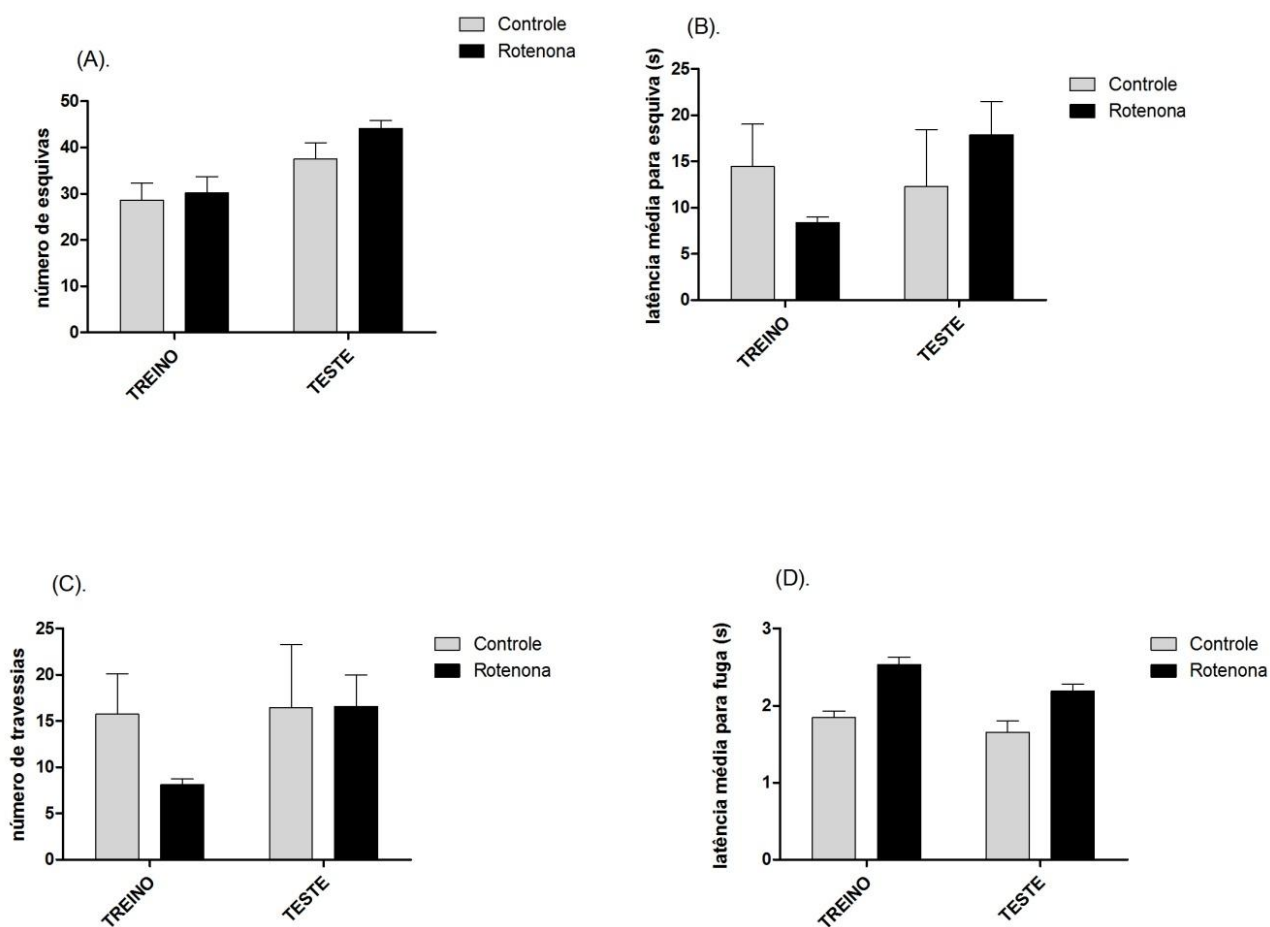


FIGURA 23: Esquiva ativa de duas vias para os grupos controle (n=10) e rotenona (n=8). (A) número de esquivas. (B) latência média de esquivas. (C) número de travessias. (D). latência média para fuga.

Os resultados estão representados por médias \pm erro padrão da média. ANOVA de medidas repetidas.

5.3 DOSAGEM DE MONOAMINAS ATRAVÉS DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPENHO (HPLC)

5.3.1 Estriado

Os resultados da dosagem das monoaminas e seus metabólitos no estriado estão representados na figura 23. O grupo rotenona apresentou redução de DA no Estriado ($t=2,537$; $p<0,0228$) e o aumento do turnover (HVA+DOPAC/DA) de Dopa-

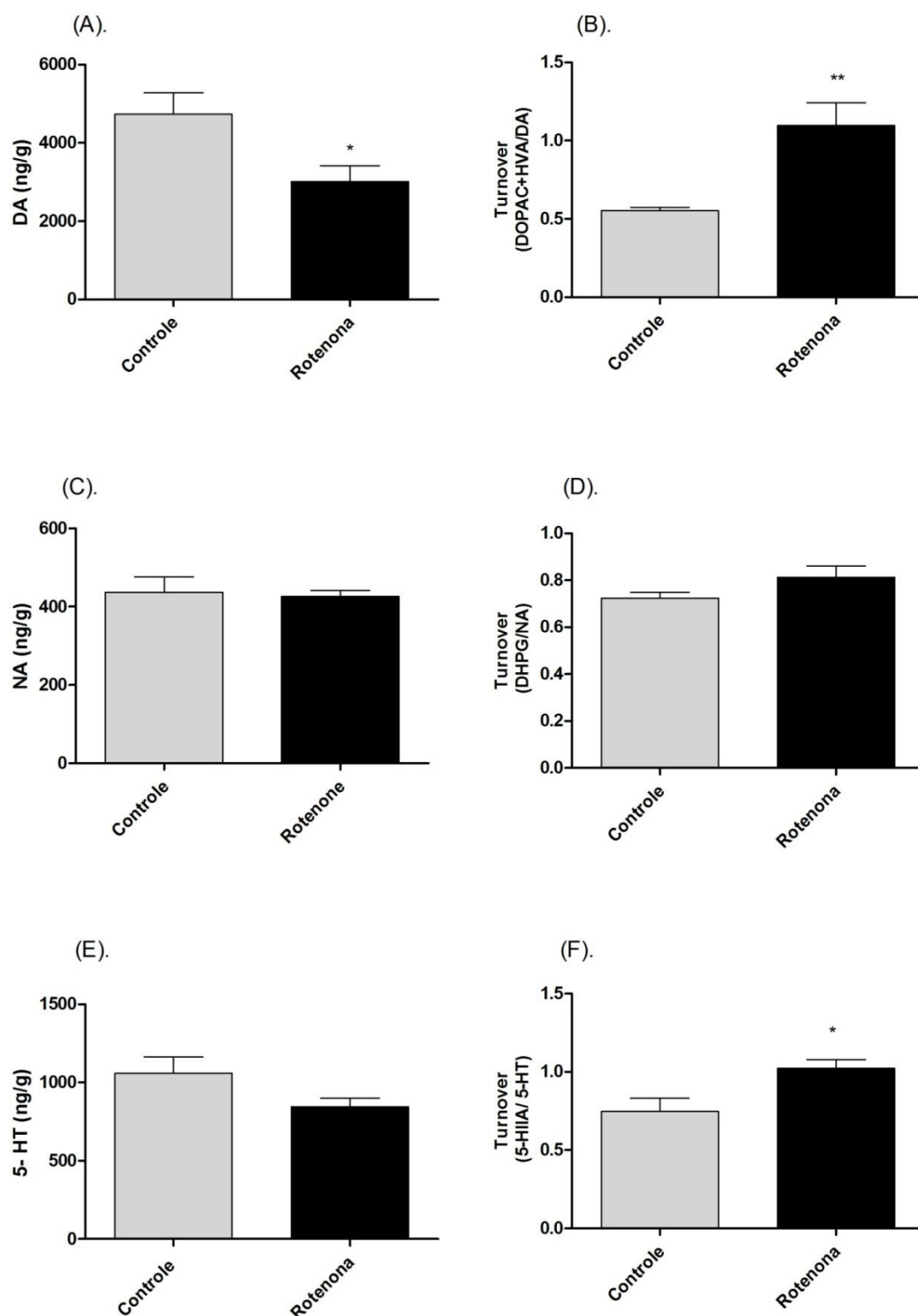


FIGURA 24: Resultados da dosagem de monoaminas por HPLC no Estriado para os grupos controle (n=8) e rotenona (n=9). (A) Concentração de DA (ng/g). (B) Turnover (DOPAC+HVA/DA). (C) Concentração de NA (ng/g). (D) Turnover (DHPG/NA). (E) Concentração de 5-HT (ng/g). (F) Turnover (5-HIAA/5-HT). Os resultados estão representados por médias \pm erro padrão da média. Teste t-student. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

mina ($t=3,41$; $p=0,0039$) em relação ao Controle (FIGURA 24 A, B). Não foram encontradas diferenças significativas nas concentrações de Noradrenalina ($t=0,2862$; $p=0,7787$) e no seu turnover (DHPG/NA) comparando os dois grupos ($t=1,571$; $p=0,1370$) (FIGURA 24 C,D). Não houve diminuição da 5-HT do grupo rotenona ($t=1,892$; $p=0,081$), porém, houve aumento do turnover de 5-HT no estriado do grupo rotenona ($t=2,72$; $p=0,0186$) (FIGURA 24 E,F).

5.3.2 Hipocampo

Os resultados da dosagem das monoaminas e seus metabólitos no hipocampo estão representados na figura 24. Não houve diferença na concentração de DA no hipocampo dos dois grupos ($t=0,3189$; $p<0,75$) e também não houve diferença no do turnover (HVA+DOPAC/DA) de DA ($t=0,8186$; $p=0,43$) (FIGURA 25 A, B). Não foram encontradas diferenças significativas nas concentrações de Noradrenalina ($t=0,1159$; $p=0,9093$) porém houve aumento do turnover (DHPG/NA) no grupo rotenona ($t=2,738$; $p=0,160$) (FIGURA C,D). Não foram encontradas diferenças significativas da concentração de 5-HT entre os grupos ($t=1,593$; $p=0,1320$) porém, houve aumento do turnover de 5-HT no hipocampo do grupo rotenona ($t=2,859$; $p=0,0120$) (FIGURA 25 E,F).

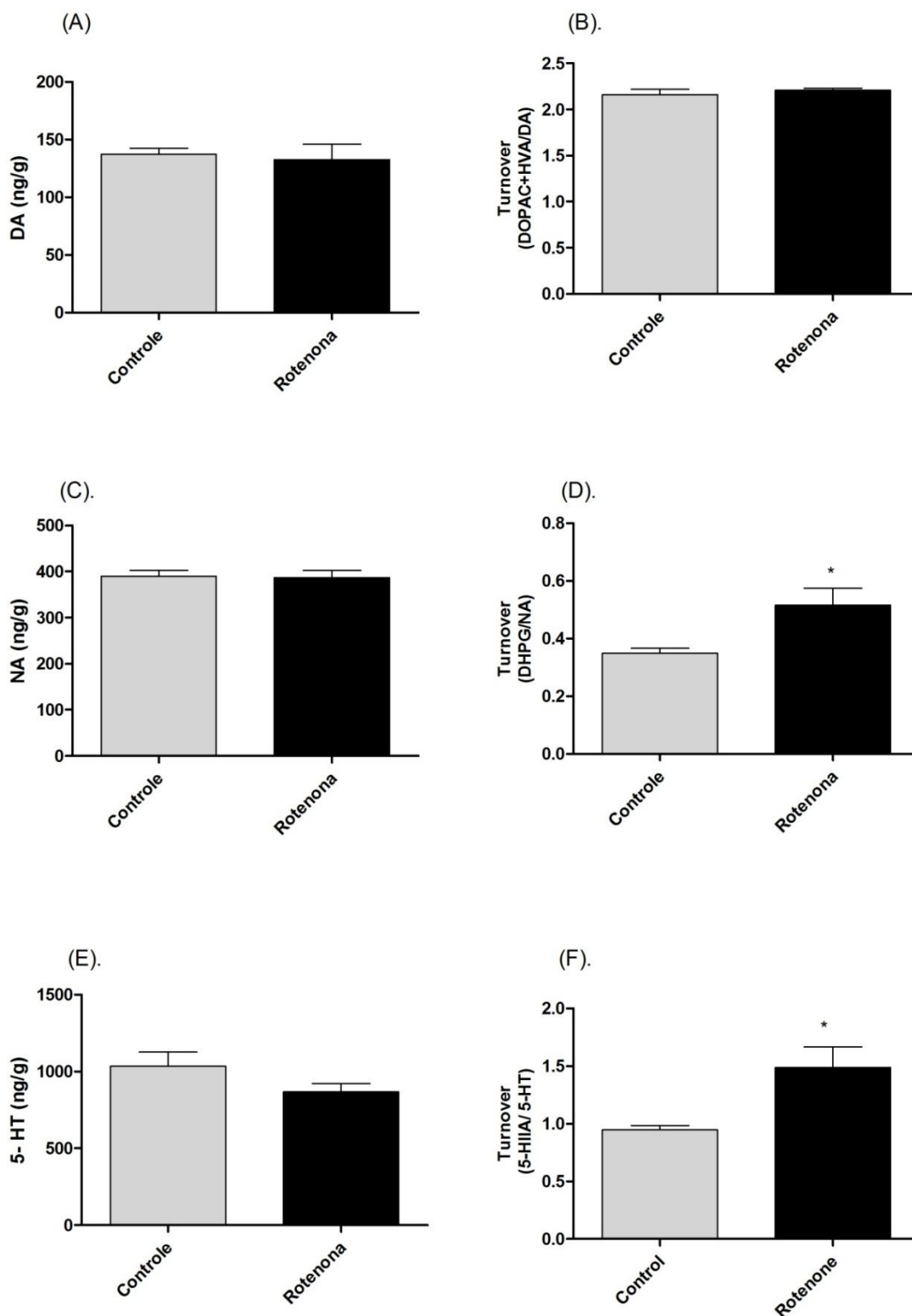


FIGURA 25: Resultados da dosagem de monoaminas por HPLC no Hipocampo para os grupos controle (n=11) e rotenona (n=9). (A) Concentração de DA (ng/g). (B) Turnover(DOPAC+ HVA/DA). (C) Concentração de NA (ng/g). (D) Turnover (DHPG/NA). (E) Concentração de 5-HT (ng/g). (F) Turnover

(5-HIA/5-HT). Os resultados estão representados por médias \pm erro padrão da média. Teste t-student. * $p < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho mostram que a administração de rotenona pode causar alterações comportamentais em roedores que mimetizam a DP. As alterações motoras foram observadas no teste do campo aberto realizado 24 horas após a administração de duas doses diferentes de rotenona (2,5 mg/kg e 5 mg/kg) e após a administração prolongada da menor dose, 24 horas e 7 dias após o início do tratamento. No 21º dia do experimento encontramos hipercinesia (aumento do número de levantamentos e diminuição da imobilidade) do grupo tratado, o que pode estar relacionado a mecanismos compensatórios que serão explorados nesta discussão mais a diante. O prejuízo motor também foi verificado no teste da pata, com o aumento do tempo para retração das patas dianteiras e traseiras. Além dos sinais motores, verificamos que os ratos que receberam rotenona por 10 dias também apresentaram comportamento tipo-depressivo em dois testes diferentes: teste da natação forçada e teste da preferência por sacarose. Além destas alterações comportamentais, foram encontradas alterações neuroquímicas nos níveis de monoaminas no estriado e no hipocampo; Foi observado, diminuição dos níveis de DA e aumento do turnover de DA e da 5-HT no estriado; e, aumento do turnover de NA e 5-HT no hipocampo, 23 dias após o início do tratamento prolongado. Não foram encontradas diferenças significativas no teste da esQUIVA de duas-vias, demonstrando que o tratamento prolongado com rotenona não causou prejuízos cognitivos.

A utilização de pesticidas como modelos animais de DP, torna-se cada vez mais popular e tem fornecido informações valiosas sobre o processo neurodegenerativo (DRECHSEL e PATEL, 2008).

Neurotoxinas, como 6-OHDA e MPTP, também são amplamente utilizadas como modelos animais de DP. Além disso, tem sido relatado que os produtos químicos agrícolas, como a rotenona, paraquat ou maneb podem induzir processos de neurotoxicidade, quando de sua exposição sistêmica. Um mecanismo de ação neurotóxica comum a esses compostos é dado pela inibição do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial dos neurônios dopaminérgicos da SNpc (GREENAMYRE *et al.*, 2003).

As alterações motoras encontradas no teste do campo aberto no experimento agudo (24 horas) e prolongado (24 horas e 7 dias) estão de acordo com estudos prévios realizados por Alam e Schmidt (2002) e Cannon *et al* (2009). O prejuízo motor verificado deve estar relacionado à diminuição dos terminais dopaminérgicos estriatais. Nesta linha, sabe-se que a perda de 50%-70% dos neurônios da SNpc levaria a diminuição espontânea da atividade motora (ALAM e SCHMIDT, 2002). Além disso, Fleming *et. al*, (2004) relacionaram a diminuição do comportamento de levantar às evidências histológicas de lesões do sistema nigro-estriatal. Notavelmente, em outro experimento prolongado os animais que receberam rotenona e que foram testados no campo aberto apenas no 21º dia apresentaram imobilidade diminuída e número de levantamentos aumentado em relação ao controle. Este comportamento foi observado anteriormente por Perry e colaboradores (2005) dias após o tratamento com um outro inibidor do complexo I, o MPTP. Neste estudo a hipercinesia observada nos animais lesados com o MPTP foi relacionada a mecanismos compensatórios nos quais a morte de neurônios da SNpc e a diminuição da DA no estriado levariam ao aumento da produção de DA pelas

células restantes e ao aumento dos receptores pós-sinápticos (SONSALLA et al., 1986).

O teste da pata foi utilizado como uma alternativa para o estudo dos prejuízos motores. Este teste foi descrito por Ellenbroek (1987) para distinguir efeitos de antipsicóticos típicos e atípicos. Drogas que apresentam efeitos tipo antipsicóticos típicos aumentam a latência de retirada das patas dianteiras e traseiras, o que está relacionado aos efeitos extra-piramidais e ao parkinsonismo em humanos devido ao bloqueio dopaminérgico da via nigro-estriatal. Drogas com efeitos tipo antipsicóticos atípicos retardam a retirada das patas traseiras em doses menores que prejudicam as patas dianteiras o que está relacionada ao bloqueio da via mesolímbica. No presente estudo, a rotenona prejudicou a retirada das patas dianteiras nas duas doses, o que pode estar relacionado ao a diminuição de DA na via nigroestriatal, causando efeitos extra-piramidais. No entanto, a dose mais alta de rotenona prejudicou a retirada de ambas as patas. O que demonstra que o bloqueio das vias dopaminérgicas e a especificidade da rotenona que é dose-dependente. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos realizados por Adringa e colaboradores (2000), com o modelo animal da 6-OHDA. Os resultados obtidos no teste da pata e no teste do campo aberto conferem validade ao modelo da rotenona como um bom modelo para o estudo do parkinsonismo.

O presente trabalho investigou a presença de comportamento tipo-depressivo em ratos tratados no experimento prolongado. A relação entre a depressão e a DP e sua relação com a depleção de monoaminas está sendo estudada por nosso grupo devido à alta prevalência desse sintoma em portadores da DP. Os resultados desse estudo indicam comportamento tipo-depressivo induzido pela rotenona em dois testes diferentes. No teste da natação forçada houve aumento do tempo de

imobilidade e diminuição do tempo de nado nos ratos do grupo rotenona, no 22º dia de experimento. O estresse e a depressão foram relacionados ao aumento do tempo de imobilidade e diminuição do tempo de nado no teste da natação forçada (HATA *et al.*, 1995, KRISHNAN e NESTLER *et al.*, 2008), esses comportamentos tem sido relacionados a drogas que diminuem a concentração de monoaminas, sendo que a diminuição do tempo de nado está relacionada a diminuição de 5-HT e o aumento do tempo de imobilidade com a redução de NA e DA (ESPEJO *et al.*, 1997 e SANTIAGO, *et al.* 2010).

A anedonia, perda do prazer, é um sintoma da depressão em humanos e uma das maneiras de avaliá-la em modelos animais é por meio do teste de preferência por sacarose, no qual ratos com comportamento tipo-depressivo apresentam redução do consumo de sacarose (STREKALOVA *et al.*, 2004). Em nosso experimento, os ratos apresentaram uma redução significativa da preferência por sacarose no 21º dia. SANTIAGO e colaboradores (2010) descreveram este mesmo comportamento em ratos com administração intra-nigral de rotenona. O teste da natação forçada e o teste de preferência por sacarose foram utilizados no âmbito de verificar transtornos afetivos em animais, semelhantes aqueles apresentados por portadores da DP. O fato de a rotenona não ser seletiva para os neurônios dopaminérgicos pode explicar, em parte, os comportamento observados.

As análises da concentração de monoaminas por HPLC –ED evidenciam essas alterações monoaminérgicas no estriado e no hipocampo de ratos expostos a rotenona, 23 dias após o início do experimento prolongado. Como esperado, no estriado houve diminuição da concentração de DA e aumento do turnover (DOPAC+HVA/DA). Estes resultados corroboram com estudos realizados por Alam e Schmidt (2002) e Cannon (2009) que sugerem que os neurônios dopaminérgicos

sejam afetados primeiramente pela rotenona e isso levaria ao déficit motor. Alam e Schmidt (2004) também verificaram aumento do turnover de DA, porém, apenas após a administração aguda de rotenona.

Os mesmos autores encontraram alteração na concentração de 5-HT no estriado. Em nosso estudo encontramos alteração estriatal no turnover de 5-HT (5-HIAA/5-HT). Bem como alterações do turnover de 5-HT no hipocampo. Na DP, além dos neurônios dopaminérgicos da substância negra, ocorre a diminuição de outras populações de neurônios. Em estudos *post-mortem* foi encontrada uma significativa diminuição dos neurônios serotoninérgicos dos núcleos da rafe em pacientes com a DP e depressão. A diminuição do metabólito 5-HIAA no fluido cérebro-espinal em muitos estudos foi associada a depressão na DP (FRISINA et al., 2009). Um dos mecanismos propostos para depleção dos neurônios serotoninérgicos pela rotenona pode estar relacionado com a despolarização dos microtúbulos que altera o transporte de vesículas. Além disso, a 5-HT tem função inibitória da liberação de DA no estriado, o que pode ser um mecanismo compensatório para a redução da atividade dopaminérgica. A redução da atividade de 5-HT aumenta o risco de depressão, o que favorece a relação entre DP e depressão. (RENG e FENG, 2007 e TEMEL et al., 2007).

No presente estudo, foram encontradas alterações no turnover de NA (DHPG/NA) no hipocampo, sugerindo uma alteração das concentrações deste neurotransmissor ao longo prazo. Estudos *post-mortem* em pacientes com DP também correlacionaram a perda de neurônios noradrenérgicos com a depressão associada aos portadores da DP (FRISINA et al., 2009, BALLAYANIS et al., 2006). Alguns estudos investigaram a morte de neurônios do hipocampo provocada pela rotenona *in vitro* (XU et al., 2002 e CHAVES et al., 2010) e atribuem este fato a

inibição do complexo I e ao aumento das espécies reativas de oxigênio. Além disso, Jeanotte et al. (2009) verificou diminuição dos níveis de NA no hipocampo à alta expressão de α -sinucleína. Portanto, provavelmente o aumento do turnover de NA no hipocampo após a administração prolongada de rotenona esteja relacionado a perda projeções noradrenérgicas no hipocampo.

O turnover aumentado deste neurotransmissor por sua vez pode estar relacionado aos resultados encontrados no teste da natação forçada devido a importância destas monoaminas na expressão dos comportamentos durante o teste e também devido o papel do hipocampo como na adaptação ao estresse: desconectar as associações aversivas previamente aprendidas de suas conseqüências comportamentais (JOCA *et al.*, 2003).

Neste estudo não foram encontradas alterações cognitivas após o tratamento prolongado com a rotenona. Estudos prévios realizados por nosso grupo (BARBIEIRO *et al.*, 2010; DA CUNHA *et al.*, 2001; FERRO *et al.*, 2005) demonstraram que a infusão intra-nigral de outras neurotoxinas como 6-OHDA e MPTP podem ocasionar prejuízos cognitivos, mimetizando um dos estágios da DP. A administração sistêmica de rotenona em roedores costuma causar lesões em um terço dos animais tratados o que leva a variabilidade de respostas comportamentais (Betarbet *et al.*, 2000), além disso, a magnitude da lesão da substância negra causada pela rotenona é muito inferior a lesão bilateral da substância negra causada por 6-OHDA (CANNON *et al.*, 2009), o que pode estar relacionado ao não aparecimento de déficit cognitivo no protocolo utilizado neste estudo.

Outro aspecto a ser considerado foi o peso dos animais. Durante todos os dias de administração os animais foram pesados e foi observada uma perda de massa corporal significativa no grupo que recebeu rotenona. Estes resultados foram

também encontrados por Alam e Shmidt (2004), Cannon (2009), Betarbet (2000). A natureza desta perda de peso não pode ser explicada até o momento e necessita de estudos mais aprofundados, porém, estudos recentes de Betarbet e colaboradores (2009) e Drolet e colaboradores (2009) demonstram que a perda de peso nos animais tratados com rotenona sistemicamente pode estar relacionada à diminuição da motilidade gastro-intestinal, similar aos sintomas encontrados nos primeiros estágios da DP.

Com base nesses resultados ressaltamos a importância dos estudos da rotenona como um modelo animal de parkinsonismo que causou alterações comportamentais, neuroquímicas e fisiológicas e poderá contribuir para melhor compreensão da etiologia da Doença de Parkinson.

7 CONCLUSÃO

- Os resultados deste trabalho permitem concluir que a rotenona é um bom modelo animal para estudo das alterações motoras e não-motoras que caracterizam o parkinsonismo.
- Foram encontradas alterações motoras no teste do campo aberto e no teste da pata nos animais do grupo rotenona quando comparados com o controle.
- Foram encontradas alterações no comportamento tipo-depressivo. Sendo que a rotenona induziu este comportamento em dois testes diferentes: teste da natação forçada e preferência por sacarose.

- Não foram observadas alterações cognitivas, similares ao observado em portadores da DP. O que portanto, é uma limitação do modelo da rotenona no protocolo utilizado.
- Foram verificadas alterações neuroquímicas no estriado e hipocampo de ratos que receberam rotenona. Estas alterações neuroquímicas podem estar relacionadas aos efeitos comportamentais induzidos pela rotenona.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

WIETZIKOSKY, E.C. Mediação das vias dopaminérgicas meso-estriatais no comportamento de escolha de ações motoras e na formação de memórias de procedimento. Curitiba, 2009. Tese de doutorado (Doutorado em Farmacologia)-UFPR.

AHMADI , F.A., LINSEMAN, D.A, GRAMMATOPOULOS, T.N., JONES, S.M., BOUCHARD, R.J , FREED, K..A, HEIDENREICH, W.M., ZAWADA. The pesticide rotenone induces caspase-3 mediated apoptosis in ventral mesencephalic dopaminergic neurons. **Journal of Neurochemistry**, 87: 914-921, 2003.

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

ALAM, M., SCHMIDT, W.J., L-DOPA reverses the hypokinetic behaviour and rigidity in rotenone-treated rats. **Behavioral Brain Research**, n.153, p.439-446, 2004.

ANDRINGA, G., VAN OOSTEN, R.V, UNGER, W., HAFMANS, T.G.M, VEENING, J., STOOL, J.C., COOLS, A.R. Systemic administration of the propargylamine CGP 3466B prevents behavioural and morphological deficits in rats with 6-hydroxydopamine-induced lesions in the substantia nigra. **European Journal of Neuroscience**, 12:3033-3043, 2000.

BALDERESCHI, M.DICARLO, A., VANNI, P, GHETTI, A. CARBONIN, P. AMADUCCI, L. , INZITARI, D. Lifestyle-related risk factors for Parkinson's disease: a population-based study. **Acta Neurologica Scandinavica**, 108(4): 239-244, 2003.

BALOYANNIS, S.J., COSTA, V., BALOYANINIS, I.S. Morphological alterations, of the synapses in the locus coeruleus in Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, 248: 35-41, 2006.

BARBIEIRO, J.K., SANTIAGO, R.M., LIMA, M.M.S., ARIZA, D., MORAIS, L.H., ANDREATINI, R.VITAL, M.A.B.F. Acute but not chronic administration of pioglitazone promoted behavioral and neurochemical protective effects in the MPTP model of Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, 216:186-192, 2010.

BRAAK, H., TREDICI, K.D., RUB, U., VOS, R.A.I., STEUR, E.N.H.J., BRAAK, E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology of Aging**, 24: 197-211, 2003.

BETARBET, R., SHERE, T.B., MACKENZIE, G., GARCIA-OSUNA, M., PANOV, A.V., GEENAMYRE, J.T. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. **Nature Neuroscience**, 3: 1301-1306, 2000.

BROWN, T.P., RUMSBY, P..C., CAPLETON, A.C., RUSHTON, L., LEVY, L.S. Pesticides and Parkinson's Disease- Is there a Link? **Environmental Health Perspectives**, 114 (2):156-164, 2006.

CANNON, J R. T., VICTOR, M., HYE, M., H., ANTHONY, S. D. R., GREENAMYRE, J.T. A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, 34(2): 279-290, 2009.

CAMARGO , A.C.R., COPIO, F.C.Q, SOUZA, T.R.R, GOULART, F. O impacto da doença de Parkinson na qualidade de vida: uma revisão de literatura. **Revista Brasileira de Fisioterapia** 8 (3):267-272, 2004.

CHAVES, R.S, MELO, T.Q., MARTINS, S.A., FERRARI, F.R., Protein aggregation containing beta-amyloid, alpha-synuclein and hyperphosphorylated tau in cultured cells of hippocampus, substantia nigra and locus coeruleus after rotenone exposure. **BMC Neuroscience**, 11:144, 2010

DA CUNHA, C.D., GEVAERD, M.S, VITAL, M.A.B.F, MIYOSHI, E., ANDREATINI, R., SILVEIRA, TAKAHASHI, R.N., CANTERAS, N.S. Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. **Behavioural Brain Research**, 124:9-18, 2004.

DRECHSEL, D. A., PATEL, M. Role of reactive oxygen in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. **Free Radical Biology & Medicine**, 44: 1873-1886, 2008.

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

DUVOISIN, R. History of Parkinsonism. **Pharmacology and Therapeutics** 32: 1-17, 1987.

ELLENBROEK, B. & COOLS, A.R. The paw test: an animal model for neuroleptic drugs which fulfils the criteria pharmacological isomorphism. **Life Science**, 42: 1205-1213, 1988.

EMERIT, J., EDEAS, M., BRICAIRE, F. Neurodegenerative disease and oxidative stress. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 58 (1): 39-46, 2004.

ESPEJO, E.F. Selective dopamine depletion within the medial prefrontal cortex induced anxiogenic-like effects in rats placed on the elevated plus maze. **Brain Research**, 726: 281-284, 1997.

FENG, Y., LIANG, Z., WANG, T., QIAO, T. W. X., LIU, H., SUN, S. Subcutaneous Rotenone Injection Destroys Dopaminergic Neurons and Induced Parkinsonism Symptoms in Rats. **Journal of US- China Medical Science**, 3(5): 9-14, 2006.

FLEMING, SM., ZHU, C., FERNAGUT, P.O., MEHTA, DICARLO, C.D., SEAMAN, R.L., CHESSELET, M.F. Behavioral and immunohistochemical effects of chronic intravenous and subcutaneous infusions of varying doses of rotenone. **Experimental Neurology**, 187: 418-29, 2004

FERRO, M.M., BELLISSIMO, M.I., FRANCI, J.A.A, ANGELUCCI, M.E.M., CANTERAS, N.S., DA CUNHA, C. Comparison of bilaterally 6-OHDA and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease? Histological, neurochemical, motor and memory alterations. **Journal of Neuroscience Methods**, 148 78-87, 2005.

GÖREN, B., MIMBAY, B., BILIBI, N., ZANFONGLU, M, OGUL, E., KORFALI, E. Investigation of Neuroprotective Effects of Cyclooxygenase Inhibitors in the 6-Hydroxydopamine Induced Rat Parkinson Model. **Turkish Neurosurgery**, 19(3): 230-236, 2009.

GREENE, J. G., NOORIAN, A.R., SRINIVASAN, S. delayed gastric and enteric nervous system dysfunction in the rotenone model of Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, 218: 154-161, 2009

GREENAMYRE, J.T., BETARBET, R., SHERER, T.B. The rotenone model of Parkinson's disease: genes, environmental and mitochondria. **Parkinsonism and Related Disorders**, 9: S59-S64, 2003.

HASEGAWA, T., KOBAYASHI, M.M., TAKEDA, A. SUGENO, N., KIKUCHI, A., FURUKAWA, G., PERRY, G., SMITH, M.A., ITOYAMA, Y. Alpha-synuclein facilitates the toxicity of oxidized catechol metabolites: implications for selective neurodegeneration in Parkinson's disease. *FEBS Letters* 580: 2147-2152, 2006

HATA, T., ITOH, E., NISHIKAWA. Behavioral Characteristics of SART-stressed mice in the forced swim test and drug action. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 51 (4):849-853, 1995.

HSU, M., SRINIVAS, B., KUMAR, J., SUBRAMANIAN, R., ANDERSEN, J. Glutathione depletion resulting in selective mitochondrial complex I inhibition in dopaminergic cells is via an NO-mediated pathway not involving peroxynitrite: implications for Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 92(5): 1091-1103, 2005

ISHIHARA, L.S., KHAW, K., LUBEN, R., BINGHAM, S., WELCH, A., DAY, N., BRAYNE, C. Self-reported parkinsonian symptoms in the EPIC-Norfolk cohort. *BMC Neurology*, 5:15 , 2005.

JEANNOTTE, A.M., MCCARTHY, J.G., SIDHU, A. Desipramine induced in the norepinephrine transporter, α and γ -synuclein in the hippocampus, amygdala and striatum. *Neuroscience Letters*, 467(2): 86-89, 2009.

JOCA, S.R., PADOVAN, C.M. , GUIMARÃES, F.S. Estresse, depressão e hipocampo. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 25 (2): 46-51, 2003

KRISHNAN, V., NESTLER, E.J. The molecular neurobiology of depression. *Nature*, 455 (7215):894-902, 2008.

KUTER, K. SMIALOWSKA, M., WIERONSKA, J. ZIEBA, B., WARDAS, J., PIETRASZEK, M., NOWAK, P, BIEDKA, I, ROCZNIAK, W., KONIECZY, J., WOLFARTH, S., OSSOWSKA, K. Toxic influence of subchronic paraquat administration on dopaminergic neurons in rats. *Brain Research*, 1155:196-207, 2007.

LANGSTON, J.W., BALLARS, P. TETRUD, JW, IRWIN, I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, 219 (4587);979-980, 1983.

LEENTJENS, A.F.G., AKKER, M.V, METSEMARKERS, M.D, LOUSBERG, M.A., VERHEY, F.R.J. Higher incidence of depression preceding the onset of Parkinson's disease: a register study. *Movement disorders* 18 (4): 414-418, 2003.

LIEBERMAN, A. Are dementia and depression in Parkinson's disease related? **Journal Neurological Sciences** 248: 138-142, 2006.

LOTHARIUS, J. e BRUNDIN, P. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alfa-sinuclein. **Nature Neuroscience** 3: 932-942, 2002.

MARELLA, M., SEO, B.B., MATSUMO-YAGI, A., YAGI, T. Mechanism of Cell Death by Complex I Defects in a Rat Dopaminergic Cell Line. **The Journal of Biological Chemistry**, 282(33): 24146-24156, 2007.

MCGEER, P.L., MCGEER, E.G. Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. **Parkinsonism and related disorders**, 10: S3-S7, 2004

MEREDITH, G.E., SONSALLA, P.K., CHESSELET, M. F. Animal models of Parkinson's disease progression. **Acta Neuropathologica**, 115(4):385-98, 2008.

MILLER, R.L, KRACKE, M.J., SUN, G.Y, SUN, A.Y. Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's disease. **Neurochemical Research**. 34:55-65.

MIZUNO Y, OHTA, S., TANAKA, M., TAKAMYRA, 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**, 163:1450-1455, 1989.

PAVLOV, P.I. Conditioned Reflex. London:Oxford Univ. Press, 1927

REN, Y., FENG, J. Rotenone selectively kills serotonergic neurons through a microtubule dependent mechanism. **Journal of Neurochemistry**, 103: 303-311, 2007.

PEREZ, R.G., WAYMIRE, J.C., LIN, E., LIU, J.J., GUO, F., ZIGMOND, M.J. A role for alfa-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. **The Journal of Neuroscience** 22(8):3090-3099, 2002.

PREDIGER, R.D.S., BATISTA, L.C., MEDEIROS, R., PANDOLFO, P, FLORIO, J.C, TAKAHASHI, R.N. The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. **Experimental Neurology** 202: 391-403, 2006.

PORSOLT R.D., ANTON, G., BLAVET, JALFRE, M. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology** 47:879-381:1978.

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

ROBERTSON, D.R. E SMITH-VANIZ, W.F. Rotenone: an essential but demonized tool for assessing marine fish diversity. **BioScience** 58 (2):165-170, 2008

ROJO, A., AGUILAR, M., GAROLERA, M.T., CUBO, E., NAVAS, I, QUINTANA, S. Depression in Parkinson's disease: clinical correlates and outcome. **Parkinsonism e Related Disorders** 10(1): 23-28, 2003.

SANTIAGO, R.M., BARBIEIRO, J., LIMA, M.M.S., DROMBOWSKI, P.A., ANDREATINI, R., VITAL, M.A.B.F. Depressive -like behaviours alternations 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**, 34(6): 1104-1114, 2010.

SCHAPIRA, A. H., COOPER, J. M., DEXTER, D., JENNER, P., CLARK, J.B., MARSDEN, C.D. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry** 54(3): 823-827,1990.

SCHRAG, A. Psychiatric aspects of Parkinson's disease: involvement of nitric oxid. **Journal of Neurology** 251: 795-804, 2004.

SHERER, T. B., KIM, J., BETARBET, R., GREENAMYRE, J.T. Acute intranigral infusion of rotenone in rats causes progressive biochemical lesions in the striatum similar to Parkinson's disease. **Brain Research**, 1049: 147-155, 2003 (a).

SHERER, T.B., JIN-HO, K., BETARBET, R., GREENAMYRE, J.T. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. **Experimental Neurology**, 179:9-16, 2003 (b)

SLATTERY, D.A., MARKOU, A, CRYAN, J.F. Evaluation of reward processes in an animal model of depression. **Psychopharmacology** 190:555-568, 2007.

SHI, M., BRADNER, J., BRAMMLER, T.K., EATON, S.L., ZHANG, J., YE, Z., WILSON, A.M., MONTINE, T.J., PAN, C, ZHANG, J. Identification of Glutathione S-Transferase Pi as a Protein Involved in Parkinson Disease Progression. **The American Journal of Pathology**, 175: 54-65, 2009.

STREKALOVA,T., SPANAGEL,R., BARTSCH,D., HENN, F.A, GASS, P. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. **Neuropsychopharmacology** 29, 2007-2017, 2004.

TANDBERG, E., LARSEN, J.P., AARSLAND, D., LAAKE, K. CUMMINGS, J.L., Risk factors for depression in Parkinson's disease. **Archives of Neurology**, 54(5): 625-630, 1997.

TAHARA, E.B., NAVARETE, F.D.T., KOWALTOWSKI. Tissue-substrate, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. **Free Radical Biology & Medicine**, 46: 1283-1297, 2009.

TADAIESKY, M.T. DROMBROWSKI, P.A., FIGUEIREDO, C.P., CARGNIN-FERREIRA, E., DA CUNHA, C., TAKAHASHI, R.N. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage of model of Parkinson's disease. **Neuroscience** 156: 830-840, 2008.

TOLOUSSE, A., SULLIVAN, A.M. Progress in Parkinson's disease- Where do we stand?. **Progress in Neurobiology**, v.85, n.4, p. 376-392, 2008.

TEMEL, Y., BOOTHMAN, L.J., MAGILL, P.J., STEINBUCH, H.W.M., VANDEWALLE, V.V., S, T. Inhibition of 5-HT neuron activity and induction of depressive-like behavior by high frequency stimulation of the subthalamic nucleus. **Proceedings of the National Academy Sciences of the USA**, 104 (43): 17081-17092, 2007.

WANDENBERG, M.L.G. e HICKS, P.B. The conditioned avoidance response test re-evaluated, is it a sensitive test for the detection of potentially atypical antipsychotics? **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, 23: 851-862:1999

XU, J., KAO, S.Y, LEE, F.J.S., SONG, W., JIN, L.W, YANKNER, B.A. Dopamine-dependent neurotoxicity of alpha-synuclein: A mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson's disease. **Nature Medicine**, 8: 600-606,2002.

IBGE -<http://www.ibge.gov.br/censo/>. Acesso em 05/01/2011.

French engravings- [http://www.french-
engravings.com/product_info.php?products_id=6499&language=pt](http://www.french-
engravings.com/product_info.php?products_id=6499&language=pt). Acesso em
10/01/2011.