

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BIANCA RIBEIRO PIZZATO

ESTUDO DOS EFEITOS FARMACOLÓGICOS DO CELECOXIBE NO  
PARKINSONISMO E NO COMPORTAMENTO DEPRESSIVO INDUZIDOS POR  
ROTENONA EM CAMUNDONGOS

CURITIBA

2013

BIANCA RIBEIRO PIZZATO

ESTUDO DOS EFEITOS FARMACOLÓGICOS DO CELECOXIBE NO  
PARKINSONISMO E NO COMPORTAMENTO DEPRESSIVO INDUZIDOS POR  
ROTENONA EM CAMUNDONGOS

Trabalho apresentado como requisito parcial à obtenção do grau de bacharel no curso de graduação em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

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

Co-orientadora: Msc. Janaína Kohl Barbiero

CURITIBA

2013

Ao meu querido e amado avô Silvadávio Nascimento Ribeiro, portador da Doença de Parkinson, minha inspiração e minha força para conclusão desse projeto.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que me amparou e confortou nos momentos de desespero, me deu coragem, determinação e, sempre ao meu lado, me mostrou o caminho a seguir.

A meu pai, Roberto, responsável por eu ter chegado até aqui e por quem me tornei, por me aconselhar e estar ao meu lado independente das minhas escolhas.

A minha mãe, Silvia, pelo apoio incondicional, pelo poder do seu abraço e das suas palavras, pelo amor mais sincero e grandioso e por ser minha melhor amiga e companheira.

Ao meu irmão, Víctor, por ser tão atencioso e zelar por mim sobre todas as circunstâncias.

Ao meu amor, Káio, pelo companheirismo nos intermináveis finais de semana de experimento, pela paciência, dedicação e incentivo, por me fazer sentir o amor na sua forma mais plena e verdadeira e me fazer feliz todos os dias da minha vida.

A minha amadíssima avó, Sirlene, por me transmitir toda sua grandiosa sabedoria.

A todos os meus queridos familiares pelo amor e carinho de um vida inteira.

A minha amiga irmã, Elisa, que mesmo de longe me ampara e orienta em todas as situações, por me dar o seu melhor e estar ao meu lado incondicionalmente.

A minha amiga, Gabriella, pela parceria nos estudos e por me dar a maior força no momento em que mais precisei.

A minha pequena Mazão, pela parceria agora no fim.

A todas as minhas amadas, Eduarda Kanieski, Giovanna Trovato, Marília Pelanda, Letícia Lowen, Betina Dias, Caroline Ferrari, Janaina Taborda, Marina Cotta e Linara Mendes que compartilharam minhas emoções ao longo de todo esse projeto.

A minhas eternas, Sabrina, Rafaella, Angélica, Luciana, Penélope e Isabelle, por tantos bons anos de amizade.

A minha querida orientadora, Maria Vital, por aceitar ser minha mestra nesse desafio.

A minha co-orientadora, Janaína, por toda força, amparo, cuidado e amizade.

A companheira, Taysa, por estar presente em todas as etapas desse projeto.

A todos do grupo do Sistema Nervoso Central do Departamento de Farmacologia da UFPR, por estarem sempre prontamente a orientar.

A nossa querida secretária do curso de Ciências Biológicas, Rô, pela dedicação, paciência, atenção e suporte durante esses 5 anos.

Aos camundongos utilizados no experimento.

Amo vocês.

## RESUMO

Considerada uma das desordens neurológicas progressivas crônicas mais comuns, a Doença de Parkinson (DP) acomete 3% da população com mais de 65 anos de idade. É caracterizada pela degeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos da substância negra mesencefálica, resultando em disfunção motora. Além dos sintomas motores que caracterizam a DP, cerca de 90% dos pacientes sofrem com os sintomas não motores, que envolvem vários sistemas funcionais, como déficits cognitivos e neuropsiquiátricos, distúrbios do sono e disfunção autonômica e sensorial. A depressão, principal comorbidade associada à DP, ocorre em aproximadamente 40% dos pacientes, e antecede os sintomas motores em cerca de 25% dos parkinsonianos deprimidos. Fatores ambientais, sociais e psicológicos aliados a fatores genéticos e neuroquímicos são capazes de desencadear esse transtorno de humor.

Estudos da DP com modelos animais são de grande importância para compreensão da sua etiologia e para busca de novos tratamentos. Agentes neurotóxicos, tal como rotenona, são utilizados para induzir o animal ao parkinsonismo. A rotenona é um rotenóide extraído de raízes, sementes e folhas de algumas plantas como *Derris elliptica* e *Lonchocarpus urucu*. Inicialmente utilizada como pesticida foi relacionada ao parkinsonismo quando observadas características clínicas e patológicas semelhantes à DP nos animais expostos a ela.

Dados epidemiológicos indicam que agentes anti-inflamatórios, tais como drogas anti-inflamatórias não esteroidais, podem ter um efeito protetor sobre a DP. O presente estudo investigou os efeitos farmacológicos do celecoxibe diante do parkinsonismo e do comportamento depressivo induzidos pela rotenona, administrada via i.p. na dose 2,5 mg/kg por 10 dias consecutivos em camundongos. Os animais receberam celecoxibe, na dose 5 mg/kg via i.p., por 21 dias consecutivos após a administração da última dose de rotenona. Nossos resultados mostram que o celecoxibe foi capaz de reverter a hipolocomoção observada nos animais 14 dias após o início do tratamento. Além disto, foi eficaz em aumentar o tempo de natação e reduzir o tempo de imobilidade no teste de natação forçada modificado, parâmetros estes que avaliam o comportamento depressivo. Por fim, pela primeira vez observamos que o celecoxibe foi capaz de reduzir significativamente o tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda. Os resultados sugerem que o celecoxibe possui efeito neuroprotetor, sendo capaz de reverter os sinais de depressão e a hipolocomoção induzidos pela rotenona.

Palavras-Chave: Doença de Parkinson. Depressão. Rotenona. Celecoxibe.

## ABSTRACT

As considered one of the chronic progressive neurological disorders more common, Parkinson's Disease (PD) affects 3% of the population over 65 years old. It is characterized by progressive degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra mesencephalic, resulting in motor dysfunction. In addition to the motor symptoms that characterize PD about 90% of patients suffer from non-motor symptoms, which involve various functional systems, such as cognitive and neuropsychiatric deficits, sleep disorders and autonomic and sensory dysfunction. The depression occurs in approximately 40% of patients, and precedes the motor symptoms in some 25% of parkinsonian depression. Environmental, social and psychological factors coupled with genetic and neurochemical factors are capable of triggering this mood disorder.

Studies with animal models of PD have a great importance for understanding the etiology and to search for new treatments. Neurotoxic agents such as rotenone are used to induce the human disease in the animals. Rotenone is a rotenóid extracted from roots, seeds and leaves of some plants like *Derris elliptica* and *Lonchocarpus urucu*. Initially used as a botanical pesticide was related to parkinsonism when observed clinical and pathological characteristics similar to PD in animals exposed to it.

Epidemiological data indicates that anti-inflammatory agents, such as nonsteroidal anti-inflammatory drugs, may have a protective effect on PD. The present study investigated the pharmacological effects of celecoxib on the parkinsonism and depressive-like behavior induced by rotenone, administered via i.p. at 2.5 mg/kg for 10 consecutive days in mice. The animals received celecoxib in the dose 5 mg/kg via i.p. for 21 consecutive days after the last dose of rotenone. Our results show that celecoxib was able to reverse the hypolocomotion observed in the animals 14 days after initiation of treatment. Besides, it was effective in increasing the swimming time and reduce the immobility time in the forced swimming test modified, these parameters that assess depressive-like behavior. Finally, for the first time we found that celecoxib was able to significantly reduce the time of immobility in the tail suspension test. The results suggest that celecoxib has a neuroprotective effect, being able to reverse the signs of depression and hypolocomotion rotenone-induced.

Key-words: Parkinson`s Disease. Depression. Rotenone. Celecoxib.

## LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT – Serotonina  
6-OHDA – 6-hidroxidopamina  
BHE – Barreira Hematoencefálica  
COX – Ciclooxigenase  
COX-2 – Ciclooxigenase-2  
CRH – Hormônio liberador de corticotrofina  
DA – Dopamina  
DBS – *deep brain stimulation*  
DP – Doença de Parkinson  
GDNF – Fator neurotrófico derivado da glia ativada  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio  
HPA – Hipotálamo-hipófise-adrenal  
IL – Interleucina  
iNOS – óxido nítrico sintase induzível  
i.p. – Intraperitoneal  
L-dopa – 3,4-diidroxifenilalanina  
LC – Locus coeruleus  
LCR – Líquido cefalorraquidiano  
LPS – Lipopolissacarideo  
MAO – Monoamina oxidase  
MAO-B – Monoamina oxidase B  
MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropirina  
NA – Noradrenalina  
NE – Norepinefrina  
NO – Óxido nítrico  
PET – Tomografia computadorizada por emissão de pósitrons  
PGE – Prostaglandina  
PGE<sub>2</sub> – Prostaglandina E<sub>2</sub>



ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

SNM – Sintomas não motores

SN – Substância Negra

SNC – Sistema Nervoso Central

SNpc – Substância Negra parte compacta

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa

UFPR – Universidade Federal do Paraná

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | 1  |
| 1.1. HISTÓRICO, FISIOPATOLOGIA E SINTOMAS DA DOENÇA DE PARKINSON..... | 1  |
| 1.2. DEPRESSÃO E DOENÇA DE PARKINSON.....                             | 3  |
| 1.3. TRATAMENTO.....  | 6  |
| 1.3.1. CELECOXIBE.....  | 8  |
| 1.4. MODELOS ANIMAIS.....   | 9  |
| 1.4.1. ROTENONA.....  | 10 |
| 1.5. NEUROINFLAMAÇÃO E DOENÇA DE PARKINSON.....                       | 12 |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....   | 16 |
| 2.1. OBJETIVOS GERAIS.....  | 16 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                                       | 16 |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....                                    | 17 |
| 3.1. ANIMAIS.....   | 17 |
| 3.2. DROGAS.....  | 17 |
| 3.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....                                   | 17 |
| 3.4. TESTE DO CAMPO ABERTO.....                                       | 18 |
| 3.5. TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA MODIFICADO.....                         | 19 |
| 3.6. TESTE DE SUSPENSÃO DA CAUDA.....                                 | 19 |
| 3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....   | 19 |
| <b>4. RESULTADOS</b> .....  | 21 |
| 4.1. TESTE DO CAMPO ABERTO.....                                       | 21 |
| 4.2. TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA MODIFICADO.....                         | 23 |
| 4.3. TESTE DE SUSPENSÃO DA CAUDA.....                                 | 25 |
| <b>5. DISCUSSÃO</b> .....   | 26 |
| <b>6. CONCLUSÃO</b> .....   | 29 |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....                            | 30 |



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. HISTÓRICO, FISIOPATOLOGIA E SINTOMAS DA DOENÇA DE PARKINSON

Considerada uma das desordens neurológicas progressivas crônicas mais frequentes, a DP acomete 3% da população com mais de 65 anos de idade (LANG e LOZANO, 1998, *apud* LIMA *et al.*, 2006). Descoberta por James Parkinson em 1817, a DP é caracterizada principalmente por bradicinesia (atraso em iniciar os movimentos voluntários), rigidez, tremores em repouso, instabilidade postural e alteração do equilíbrio. Os pacientes apresentam também dificuldades na programação e execução de movimentos habituais e automáticos (CAPITELLI, 2006). O grande fator de risco para o desenvolvimento da DP é a idade, porém sua exata etiologia permanece desconhecida.

A patologia primária é a relevante perda dos neurônios dopaminérgicos na substância negra (SN), o que conduz a uma significativa diminuição nos níveis de dopamina (DA) no estriado, um neurotransmissor catecolaminérgico envolvido na regulação do movimento, das funções viscerais, do humor e da atenção. Quando o prejuízo motor se torna evidente, cerca de 58-64% dos neurônios dopaminérgicos da substância negra parte compacta (SNpc) já foram comprometidos e o conteúdo de DA no estriado reduzido em aproximadamente 60-80% (TADAIESKY *et al.*, 2008). As enzimas envolvidas no metabolismo da DA são a tirosina hidroxilase e a monoamina oxidase (MAO), e a atividade de ambas produz  $H_2O_2$  como um subproduto normal. Além disso, a auto-oxidação da dopamina resulta na dopamina quinona, bem como na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). O rompimento das vesículas que contém dopamina, devido a uma falha de energia ou à  $\alpha$ -sinucleína anormal, aumenta os níveis de dopamina livre e também a geração de ROS (BETARBET e GREENAMYRE, 2007).

Outras características patológicas incluem a inflamação crônica, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial ou proteossomal, e a presença de corpos de Lewy (HUNTER *et al.*, 2007).

A  $\alpha$ -sinucleína, principal constituinte dos corpos de Lewy, é uma proteína pré-sináptica expressa heterogeneamente em todo o cérebro. Sua associação com a DP surgiu a partir da identificação de mutações em seu gene em alguns casos raros da DP familiar. Entretanto, o seu papel na neurodegeneração e patogênese da DP permanece um enigma (BETARBET e GREENAMYRE, 2007).

Evidências sugerem que a inflamação crônica, a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo desempenham papéis importantes e até mesmo sinérgicos na DP (HUNTER *et al.*, 2007).

O estresse oxidativo na patologia da DP tem sido associado a déficits na cadeia respiratória mitocondrial nigral, pois é uma fonte abundante de radicais livres de oxigênio, principalmente na microglia ativada, onde um grande número de íons superóxidos é liberado (BARTELS e LEENDERS, 2007). As mitocôndrias são essenciais por serem a fonte de energia da célula. O dano mitocondrial implica em uma causa e efeito direta entre a inflamação e a morte neuronal dopaminérgica (HUNTER *et al.*, 2007). Alterações relacionadas ao estresse oxidativo foram detectadas no cérebro de pacientes com DP, como elevado dano oxidativo ao DNA, proteínas e lipídios, diminuição dos níveis de glutathione reduzida e aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase e MAO na SN, implicando em um mecanismo de importância central na neurodegeneração na DP (BETARBET e GREENAMYRE, 2007).

Além dos sintomas motores, os pacientes com a DP sofrem também com os sintomas não motores (SNM) (depressão, ansiedade, demência e psicose), estes afetam a qualidade de vida dos pacientes de forma significativa, principalmente a depressão. O grande problema é que na maioria dos casos ela não é detectada no diagnóstico clínico, pois os sintomas de ambas as doenças se sobrepõem. Tanto na DP quanto na depressão ocorrem distúrbios no apetite e no sono, perda de peso, diminuição do interesse, concentração e libido, ausência de resposta emocional e lentidão dos movimentos (RICHARD, 2007).

TADAIESKY e colaboradores (2008) observaram que a degeneração estriatal parcial e alterações dopaminérgicas, noradrenérgicas e serotoninérgicas no estriado e no córtex pré-frontal causaram déficits emocional e cognitivo observados nos ratos tratados com 6-OHDA, corroborando sua hipótese de que a degeneração parcial dos neurônios dopaminérgicos é capaz de induzir os sinais pré-motores comportamentais, e sugerindo que esses neurotransmissores possuem um papel importante no comportamento depressivo dos pacientes com DP. Além disso, um aumento nos níveis da NA sugere um mecanismo compensatório à redução de DA. Em pacientes com DP avançada, a conversão de levodopa para DA pode ser realizada por projeções serotoninérgicas que inervam o estriado (CHASE *et al.*, 1971, *apud* AARSLAND *et al.*, 2012). Para AARSLAND e colaboradores (2012) a presença da DA nos terminais nervosos serotoninérgicos poderia levar a um deslocamento de serotonina, que pode resultar em níveis mais baixos do neurotransmissor e assim afetar o seu metabolismo.

Entretanto, os vários SNM respondem escassamente ao tratamento dopaminérgico, sugerindo que eles podem ser consequência de outras patologias (MCDOWELL e CHESSELET, 2012).

## 1.2. DEPRESSÃO E DOENÇA DE PARKINSON

A depressão é a principal comorbidade associada à DP, afetando aproximadamente 40% dos pacientes em estágio inicial da doença (TOLOSA *et al.*, 2007, *apud* TADAIESKY *et al.*, 2008).

Os sintomas centrais da síndrome da depressão são o humor deprimido, perda do prazer e sentimentos de inutilidade ou culpa, já os sintomas somáticos são a perda do apetite, distúrbios de sono, retardo psicomotor e alteração da expressão facial, porém esses sintomas podem ser observados em pacientes com a DP não deprimidos. Existem várias escalas para a avaliação, cada uma seguindo determinados critérios, porém tentativas são feitas para estabilizar um critério clínico para depressão em pacientes com DP (AARSLAND *et al.* 2012) e, assim, facilitar o diagnóstico. Conforme

REIJNDERS e colaboradores (2008) 35% dos pacientes com DP possuem sintomas de depressão clinicamente relevantes.

ISHIHARA e BRAYNE (2006) identificaram em oito de nove estudos revisados uma forte relação entre o histórico de depressão e o aumento do risco de desenvolver DP posteriormente. AARSLAND e colaboradores (2012) averiguaram se a depressão é uma condição prodrômica da DP (nesse caso, o período de tempo entre o início da depressão e o início da DP seria curto) ou se é um fator de risco para DP (caso em que um intervalo de tempo prolongado entre o início da depressão e do início da DP seria esperado). Um estudo realizado com 371 pacientes corroboram a hipótese de que a depressão é um sintoma prodrômico da DP (JACOB *et al.*, 2010, *apud* AARSLAND *et al.*, 2012).

LIEBERMAN (2006) sugeriu em seus estudos que a patofisiologia envolvida nas desordens de humor na DP é diferente dos mecanismos que causam os sintomas comportamentais observados na população geral. Apesar de ainda não ser muito esclarecida, a patofisiologia dos sintomas psiquiátricos está relacionada com as vias dopaminérgicas estriatal, frontal e límbicas e com as vias colinérgicas, serotoninérgicas, noradrenérgicas e GABAérgicas (SCHRAG, 2004).

NEGRE-PAGES e colaboradores (2008) em um estudo com 450 pacientes com DP e 98 pacientes sem a doença encontraram que os pacientes com a DP possuem qualidade de sono, índices de ansiedade e depressão maiores em comparação ao controle, que em contrapartida sofre mais frequentemente de comorbidades somáticas e desordens metabólicas. Ademais, dois terços dos pacientes com DP mencionaram sentir dor musculoesquelética e dor neurogênica ou síndromes de dor psicogênicas.

O fato de algumas mudanças ocorridas no cérebro envolvidas na patogênese da DP, como o déficit monoaminérgico e lesões nos circuitos fronto-subcorticais, poderem estar associadas à depressão suporta a hipótese de que fatores específicos da DP contribuem para essa comorbidade (LEES *et al.*, 2009).

A depressão ocorre nos pacientes em todos os estágios da DP, porém não aparece em paralelo à progressão dos sintomas motores, propondo um processo independente da DP (BROWN e JAHANSHAH, 1995). Entretanto, pacientes que desenvolvem a DP em idade precoce possuem maiores taxas de depressão quando

comparados aqueles com início tardio (GILADI *et al.*, 2000; SCHRAG *et al.*, 2003). Ademais, estudos revelam que os distúrbios de humor ocorrem com maior frequência nos pacientes com DP do que em indivíduos saudáveis ou naqueles com outras doenças incapacitantes ou crônicas (NILSSON *et al.*, 2002; AARSLAND *et al.*, 2012).

Quando a depressão ocorre em pessoas com mais de 65 anos ela é mais complexa e pode ser afetada por questões psicossociais, fatores genéticos, mudanças ocorridas no cérebro e pela condição médica do paciente. Dentre as mudanças que ocorrem no cérebro se podem citar os distúrbios monoaminérgicos, doença cerebrovascular e mudanças funcionais nos circuitos límbico e subcortical (AARSLAND *et al.*, 2012).

Estudos neuropsiquiátricos indicam que o estresse está envolvido na patogênese da DP. O estresse é um fator de risco para o desenvolvimento da depressão e pode contribuir para o avanço de ambas as patologias, podendo também piorar os sintomas motores (HEMMERLE *et al.*, 2012).

A resposta ao estresse envolve a ativação de vários sistemas, principalmente o eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA), principal sítio dos transtornos de humor, e o sistema nervoso autonômico. A ativação do eixo HPA resulta no aumento dos níveis de glicocorticoides. O cortisol é importante para as funções adaptativas durante a exposição ao estresse e também faz um feedback negativo na regulação da ativação do eixo HPA, limitando a sua secreção. A regulação da secreção dos glicocorticoides é necessária para a apropriada adaptação ao estresse. Os receptores de glicocorticoides estão localizados em várias regiões do cérebro envolvidas na depressão, sugerindo assim que eles podem ter um papel importante na progressão da doença (HEMMERLE *et al.*, 2012). SAPOLSKY e colaboradores (1985) hipotetizam que a perda da sinalização dos receptores de glicocorticoides causa aumento da secreção de corticosterona, pois gera uma falha no feedback negativo. Cerca de 50% dos pacientes deprimidos apresentam uma disfunção do eixo HPA, caracterizada pelo comprometimento na regulação do feedback pela secreção de corticosteroides (HEMMERLE *et al.*, 2012).

A hipótese 5-HT foi proposta para a depressão nos pacientes da DP (MAYEUX, 1990). O sistema serotoninérgico está envolvido no processo emocional e os principais



neurotransmissores comumente associados com a patogênese da depressão são a serotonina (5-HT) e a norepinefrina (NE), que juntamente com a noradrenalina (NA) são afetados ao longo da DP e também possuem um papel importante no desenvolvimento dos SNM. Alguns achados corroboram o possível envolvimento serotoninérgico em pacientes com DP deprimidos. O locus coeruleus (LC) e o núcleo da rafe fornecem a inervação noradrenérgica e serotoninérgica ao córtex cerebral e ao sistema límbico, respectivamente (PAULUS e JELLINGER, 1991). O LC é afetado pela neurodegeneração nos estágios iniciais da DP. CHAN-PALAY (1993) relatou uma maior degeneração dentro desta região em indivíduos deprimidos em comparação aos não deprimidos que possuem DP. Outra evidência é a diminuição da atividade e do número de neurônios serotoninérgicos no núcleo dorsal da rafe (REN e FENG, 2007) e dos neurônios noradrenérgicos no LC (LIEBERMAN, 2006). Apesar de ser observada a degeneração acelerada dos neurônios serotoninérgicos mais frequentemente em pacientes com a DP deprimidos do que em pacientes sem depressão (PAULUS e JALLINGER, 1991) é improvável que a diminuição da 5-HT sozinha desempenhe um papel principal na etiologia da depressão na DP, visto que os inibidores seletivos da recaptação da 5-HT (SSRI) nem sempre são eficazes, apesar de muitas vezes ser a primeira escolha para o tratamento (LEENTJENS *et al.*, 2003b; YAMAMOTO, 2001; HEMMERLE *et al.*, 2012). Para CHAUDHURI e SCHAPIRA (2009) os SNM na DP não podem ser considerados os mesmos que os sintomas causados por vias não dopaminérgicas. A sintomatologia depressiva na DP também pode estar relacionada a uma disfunção dopaminérgica, já que agonistas da dopamina podem melhorar sintomas depressivos (BARONE *et al.*, 2007, *apud* HEMMERLE *et al.*, 2012).

### 1.3. TRATAMENTO

O tratamento utilizado para os pacientes que possuem a DP serve para aliviar os sintomas, pois ainda não existe um medicamento que impeça a neurodegeneração e leve a cura. Com a administração do precursor da DA, L-dopa, a mesma é restituída.

Apesar dos efeitos adversos observados, o tratamento com L-dopa melhora o funcionamento motor e diminui os níveis de mortalidade (RAJPUT, 2001). Ainda assim, deficiências físicas e mentais aumentam de acordo com a progressão da doença e são refratários ao tratamento (BARTELS e LEENDERS, 2007). Acredita-se que os efeitos colaterais da L-dopa seja resultado do seu metabolismo nos tecidos periféricos, logo é recomendada a administração conjunta da L-dopa e de inibidores da levodopa descarboxilase, como a carbidopa ou benserazida, estas não atravessam a BHE e inibem a descarboxilação extracerebral disponibilizando mais L-dopa para o cérebro e minimizando os efeitos indesejados (ZANOVELI, 2013).

Outros fármacos utilizados no tratamento são a selegelina, responsável pela inibição da MAO-B, pramipexol e bromocriptina, agonistas dos receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> ou D<sub>3</sub>, e amantadina que aumenta a liberação e bloqueia a recaptação da DA (ZANOVELI, 2013).

Estudos anteriores confirmam que a inibição da resposta inflamatória pode prevenir ou amenizar a degeneração dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais em vários modelos animais (GAO *et al.*, 2003). Fármacos anti-inflamatórios forneceram propriedades protetoras e podem ter potencial uso terapêutico para o tratamento de neuroinflamação na DP (HUNTER *et al.*, 2007).

Para tratar a depressão na DP são escolhidos os antidepressivos que possuem efeitos serotoninérgicos, como a fluoxetina, citalopram e paroxetina, e noradrenérgicos, dentre eles desipramina e reboxetina, como também aqueles capazes de inibir a recaptação das monoaminas e a enzima MAO. Para aumentar a neurotransmissão monoaminérgica utilizam-se fármacos responsáveis por inibir a recaptação e metabolização das monoaminas e também antagonistas dos receptores pré-sinápticos. Alguns medicamentos antiparkinsonianos também são eficazes para o tratamento do humor além dos sintomas motores (AARSLAND *et al.*, 2012).

Quando os medicamentos se tornam ineficazes para tratar a DP uma das alternativas utilizadas é a terapia de estimulação cerebral profunda (*deep brain stimulation* – DBS), na qual um marca-passo cerebral é implantado, reversivelmente, sendo capaz de estimular eletricamente o cérebro, bloqueando os sinais que causam os sintomas motores. Todavia a DBS pode piorar a depressão em alguns pacientes.

Devido a essa reversibilidade, a DBS pode auxiliar na identificação do potencial papel fisiopatológico de diferentes circuitos neuronais que estão envolvidos na depressão em pacientes com DP, e conseqüentemente, detectar os circuitos neuronais que podem ser alvo de antidepressivos (AARSLAND *et al.*, 2012). Estudos preliminares sugerem que com a estimulação magnética transcranial, método não invasivo que induz a despolarização ou hiperpolarização dos neurônios do córtex cerebral, pode haver melhora dos sintomas da depressão como também dos sintomas motores (AARSLAND *et al.*, 2012).

A tomografia computadorizada por emissão de pósitrons (PET) e a tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) parecem ser capazes de detectar a diminuição da função da dopamina no estriado antes mesmo dos sintomas clínicos aparecerem. Assim, especula-se que, para além da triagem de pacientes com DP assintomáticos, os sistemas de imagens podem também ser utilizados para detectar pacientes pré-clínicos da DP em uma população de alto risco, tais como indivíduos submetidos à exposição crônica a pesticidas, com predisposição genética ou que sofreram inflamação ou lesão cerebral no início da vida. Essa detecção poderá fazer um diagnóstico precoce da doença e, portanto, apresentar uma oportunidade para o tratamento com intervenções neuroprotetoras tão cedo quanto for possível (GAO *et al.*, 2003).

### 1.3.1. CELECOXIBE

O celecoxibe é um anti-inflamatório não esteroideal que vem sendo implicado em diversas pesquisas direcionadas à inflamação.

HUNTER e colaboradores (2007) observaram que o celecoxibe, inibidor seletivo da enzima COX-2, limitou a resposta inflamatória induzida por LPS reduzindo a liberação e produção excessiva de moléculas citotóxicas e restaurando parcialmente a função mitocondrial, e assim, aumentando a sobrevivência neuronal dopaminérgica.

Segundo BARTELS e LEENDERS (2007), o benefício observado do celecoxibe pode também derivar diretamente da inibição neuronal da COX-2 que, aparentemente, é capaz, diretamente e através da inibição da ativação da microglia, de reduzir a neurodegeneração dopaminérgica.

De fato, inibidores da COX-2, tal como celecoxibe, mostraram-se eficazes em proporcionar neuroproteção ou recuperação da rigidez em modelos animais parkinsonianos (MOGHADDAM *et al.*, 2008).

Utilizando um modelo animal da 6-OHDA da DP, SÁNCHEZ-PERNAUTE e colaboradores (2004) inibiram seletivamente a COX-2 através do tratamento, pré e pós-lesão, com celecoxibe e demonstraram a proteção contra o efeito da neurotoxina. Os efeitos do celecoxibe foram avaliados utilizando técnicas de imuno-histoquímica e micro PET, dentre eles foi possível observar uma diminuição da ativação da microglia no estriado e no mesencéfalo ventral, esta foi associada a uma prevenção da degeneração progressiva. O benefício da inibição da atividade da COX-2 pode ser atribuído a uma redução seletiva das células gliais prejudiciais e por não ser efetiva sobre a astroglia protetora. O efeito obtido pelo celecoxibe foi o de criar condições favoráveis para a prevenção das cascatas neurodegenerativas progressivas durante e após a lesão semelhante à observada na DP (ESPOSITO *et al.*, 2007).

#### 1.4. MODELOS ANIMAIS

Estudos da DP com modelos animais são de grande importância para compreensão da sua etiologia e para busca de novos tratamentos. Agentes neurotóxicos, tais como rotenona, 6-OHDA, MPTP e LPS, são utilizados para induzir o parkinsonismo em animais. Estes modelos da DP são indispensáveis para explorar os importantes mecanismos celulares e moleculares da degeneração nigral (GAO *et al.*, 2003). Ademais, a diminuição da eficácia de uma das principais drogas utilizada para o tratamento da DP, a 3,4-diidroxifenilalanina (L-dopa), diante ao uso crônico e, ainda, seus diversos efeitos colaterais, leva a urgência no desenvolvimento de estratégias

terapêuticas mais efetivas capazes de impedir a progressão da doença (GAO *et al.*, 2003).

Estes modelos reproduzem as características principais da DP, tais como a degeneração dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal, formação de corpos de Lewy como inclusões intracitoplasmáticas e, conseqüente, disfunções motoras extrapiramidais, e também, os principais processos bioquímicos da DP, como o estresse oxidativo, inibição mitocondrial e inflamação.

Já o uso de modelos animais para reproduzir os SNM é limitado pelo fato da maioria desses sintomas serem parcialmente independentes de DA. Pesquisando as deficiências cognitivas e comportamentais observadas na DP torna-se evidente a participação da 5-HT, da NE e da acetilcolina nesse processo (ZGALJARDIC *et al.*, 2004).

#### 1.4.1. ROTENONA

A rotenona é um rotenóide, uma família de isoflavonóides, presente nas *Leguminosae* (SARAVANAN *et al.*, 2005, *apud* CAPITELLI, 2006), terceira maior família da *Angiospermae*.

Antigamente utilizado como pesticida, foi comprovado através de observações que animais expostos a esta toxina exibiam características clínicas e patológicas semelhantes à DP (NEWHOUSE *et al.*, 2004, *apud* CAPITELLI, 2006).

A sua falta de especificidade e a variabilidade dos seus efeitos em estudos anteriores limitou a sua utilização para a avaliação de estratégias neuroprotetoras. Para MCDOWELL e CHESSELET (2012), essa alta variabilidade e a especificidade progressiva não dopaminérgica da toxina aumentariam as oportunidades para o estudo dos SNM da DP. Porém em 2005, SARAVANAN e colaboradores comprovaram, através de experimentos com infusão intranigral, que a rotenona reduz os níveis de DA e que é específica para os neurônios dopaminérgicos, entretanto os neurônios do

estriado e de outras regiões do cérebro, incluindo o globo pálido e núcleo subtalâmico, permaneceram intactos diante da toxina (BETARBET e GREENAMYRE, 2007).

MOREIRA e colaboradores (2012) mostraram através de infusão bilateral intranigral de rotenona, que o seu uso para induzir o parkinsonismo no modelo animal é válido e capaz de causar sinais da doença. Ademais, a neurotoxina ocasiona a formação de inclusões de ubiquitina e  $\alpha$ -sinucleína, morfológicamente semelhantes aos corpos de Lewy encontrados na DP idiopática (BETARBET e GREENAMYRE, 2007).

A rotenona é um composto lipofílico que atravessa facilmente a barreira hematoencefálica (BHE) e não necessita de transportadores para atravessar as membranas celulares dos neurônios dopaminérgicos. Uma vez dentro da célula se acumula nas mitocôndrias e prejudica a fosforilação oxidativa através da inibição do complexo I, que resulta no aumento do estresse oxidativo, tanto em ratos *in vivo* como em células de neuroblastoma *in vitro* (BETARBET e GREENAMYRE, 2007).

A toxicidade da rotenona para neurônios dopaminérgicos foi inicialmente atribuída apenas à sua inibição da atividade do complexo I mitocondrial, porém recentemente essa inibição foi associada à presença de microglia ativada (BARTELS e LEENDERS, 2007). BETARBET e GREENAMYRE (2007) também detectaram a ativação seletiva da microglia no estriado e em regiões nigrais do cérebro.

REN e FENG (2007) comprovaram que a rotenona atua como um agente despolimerizante de microtúbulos afetando particularmente os neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo e causando a degeneração seletiva dos neurônios serotoninérgicos em culturas neuronais do mesencéfalo. Devido a essa despolimerização o transporte vesicular é interrompido, o que leva ao acúmulo de vesículas no soma. O aumento da oxidação da dopamina e da serotonina, que extravaza das vesículas para o citosol, produz muita ROS agravando o estresse oxidativo e colocando em risco a sobrevivência dos neurônios. Já os neurônios glutamatérgicos e GABAérgicos da mesma cultura foram poupados por seus neurotransmissores não poderem ser oxidados, concluindo que os neurônios serotoninérgicos e monoaminérgicos de longa projeção são mais vulneráveis à despolimerização (REN *et al.*, 2005).

Em termos de comportamento, os ratos expostos apresentaram uma postura flexionada semelhante à postura inclinada de pacientes com DP, alguns desenvolveram rigidez grave e outros mostraram patas trêmulas espontâneas como uma reminiscência do tremor em repouso de pacientes com DP (BETARBET e GREENAMYRE, 2007). DAUER e PRZEDBORSKI (2003) observaram que animais intoxicados pela rotenona desenvolveram posturas anormais e lentidão dos movimentos, porém não foi verificada a eficácia do tratamento com a levodopa nos mesmos.

Vários estudos estão sendo realizados com o modelo animal da rotenona, pois além de reproduzir os sintomas motores da DP esse modelo também retrata alguns SNM. Estudos conduzidos em nosso laboratório mostram que a infusão bilateral de rotenona na SN induziu o comportamento do tipo depressivo em ratos avaliados nos testes de natação forçada e de preferência de sacarose, apresentando ainda mudanças nos níveis de metabólitos da 5-HT e NE no hipocampo, área implicada na depressão (SANTIAGO *et al.*, 2010). A administração crônica da rotenona levou a alteração na cognição (MCDOWELL e CHESSELET, 2012). Mais recentemente, MORAIS e colaboradores (2012) validaram o protocolo de administração de rotenona por via intraperitoneal (i.p.), demonstrando que por essa via a rotenona também é capaz de produzir as alterações motoras e o comportamento depressivo.

Desde os estudos iniciais com a rotenona diversas pesquisas confirmaram, porém também questionaram a sua seletividade na degeneração da via nigroestriatal dopaminérgica. Cada droga possui um limiar para qual exibe efeitos colaterais ou não específicos. Para a rotenona este limiar parece ser muito pequeno, alguns animais têm uma resposta aguda, outros desenvolvem as características da DP, enquanto alguns não são afetados. Em doses elevadas, a rotenona pode ter efeitos não-específicos (BETARBET e GREENAMYRE, 2007).

## 1.5. NEUROINFLAMAÇÃO E DOENÇA DE PARKINSON

A inflamação é a primeira linha de defesa contra lesões e infecções, entretanto, uma resposta inflamatória excessiva pode se tornar uma fonte de prejuízo adicional às células (WYSS-CORAY E MUCKE, 2002, *apud* GAO *et al.*, 2003).

O cérebro possui uma resposta imune adaptativa relativamente baixa, todavia, é vulnerável as reações imunes inatas. Os neurônios são extremamente sensíveis aos processos imunes auto-destrutivos e inflamatórios pois são incapazes de se dividir e possuem pequena habilidade de se restabelecer de uma lesão, o que pode dificultar a recuperação da função neurológica em locais de inflamação ou até mesmo agravá-la (GAO *et al.*, 2003).

O atributo da inflamação cerebral é a ativação de células gliais, particularmente a microglia, estas são sensíveis até mesmo a pequenas perturbações na homeostase do sistema nervoso central (SNC) e são rapidamente ativadas durante a maioria das condições neuropatológicas, tais como DP e Alzheimer (GAO *et al.*, 2003).

A microglia pode ser ativada diretamente por produtos de microorganismos, toxinas ambientais e agregados de  $\alpha$ -sinucleína, ou indiretamente após a neurodegeneração ser induzida (BARTELS e LEENDERS, 2007). Uma vez ativada, a microglia exibe uma visível plasticidade funcional, transformando-se em um fenótipo semelhante a um macrófago, envolvendo mudanças morfológicas, proliferação, aumento na expressão de receptores da superfície celular e produção de fatores neurotróficos e neurotóxicos. A ativação da microglia pode desencadear ou agravar a lesão neuronal através da liberação de fatores pró-inflamatórios e neurotóxicos, dentre eles, ROS, espécies reativas de nitrogênio, enzimas ciclooxigenases (COXs), proteases, aminoácidos excitatórios e citocinas pró-inflamatórias, tais como, TNF- $\alpha$  e IL-1, componentes essenciais do processo inflamatório que contribuem para o dano oxidativo (GAO *et al.*, 2003).

Contudo, alguns aspectos da inflamação podem ser benéficos para combater a doença. Diante da remoção de fragmentos celulares, destruição de patógenos e liberação de fatores neurotróficos, a microglia ativada pode exibir um efeito neuroprotetor, ao passo que, a astroglia ativada pode promover a sobrevivência neuronal e resgatar neurônios lesionados eliminando substâncias tóxicas, disponibilizando fatores neurotróficos e, então, reparando os tecidos. É através da



elevada liberação de fator neurotrófico derivado da glia ativada (GDNF) que a mesma exerce os seus efeitos neuroprotetores.

Estudos com o modelo animal da rotenona mostraram que a ativação microglial ocorre antes do aparecimento da lesão dopaminérgica, corroborando o papel da inflamação no início da cascata degenerativa. Contudo, também tem sido demonstrado que o prejuízo de neurônios dopaminérgicos pode, por si só, resultar na ativação da microglia, iniciando uma sequência de auto-propagação estável de dano celular. Portanto, ainda não está claro se a reação glial é uma consequência da morte neuronal ou se ocorre muito cedo na cascata que conduz à morte das células nervosas (BARTELS e LEENDERS, 2007).

A enzima ciclooxigenase do tipo 2 (COX-2), produzida pela ativação microglial, também é capaz de gerar ROS. Após a doação de elétrons para a COX, a COX-2 oxida co-substratos como, por exemplo, a dopamina em dopamina quinona reativa, esta é altamente reativa e pode conduzir à morte celular (BARTELS e LEENDERS, 2007).

As evidências aumentam e sugerem que a reação inflamatória, observada em várias desordens neurodegenerativas e causada pela enzima COX-2, acompanha o processo patológico da DP (MOGHADDAM *et al.*, 2008).

A COX-2 é responsável por catalisar a produção de prostaglandinas  $E_2$  ( $PGE_2$ ) e sofre *up-regulation* diante de várias condições de estresse, tais como o dano cerebral. Ela é expressa em dendritos e corpos celulares de neurônios em diversas regiões do cérebro, inclusive na via nigroestriatal (MOGHADDAM *et al.*, 2008), e está relacionada à apoptose dos mesmos. Processos inflamatórios associados com um aumento na expressão da enzima COX-2 e elevadas concentrações de  $PGE_2$  implicam na cascata de eventos deletérios levando a neurodegeneração (SANTIAGO *et al.*, 2010).

MOGHADDAM e colaboradores (2008) sugerem que a COX-2 eleva os níveis de acetilcolina no cérebro através da produção de  $PGE_2$ , assim como aumenta a expressão de marcadores colinérgicos, como o transportador proteico de acetilcolina vesicular. Observaram também que as prostaglandinas, principalmente a  $PGE_2$ , possuem efeitos modulatórios sobre a transmissão adrenérgica, noradrenérgica e glutamatérgica. Além disso, os neurônios pré-sinápticos dopaminérgicos possuem

receptores muscarínicos que, quando ativados, diminuem a liberação de DA (ZANOVELI, 2013).

Inibidores da COX-2, tal como celecoxibe, mostram-se eficazes na neuroproteção nos modelos animais da DP (MOGHADDAM *et al.*, 2008). BARTELS e LEENDERS (2007) sugerem que o efeito neuroprotetor da inibição da COX-2 está relacionado ao bloqueio da COX-2 mediada pela oxidação da dopamina e não à diminuição da microglia ativada.

A combinação da inflamação com estresse oxidativo e disfunção mitocondrial gera uma ativação microglial exacerbada e um ciclo vicioso que parece levar a uma progressiva morte neuronal dopaminérgica (HUNTER *et al.*, 2007).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos farmacológicos e neuroprotetor do anti-inflamatório celecoxibe no modelo animal da DP induzido pela rotenona em camundongos.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Observar os efeitos farmacológicos do celecoxibe, dentre eles:

- Reversão dos sinais de depressão causados pela indução do parkinsonismo pela rotenona.
- Melhora na hipolocomoção causada pela indução do parkinsonismo pela rotenona.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. ANIMAIS

Os animais utilizados foram camundongos machos (30-50 g), provenientes do Biotério Central 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 durante todos os experimentos. Todos os procedimentos utilizados foram submetidos à aprovação da Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Número de protocolo 685.

#### 3.2. DROGAS

- Rotenona (Sigma-Aldrich, German).
- Solução salina (NaCl 0,9%).
- Celecoxibe (Celebra®).
- Óleo de Girassol

#### 3.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram distribuídos em quatro grupos, conforme descrito a seguir:

| ÓLEO DE GIRASSOL |                      | ROTENONA         |                      |
|------------------|----------------------|------------------|----------------------|
| Salina<br>(n=10) | Celecoxibe<br>(n=10) | Salina<br>(n=10) | Celecoxibe<br>(n=10) |

As drogas foram administradas por via intraperitoneal (i.p.). Primeiramente os animais receberam rotenona ou óleo de girassol (veículo da rotenona) por 10 dias consecutivos na dose de 2,5 mg/kg. Posteriormente, no 11º dia, estes animais receberam celecoxibe 5 mg/kg (CHEN, *et al.*, 2000) por 21 dias consecutivos ou 1mL/kg de solução salina 0,9% (veículo do celecoxibe).

O teste de campo aberto foi realizado nos dias 1, 7, 14 e 21 após a última administração de celecoxibe ou veículo.

O teste de suspensão pela cauda foi realizado no 21º dia duas horas após o teste do campo aberto. No dia seguinte, pelo período da manhã, ocorreu o teste de natação forçada modificado.

#### 3.4. TESTE DO CAMPO ABERTO

O teste do Campo Aberto ou *Open Field Test* foi utilizado para avaliar a função motora animal. O aparato consiste em uma arena circular com 30 cm de diâmetro e 30 cm de altura, dividida com linha pretas em 8 unidades e sobre a arena encontram-se duas lâmpadas emitindo luz brilhante. Os animais foram individualmente colocados no centro do campo aberto e seu comportamento foi avaliado durante um período de 5 minutos. O tempo foi mensurado utilizando cronômetros. Após cada animal a arena foi limpa com álcool 5%.

Para avaliação foram utilizados os seguintes parâmetros: frequência de locomoção (quando o animal entrar com as quatro patas em uma divisão do aparato) e

frequência de levantar (quando o animal estiver somente com as patas traseiras no chão e tronco perpendicular ao mesmo).

### 3.5. TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA MODIFICADO

O Teste de Natação Forçada foi utilizado para avaliar os sinais de depressão animal. O procedimento utilizado foi uma modificação do método proposto por PORSOLT e colaboradores em 1978.

Os camundongos foram colocados em um tanque cilíndrico (20x20x40 cm) contendo água a uma temperatura de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , a uma profundidade de 15 cm, durante 6 minutos. Para análise dos resultados foram desconsiderados os 2 primeiros minutos do teste.

Para avaliação foram utilizados os seguintes parâmetros: tempo de imobilidade (falta de movimento de todo o corpo, apenas movimentos necessários para manter a cabeça do animal fora da água), tempo de escalada (movimentos vigorosos com as patas dianteiras para dentro e para fora da água, normalmente dirigida contra a parede do tanque) e tempo de natação (quando os movimentos das patas dianteiras desloca o corpo em torno do cilindro, mais do que o necessário para manter apenas a cabeça acima da água).

A água foi trocada entre cada animal testado para evitar a interferência de odores dos outros animais e temperatura. Todos os animais foram secados após o teste e colocados novamente em gaiolas limpas.

### 3.6. TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA

O Teste de Suspensão da Cauda foi um procedimento proposto por PORSOLT e colaboradores em 1987, e tem a capacidade de detectar um amplo espectro de drogas antidepressivas.

Os camundongos foram suspensos pela cauda durante 5 minutos. O parâmetro de avaliação utilizado foi o tempo de imobilidade (tempo durante o qual o animal permanece imóvel). A diminuição no tempo de imobilidade do grupo teste em relação ao grupo controle sugere uma ação antidepressiva do anti-inflamatório testado.

O teste de suspensão da cauda e o teste de natação forçada são semelhantes por avaliar os sinais de depressão nos animais, porém são diferentes em termos dos substratos biológicos que fundamentam os comportamentos observados. Assim, o uso de ambos os testes, pode nos oferecer dados complementares e convergentes sobre potenciais medicamentos antidepressivos.

### 3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são expressos como média  $\pm$  SEM. Testes de desvio de homogeneidade, normalidade e distribuição foram realizados para assegurar que os pressupostos necessários para a análise de variância paramétrica padrão foram satisfatórios. Os resultados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido por teste post-hoc de Tukey. Os valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). O nível de significância foi de  $P \leq 0,05$ .

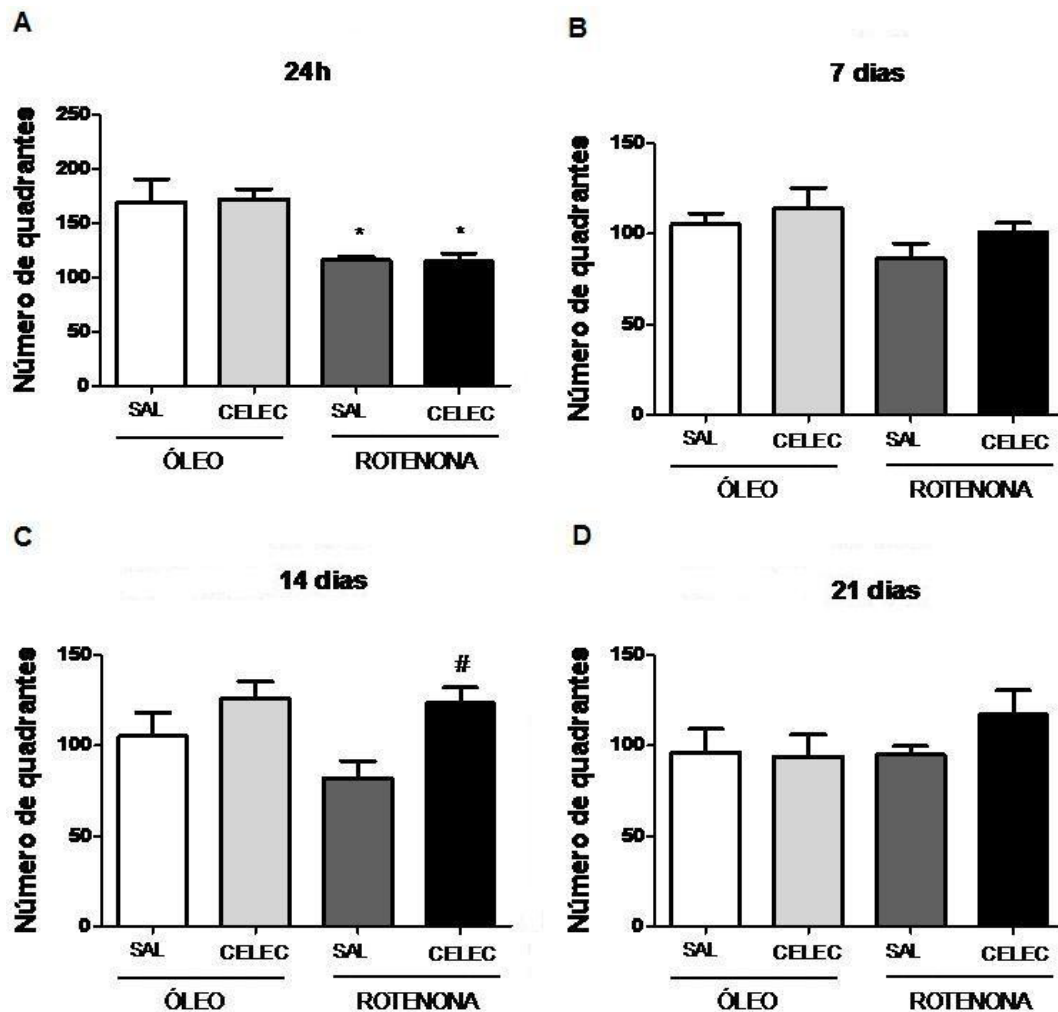
## 4. RESULTADOS

### 4.1. TESTE DO CAMPO ABERTO

Com relação aos parâmetros número de quadrantes percorridos (FIG. 1), os resultados mostram que os animais submetidos ao tratamento prolongado com a rotenona (grupo rotenona + óleo e grupo rotenona + celecoxibe) apresentaram redução significativa da frequência de locomoção, em relação aos animais do grupo controle (óleo + salina), 24 horas após receberem a última dose da rotenona (FIG. 1A).

Em contrapartida, na análise do parâmetro de número de quadrantes percorridos verifica-se que os camundongos que receberam rotenona + celecoxibe demonstraram aumento significativo na frequência de locomoção, quando comparados aos camundongos do grupo rotenona + óleo, no 14<sup>o</sup> dia de tratamento com o celecoxibe (FIG. 1C).

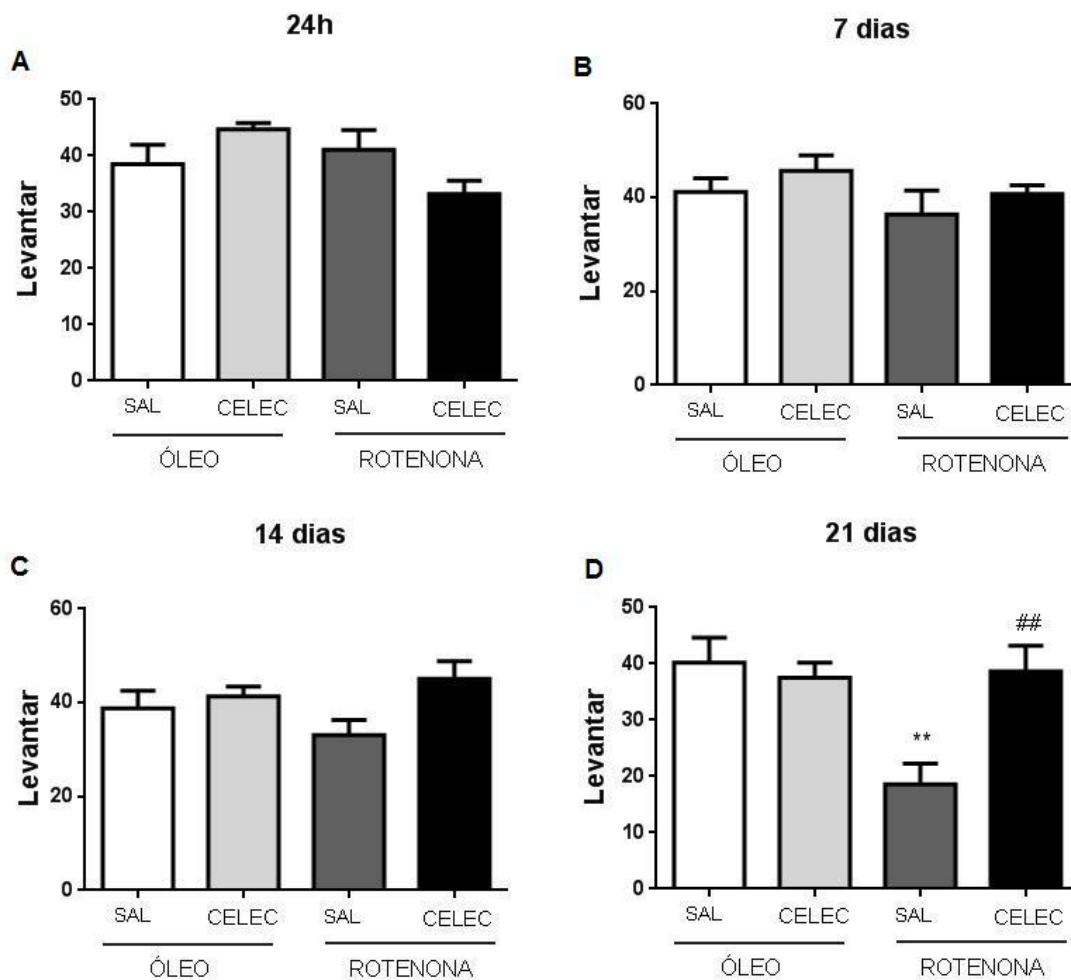




**Figura 1. Efeitos do celecoxibe em relação ao parâmetro número de quadrantes percorridos no centro do campo aberto.** Camundongos avaliados no campo aberto (A) Frequência de locomoção obtida 1 dia após a última administração de rotenona ou veículo e primeiro dia de tratamento com o celecoxibe. Valores são expressos como média  $\pm$ SEM. \* $P < 0.05$  comparado ao grupo óleo + salina. ANOVA de uma via seguido pelo post hoc de Tukey. (B) Frequência de locomoção obtida 7 dias após a última administração de rotenona ou veículo e 7° dia de tratamento com o celecoxibe. Valores são expressos como média  $\pm$ SEM. ANOVA de uma via seguido pelo post hoc de Tukey. (C) Frequência de locomoção obtida 14 dias após a última administração de rotenona ou veículo e 14° dia de tratamento com o celecoxibe. Valores são expressos como média  $\pm$ SEM. # $P < 0.05$  comparado ao grupo rotenona + salina. ANOVA de uma via seguido pelo post hoc de Tukey.;e (D) Frequência de locomoção obtida 21 dias após a última administração de rotenona ou veículo e 21° dia de tratamento com o celecoxibe. Valores são expressos como média  $\pm$ SEM. ANOVA de uma via seguido pelo post hoc de Tukey.

A figura 2 ilustra os resultados do parâmetro frequência de levantar obtidos no teste do campo aberto. Os animais do grupo rotenona + salina exibiram redução significativa da frequência de levantar, em contraste aos animais do grupo controle, somente 21 dias após o fim do tratamento com a rotenona (FIG. 2D). De modo

pertinente, os animais do grupo rotenona + celecoxibe apresentaram aumento significativo neste parâmetro, quando comparados aos animais do grupo rotenona + salina também somente após 21 dias (FIG. 2D).



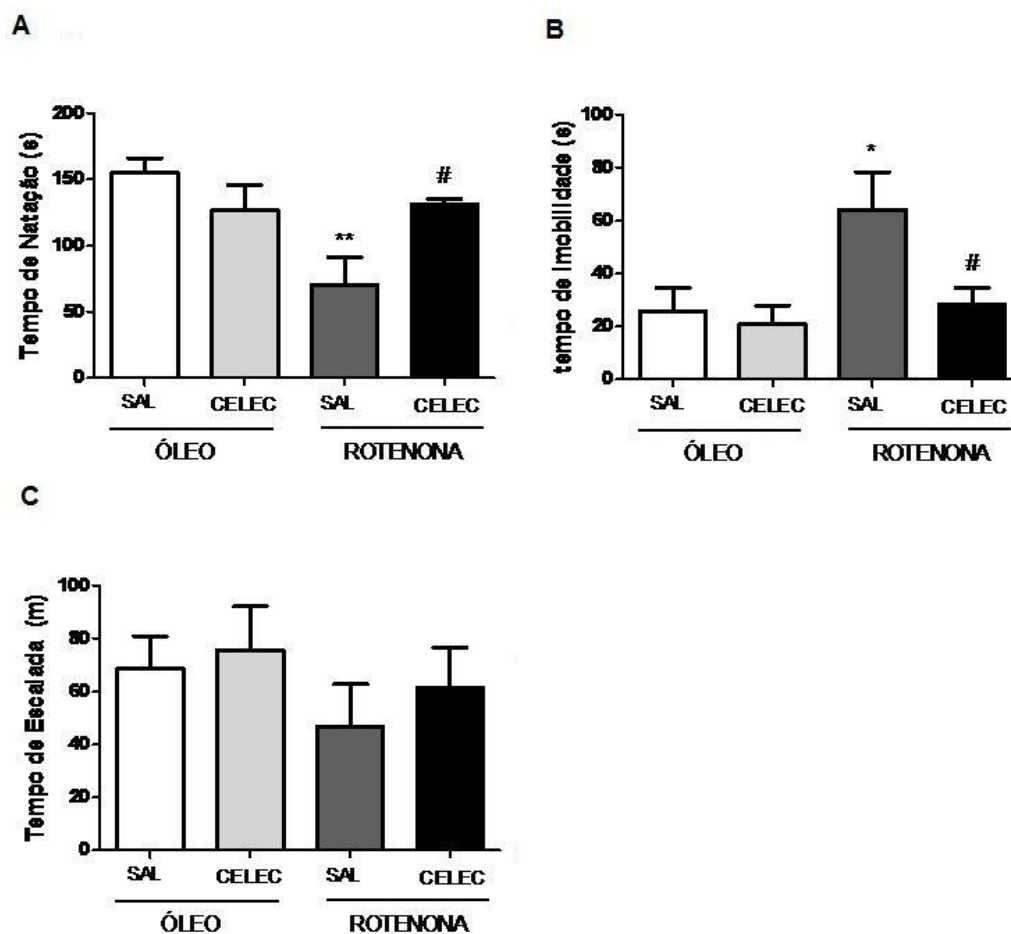
**Figura 2. Efeitos do celecoxibe em relação ao parâmetro frequência de levantar no campo aberto.** Camundongos avaliados no campo aberto (A) 24 hrs após a administração da última dose de rotenona - valores expressos como média  $\pm$  SEM (n=6-9/grupo). ANOVA de uma via seguido pelo *post hoc* de Tukey; (B) 7 dias após a administração da última dose de rotenona - valores expressos como média  $\pm$  SEM (n=6-9/grupo). ANOVA de uma via seguido pelo *post hoc* de Tukey; (C) 14 dias após a administração da última dose de rotenona - valores expressos como média  $\pm$  SEM (n=6-9/grupo). ANOVA de uma via seguido pelo *post hoc* de Tukey; e (D) 21 dias após última aplicação de rotenona - valores expressos como média  $\pm$  SEM (n=6-9/grupo). ANOVA de uma via seguido pelo *post hoc* de Tukey.

#### 4.2. TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA

Camundongos do grupo rotenona + salina submetidos ao teste de natação forçada exibiram redução significativa do tempo de natação em relação aos camundongos do grupo controle, como mostra a figura 3A. Esses mesmo animais apresentaram ainda acréscimo significativo no tempo de imobilidade em comparação aos animais do grupo controle (FIG. 3B).

Por outro lado, os animais que receberam rotenona + celecoxibe mostraram aumento significativo no tempo de natação (FIG. 3A), como também redução do tempo de imobilidade (FIG. 3B) quando comparados aos animais do grupo rotenona + salina.

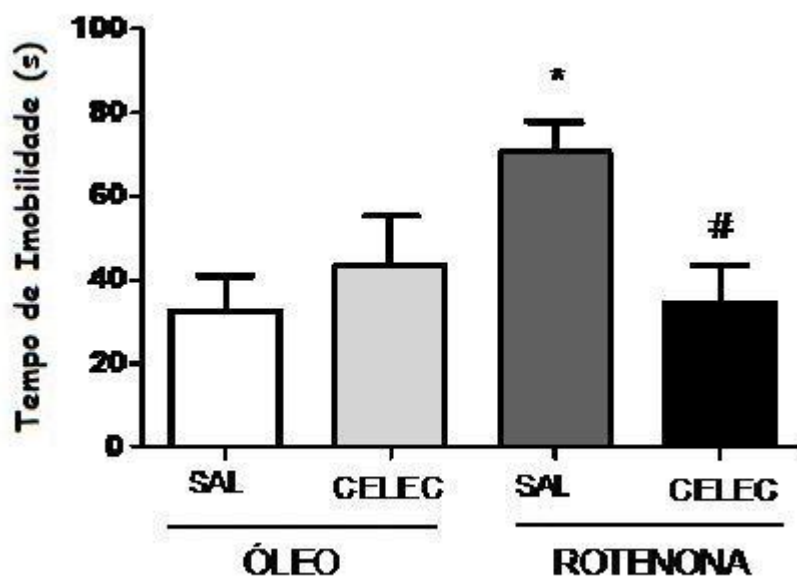
Com relação ao parâmetro tempo de escalada não houve diferenças significativas entre os camundongos dos grupos tratados (FIG. 3C).



**Figura 3. Efeitos do celecoxibe no teste de natação forçada.** Camundongos avaliados segundo os parâmetros: (A) tempo de natação - valores expressos como média  $\pm$  SEM (n=6-9/grupo). \*\*P<0.001 comparado com o grupo óleo + salina. #P<0.05 comparado com o grupo rotenona + salina. ANOVA de uma via seguido pelo *post hoc* de Tukey; (B) tempo de imobilidade - valores expressos como média  $\pm$  SEM (n=6-9/grupo). \*P<0.05 comparado com o grupo óleo + salina. #P<0.05 comparado com o grupo rotenona + salina. ANOVA de uma via seguido pelo *post hoc* de Tukey; (C) tempo de escalada - valores expressos como média  $\pm$  SEM (n=6-9/grupo). ANOVA de uma via seguido pelo *post hoc* de Tukey - após 10 dias de tratamento com rotenona e 21 dias de tratamento com celecoxibe (via i.p.).

#### 4.3. TESTE DE SUSPENSÃO DA CAUDA

A figura 4 ilustra o aumento significativo do tempo de imobilidade dos animais do grupo rotenona + salina submetidos ao teste de suspensão pela cauda, quando comparados aos animais do grupo controle. De modo relevante, os camundongos que receberam rotenona + celecoxibe apresentaram redução deste parâmetro em contraste aos camundongos do grupo rotenona + salina.



**Figura 4. Efeitos do celecoxibe no teste de suspensão pela cauda.** Camundongos avaliados segundo o parâmetro tempo de imobilidade após 10 dias de tratamento com rotenona e 21 dias de tratamento com celecoxibe (via i.p.). Valores expressos como média  $\pm$  SEM (n=6-9/grupo). \*\*P<0.001 comparado com o grupo óleo + salina. #P<0.05 comparado com o grupo rotenona + salina. ANOVA de uma via seguido pelo post hoc de Tukey.

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados mostram que o modelo animal da rotenona é incisivo em reproduzir os sinais de parkinsonismo. O tratamento prolongado com rotenona via i.p. reduziu a função motora nos camundongos, avaliada no teste do campo aberto, e causou sinais de depressão, avaliados nos testes de natação forçada modificado e de suspensão pela cauda. Os dados obtidos estão em acordo com os resultados de outros estudos realizados com o mesmo modelo pelo nosso grupo. SANTIAGO e colaboradores (2010) expuseram que além do prejuízo motor, ocasionado pela diminuição dos níveis de DA no estriado, a infusão bilateral intranigral de rotenona provocou o comportamento depressivo, avaliados através dos testes de natação forçada e de preferência pela sacarose, acompanhado da redução de 5-HT no hipocampo. O mesmo foi verificado por MORAIS e colaboradores (2012) utilizando o protocolo de administração via i.p., que através de análises neuroquímicas e histológicas também encontraram os níveis de 5-HT e NA diminuídos.

Ademais o modelo da rotenona é eficaz em inibir sistemicamente o complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial resultando na degeneração específica, progressiva e crônica da via nigroestriatal, reproduzindo o dano oxidativo e as inclusões citoplasmáticas neuronais, ambos observados na DP humana. Desta forma esse modelo recapitula a maioria dos mecanismos importantes na patogênese da doença (BETARBET e GREENAMYRE 2007).

Os animais avaliados no teste de natação forçada modificado 21 dias após receberem a última dose da neurotoxina apresentaram redução do tempo de natação e aumento do tempo de imobilidade, bem como não houve alteração estatisticamente significativa no parâmetro tempo de escalada. Os mesmos resultados foram verificados por MORAIS e colaboradores (2012), que também demonstraram através de análises neuroquímicas redução dos níveis de 5-HT e DA no estriado. Em 2002, CRAYN e colaboradores propuseram que drogas que alteram os níveis de 5-HT são responsáveis pela modificação do tempo de natação, drogas que alteram os níveis de NA interferem no tempo de escalada e alterações nos níveis de DA estão relacionadas ao tempo de

imobilidade (PEREIRA, 2013), o que sugere que a rotenona possivelmente diminuiu os níveis de 5-HT e DA, visto que observamos aumento do tempo de imobilidade e redução do tempo de natação, entretanto não foi capaz de modificar os níveis de NA, pois não houve mudança no tempo de escalada.

O comportamento depressivo também pôde ser analisado através do teste de suspensão pela cauda diante do aumento do tempo de imobilidade dos animais tratados com rotenona em comparação aos animais do grupo controle.

Atualmente sabe-se que a neuroinflamação possui um papel importante na patogênese da DP e, em particular, o papel desempenhado pela microglia neste processo. Os agentes capazes de suprimir a ativação da microglia ou interferir na produção de seus fatores citotóxicos merecem serem considerados sérios candidatos a um tratamento neuroprotetor (GAO *et al.*, 2003). De fato, o tratamento com celecoxibe, inibidor seletivo da COX-2, é eficiente em prevenir a disfunção mitocondrial, o que sugere que o prejuízo mitocondrial é secundário à inflamação. Isto pode representar tanto um evento patogênico quanto um potencial alvo para o tratamento do processo neuroinflamatório (HUNTER *et al.*, 2007).

Surpreendentemente podemos concluir diante dos resultados que o celecoxibe foi capaz de reverter os efeitos causados pelo tratamento prolongado com rotenona. O anti-inflamatório foi capaz de proteger os animais da hipolocomoção no 14º dia de tratamento, como visto no teste do campo aberto analisando os parâmetros número de quadrantes percorridos. Na realidade, inibidores da COX-2 mostraram-se eficazes em proporcionar neuroproteção ou recuperação da rigidez em modelos animais parkinsonianos (MOGHADDAM *et al.*, 2008).

Em relação à natação forçada, o celecoxibe também foi capaz de proteger os animais contra os sinais de depressão causados pela rotenona. Além do mais, comprovando o efeito antidepressivo visualizado no teste de natação forçada pela primeira vez obtivemos resultados satisfatórios no teste de suspensão pela cauda. O anti-inflamatório testado mostrou competência em reduzir o tempo de imobilidade dos animais do grupo tratado com rotenona e celecoxibe em relação aos animais do grupo que receberam apenas a neurotoxina.

O papel exato da COX-2 na DP ainda não está claro, como também poucos estudos investigaram até o presente momento os efeitos farmacológicos do celecoxibe no modelo animal da DP. Apesar disto, especula-se que o benefício proporcionado pelo celecoxibe pode derivar da inibição neuronal da COX-2, que aparentemente é capaz, diretamente e através da inibição da ativação da microglia, de reduzir a neurodegeneração dopaminérgica. Portanto, é proposto que a inibição da atividade da COX-2 pode inibir o ciclo vicioso da neuroinflamação e degeneração e ser uma estratégia útil no tratamento (BARTELS e LEENDERS 2007).

## 6. CONCLUSÃO

- O tratamento prolongado com rotenona, administrada via i.p. na dose 2,5 mg/kg, provocou redução estatisticamente significativa da frequência de locomoção em camundongos submetidos ao teste do campo aberto.
- O modelo da DP induzido pela rotenona se mostrou eficaz em reproduzir os sinais de depressão nos animais, como apresentado nos testes de natação forçada modificado e de suspensão pela cauda.
- O celecoxibe, na dose 5 mg/kg, foi capaz de reverter a hipolocomoção e o comportamento depressivo observados nos camundongos decorrentes do tratamento prolongado com rotenona.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARSLAND, D. *et al.* **Depression in Parkinson disease – epidemiology, mechanisms and management.** Nature reviews 8: 35-47, 2012.

BARTELS, A.L.; LEENDERS, K.L. **Neuroinflammation in the Pathophysiology of Parkinson's Disease: Evidence from Animal Models to Human *In Vivo* Studies with [<sup>11</sup>C]-PK11195 PET.** Movement Disorders 22 (13): 1852-1856, 2007.

BETARBET, R.; GREENAMYRE, J. T. Parkinson's disease: animal models. In: KOLLER, W. C. **Handbook of Clinical Neurology Part I – Parkinson's disease and related disorders.** Vol. 83. Ed. Elsevier, 2007. p. 265-287.

BROWN, R.; JAHANSHAH, M. **Depression in Parkinson's disease: a psychosocial viewpoint.** Adv. Neurol. 65: 61-84, 1995.

CAPITELLI, C.S. **Patofisiologia da doença de Parkinson e *Mucuna pruriens* como uma alternativa terapêutica.** 54 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

CHAN-PALAY, V. **Depression and dementia in Parkinson's disease. Catecholamine changes in the locus ceruleus, a basis for therapy.** Adv. Neurol. 60: 438-446, 1993.

CHAUDHRI, K. R.; SCHAPIRA, A. H. **Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment.** Lancet Neurol. 8: 464-474, 2009.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. **Parkinson's disease: mechanisms and models.** Neuron 39: 889-909, 2003.

ESPOSITO, E. *et al.* **Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Parkinson's disease.** Experimental Neurology 205: 295-312, 2007.

GILADI, N. *et al.* **Risk factors for dementia, depression and psychosis in long-standing Parkinson's disease.** J. Neural Transm. 107: 59-71, 2000.

GAO, H. *et al.* **Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease.** Pharmacological Sciences 24 (8): 395-401, 2003

HEMMERLE, A M. *et al.* **Stress, depression and Parkinson's disease.** Experimental Neurology 233: 79-86, 2012.

HUNTER, R.L. *et al.* **Inflammation induces mitochondrial dysfunction and dopaminergic neurodegeneration in the nigrostriatal system.** Journal of Neurochemistry 100: 1375-1386, 2007.

ISHIHARA, L.; BRAYNE, C. **A systematic review of depression and mental illness preceding Parkinson's disease.** Acta Neurol. Scand. 113: 211-220, 2006.

KOSTIC, V. S. *et al.* **Regional patterns of brain tissue loss associated with depression in Parkinson's disease.** Neurology 75: 857-863, 2010.

LEENTJENS, A. F. *et al.* **SSRIs in the treatment of depression in Parkinson's disease.** Int. J. Geriatr. Psychiatry 18: 552-554, 2003b.

LEES, A. J.; HARDY, J.; REVESZ, T. **Parkinson's disease.** Lancet 373: 2055-2066, 2009.

LIEBERMAN, A. **Managing the neuropsychiatric symptoms of Parkinson's disease.** Neurology 1998; 50:33-8.

LIMA, M. M. S. *et al.* **Different parkinsonism models produce a time-dependent induction of COX-2 in the substantia nigra of rats.** Brain research 1101: 117-125, 2006.

MAYEUX, R. **The "serotonin hypothesis" for depression in Parkinson's disease.** Adv. Neurol. 53: 163-166, 1990.

MCDOWELL, K.; CHESSELET, M.-F. **Animal models of the non-motor features of Parkinson's disease.** *Neurobiol.Dis.* (2012), doi:10.1016/j.nbd.2011.12.040

MOGHADDAM, H.F. *et al.* **Dopaminergic but Not Glutamatergic Neurotransmission Is Increased in the Striatum after Selective Cyclooxygenase-2 Inhibition in Normal and Hemiparkinsonian Rats.** *Nordic Pharmacological Society. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 103: 293-296, 2008.

MORAIS, L. H. *et al.* **Characterization of motor, depressive-like and neurochemical alterations induced by a short-term rotenone administration.** *Pharmacological Reports* 64: 1081-1090, 2012.

MOREIRA, C. G. *et al.* **Behavioral, Neurochemical and Histological Alterations Promoted by Bilateral Intranigral Rotenone Administration: A New Approach for an Old Neurotoxin.** *Neurotox. Res.* 21: 291-301, 2012.

NEGRE-PAGES, L. *et al.* **Chronic pain in Parkinson's disease: The cross-sectional French DoPaMiP survey.** *Mov. Disord.* 23: 1361-1369, 2008.

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 Psychiatr. Scand.* 106: 202-211, 2002.

PAULUS, W.; JELLINGER, K. **The neuropathologic basis of different clinical subgroups of Parkinson's disease.** *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 50: 743-755, 1991.

PEREIRA, M. **Neurobiologia da Depressão.** UFPR. Curitiba, 12 de março 2013. *Métodos Experimentais de Pesquisa em Farmacologia.*

RAJPUT, A. H. **Levodopa prolongs life expectancy and is non-toxic to substantia nigra.** *Parkinsonism Relat. Disord.* 8: 95-100, 2001.

REIJNDERS, J. S.; EHRT, U.; WEBER, W. E.; AARSLAND, D.; LEENTJENS, A. F. **A systematic review of prevalence studies of depression in Parkinson's disease.** *Mov. Disord.* 23: 183-189, 2008.

REIJNDERS, J. S. *et al.* **Neuroanatomical correlates of apathy in Parkinson's disease: a magnetic resonance imaging study using voxel-based morphometry.** *Mov. Disord.* 25: 2318-2325, 2010.

REN, Y.; LIU, W.; JIANG, H.; FENG, J. **Selective vulnerability of dopaminergic neurons to microtubule depolymerization.** *J. Biol. Chem.* 280: 34105-34112, 2005.

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

RICHARD, I. H. **Depression and apathy in Parkinson's disease.** *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 7: 295-301, 2007.

SÁNCHEZ-PERNAUTE, R. *et al.* **Selective COX-2 inhibition prevents progressive dopamine neuron degeneration in a rat model of Parkinson's disease.** *Journal of Neuroinflammation* 1:6 doi: 10.1186/1742-2094-1-6, 2004.

SANTIAGO, R.M. *et al.* **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* 34: 1104–1114, 2010.

SAPOLSKY, R. M. *et al.* **Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: implications for aging.** *J. Neurosci.* 5: 1222-1227, 1985.

SARAVANAN, K.S. *et al.* **Acute intranigral infusion of rotenone in rats causes progressive biochemical lesions in the striatum similar to Parkinson's disease.** *Brain Research* 1049: 147-155, 2005.

SCHRAG, A. *et al.* **Young- versus older-onset Parkinson's disease: impact of disease and psychosocial consequences.** *Mov. Disord.* 18: 1250-1256, 2003.

SCHRAG, A. **Psychiatric aspects of Parkinson's disease – an update.** *J. Neurol.* 251: 795-804, 2004.

TADAIESKY, M. T. *et al.* **Emocional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage modelo f parkinson's disease.** *Neuroscience* 156 : 830-840, 2008.

YAMAMOTO, M. **Depression in Parkinson's disease: its prevalence, diagnosis, and neurochemical background.** J. Neurol. 248 (Suppl. 3): III5-III11, 2001.

ZANOVELI, J. M. **Farmacologia dos processos crônico-degenerativos do sistema nervoso central: D Alzheimer e D Parkinson.** UFPR. Curitiba, 12 de março 2013. Métodos Experimentais de Pesquisa em Farmacologia.

ZGALJARDIC, D. J. *et al.* **Cognitive and behavioral dysfunction in Parkinson's disease: neurochemical and clinicopathological contributions.** J. Neural Transm. 111: 1287-1301, 2004.