



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LÍLIAN JULIANA LISSNER

**FENOTIPAGEM COMPORTAMENTAL DE RATOS TRATADOS COM MPTP:
UM MODELO DA FASE INICIAL DA DOENÇA DE PARKINSON**

CURITIBA
2017

LÍLIAN JULIANA LISSNER

FENOTIPAGEM COMPORTAMENTAL DE RATOS TRATADOS COM
MPTP: UM MODELO DA FASE INICIAL DA DOENÇA DE PARKINSON

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências (Bioquímica), Setor de
Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná como requisito
parcial para obtenção do título de
Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Claudio da Cunha

CURITIBA

2017

**Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas**

Lissner, Lílian Juliana

Fenotipagem comportamental de ratos tratados com MPTP - um modelo da fase inicial da doença de Parkinson / Lílian Juliana Lissner - Curitiba, 2017

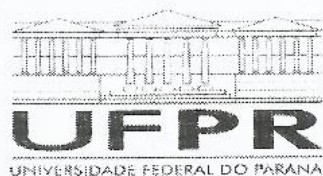
59f il , 30cm

Orientador Claudio da Cunha

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica

1 Parkinson, Doença de 2 Dopamina I Título II Cunha, Claudio da III Universidade Federal do Paraná Setor de Ciências Biológicas Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica

CDD (20 ed) 574 192



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **LÍLIAN JULIANA LISSNER** intitulada: **FENOTIPAGEM COMPORTAMENTAL DE RATOS TRATADOS COM MPTP: UM MODELO DA FASE INICIAL DA DOENÇA DE PARKINSON**, após terem inquirido a aluna e realizado e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação.

CURITIBA, 20 de Dezembro de 2016.


GLÁUDIO DA CUNHA

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


GLÁUCIA REGINA MARTINEZ

Avaliador Externo (UFPR)


ROBERTO ANDREATINI

Avaliador Externo (UFPR)

SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1672 - E-mail: pgbioq@ufpr.br

Dedico este trabalho à minha família e a todas as pessoas que de alguma forma me acompanharam na realização desse sonho.

AGRADECIMENTOS

Seguindo uma ordem cronológica, quero agradecer aos mestres que desde meu ensino fundamental despertaram em mim, o interesse pela ciência, em especial a professora Claudia Bernadini que em suas aulas práticas e a campo despertou a minha curiosidade pela ciência.

Agradeço também ao meu orientador da iniciação científica professor João Batista Teixeira da rocha da UFSM por me instigar a entender a ciência, seja em suas aulas práticas (mirabolantes eu diria, mas muito produtivas) ou apenas no trabalho diário do laboratório. Confesso que foi no seu laboratório, com sua visão crítica, curiosa e criativa que me apaixonei pela ciência, mais especificamente pela bioquímica.

Agradeço ao meu orientador de mestrado professor Claudio da Cunha por ser um educador nesses dois anos de incansável orientação. Muito obrigada pela sua compreensão e disponibilidade sempre que precisei.

Agradeço aos membros da banca que aceitaram avaliar meu trabalho.

Agradeço aos meus pais, Nilson e Orildes, pelo exemplo de caráter e humildade e pela educação que vocês me proporcionaram pra que, embora frente a todas as dificuldades, hoje eu pudesse estar aqui escrevendo esse agradecimento. Amo vocês.

Aos meus amigos especiais, Fernanda, Tayna, Meira, Maíra, Natale, Laura e Alexandre. Vocês foram a minha base de suporte tanto em momentos felizes como os não tão felizes assim. Falando em pessoas especiais, também tenho de agradecer a você, Danilo, que em tão pouco tempo deixou a minha vida mais bonita.

Aos meus colegas e amigos que tive no laboratório, os quais tornaram tudo mais alegre e bonito.

À minhas 'hermanas', Laura, Rocío e Silvinha. Morando com vocês tive a oportunidade de uma segunda família aqui em Curitiba. Foram muitos momentos de alegrias e aprendizagem que levarei para sempre.

Aos amigos da farmacologia: muito obrigada pelos momentos descontraídos, seja para um café ou para aquelas festas divertidas de vez em sempre. Foram momentos muito divertidos, algumas poucas caronas né Débora e Taysa, e amizades que sentirei saudades demais. Levarei nossos momentos guardados do lado esquerdo do peito.

Ao bom e amargo chimarrão, meu fiel companheiro, que me manteve acordada vários momentos desses dois anos.

Hoje, me sinto uma pessoa muito realizada, tanto profissionalmente quanto pessoalmente. A jornada não é fácil, mas vale a pena. Esses dois anos foram resultados de muitos momentos na minha vida. Se parasse para agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para que eu realizasse esse sonho eu escreveria outra dissertação. O que posso dizer é apenas, obrigada!

À Deus, pela beleza da vida.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do
que parecia impossível.”

Charles Chaplin

NOTA EXPLICATIVA

Esta dissertação é apresentada em formato alternativo, como artigo científico para publicação, de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em ciências bioquímica da Universidade Federal do Paraná. A dissertação consta de uma revisão bibliográfica, hipótese do trabalho, discussão e conclusão bem como o artigo científico formatado conforme normas de revistas científicas internacionais.

RESUMO

Ratos tratados com a neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropirindina (MPTP) têm sido utilizados como modelo de déficit cognitivo observado na fase inicial da doença de Parkinson (DP). A principal vantagem deste modelo é que os animais apresentam déficit cognitivo na fase inicial da DP, mas não apresentam déficits sensório-motores grosseiros que possam afetar os comportamentos nas tarefas cognitivas. O objetivo do presente estudo foi realizar um acompanhamento detalhado e longitudinal de parâmetros como imobilidade, locomoção, rotações e visitas em áreas da caixa moradia onde os animais geralmente dormem, bebem e se alimentam. 100 µg de uma solução de MPTP foi bilateralmente infundida na substância negra parte compacta (SNc) de ratos machos adultos. Os ratos SHAM operados receberam uma infusão de salina o qual é utilizado como veículo. Por uma semana antes e 3 semanas após a cirurgia, os ratos foram individualmente alojados em caixas Noldus Phenotyper sob sistema de monitoramento contínuo (Ethovision). Embora severos escores comportamentais variaram ao longo do tempo, animais MPTP e SHAM diferiram de forma leve no parâmetro de locomoção. Eles apresentaram redução significativa de locomoção 21 dias após a cirurgia e uma tendência a caminhar mais lentamente 14 e 21 dias após a cirurgia. Os picos de atividade locomotora (acrofase) não diferiram entre os grupos. A preferência por sacarose foi testada uma vez por semana e o tempo gasto nas áreas de bebida e comida foram avaliados continuamente. Diferença entre os grupos não foi observada. Não foi observada também diferença entre os grupos no parâmetro de análise da marcha no equipamento Catwalk (Noldus). Quando uma das garrafas de água foi substituída por sacarose, não foi observada diferença entre os grupos. Esses achados proporcionam um forte apoio a hipótese de que os ratos tratados com MPTP não apresentam alterações motoras e alterações motivacionais que possam afetar nas medidas comportamentais que avaliam déficits cognitivos.

Palavra-chave: Doença de Parkinson; demência; depressão; acinesia; modelo animal; dopamina; sono; cronobiologia; ritmos biológicos.

ABSTRACT

Rats treated with the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) have been used as a model of cognitive deficits observed in the early phase of Parkinson's disease (PD). The main advantage of this model is that the animals present the cognitive observed in the early phase of PD, but do not present gross sensorimotor deficits that could affect the behaviors scored in cognitive tasks. The goal of the present study was to make a detailed and longitudinal follow up of immobility, locomotion, gait, rotations, and visits to areas of the home cage where the animals usually sleep, drink, and feed. 100 µg MPTP was bilaterally infused into the substantia nigra pars compacta of adult male Wistar rats. SHAM operated rats received intranigral infusion of saline. For 1 week before surgery and 3 weeks after surgery rats were individually housed in Noldus Phenotyper cages under a continuously video-tracking system (Ethovision). Although several scored behaviors varied along the time, MPTP and SHAM animals differed in very few locomotor parameters. They presented significantly reduced locomotion 21 days after surgery and a trend to walk more slowly 14 and 21 days after surgery. The peaks of locomotor activity (acrophase) did not differ among groups. The preference for drinking sucrose was tested once a week and the time spent in the feeding and drinking areas evaluated continuously. No significant difference among groups was observed. No significant difference among groups was observed for gait parameters analyzed in a Cat-Walk apparatus (Noldus). When one of the water supply was replaced by sucrose, no significant difference among groups was observed for sucrose preference. These findings provide a stronger support to the assumption that the MPTP rats do not present motor sensorymotor and motivational alterations that can affect the behaviors measured to evaluate cognitive impairment.

Keywords: Parkinson's disease; dementia; depression; akinesia; animal model; dopamine; sleep; chronobiology; biological rhythms.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP - Adenosina tri-fosfato
DA – Dopamina
DAT – Transportador de dopamina
COMT - Catecolamina orto-metiltransferase
DOPAC - Ácido 3,4-diidroxifenilacético
DNA - Ácido desoxiribonucléico
DP - Doença de Parkinson
GABA.- Ácido gama-amino butírico
Gpe - globo pálido externo
HVA - Ácido homovanílico
MAO – Monoamina oxidase
MPP⁺ - 1-metil-4- fenilpiridina
MPTP - 1- metil-4-fenil-2,3,6-tetraidropiridina
NST - núcleo subtalâmico
6-OHDA - 6-hidroxidopamina
REM – Rápido movimento dos olhos
SNc – Substância negra parte compacta
SNr - substância negra parte reticulada
VMAT – Transportador de monoamina vesicular
VTA.- Área tegmental ventral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Doença de Parkinson	13
1.2	Dopamina e doença de Parkinson	14
1.3	O papel dos núcleos da base no controle neural do movimento	15
1.4	Modelos animais da doença de Parkinson	16
1.5	O Modelo do MPTP	17
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo geral	20
2.2	Objetivo específico	20
3	ARTIGO CIENTÍFICO	21
3.1	Abstract	22
3.2	Introduction	23
3.3	Materials and methods	25
3.3.1	Animals	25
3.3.2	Experimental design	25
3.3.3	Surgery	26
3.3.4	Behavioral phenotyping	26
3.3.5	Automated gait analysis (CatWalk test)	27
3.3.6	Sucrose preference test	28
3.4	Statistical analysis	28
3.5	Results	28
3.6	Discussion	29
3.7	Acknowledgements	32
4	References	33
5	DISCUSSÃO GERAL	51
6	CONCLUSÃO	53

7	REFERÊNCIAS	54
8	ANEXOS.....	58

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) foi descrita pela primeira vez pelo médico inglês James Parkinson em 1817, denominando-a “Paralisia Agitante” (PARKINSON (1817) nome que originariamente deu à doença. Nesse ensaio, ele descreveu quatro casos clínicos de pacientes que apresentavam tremor de repouso nos membros superiores, rigidez muscular, lentidão de movimentos e instabilidade postural, o que proporcionava muitas quedas. À época a DP passou a ser considerada uma desordem apenas motora, sem qualquer comprometimento cognitivo. Em 1962 Jean-Martin Charcot sugeriu a mudança de nome da enfermidade “Paralisia Agitante” para “Doença de Parkinson”. Charcot foi o primeiro a estabelecer um protocolo de tratamento para a doença, sendo também quem inicialmente caracterizou a existência de disfunções cognitivas (MENEZES e TEIVE, 2003).

Atualmente, há vários estudos evidenciando os sintomas pré-motores associados à doença. A depressão é um dos mais comuns desses sintomas (ZAHODNE et al., 2011). A anhedonia (perda da capacidade de sentir prazer) é um sintoma central em alguns estados depressivos (SLATTERY et al., 2007). Estudos sugerem que a depressão na DP esteja associada com a perda da inervação dopaminérgica e noradrenérgica em componentes corticais e subcorticais do sistema límbico (REMY et al., 2005).

Além disso, parkinsonianos também apresentam uma variedade de disfunções cognitivas tais como déficits de memória de procedimentos, memória operacional e déficits visuo-espaciais e de outras funções executivas (p. ex. atenção). Déficits em funções executivas e memórias de trabalho estão relacionados a danos no lóbulo frontal (LEWIS et al., 2003). Pacientes que apresentam déficits em funções executivas também apresentam como consequência déficits de aprendizagem (JACKSON et al., 1995), sugerindo que núcleos basais e córtex pré-frontal compartilhariam papéis importantes nesses processos cognitivos. Desse modo, o sistema via nigroestriatal degenerado afetaria essa conexão e conseqüentemente, afetaria as habilidades cognitivas (DUBOIS e PILON, 1997).

Outro sintoma na doença de Parkinson é o transtorno do sono REM (do inglês, rapid eye movement); os pacientes apresentam insônia, movimentos anormais durante o sono (movimento periódico dos membros) (ADLER et al., 2005), e excessiva sonolência diurna (DE COCK et al., 2008). Devido a múltiplas variáveis associadas na DP, o mecanismo dos distúrbios do sono REM ainda não está completamente elucidado, mas uma aparente relação com o sistema dopaminérgico vem sendo discutida na literatura.

1.2 Dopamina e doença de Parkinson

A doença de Parkinson é caracterizada por uma progressiva perda de neurônios dopaminérgicos da substância negra parte compacta (SNc) do mesencéfalo (HIRSCH et al., 1988) e da subsequente depleção de dopamina (DA) no corpo estriado. Embora a doença seja diagnosticada por sinais motores, os sintomas não-motores (funções cognitivas e emocionais) surgem primeiro. Quando sinais motores são diagnosticados, 58 a 64% dos neurônios dopaminérgicos da SNc foram perdidos e o conteúdo de dopamina estriatal foi reduzida em 60-80% (TISSINGH et al., 1998).

O neurotransmissor dopamina (3,4-dihidroxi-feniletanamina, DA) é uma amina biogênica do grupo das catecolaminas. A síntese da DA ocorre a partir da hidroxilação do aminoácido tirosina (S)-2-Amino-3-(4-hidroxifenilpropanóico), através da ação enzimática da tirosina hidroxilase (TH) forma L-DOPA (3,4-diidroxifenilalanina). Esta, por sua vez, é convertida a DA pela enzima DOPA descarboxilase (SIEGEL et al., 2006;).

A DA é então transportada para vesículas sinápticas pelo transportador vesicular de dopamina (VMAT, do inglês vesicular monoamine transporter) (KANDEL, 2000). Após ser liberada, ela é recaptada para os terminais sinápticos pelo transportador de dopamina (DAT, do inglês dopamine transporter). A DA citosólica é metabolizada pelas enzimas monoamina oxidase (MAO) e catecolamina orto-metiltransferase (COMT). A MAO possui duas isoformas, a MAO-A e a MAO-B e se encontra ligada à membrana mitocondrial externa; A COMT também possui duas isoformas: a COMT-MB que se encontra ligada à parte extracelular das membranas pré- e pós-sinápticas e a COMT-S presente em solução no meio extracelular. Os produtos finais da

metabolização da DA são o ácido homovanílico (HVA, do inglês homovanillic acid) e o ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC, do inglês 3,4-dihydroxyphenylacetic acid) (BJORKLUND e DUNNETT, 2007).

Os efeitos da dopamina são mediados pela ligação com receptores acopladas à proteína G. Existem duas famílias de receptores da DA: os receptores do tipo D1 (compreendendo os receptores D1 e D5) e os receptores do tipo D2 (compreendendo os receptores D2, D3 e D4). Os receptores do tipo D1 ativam a enzima adenilato ciclase via proteína Gs e também ativam a enzima fosfolipase C; os do tipo D2 inibem a adenilato ciclase via proteínas Gi e Go (MISSALE et al., 1998).

A maior via dopaminérgica no encéfalo é a via nigroestriatal a qual contém cerca de 80% da DA encefálica. Ela é formada por neurônios da *substantia nigra pars compacta* (SNc) com as terminações que inervam ricamente o núcleo caudado e o putâmen, dois núcleos que, em seu conjunto são denominados de neostriado ou estriado dorsal. O estriado é assim designado pelo aspecto listrado dos tratos de fibras brancas que correm por ele; a substância negra é assim denominada pela pigmentação negra decorrente da presença de neuromelanina (STANDAERT et al., 2009).

Existem também as chamadas vias meso-límbica e meso-cortical. Elas são formadas por neurônios do mesencéfalo denominada área tegmental ventral (VTA). Os neurônios dopaminérgicos da VTA têm projeções para o córtex préfrontal, o núcleo accumbens e outras estruturas límbicas. Essas estruturas desempenham um papel importante na motivação, em particular nos mecanismos de recompensa, no pensamento orientado para metas, na regulação do afeto (STANDAERT et al., 2009).

Existe também a via túbero-infundibular que termina no hipotálamo e regula a secreção de prolactina (PIVONELO et al, 2007).

1.3 O papel dos núcleos da base no controle neural do movimento

O corpo estriado faz parte dos núcleos da base. Ele é formado pelos núcleos caudado, putamen e pelo estriado ventral, sendo que esse último inclui o núcleo accumbens (GERFEN e SURMEIER, 2011). O estriado é o local onde

a DA está presente em maior concentração (BOLAM et al., 2000) e onde grande parte do processamento de informação relacionada à seleção de ações é efetuada. A DA desempenha um papel central na modulação desse sistema ao sinalizar quando movimentos dever ser executados para que se atinja um determinado objetivo com sucesso (STANDAERT et al., 2009). A variação na concentração sináptica da DA têm uma grande importância para a seleção de ações motoras, estados motivacionais e aprendizagem (SCHULTZ, DAYA e MONTAGNE, 1997).

Os neurônios de projeção do estriado pertence à classe denominada de "neurônios espinhosos médios". Essas células têm dendritos com uma alta densidade de espinhos. São nesses espinhos dendríticos que ocorrem as sinapses (glutamatérgicas) entre axônios de neurônios corticais e os neurônios espinhosos médios. Os neurônios espinhosos médios liberam o neurotransmissor GABA. Eles são divididos em duas classes de acordo com seu alvo de projeção: os da via direta fazem projeções diretas para os núcleos de saída dos núcleos da base – o globo pálido interno e substância negra parte reticulada (SNr). Já os neurônios espinhosos médios da via indireta fazem projeções indiretas via globo pálido externo (GPe) e núcleo subtalâmico (NST) para os mesmos núcleos de saída (GERFEN e SURMEIR, 2011).

Na DP, devido à depleção de DA no estriado, a transmissão sináptica entre os neurônios do córtex e os neurônios estriatais das vias direta e indireta encontra-se comprometida: a via direta apresenta uma redução na sua atividade e a via indireta um aumento. Como consequência a seleção e o início de ações motoras estão reduzidos. Isso explica a lentidão anormal dos movimentos observada nos pacientes com DP (BLANDINI et al., 2000).

1.4 Modelos animais da doença de Parkinson

A compreensão da patofisiologia da DP tem avançado em grande parte devido ao desenvolvimento de modelos animais dessa doença. Os principais modelos animais da DP foram desenvolvidos em macacos, ratos e camundongos. Os modelos por lesão neurotóxica de neurônios dopaminérgicos são muito utilizados por serem facilmente reprodutíveis e de menor custo (SCHWARTING e HUSTON, 1996(a), 1996(b)). Várias toxinas são utilizadas

para causar a lesão da via nigroestriatal, dentre essas estão a 6-hidroxidopamina, a rotenona e o 1- metil-4-fenil-2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) e modelos genéticos como por exemplo, a mutação na proteína α -sinucleína (BETARBET et al., 2002).

A 6-hidroxidopamina (6-OHDA) foi o primeiro agente químico descoberto com efeitos neurotóxicos em vias catecolaminérgicas (SACHS e JONSSON, 1975). A toxicidade induzida pela 6-OHDA é devida à interação preferencial pelos transportadores de dopamina e noradrenalina pela similariedade da molécula com estas (LUTHMAN et al. 1989). Dentro dos neurônios, a 6-OHDA acumula-se no citosol e induz a morte celular por apoptose (JEON et al., 1995). Já a rotenona é um pesticida e sua toxicidade em vias catecolaminérgicas é devido a inibição do complexo 1 da cadeia respiratória. Doses baixas com exposição crônica são suficientes para essa inibição.

Além de modelos que induzem à doença pela toxicidade gerada à via nigroestriatal, análises moleculares genéticas identificaram variantes em genes associados a proteínas como α -sinucleína (SNCA) e parkina (PARK2), por exemplo. A proteína α -sinucleína foi encontrada em corpos de Lewis e mutações nos genes. Então, modelos tem focado no uso de comundongos transgênicos ou drosófilas e no entendimento de como se dá essa mutação (BETARBET et al., 2002; DENG e YUAN, 2014).

1.5 O Modelo do MPTP

A neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) foi descoberta em 1983. Por algum tempo esta se tornou a principal toxina utilizada em modelos animais que mimetizam as características de parkinsonismo (BEAL et al., 2001).

O MPTP é altamente lipofílico; após atravessar a barreira hematoencefálica, é metabolizado a 1-metil-4-fenil-2,3-diidropiridina (MPDP) pela enzima monoamina oxidase B (MAO B) nas células da glia. Esse metabólito é então oxidado produzindo o metabólito 1-metil-4-fenilpiridina (MPP⁺), um potente agente oxidante (NICKLAS et al. 1985, 1987; PRZEDBORSKI e VILA, 2003).

O MPP⁺ tem afinidade pelos transportadores de DA e como os neurônios da SNc possuem concentração de transportador de dopamina extremamente alta, isto torna a região altamente susceptível à lesão por esta toxina. O MPP⁺ captado pelo neurônio se concentra na mitocôndria, onde inibe o complexo I da cadeia transportadora de elétrons, reduzindo a produção de ATP e aumentando as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. As espécies reativas de oxigênio causam degeneração das macromoléculas celulares, como a membrana plasmática ou o DNA. Esta degeneração inicia um ciclo que aumenta a síntese de espécies reativas de oxigênio, e causa morte por apoptose (SMEYENE et al., 2005; BEAL, 2001).

Assim, em 2001, no trabalho de Da Cunha et al., 2001, os animais lesados com MPTP apresentaram déficits na aprendizagem sem afetar a capacidade motora; desde esse primeiro modelo do estágio inicial da DP com a toxina, estudos posteriores observaram que os animais tratados com a toxina, apresentaram também, déficits específicos de memória de procedimentos e memória operacional. Porém, esses animais mantiveram a capacidade de aprendizagem para tarefas de memória espacial (MIYOSHI et al., 2002). Mesmo após 21 dias da infusão de uma alta dose da toxina (100µg/µL), os animais não apresentaram nenhuma alteração motora (REKSIDLER et al., 2007).

Desse modo, ratos tratados com MPTP apresentam-se como um bom modelo para mimetizar os sintomas não-motores da doença porque eles não apresentam alterações motoras grosseiras, o que não interfere com testes de funções cognitivas. Kalaria et al., 1987 sugere que a falta de efeito neurotóxico da administração sistêmica do MPTP é possível devido ao fato que as células endoteliais dos capilares sanguíneos do encéfalo de roedores têm altos níveis da enzima MAO-B. Estes autores afirmam também que a ligação irreversível entre o inibidor da MAO, [³H]Pargilina, foi 10 vezes maior em camundongos que em humanos e que a oxidação do MPTP a MPP⁺ foi 30 vezes maior em camundongos que em humanos. Dessa forma, quando o MPTP é administrado em roedores por uma via sistêmica a maior parte das moléculas são metabolizadas a MPP⁺ antes de chegar aos neurônios. Embora o MPP⁺ seja o composto neurotóxico, ele tem uma meia vida curta e é transformado em um metabólito não-tóxico antes de chegar aos neurônios.

Desse modo, muitos estudos comportamentais e bioquímicos validando o modelo do MPTP em ratos para estudos dos mecanismos e de tratamentos da DP têm sido publicados (SMEYENE et al., 2005; BEAL, 2001; PRZEDBORSKI et al. 2001). Em particular o modelo do MPTP em ratos têm sido bastante usado em estudos de *screening* de drogas para o tratamento de quadros demenciais associados à DP (HUANG et al., 2015; HSU et al., 2015; HO et al. 2014; DAS et al., 2014; CASTRO et al., 2013). Porém, em nenhum desses estudos foi feito um acompanhamento contínuo e de longa duração do fenótipo comportamental desses animais e das alterações neuroquímicas concomitantes. Nesse trabalho, usamos um equipamento que permite o monitoramento comportamental contínuo (em anexo, pg 60) para estudar as alterações induzidas pela administração de MPTP na SNc ratos por um período de 1 mês bem como concomitante análise de comportamentos do tipo depressivo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar a fenotipagem comportamental do modelo de parkinsonismo em ratos induzido pelo MPTP antes e após a lesão pela toxina.

2.2 Objetivo específico

Monitorar por três semanas e de forma contínua comportamentos sugestivos de déficits motores, motivacionais, de ritmo circadiano e de comportamentos do tipo depressivo decorrentes da lesão da substância negra *pars compacta* de ratos com MPTP.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

TITLE PAGE

Longitudinal analysis of the behavioral phenotype of rats treated with MPTP – a model of the early phase of Parkinson´s disease.

Lílian Juliana Lissner, Adam Sugi, Meira Maria Forcelini Machado, Laura Pulido, Debora Dalla Vechia, Roberto Andreatini, Bruno Jacson Martynhak, Claudio Da Cunha*

Departamento de Fisiologia e Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, 81530-350 Brazil.

* Corresponding author

Highlights

- Increase of locomotor activity as velocity in day 21 in light and dark phase
- Decrease of number of entries in feeding area in day 14 in dark phase

3.1 Abstract

Rats treated with the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) have been used as a model of cognitive deficits observed in the early phase of Parkinson's disease (PD). The main advantage of this model is that animals present the cognitive deficits observed in the early phase of PD, but not the gross sensorimotor deficits that could bias a possible impairment of the performance in cognitive tasks. The goal of the present study was to make a detailed and longitudinal follow up of immobility, locomotion, gait, rotations, and visits to areas of the home cage where the animals usually sleep, drink, and feed. 100 µg MPTP was bilaterally infused into the substantia nigra pars compacta of adult male Wistar rats. SHAM operated rats received intranigral infusion of saline. For 1 week before surgery and 3 weeks after surgery rats were individually housed in Noldus Phenotyper cages under a continuously video-tracking system (Ethovision). Although several scored behaviors varied along the time, MPTP and SHAM animals differed in very few locomotor parameters. They presented significantly increased locomotion 21 days after surgery in light and dark phase. The peaks of locomotor activity (acrophase) did not differ among groups. The preference for drinking sucrose was tested once a week and the time spent in the feeding and drinking areas was evaluated continuously. It had a decrease in number of entries in feeding area in dark phase on day 14. No significant difference among groups was observed for gait parameters analyzed in a Cat-Walk apparatus (Noldus). These findings provide a stronger support to the assumption that the MPTP rats do not present sensorimotor and motivational alterations that can affect the behaviors measured to evaluate cognitive impairment.

Keywords: Parkinson's disease; dementia; depression; akinesia; animal model; dopamine; sleep; chronobiology; biological rhythms.

3.2 Introduction

Parkinson disease (PD) is a disorder very common in geriatric population (the most prevalent neurodegenerative disease in elderly people after Alzheimer's disease) [1]. The most known clinical manifestations of PD are the locomotor alterations in the patients. People with PD gradually lose voluntary control of their movement which interferes with their life quality and wellbeing. Most early phase of PD patients present non-motor symptoms which include depression, cognitive deficits, sleep dysfunction, hyposmia, and dysautonomia [2, 3]. In later phases motor impairment signs contribute to worsen the quality life of PD patients. Motor symptoms include resting tremor, rigidity, slowness (bradykinesia) and postural instability [4].

At the cellular level idiopathic, PD consists of a progressive loss of dopaminergic cells of the substantia nigra pars compacta (SNc), and the formation of protein aggregates of α -synuclein into the neurons, forming the Lewy Bodies [5]. Neurons in SNc project to the neostriatum, a circuit related with control of voluntary movement, procedural learning, and motor action selection [6, 7]. Dopamine from the SNc has also being associated with reward processing and sleep regulation [8, 9]. Thus, the dopaminergic deficit resulting from the cell death may explain, at least in part, several of the symptoms seen in [10]. The exact cause of this neural loss is unknown, although it is probably the consequence of several risk factors including environmental and genetic alterations [11]. To this date there is no cure for PD and the golden treatment is the administration of levodopa (the dopamine precursor). However, levodopa does not prevent further neuronal loss, so it loses its effect over time; additionally, it has side effects such as hormonal alterations, allucinations, and dyskinesia with prolonged use [12]. So a better understanding of the etiology of the illness, and how the dopaminergic system contributes to the clinical manifestations, it is fundamental to reach better therapeutic options. In this regard, animal models represent a valuable tool for understanding the pathophysiology of PD.

The most common animal models used in PD research is the systemic or local injection of a toxin selective for dopaminergic neurons,

e.g., 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). This toxin is widely used in monkeys and mice and is injected subcutaneously. For unknown reasons, rats are less sensitive to the effects of MPTP than other species, so the administration for rats should be done locally into the SNc. This feature makes the rat model a good tool to study early stages of the disease when non-motor symptoms are more prominent and motor symptoms are less noticeable. The local SNc injection of MPTP in rats has been demonstrated to induce depressive-like behavior [13] circadian alterations [14] and minor motor impairment [15-18]. However, these studies have been done separately or in an acute way (one injection of drugs is made once and after some experiments are performed). In this case, the experiments are performed in different places than the animal live; thus, a full behavioral characterization of the effects of intra nigral MPTP in rats is still lacking.

The aim of this study was to perform a behavioral phenotyping of parkinsonian rats and characterize the circadian oscillations of basic behaviors such as feeding, drinking and locomotion within the home cage; as well as to evaluate the expression of motor symptoms and non-motor symptoms as depressive-like behavior. For this, we housed animals that received an intra nigral injection of MPTP and rats that underwent a sham surgery in the instrumented cage PhenoTyper[®] (Noldus, Wageningen, The Netherlands). The animals were recorded for 24 hours a day during 29 days, and their feeding, drinking, and locomotion behavior were registered; in addition, the preference for sucrose was also evaluated during these recordings as a measure of anhedonia (a well characterized manifestation of depressive-like behavior). Furthermore, the motor performance of the animals was assessed with the CATWALK (Noldus, Wageningen, The Netherlands) to identify any motor alterations.

3.3 Materials and methods

3.3.1 Animals

Thirty two adult male Wistar rats from our own breeding stock, weighing 280–310 g at the beginning of the experiments were used. The rats were housed one per cage on a 12-h/12-h light/dark cycle (lights on, 7:00 a.m.) with unlimited access to food and water in a PhenoTyper 4500 home cages (Noldus, Wageningen, Netherlands, <http://www.noldus.com/content/phenotyper>). The cages are 55cm high and have a floor area of 45 cm x 45 cm. In one of the back corners there were a 12 cm vs 14.5 cm black shelter with two openings. In the front of the cages there was a chow feeder and places for two water bottles (Fig. 1). The floor of the cages was covered with a black non-woven fabric which provided a better contrast between the animal and the background. The PhenoTyper is an observation cage that is optimized for video tracking. It is equipped with a top unit with a fully integrated with an infrared camera, infrared LED lights and with a high-pass filter blocking visible light. The infrared light makes tracking possible in the dark phase of the animal independent of the light cycle and is integrated with the tracking software. All behavioral testing carried out during the light phase of the cycle. All surgical and behavioral procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of the Universidade Federal do Parana (protocol number 907) and are consistent with the Brazilian law (Bill#11.794/8 October 2008) and the Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research (National Research Council 2003).

3.3.2 Experimental design

Rats were divided into two groups: SHAM (N=10) and MPTP (N=10). Seven days after the rats started living in the PhenoTyper homecages they were operated and returned to the homecages. Sucrose preference tests were carried out 4 days before surgery (basal) and on days 9 and 15 after surgery. Catwalk tests were carried out 3 days before surgery (basal) and on days 10 and 16 after surgery (Fig. 2).

Independent groups (N= 6) of rats received saline or 2 mg/kg (i.p) reserpine (N = 6) and were tested for sucrose preference.

3.3.3 Surgery

Seven days after habituation, the animals were divided into a control sham-operated group and and SNc-lesioned group of 10 animals per group. Rats received atropine sulfate (0.4 mg/kg, i.p.) and were anesthetized with 3 mL/kg equithesin (1% sodium thiopental, 4.25% chloral hydrate, 2.13% magnesium sulfate, 42.8% propylene glycol, and 3.7% ethanol in water). 100µg MPTP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) dissolved in 1 µL of saline was bilaterally infused into the SNc through a 30 gauge stainless needle at a rate of 0.33 µL/min at a site with the following coordinates adapted from the rat brain atlas (Paxinos and Watson, 1986): AP -5.0 mm, ML±1.8 mm, DV -8.0 mm from the bregma. In parallel, sham-operated rats were subjected to the same procedure, but were infused with 2 µl of saline instead of MPTP. Immediately after surgery, the rats received an intramuscular injection of penicillin-G procaine (0.2 ml, 20,000 IU) and were housed individually in home cages (45x45 cm) for 3 week e then behavioral phenotyping was analyzing.

3.3.4 Behavioral phenotyping

Animal were monitored 24 h a day during all the time they were inside the Noldus PhenoTyper home cages: 7 days before surgery (basal) and 21 days after surgery. Every 2 or 3 days they were kept out for 1-2 hs for cleaning the home cages or for other behavioral testing. Automated tracking was performed using the EthoVision 3.1 software (Spink et al., 2001). The following behavioral parameters were scored based on the position of the center of the rat body: travelled distance, velocity, time spent not moving (defined as the time locomotion velocity was < 0.0003 m/s), and number of clockwise and counterclockwise 360° round turns around the cage. The number of tight clockwise and counterclockwise (turns over the animal body axis) was scored based on the position of the nose and center of the animal's body. Immobility time

was defined as the time the shape of the animal body varied in less than 20% of the tracked pixels. In addition, the track of the center of the animal's body was used to score the time spent and frequency of visiting in the following areas of interest: shelter (sleeping area), periphery, and center of the cage (Fig. 2). In this analysis the areas close to the water bottles and food feeder were included as part of the periphery area. In another analysis the animal's nose was tracked to score the frequency and time the animals spent in the drinking and feeding areas (Fig. 1).

It was chosen dates the days -2, 7, 14 and 21 to compare the scores of the sham and MPTP group in these parameters. These days were chosen because in these days the animals were not submitted to the sucrose preference and catwalk tests and were not removed for cleaning the homecage.

3.3.5 Automated gait analysis (CatWalk test)

Rats were subjected to gait assesment with The CatWalk automated gait analysis system (Noldus information Technology, Wageningen, Netherlands, <http://www.noldus.com/animal-behavior-research/products/catwalk>). The apparatus comprises a long glass plate with a fluorescent light beamed into the glass walkway floor from one side. In a dim environment, the light is reflected downward and the footprints of the rat as it walks along the walkway are recorded by a camera mounted under the glass. The following gait parameters that were examined: max contact area (maximum area of a paw that comes into contact with the glass plate); base of support (width between the front paw and the hind paw); stride length (distance between successive placements of the same paw); swing (time between successive placements of the same paw); swing speed (speed of the paw during a swing); stance (duration of the contact of a paw with the glass plate).

3.3.6 Sucrose preference test

Sucrose preference is frequently used as measure of anhedonia in rodents (Papp et al., 1991; Wang et al., 2009). Each Phenotyper homecage was provided with two bottles of water. The difference the weight each bottles in an interval of 24 h was taken as a measure of water consumption. In the next day one bottle was randomly switched to contain 1% sucrose solution. The sum of water consumption and sucrose consumption was defined as the total intake. The percentage of sucrose intake was calculated by using the following equation ($\% \text{ sucrose preference} = \text{sucrose intake} \times 100 / \text{total intake}$) [19]. As a positive control two independent groups of non-operated rats were placed to live in the PhenoTyper home cages for 12 days. Basal water consumption was measured on days 3 and 10 and the sucrose preference was tested on days 4 and 11. On day 11 half of the rats received i.p. injections of saline (N = 6) and the other half received 2 mg/kg reserpine (Sigma-Aldrich, N = 6).

3.4 Statistical analysis

Statistical differences among groups were calculated by two way ANOVA with repeated measure and were considered significant when $p < 0.05$.

3.5 Results

The partial lesion of the rat SNc with MPTP did not affect most of the evaluated behavioral parameters (Table I). The only significant lesion effects detected by two-way ANOVA were on velocity scored during the light phase and dark phase (Table I). Post-hoc analysis showed that 21 days after surgery MPTP rats travelled a significant higher velocity than SHAM rats (Fig. 3). No significant lesion effects were detected for the measured scores of exploratory behavior (Fig. 4), acrophase (Fig. 5), turning behavior (Fig. 6, Fig. 7), immobility (Fig. 8); drinking behavior (Fig. 10), gait parameters (Fig. 11, Fig. 12, and Fig. 13) and sucrose preference (Fig. 14). Reserpine treatment was used as a positive control.

It induced a reduction in sucrose preference as expected less sucrose preference compared to untreated rats (Fig. 14). It have also a significant decrease in number of entries in feeding area in day 14 (Fig. 9);

Two-way ANOVA detected significant time effects on several scores (Table I). Significant temporal changes in relation to the surgery day were different for the SHAM and MPTP rats for the following parameters: time spent in the peripheral, central, and shelter areas during the light phase and dark phase (Fig. 4); distance travelled during the light phase (Fig. 3); number of axial rotations (Fig. 6);

3.6 Discussion

The main result of this study is that in the rat MPTP model of the early phase of PD the animals present very few motor deficits. Although we carried out a detailed analysis of the behavioral phenotype, the only an increase of velocity was detected on 21 days after surgery.

This result is in agreement with previous studies showing that three weeks after bilateral infusion of a high dose of MPTP in the substantia nigra of rats, they do not present gross motor deficits [20-23]. This behavioral phenotype suggests that intranigral administration of MPTP in rats is a good model to study the cognitive deficits that occur in the early phases of PD, before gross motor impairments are evident. Motor impairments would interfere with the motor performance of the behaviors which are scored as an index of learning and memory.

In the present study, we have conducted a continuous and detailed analysis of how locomotion, immobility, gait, rotations and visits to different areas of the home cage changed before and after MPTP infusion into the SNc. These parameters were scored in both light and dark phases. Differently from most studies in which locomotion was evaluated acutely in a novel environment, we observed only a mild decrease in locomotor activity between 2 and 3 weeks after surgery. The results of the present study were different from a previous study in which locomotor activity of MPTP rats were scored for 5 min in an open field 1, 7, 14 and 21 days after surgery [25-28]. Reksidler et al. study reported that locomotor activity of MPTP rats was decreased 1 day after surgery,

increased 7 and 14 days after surgery and normal 21 days after surgery. This study also reported increased immobility of MPTP rats 7 and 14 days after surgery. A study by [29] surgery reported reduced locomotor activity and increased immobility 1, 7, and 14 days after adult rats received the same dose of MPTP into the SNc. Another study by [30] reported impaired motor activity 7 days after infusion of MPTP into the rat medial forebrain bundle of 12-month old rats. Different of Hacıoglu et al study, young adult rats were used in the present and in the other studies cited above. In addition, differences between the previous and the present study may be related to the conditions under which locomotor activity were scored. When the animals are transferred from their home cage to an open field other factors such as stress and novelty may affect exploratory behavior.

Activity of rats in different areas of the home cage may be affected by anxiety-related behaviors (activity in the central vs periphery areas) pattern of sleep (time spent in the shelter), feeding and drinking behaviors (visits to the areas close to the feeder and water bottles). In the present study the MPTP rats were not different of the SHAM rats in none of these scores. The MPTP rats just differ from the SHAM rats in number of visits in the feeding area in dark phase. These results suggest that MPTP rats present no alteration in anxiety-like behavior, sleep pattern, and motivation for consuming water, sucrose and food. This is important for studies in which these animals are used to test the effects of different treatments on Parkinson-related cognitive deficits [31-34]. However, this finding must be taken with some caution. Absence of anxiety-like and depression like behaviors in the home cage does not mean that the MPTP rats they will not show such behaviors in tests carried out elsewhere. Indeed, some studies have shown increased anxiety-like behaviors in MPTP rats tested in the elevated plus maze test [35-37]. In addition, although we did not detected a reduction in sucrose preference in the MPTP rats, previous studies have reported depressive-like behaviors of MPTP rats in the forced-swimming test [38, 39]. Another study reported that MPTP rats lost sucrose preference when tested 7 and 21 days after surgery [40]. Different of the present study, these animals were kept with cage mates and transferred to a different cage in which they were isolated only during the test day.

MPTP infusion did not induce changes in the circadian locomotor activity under regular light/dark cycle. While changes in circadian rhythms are found in PD patients, it is not consistently observed in animal models of PD [41]. For example, systemic administration of MPTP in mice lengthened the period of the endogenous circadian locomotor [42] a phenotype that we propose to be associated with depressive-like behavior [43]. On the other hand, another group did not find any major alteration after acute or chronic systemic MPTP treatment in mice, despite 70% loss of dopaminergic neurons [44] mouse models of Parkinson's disease). Thus, even considering the same drug and administration route, the results can be conflicting.

Changes in the sleep-wake cycle are often observed in animal models of PD. The loss of dopaminergic neurons in the CNS caused by the intranigral lesion of the MPTP toxin promoted several changes in REM sleep in rats neurons [45]. Since we did not observe any changes in the circadian rhythms, one could say that sleep changes in PD are not directly related to changes in the circadian rhythms seen in patients. Another hypothesis, is that circadian alterations are more likely to be observed in a later stage of the disease. Nonetheless, it is important to notice that changes in the light dark/cycle in mice led to an increased response to the toxic effects of systemic MPTP administration [46]. Therefore, even though an alteration in the circadian rhythms does not seem to be a marker of an early stage of PD, it might comprise a risk factor for the development of PD.

In summary, the MPTP-lesioned rats can be considered a good model of early phase PD and combine with the behavioral phenotyping is possible investigates more detailed the relationship between recovery process and corresponding behavioral changes.

3.7 Acknowledgements

This study was supported by grants from CAPES

4 References

- [1] Reeve A, Simcox E, Turnbull D. Ageing and Parkinson's disease: Why is advancing age the biggest risk factor? *Ageing Research Reviews* 2014; 14:1930
- [2] Chaudhuri KR, Odin P, The challenge of non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Prog Brain Res* 2010; 184: 325–41
- [3] Da Cunha C., Wietzikoski EC., Bortolanza, M., Dombrowski, PA., Dos Santos LM., Boschen SL, Miyoshi E, Vital MA, Boerngen-Lacerda R, Andreatini R. Non-motor function of the midbrain dopaminergic neurons. *J Neural Transm Suppl.* 2009; (73):147-60
- [4] Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, and Lees, AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J. Neurol. Neurosur. Psych.* 1992; 55:181–184
- [5] Dehay B, Bourdenx M1, Gorry P, Przedborski S, Vila M, Hunot S, Singleton A, Olanow CW, Merchant KM, Bezard E, Petsko GA, Meissner WG. Targeting alpha-synuclein for treatment of Parkinson's disease: mechanistic and therapeutic considerations. *Lancet neurology* 2015; 14(8): 855-866
- [6] Da Cunha C., Wietzikoski EC., Dombrowski, P., Santos, LM., Bortolanza M, Boschen SL, Miyoshi E Learning processing in the basal ganglia: A mosaic of broken mirrors. *Behavioural Brain Research* 2009; 199:156-169
- [7] Grillner S, Robertson B. The basal ganglia downstream control of brainstem motor centres - an evolutionarily conserved strategy. *Current opinion in neurobiology* 2015; 33:47-52
- [8] Ikemoto S, Yang C, Tan. A Basal ganglia circuit loops, dopamine and motivation: A review and enquiry. *Behavioural Brain Research* 2015; 290:17-31
- [9] Lazarus M, Chen JF, Urade Y, Huang ZL. Role of the basal ganglia in the control of sleep and wakefulness. *Current opinion in neurobiology* 2013; 23(5): 780-785
- [10] Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos, R AI, Steur E, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 2013; 24: 197-211
- [11] Trinh J, Farrer M. Advances in the genetics of Parkinson's disease. *Nature reviews neurology* 2013; 9(8):445 454
- [12] Connolly BS, Lang AE. Pharmacological Treatment of Parkinson Disease: a Review. *JAMA* 2014; 311(16):1670-83
- [13] Santiago, R. M., Barbieiro, J., Lima M. M.S.; P. A. Dombrowski, P. A; Andreatini, R.; Vital, M. A.B.F. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2010; 34:1104–1114
- [14] Lima M.M.S, Andersen M.L, Reksidler A.B., Vital M.A.B.F., Tufik S. The role of the substantia nigra pars compacta in regulating sleep patterns in rats. *PLoS ONE* 2007;16: e513
- [15] Da Cunha C, Gevaerd MS, Vital M, Miyoshi E, Andreatini R, Silveira R, Takahashi RN, Canteras NS. Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. *Behavioural Brain Research*, 2001;124:9-18

- [16] Da Cunha C, Angelucci MEM, Canteras NS, Wonnacott S, Takahashi RN (2002), The lesion of the rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons as a model for Parkinson's disease memory disabilities. *Cellular and Molecular Neurobiology* 22:227-237.
- [17] Ferro MM, Bellissimo MI, Anselmo-Franci JA, Angellucci MEM, Canteras NS, 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* 2005;148:78-87
- [18] Perry JC, Da Cunha C, Anselmo-Franci J, Andreatini R, Miyoshi E, Tufik S, Vital M. Behavioural and neurochemical effects of phosphatidylserine in MPTP lesion of the substantia nigra of rats. *European Journal of Pharmacology* 2004; 484:225-233
- [19] Slattery DA., Markou A, Cryan JF. Evaluation of reward processes in an animal model of depression. *Psychopharmacology* 2007; 190:555–568]
- [20] Da Cunha C, Gevaerd MS, Vital M, Miyoshi E, Andreatini R, Silveira R, Takahashi RN, Canteras NS. Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. *Behavioural Brain Research*, 2001;124:9-18
- [21] Da Cunha C, Angelucci MEM, Canteras NS, Wonnacott S, Takahashi RN The lesion of the rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons as a model for Parkinson's disease memory disabilities. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2002; 22:227-237
- [22] Ferro MM, Bellissimo MI, Anselmo-Franci JA, Angellucci MEM, Canteras NS, 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* 2005;148:78-87
- [23] Perry JC, Da Cunha C, Anselmo-Franci J, Andreatini R, Miyoshi E, Tufik S, Vital M. Behavioural and neurochemical effects of phosphatidylserine in MPTP lesion of the substantia nigra of rats. *European Journal of Pharmacology* 2004; 484:225-233
- [24] Reksidler AB, Lima MMS, Zanata SM, Machado HB, da Cunha C, Andreatini R, Tufik S, Vital M. The COX-2 inhibitor parecoxib produces neuroprotective effects in MPTP-lesioned rats. *European Journal of Pharmacology* 2007; 560:163-175
- [25] Reksidler A.B.; Lima, M. M. S ; Dombrowski, P. ; Andersen, M. L. ; Zanata SM ; Andreatini, R. ; Tufik S ; Vital, M. A. B. F. . Repeated intranigral MPTP administration: a new protocol of prolonged locomotor impairment mimicking Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience Methods* 2008; 167: 268-277,
- [26] Perry JC, Hipolide DC, Tufik S, Martins RD, Da Cunha C, Andreatini R, Vital M Intra-nigral MPTP lesion in rats: Behavioral and autoradiography s Lima MDS, Reksidler AB, Zanata SM, Machado HB, Tufik S, Vital M. Different parkinsonism models produce a time-dependent induction of COX-2 in the substantia nigra of rats. *Brain Research* 2006; 1101:117-125.
- [27] Lima MDS, Reksidler AB, Zanata SM, Machado HB, Tufik S, Vital M. Different parkinsonism models produce a time-dependent induction of COX-2 in the substantia nigra of rats. *Brain Research* 2006; 1101:117-125.
- [28] Santiago, R. M., Barbieiro, J., Lima M. M.S.; P. A. Dombrowski, P. A; Andreatini, R.; Vital, M. A.B.F. Depressive-like behaviors alterations induced by

- intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2010; 34:1104–1114
- [29] Xu CL, Wang QZ, Sun LM, Li XM, Deng JM, Li LF, Zhang J, Xu R, Ma SP. Asiaticoside: Attenuation of neurotoxicity induced by MPTP in a rat model of Parkinsonism via maintaining redox balance and up-regulating the ratio of Bcl-2/Bax. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2012; 100:413-418
- [30] Hacıoglu G, Seval-Celik Y, Tanrıover G, Özsoy O, Saka-Topcuoglu E, Balkan S, Agar A. Docosahexaenoic acid provides protective mechanism in bilaterally MPTP-lesioned rat model of Parkinson's disease. *Folia Histochemica Et Cytobiologica* 2012; 50:228-238.
- [31] Huang CK, Chang YT, Amstislavskaya TG, Lin CL, Hung CS, Lai TJ, Ho YJ. Synergistic effects of ceftriaxone and erythropoietin on neuronal and behavioral deficits in an MPTP-induced animal model of Parkinson's disease dementia *Behavioural brain research* 2015;294:198-207
- [32] Ho SC, Hsu CC, Pawlak CR, Tikhonova MA, Lai TJ, Amstislavskaya TG, Ho YJ. Effects of ceftriaxone on the behavioral and neuronal changes in an MPTP-induced Parkinson's disease rat model *Behavioural brain research* 2014; 268:177-184
- [33] Das NR, Gangwal RP, Damre MV, Sangamwar AT, Sharma SS1. A PPAR-beta/delta Agonist is Neuroprotective and Decreases Cognitive Impairment in a Rodent Model of Parkinson's Disease. *Current neurovascular research* 2014; 11(2):114-24
- [34] Castro AA, Wiemes BP, Matheus FC, Lapa FR, Viola GG, Santos AR, Tasca CI, Prediger RD. Atorvastatin improves cognitive, emotional and motor impairments induced by intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in rats, an experimental model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 2013; 1513:103-16
- [35] Wang WF, Wu SL, Liou YM, Wang AL, Pawlak CR, Ho YJ MPTP.Lesion Causes Neuroinflammation and Deficits in Object Recognition in Wistar Rats *Behavioral neuroscience* 2009; 123(6): 1261-1270
- [36] Sy HN, Wu SL, Wang WF, Chen CH, Huang YT, Liou YM, Chiou CS, Pawlak CR, Ho YJ. MPTP induced dopaminergic degeneration and deficits in object recognition in rats are accompanied by neuroinflammation in the hippocampus. *Pharmacology biochemistry and behavior* 2010; 95(2) 158
- [37] Ho YJ1, Ho SC, Pawlak CR, Yeh KY. Effects of D-cycloserine on MPTP induced behavioral and neurological changes: Potential for treatment of Parkinson's disease dementia. *Behavioural brain research* 2011; 219 (2):280-290
- [38] Castro AA, Wiemes BP, Matheus FC, Lapa FR, Viola GG, Santos AR, Tasca CI, Prediger RD. Atorvastatin improves cognitive, emotional and motor impairments induced by intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in rats, an experimental model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 2013; 1513:103-16
- [39] Moreira EL, Rial D, Aguiar AS Jr, Figueiredo CP, Siqueira JM, DalBó S, Horst H, de Oliveira J, Mancini G, dos Santos TS, Villarinho JG, Pinheiro FV, Marino-Neto J, Ferreira J, De Bem AF, Latini A, Pizzolatti MG, Ribeiro-do-Valle RM, Prediger RD. Proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* Baill confers neuroprotection in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine rat model of Parkinson's disease *Journal of neural transmission* 2010; 117(12):1337-1351

- [40] Santiago, R. M., Barbieiro, J., Lima M. M.S.; P. A. Dombrowski, P. A.; Andreatini, R.; Vital, M. A.B.F. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2010; 34:1104–1114
- [41] Videnovic A, Willis GL. Circadian system - A novel diagnostic and therapeutic target in Parkinson's disease? *Mov Disord.* 2016; 31(3):260-9
- [42] Tanaka M, Yamaguchi E, Takahashi M, Hashimura K, Shibata T, Nakamura W, Nakamura TJ. Connolly BS, Lang AE. Pharmacological Treatment of Parkinson Disease: a Review. *JAMA* 2014; 311(16):1670-83
- [43] Martynhak BJ, Pereira M, de Souza CP, Andreatini R. Stretch, Shrink, and Shatter the Rhythms: The Intrinsic Circadian Period in Mania and Depression. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2015; 14(8):963-9
- [44] Fifel K, Dkhissi-Benyahya O, Cooper HM. Lack of long-term changes in circadian, locomotor, and cognitive functions in acute and chronic MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) mouse models of Parkinson's disease. *Chronobiol Int.* 2013; 30(6):741-55
- [45] Lima M.M.S, Andersen M.L, Reksidler A.B., Vital M.A.B.F., Tufik S. The role of the substantia nigra pars compacta in regulating sleep patterns in rats. *PLoS ONE* 2007;16: e513
- [46] Lauretti E, Di Meco A, Merali S, Praticò D. Circadian rhythm dysfunction: a novel environmental risk factor for Parkinson's disease. *Mol Psychiatry.*, 2016

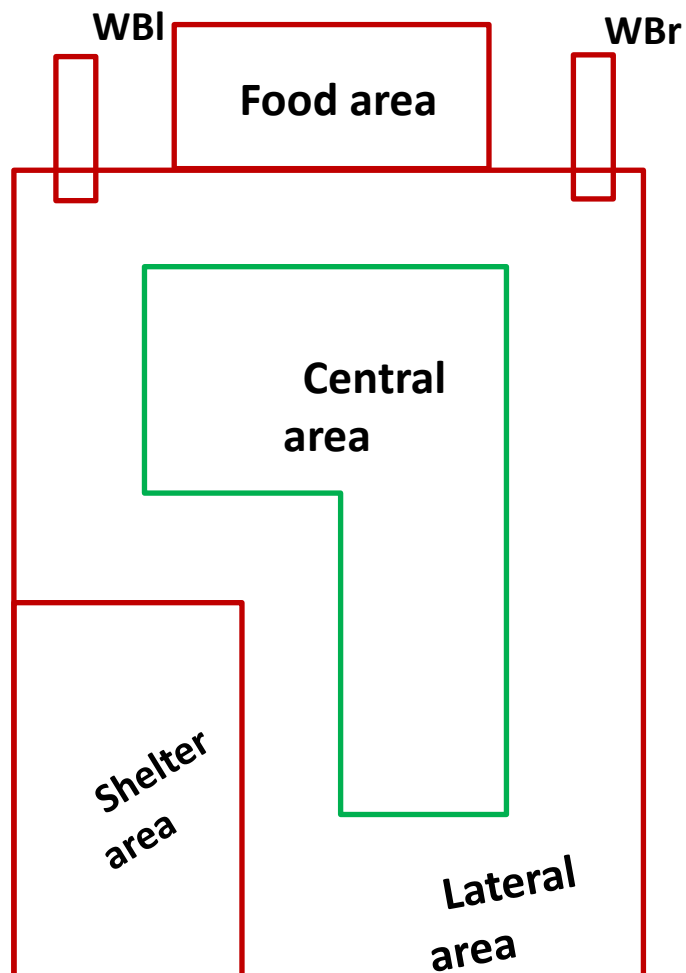
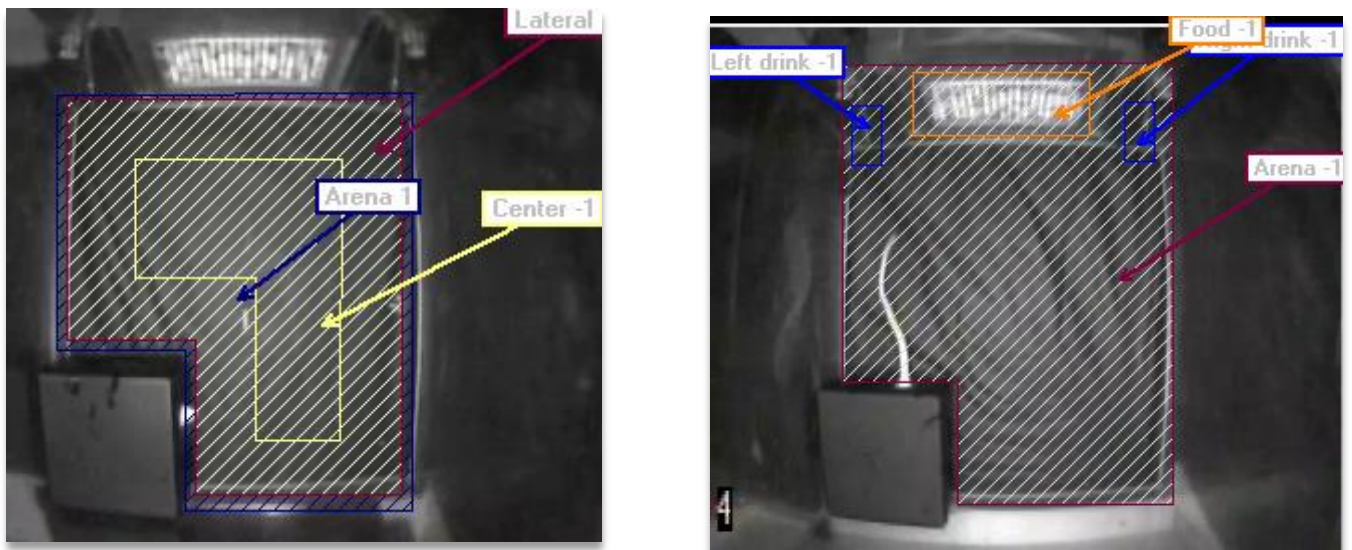


Fig. 1. Illustration showing the areas of interest in which the behavioral parameters were scored WBI (Left water bottle); WBr (Right water bottle).

Figure 2.

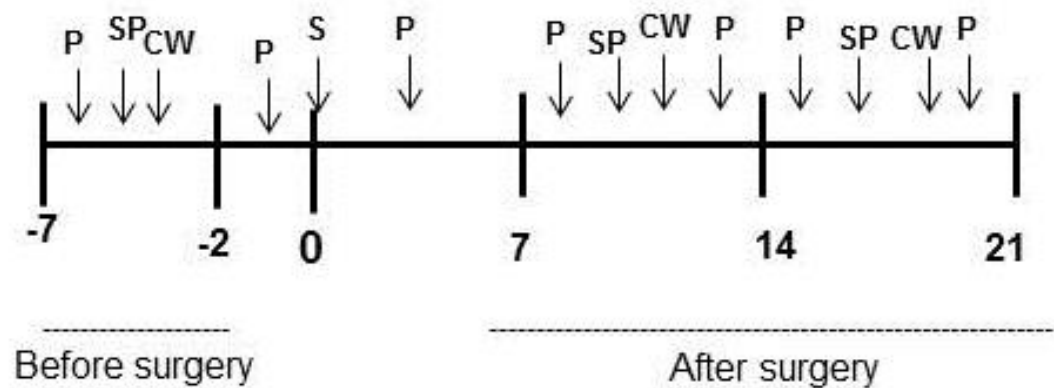


Fig 2. Experimental timeline. Arrows indicate when the animals were operated to infuse MPTP into the SNc (surgery,S), when one of the bottles of water was replaced by a bottle with 1% sucrose solution (sucrose preference test, SP), when the rats were removed from the Phenotyper home cage (P) and tested in the Catwalk apparatus (CW) .

Figure 3.

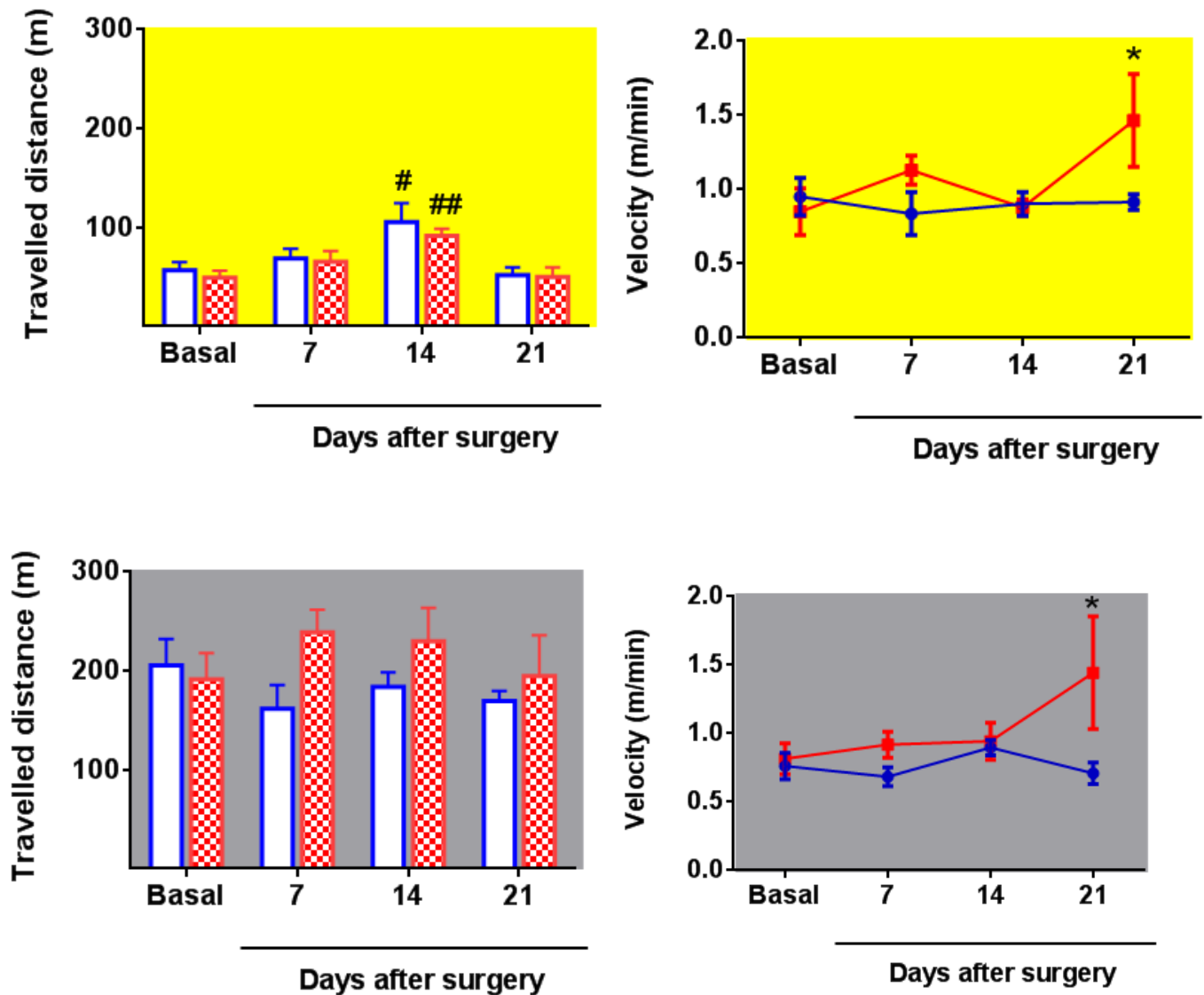


Fig. 3. Effect of the partial lesion of the SNc on locomotor activity. Data represent the mean \pm S.E.M. Top graphics: scored during the light phase of the day; bottom graphics: scored during the dark phase. * $P < 0.05$ compared to group sham; # $P < 0.05$ compared time of sham group (basal) and ## $P < 0.05$ compared MPTP (7) (ANOVA followed by the Bonferroni's test).

Figure 4.

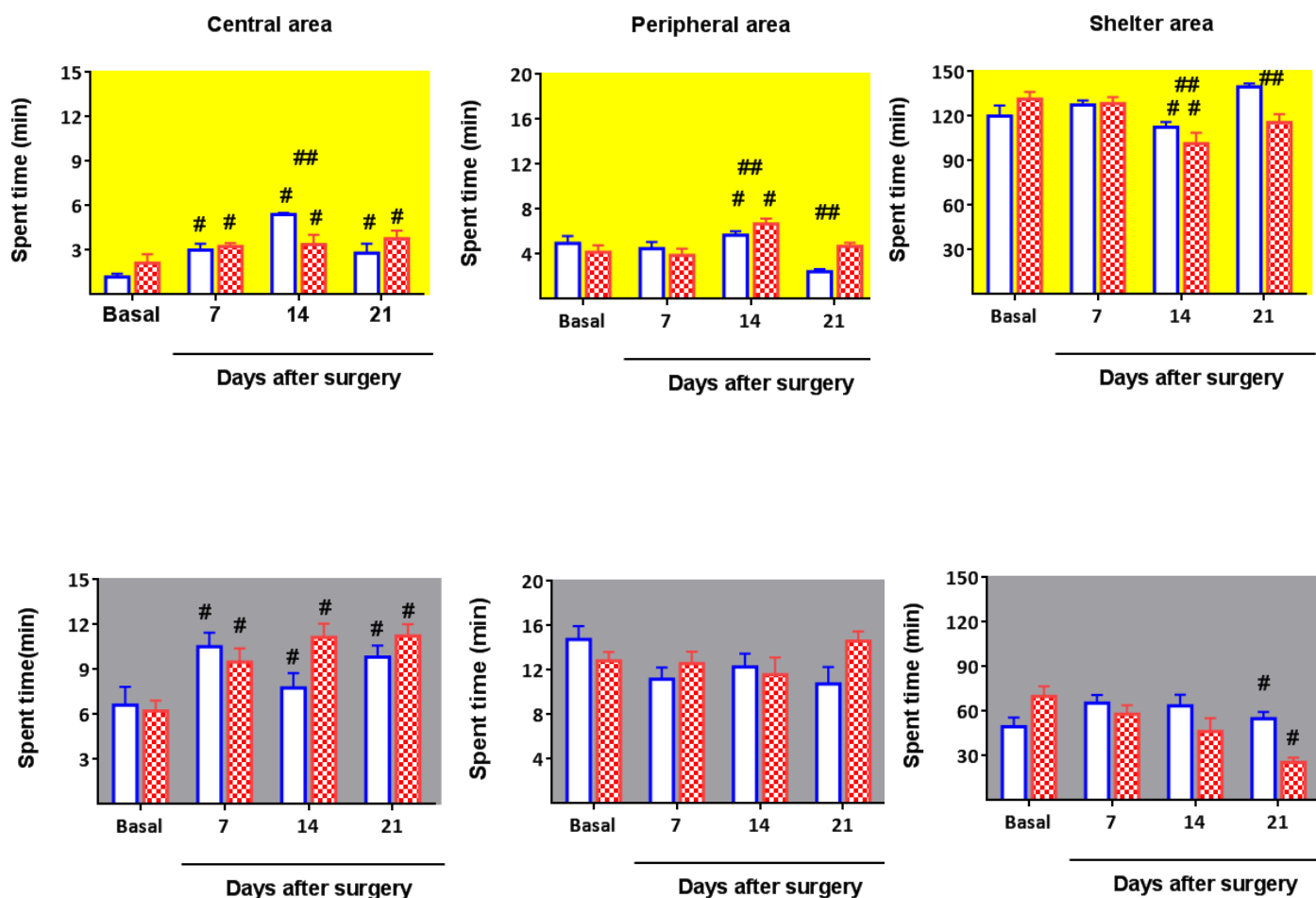


Fig. 4. Effect of the partial lesion of the SNc on exploratory behavior. Data are expressed as mean \pm SEM. Top graphics: scored during the light phase of the day; bottom graphics: scored during the dark phase. Two-way ANOVA showed no significant difference among groups. # $P < 0.05$ compared time of sham group (basal) and ## $P < 0.05$ compared time on MPTP and SHAM (ANOVA followed by the Bonferroni's test).

Figure 5.

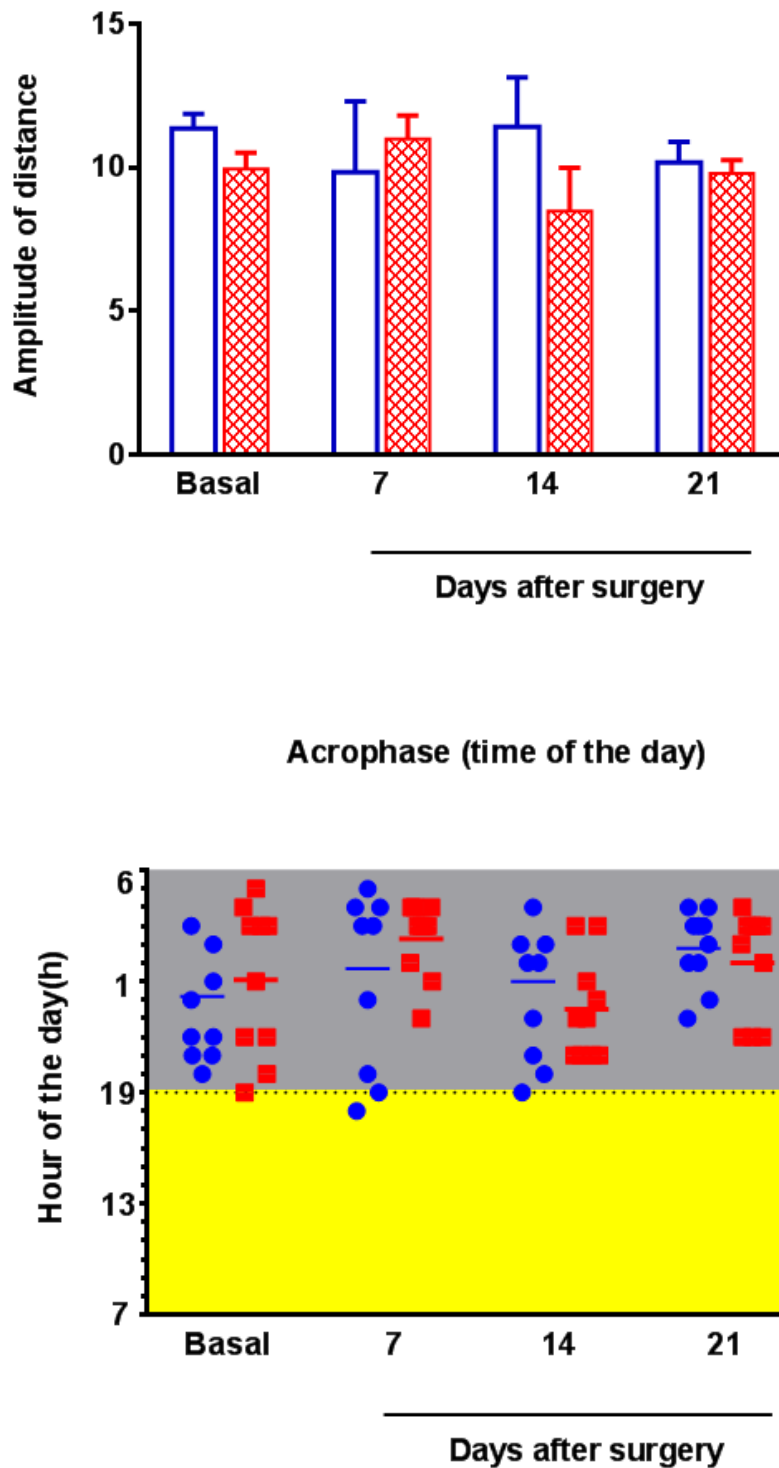


Fig. 5. Effect of the partial lesion of the SNc on time of the day that rats presented higher locomotor activity (acrophase). Data are expressed as mean \pm SEM. Two-way ANOVA showed no significant difference among groups.

Figure 6.

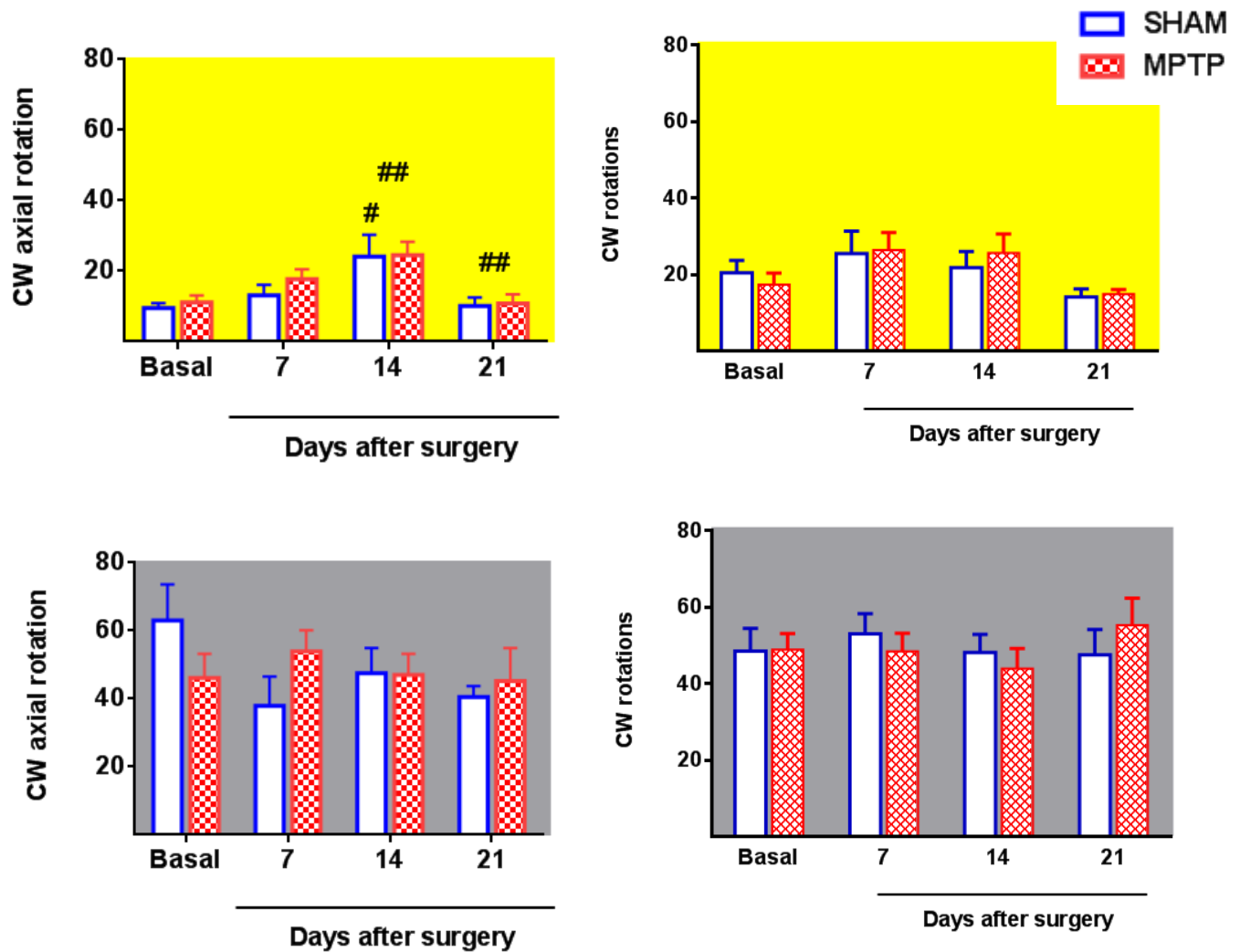


Fig. 6. Effect of the partial lesion of the SNc on the number of clockwise (CW) rotations. Data are expressed as mean \pm SEM. Top graphics: scored during the light phase of the day; bottom graphics: scored during the dark phase. . * P < 0.05 compared to group sham (basal) and ## P < 0.05 compared SHAM and MPTP (ANOVA followed by the Bonferroni's test).

Figure 7.

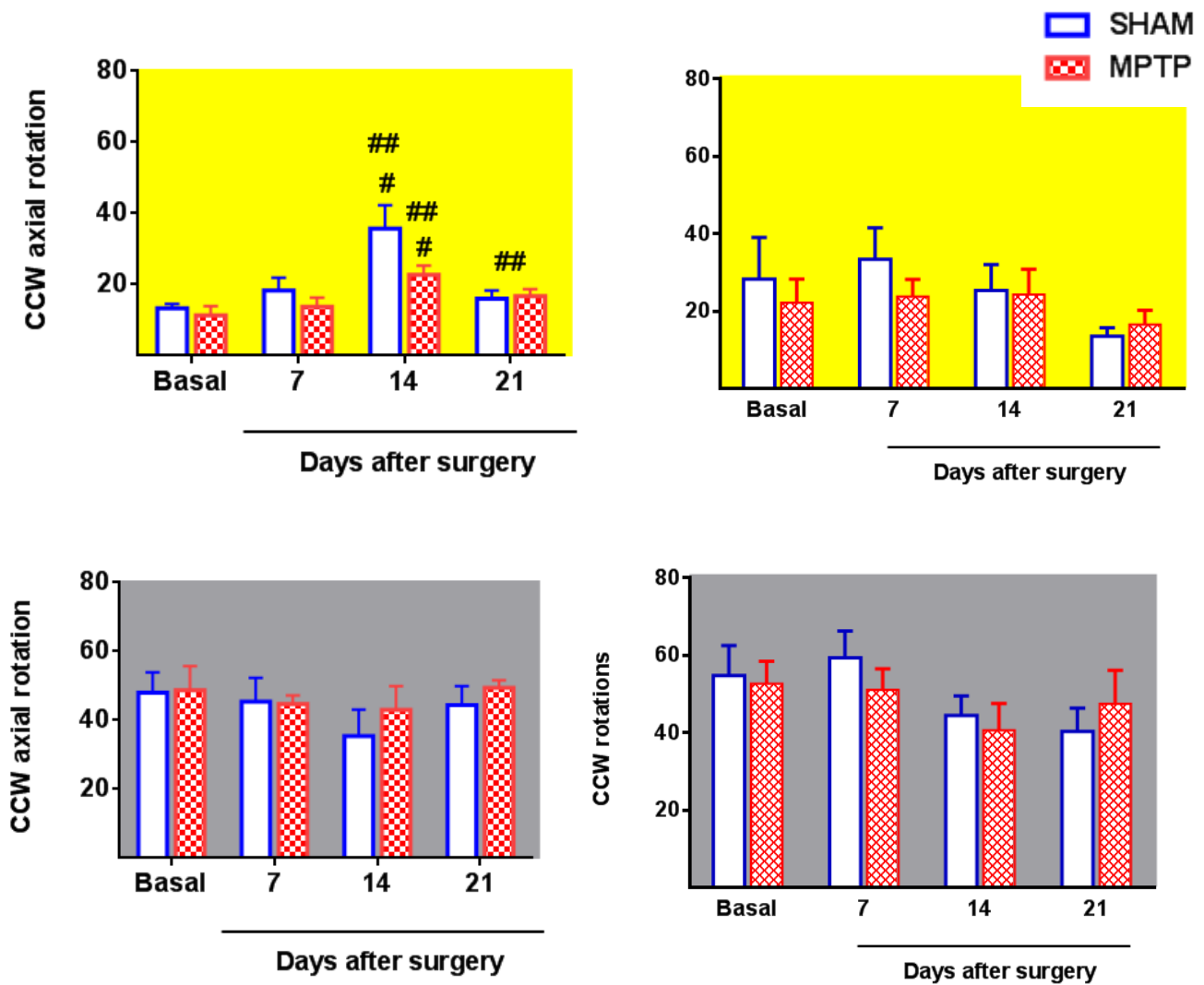


Fig. 6. Effect of the partial lesion of the SNc on the number of clockwise (CW) rotations. Data are expressed as mean \pm SEM. Top graphics: scored during the light phase of the day; bottom graphics: scored during the dark phase. . * P < 0.05 compared to group sham (basal) and ## P < 0.05 compared SHAM and MPTP (ANOVA followed by the Bonferroni's test).

Figure 8.

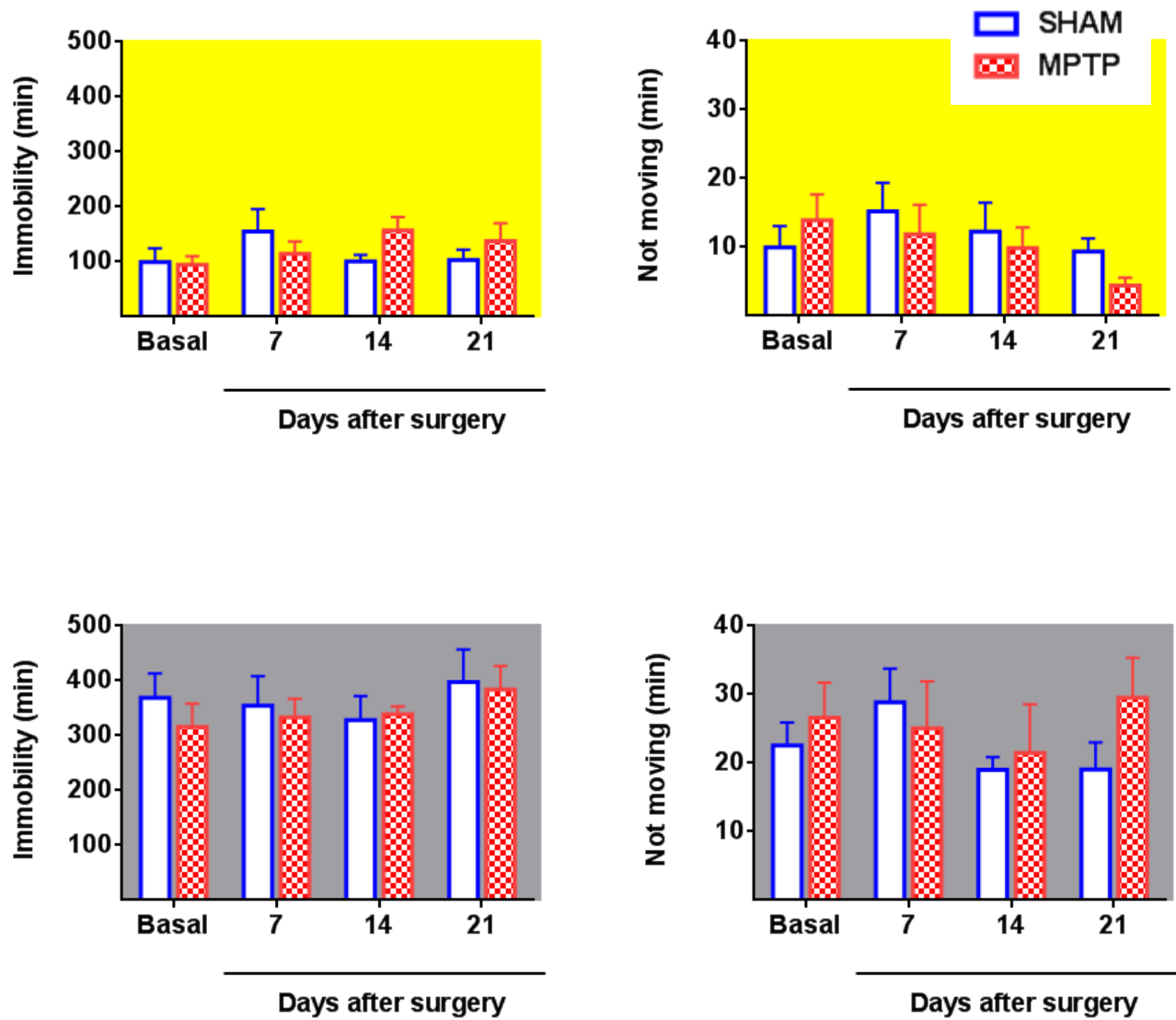


Fig. 8. Effect of the partial lesion of the SNc on immobility. Data are expressed as mean \pm SEM. Top graphics: scored during the light phase of the day; bottom graphics: scored during the dark phase. Two-way ANOVA showed no significant difference among groups.

Figure 9.

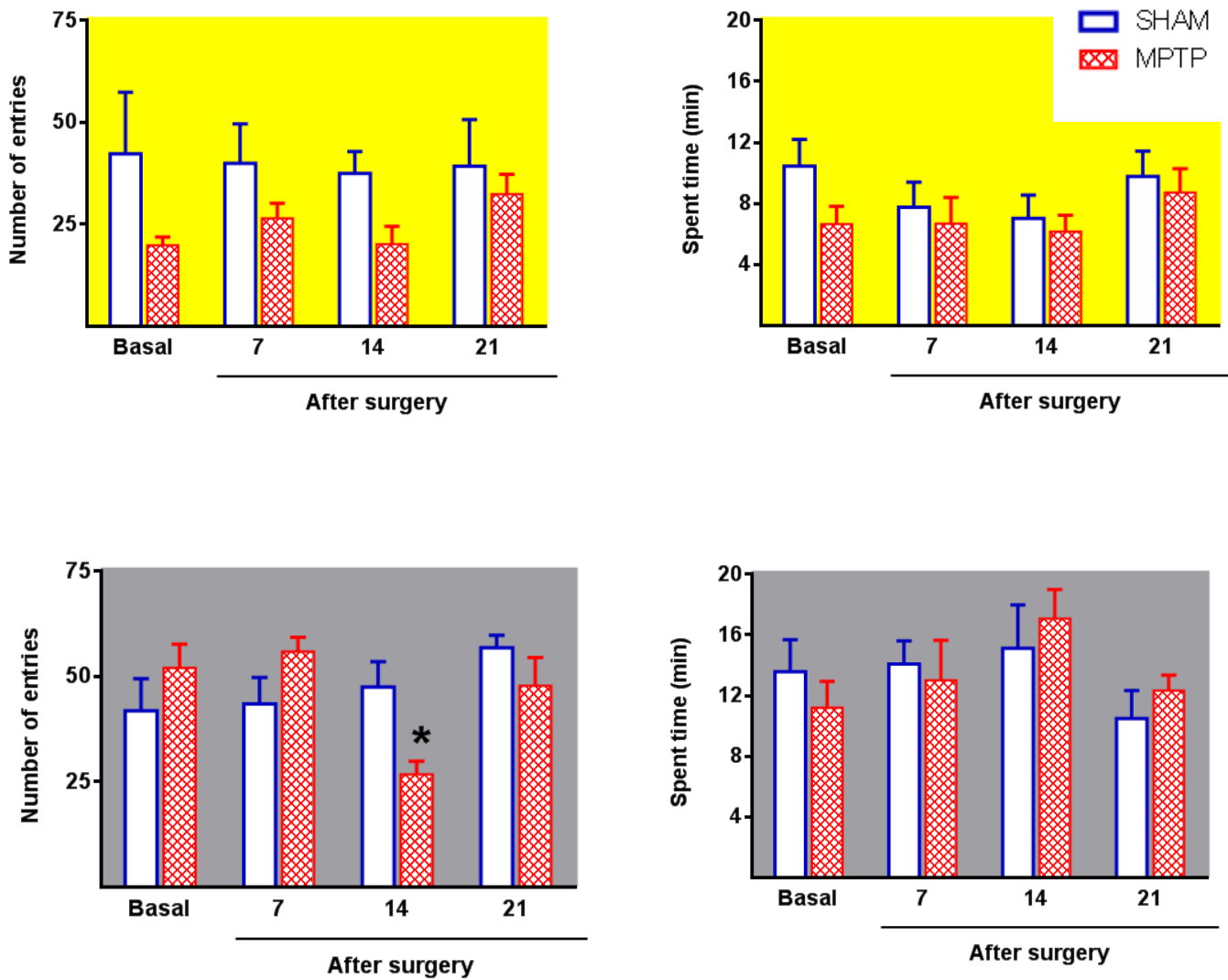


Fig. 9. Effect of the partial lesion of the SNc on eating behavior. Data express mean \pm SEM number of entries and time spent in the feeding area. Top graphics: scored during the light phase of the day; bottom graphics: scored during the dark phase. * $P < 0.05$ compared to group sham (two-way ANOVA followed by the Bonferroni's test)

Figure 10.

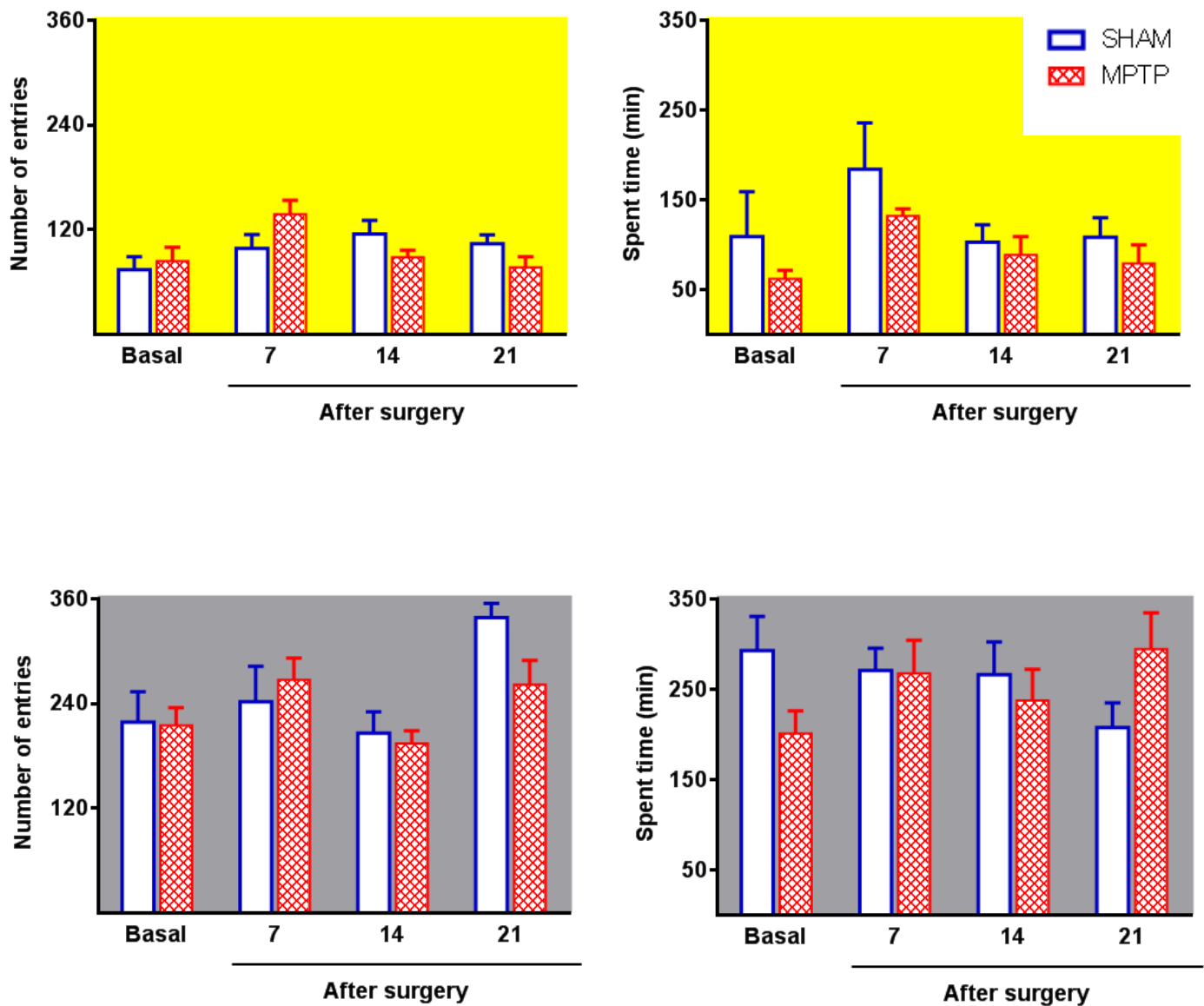


Fig. 10. Effect of the partial lesion of the SNc on drinking behavior. Data express mean \pm SEM visits and time spend in the area close to the bottles of water. Top graphics: scored during the light phase of the day; bottom graphics: scored during the dark phase Two-way ANOVA showed no significant difference among groups.

Figure 11.

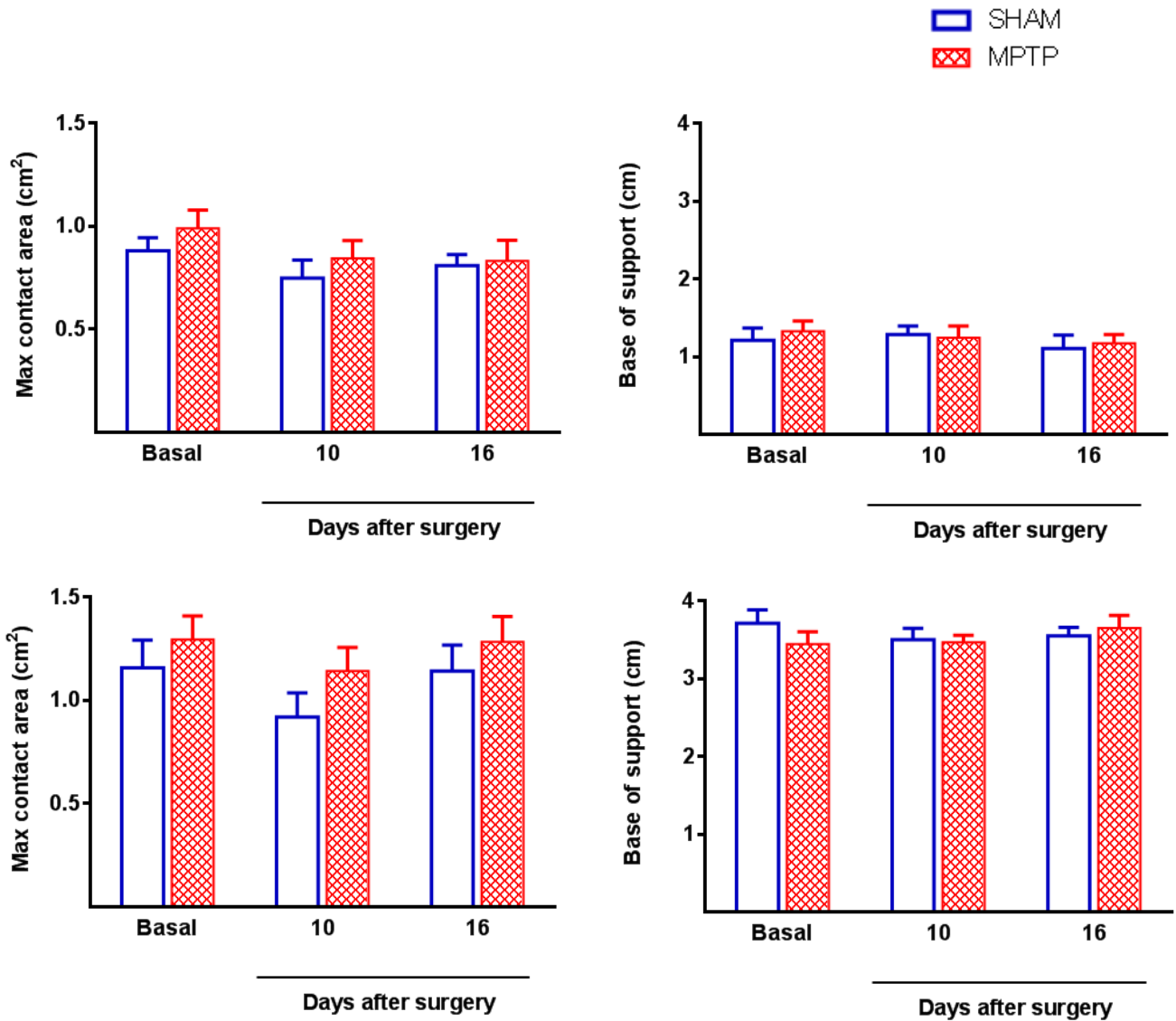


Fig. 11. Effect of the partial lesion of the SNc gait parameters: paws' contact area and base of support. Data are expressed as mean \pm SEM. Top graphics: scored of forepaw of the animal; bottom graphics: scored of hindpaws of the animal. Two-way ANOVA showed no significant difference among groups.

Figure 12.

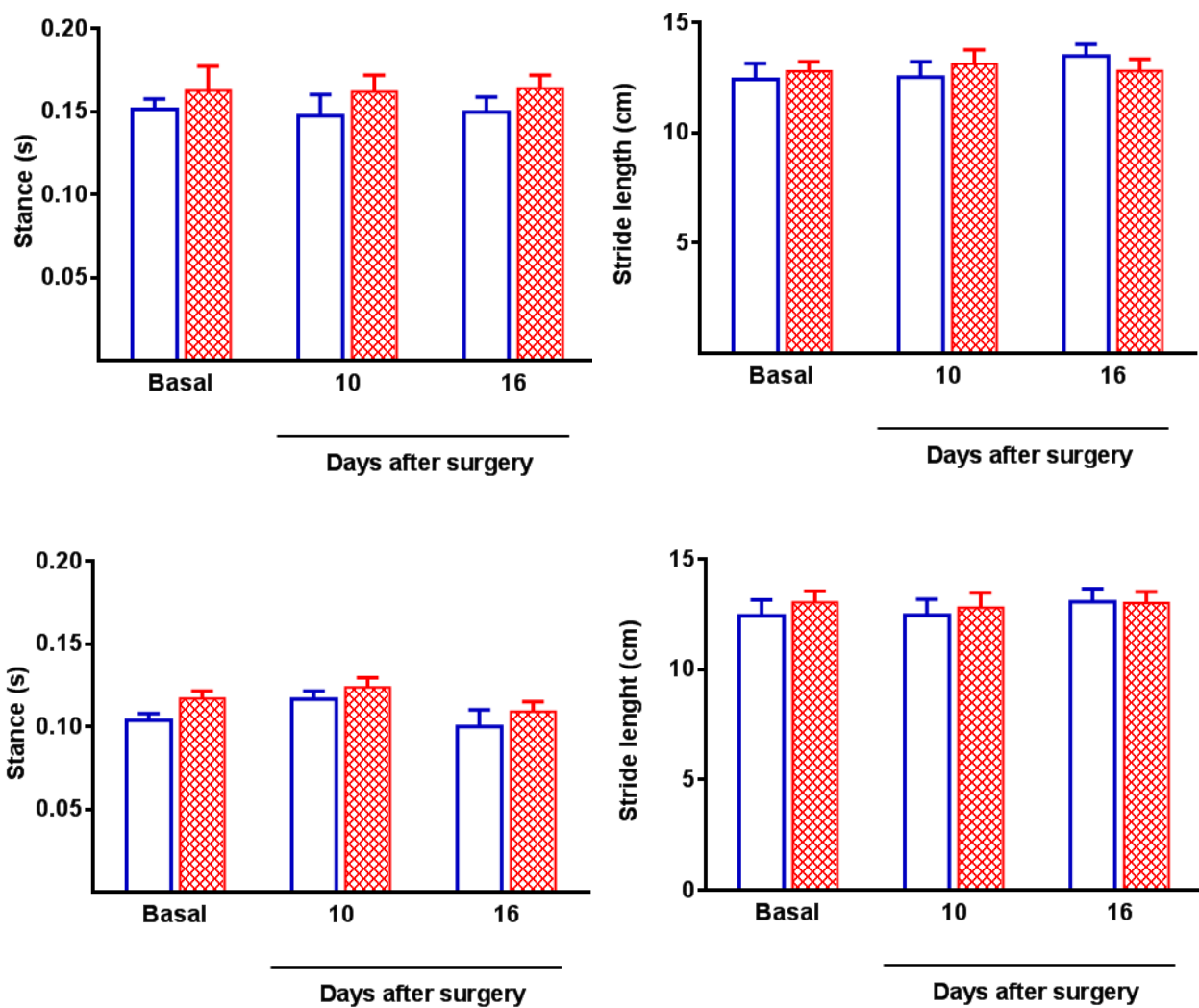


Fig. 12. Effect of the partial lesion of the SNc gait parameters: stance and stride length. Data are expressed as mean \pm SEM. Top graphics: scored of forepaw of the animal; bottom graphics: scored of hindpaws of the animal. Two-way ANOVA showed no significant difference among groups.

Figure 13.

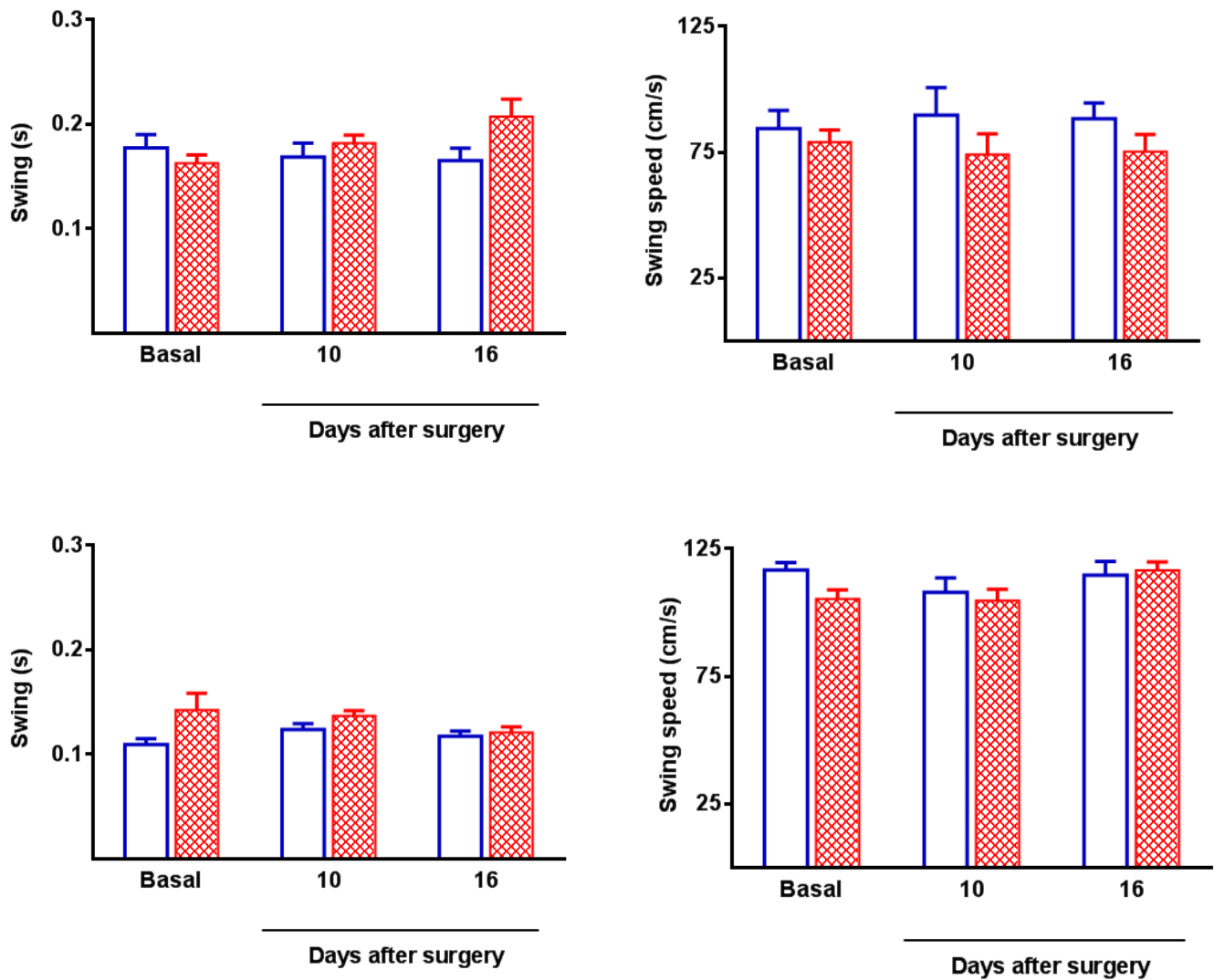


Fig. 13. Effect of the partial lesion of the SNc gait parameters: swing and swing speed. Data are expressed as mean \pm SEM. Top graphics: scored of forepaws of the animal; bottom graphics: scored of hindpaws of the animal. Two-way ANOVA showed no significant difference among groups.

Figure 14.

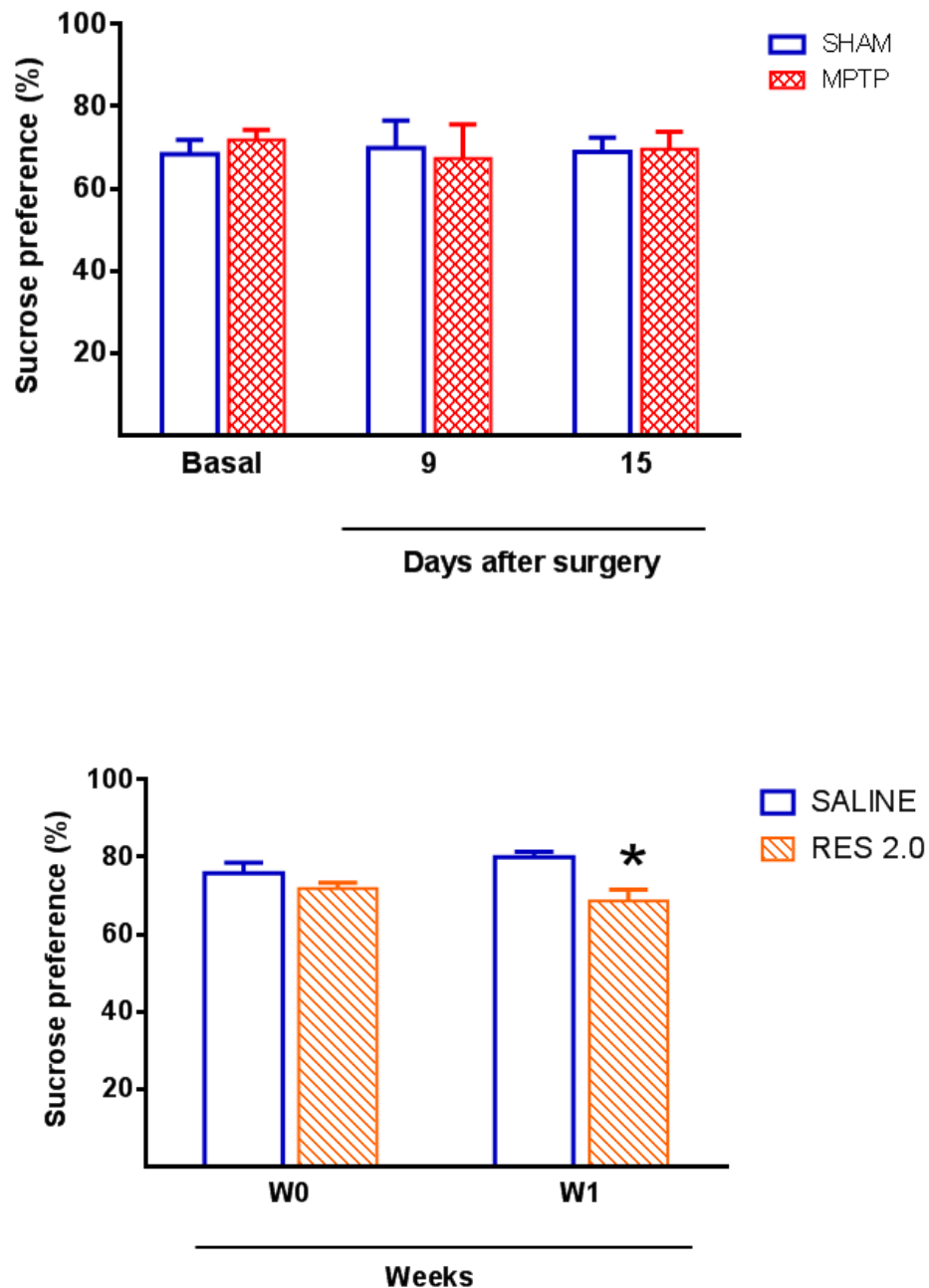


Fig. 14. Effect of the partial lesion of the SNc on sucrose preference (top graphics) showed no significant difference among groups. In bottom graphics, the effect of RES 2.0, or VEHIC intraperitoneal administration on sucrose preference . * $P < 0.05$ compared to VEHIC-treated mice (ANOVA followed Bonferroni's multiple test). Data represent the mean \pm S.E.M. (n = 6/group).

5 DISCUSSÃO GERAL

No presente estudo analisamos as alterações induzidas pela administração de MPTP na SNc de ratos, monitorados continuamente por um período de 1 mês. Nosso principal resultado é que o MPTP como modelo DP apresenta poucas alterações motoras embora análises detalhadas sobre o fenótipo comportamental foram realizadas.

Esse achado está de acordo com estudos anteriores em que mesmo a infusão bilateral de altas doses de MPTP na substância negra de ratos há leves ou nenhuma alteração motora (Da Cunha et al., 2001, 2002; Ferro et al., 2005; Perry et al., 2004). Há porém, parâmetros que diferem de estudos anteriores: Não encontramos diferença entre os grupos SHAM e MPTP na marcha, rotações e visitas em diferentes áreas das caixas moradia. Nossa hipótese é que essa diferença entre estudos anteriores e o presente é que realizamos um estudo crônico e a maioria dos demais trabalhos realiza estudos agudos. Em adição a isso, as condições pelas quais é realizado os experimentos podem influenciar: por exemplo, quando o animal for retirado de um local pra outro para realizar um teste comportamental, fatores como estresse ou novidade poderiam afetar o comportamento exploratório.

A infusão de MPTP não induziu à alterações na atividade locomotora circadiana sob ciclo regular claro /escuro. Embora alterações nos ritmos circadianos sejam encontradas em pacientes com DP, não é consistentemente observada em modelos animais de DP (Videnovic e Willis, 2016). Tanaka et al (2012) mostra que a administração sistêmica de MPTP em ratos prolongou o período da atividade locomotora circadiana, fenótipo que propomos estar associado a um comportamento depressivo (Martynhak et al., 2015). Por outro lado, outro grupo não encontrou nenhuma alteração maior após o tratamento sistêmico agudo ou crônico com MPTP em camundongos, apesar da perda de 70% de neurônios dopaminérgicos (Fifel et al., 2013). Desse modo, mesmo considerando o mesmo fármaco e via de administração, os resultados podem ser conflitantes

Alterações no ciclo sono-vigília são freqüentemente observadas em modelos animais de DP. A perda de neurônios dopaminérgicos no SNC causada pela lesão intranigral da toxina MPTP em ratos promoveu várias alterações no sono REM (Lima et al., 2007). Como não observamos alterações nos ritmos circadianos, pode-se dizer que as alterações do sono na DP não estão diretamente relacionadas às mudanças nos ritmos circadianos observados nos pacientes. Outra hipótese, é que as alterações circadianas são mais prováveis de serem observadas em uma fase posterior da doença. No entanto, é importante notar que as mudanças no ciclo claro/escuro em ratos levou a uma resposta aumentada nos efeitos tóxicos da administração sistêmica de MPTP (Lauretti et al., 2016). Portanto, mesmo que as alterações nos ritmos circadianos não parecem ser um marcador de um estágio inicial da DP, ela pode ser um fator de risco para o desenvolvimento da DP.

Assim, o modelo do MPTP como fase inicial da DP pode ser considerado um bom modelo para estudar os déficits cognitivos que ocorrem nas fases iniciais da DP, antes de deficiências motoras serem evidentes pois deficiências motoras poderiam interferir no desempenho motor dos comportamentos que são pontuados como um índice de aprendizagem e memória.

6 CONCLUSÃO

Em resumo, ratos lesados com MPTP podem ser considerados um bom modelo para a fase inicial da DP e combinado com análise de fenotipagem é possível investigar mais detalhadamente a relação entre processo de recuperação e correspondentes mudanças comportamentais sugestivos de déficits motores, motivacionais, de ritmo circadiano e de comportamentos do tipo depressivo.

7 REFERÊNCIAS

ADLER C.H., Nonmotor Complications in Parkinson's Disease. **Movement Disorders**, v. 20, Suppl. 11, pp. S23–S29, 2005

BEAL, F. Experimental models of Parkinson's disease. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 2, p. 325 – 332, 2001.

BETARBET, R.; SHERER, T.B.; GREENAMYRE, J.T. Animals models of Parkinson's disease. **BioEssays**, v.24, p.308-318, 2002.

BJORKLUND, A.; DUNNETT, S. B. Dopamine neuron systems in the brain: an update. **Trends in Neurosciences**, v. 30, n. 5, p. 194, 2007.

BLANDINI, F.; NAPPI, G.; TASSORELLI, C.; MARTIGNONI, E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 62, p.63–88, 2000.

BOLAM, J. P.; HANLEY, J. J.;BOOTH, P. A. C.; BEVAN, M. D. Synaptic organisation of the basal ganglia. **J. Anat.**, v. 196, pp. 527–542,2000.

BURN DJ. Beyond the iron mask: towards better recognition and treatment of depression associated with Parkinson's disease. **Mov Disord**, v.17:445–54, 2002.

DENG, H.; YUAN, L. Genetic variants and animal models in SNCA and Parkinson disease. **Ageing Research Reviews**, v. 15, p.161–176, 2014.

DUBOIS, B., PILLON, B. Cognitive deficits in Parkinson's disease. **J Neurol**, v. 244, p.2–8, 1997

DE COCK, V. C., VIDAILHET, M., ARNULF, I. Sleep disturbances in patients with parkinsonism. **Nature reviews**, v. 4, N. 5, 2008

DOMBROWSKI P. A., DA CUNHA C., FERRAZ A. C., LIMA M. M.S. REM Sleep Deprivation Generates Cognitive and Neurochemical Disruptions in the Intranigral Rotenone Model of Parkinson's Disease **Journal of Neuroscience Research**, v. 91, p.1508–1516 (2013)

DOS SANTOS, A.C.D., CASTRO, M.A.V., JOSE, E.A.K., DELATTRE, A.M., DOMBROWSKI, P.A., Da Cunha, C., A.C., M.M.S. Rem sleep deprivation generates cognitive and neurochemical disruptions in the intranigral rotenone model of Parkinson's disease. **Journal of Neuroscience Research**, v. 91, 1508-1516, 2013.

GERFEN, C. R.; SURMEIER, D. J. Modulation of striatal projection systems by dopamine. **Annu. Rev. Neurosci**, v.34, p.441-466, 2011

HIRSCH, E.C., GRAYBIEL, A.M., AGID Y. Melanized dopaminergic neurons are differentially affected in Parkinson's disease. **Nature** 334:345–348, 1988.

JACKSON, G.M.; JACKSON, S.R.; HARRISON, J.; HENDERSON, L.; KENNARD, C.; Serial reaction time learning and Parkinson's disease: evidence for a procedural learning deficit. **Neuropsychologia**, v.33, p.577–593, 1995.

JEON, B.S.; JACKSON-LEWIS, V.; BURKE, R.E. 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death. **Neurodegeneration**, v. 4, p.131–137, 1995.

KANDEL, E. R. S., SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. **Principles of neural science**. 2000.

LEWIS, S.J.; COOLS, R.; ROBBINS, T.W.; DOVE, A.; BARKER, R.A.; OWEN, A.M. Using executive heterogeneity to explore the nature of working memory deficits in Parkinson's disease. **Neuropsychologia**, v.41, p.645– 654, 2003

LIMA, M.M.S.; ANDERSEN M.L.; REKSIDLER A.B.; VITAL M.A.B.F.; TUFIK S. The role of the substantia nigra pars compacta in regulating sleep patterns in rats. **PLoS ONE** 16, e513, 2007.

LIMA, M.S. Sleep disturbances in Parkinson's disease: The contribution of dopamine in REM sleep regulation. **Sleep Medicine Reviews** v. 17 p.367-375, 2013.

LUTHMAN, J.; FREDRIKSSON A.; SUNDSTROM E.; JONSSON G.; ARCHER, T. Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage. **Behav Brain Res** v.33, p.267–277, 1989

MENEZES, M. S.; TEIVE, H. A. G. **Doença de Parkinson**. Rio de Janeiro: ed. Guanabara Koogan, 2003.

MISSALE, C. et al. Dopamine Receptors: From Structure to Function. **Physiological Reviews**, v. 78, n. 1, p. 189, 1998.

NICKLAS, W. J.; VYAS I.; HEIKKILA, R. E.; Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by l-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, l-methyl-4-phenyl 1, 2,5,6-tetrahydropyridine. **Life Sciences**, v. 36, p. 2503-2508, 1985.

NICKLAS, W.J; YOUNGSTER, S.K.; KINDT, M.V.; HEIKKILA, R.E.; MPTP, MPP⁺ and mitochondrial function. **Life Science**, v.40, p.721–729, 1987.

NIEOULLON, A. Dopamine and the regulation of cognition and attention. **Prog Neurobiol** v. 67 p.53–83. 2002;

PARKINSON, J. **An essay of shaking palsy**. London, 1817.
PIVONELLO, R.; FERONE, D.; LOMBARDI, G.; COLAO, A.; LAMBERTS, S. W. J.; HOFLAND L.J. Novel insights in dopamine receptor physiology **European Journal of Endocrinology**, v.156, S13–S21, 2007.

PRZEDBORSKI, S.; VILA, M.; The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model: a tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease. **Annal of the New York Academy Science**, v.991, p.189–198, 2003.

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

SACHS, C.; JONSSON, G. Mechanisms of action of 6-OHDA. **BiochemicalPharmacology**,v.24,pp,1-8, 1975.

SIEGEL, G. et al. **Basic Neurochemistry**. 7. London: Elsevier, 2006

SMEYNEA, R. J.; JACKSON-LEWI, V. The MPTP model of Parkinson's disease. **Mol. Brain. Res.**, v. 134, p 57– 66, 2005

STANDAERT, D.G.; GALANTER, J.M.; **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 166 -172, 2009.

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

SMEYNEA, R. J., JACKSON-LEWIS, V. The MPTP model of Parkinson's disease. **Mol. Brain. Res.**, v. 134, p 57– 66, 2005.

TISSINGH G., BERGMANS, P., BOOIJ J., WINOGRODZKA A., VAN ROYEN E.A., STOOFF J.C., WOLTERS, E.C. Drug-naive patients with Parkinson's disease in Hoehn and Yahr stages I and II show a bilateral decrease in striatal dopamine transporters as revealed by [¹²³I]beta CIT SPECT. **J Neurol**, v. 245, p.14 –20, 1998

TOLOSA, E. COMPTA, Y., GAIG, C. The premotor phase of Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 13 S2–S7, 2007.

ZAHODNE, L. B.; MARSISKE, M., OKUN M. S., BOWERS, D. **Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology**, v.25(3) p.131-137, 2011.

HUANG, C.K.; CHANG, Y.T.; AMSTISLAVSKAYA, T.G.; LIN C.L.; HUNG, C.S.; LAI, T.J.; HO, Y.J. Synergistic effects of ceftriaxone and erythropoietin on neuronal and behavioral deficits in an MPTP-induced animal model of Parkinson's disease dementia. **Behavioural brain research**, v.294, p.198-207, 2015

HSUM, C.Y.; HUNG, C.S.; CHANG, H.M.; LIAO, W.C.; HO, S.C.; HO, Y.J. Ceftriaxone prevents and reverses behavioral and neuronal deficits in an MPTP-induced animal model of Parkinson's disease dementia. **Neuropharmacology**, v. 91, p.43-56, 2015

HO, S.C.; HSU, C.C.; PAWLAK, C.R.; TIKHONOVA, M.A.; LAI, T.J.; AMSTISLAVSKAYA TG.; HO YJ. Effects of ceftriaxone on the behavioral and neuronal changes in an MPTP-induced Parkinson's disease rat model By: **Behavioural brain research**, v.268, p.177-184, 2014

DAS, N.R.; GANGWAL, R.P.; DAMRE, M.V.; SANGAMWAR, A.T.; SHARMA, SS.; A PPAR-beta/delta Agonist is Neuroprotective and Decreases Cognitive Impairment in a Rodent Model of Parkinson's Disease. **Current neurovascular research**,v.11(2):114-24, 2014

CASTRO, A.A.; WIEMES, B.P.; MATHEUS, F.C.; LAPA, F.R.; VIOLA, G.G.; SANTOS, A.R.; TASCA, C.I.; PREDIGER, R.D. Atorvastatin improves cognitive, emotional and motor impairments induced by intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in rats, an experimental model of Parkinson's disease. **Brain Res.**, v. 1513:103-16, 2013

SCHWARTING, R. K. W. ; HUSTON, J. P. Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of meso-striatal dopamine neurons and their physiological sequelae. **Progress in Neurobiology**, 49, v.215-266, 1996

SCHWARTING, R. K. W.; HUSTON, J. P. The unilateral 6 hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. **Progress in Neurobiology**, v.50, 275-331, 1996

SCHULTZ, W.; DAYAN P.; MONTAGUE. P. R. A Neural Substrate of Prediction and Reward. **Science**, v.275, 1997.

8 ANEXOS



Fig. 15. Equipamento Phenotyper (Noldus)



Fig. 16. Equipamento Catwalk (Noldus)