



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**Alterações comportamentais, neuroquímicas e neuroimunológicas  
induzidas por lesão estriatal com 6-OHDA**

Thiago Pereira da Silva

Florianópolis – SC

2012





UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**Alterações comportamentais, neuroquímicas e neuroimunológicas  
induzidas por lesão estriatal com 6-OHDA**

Thiago Pereira da Silva

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi

Florianópolis – SC

2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

S586a Silva, Thiago Pereira da  
Alterações comportamentais, neuroquímicas e  
neuroimunológicas induzidas por lesão estriatal com 6-OHDA  
[dissertação] / Thiago Pereira da Silva ; orientador, Reinaldo  
Naoto Takahashi. - Florianópolis, SC, 2012.  
59 p.: il., graf.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Depressão. 3. Doença de Parkinson.  
4. Dopamina. I. Takahashi, Reinaldo Naoto. II. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Farmacologia. III. Título.

CDU 615

*“A prisão não são as grades, e a liberdade não é a rua;  
existem homens presos na rua e livres na prisão.  
É uma questão de consciência.”*  
Mahatma Gandhi

*"A natureza, ao fazer-nos crescer, não só nos  
favorece em forças e tamanho, mas, à medida  
que o tempo vai passando, dilata com ele o  
espaço interno da inteligência e da alma."*  
Shakespeare

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de fazer um sincero agradecimento a todas as pessoas que participaram de forma direta ou indireta destes dois anos na pós-graduação e a todos que me ajudaram a realizar este trabalho.

A toda minha família, especialmente aos meus pais, Rita Capoani e Valdir Pereira da Silva, à minha irmã Thaís, pelo apoio incondicional e incentivo durante toda minha formação acadêmica.

Ao professor Reinaldo Naoto Takahashi, pela oportunidade, ensinamentos, críticas e orientação que me ajudaram muito a crescer e entender melhor o mundo da ciência e da pesquisa.

À minha namorada Lívia, pelo amor, companheirismo e apoio durante grande parte desta etapa.

Ao professor Anicleto Poli pela amizade e ensinamentos durante as análises neuroquímicas.

À colaboração, ajuda e incentivo da Daniela Balz Hara no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos e colegas que estiveram presentes no laboratório em algum período desta minha formação, Rafael, Pablo, Assini, Cris, Pamplona, Sanmara, Meigy, Vanessa, Lívia, Marília, Jéssica, Carina. Obrigado pelo companheirismo.

Aos meus amigos/colegas de turma, Manuel, Paulo, Frank, Lara, Mariane, Anas, Gabriela, Karla, Muryel, Taci, Maíra.

À prof.<sup>a</sup> Alexandra Latini por disponibilizar o equipamento de HPLC.

Aos professores e demais funcionários do Departamento de Farmacologia/UFSC que contribuíram de forma direta ou indireta durante estes dois anos.

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>III</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>IV</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VI</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. Epidemiologia da Doença de Parkinson.....	1
1.2. Manifestações Clínicas da Doença de Parkinson .....	1
1.3. Etiologia e Neuropatologia da Doença de Parkinson .....	2
1.4. Modelos Animais da Doença de Parkinson.....	6
1.5. Modelo da 6-hidroxidopamina (6-OHDA).....	7
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>11</b>
2.1. Objetivo Geral.....	11
2.2. Objetivos Específicos .....	11
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
3.1. Animais .....	12
3.2. Drogas .....	12
3.3. Administração intraestriatal de 6-OHDA.....	12
3.4. Cronograma Experimental .....	13
3.5.1. Teste do Campo Aberto .....	15
3.5.2. Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) .....	16
3.5.3. Teste do Consumo de Sacarose .....	17
3.6. Testes Neuroquímicos .....	17
3.6.1. Determinação dos níveis cerebrais de monoaminas através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ...	17
3.6.2. Determinação da atividade da enzima N-acetil- glucosaminidase (NAG).....	19
3.7. Análise Estatística .....	20

<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>21</b>
4.1. Testes Comportamentais .....	21
4.1.1. Efeito do tratamento com 6-OHDA na atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto.....	21
4.1.2. Efeito do tratamento com 6-OHDA no teste do labirinto em cruz elevado (LCE) .....	22
4.1.3. Efeito do tratamento com 6-OHDA no teste do consumo de sacarose .....	24
4.2. Níveis encefálicos de monoaminas (HPLC) .....	24
4.3. Determinação da atividade da enzima N-acetilglucosaminidase (NAG).....	27
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>36</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>37</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Esquema ilustrando as fases pré-sintomáticas e sintomáticas (sintomas motores), além das áreas encefálicas afetadas .....	4
<b>Figura 2.</b> Esquema ilustrando o local da injeção da 6-OHDA, bem como o posicionamento das cânulas .....	13
<b>Figura 3.</b> Esquema ilustrando a sequência cronológica dos experimentos .....	14
<b>Figura 4.</b> Ilustração representativa do campo aberto .....	15
<b>Figura 5.</b> Ilustração representativa do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) .....	16
<b>Figura 6.</b> Esquema representativo do teste do Consumo de Sacarose .....	17
<b>Figura 7.</b> Efeito da administração bilateral de veículo ou 6-OHDA sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto .....	22
<b>Figura 8.</b> Efeito da administração bilateral de veículo ou 6-OHDA no teste do labirinto em cruz elevado.....	23
<b>Figura 9.</b> Efeito da administração bilateral de veículo ou 6-OHDA no teste do consumo de sacarose .....	24
<b>Figura 10.</b> Efeito da administração de veículo ou 6-OHDA no estriado sobre as concentrações de monoaminas.....	26
<b>Figura 11.</b> Efeito da administração de veículo ou 6-OHDA no estriado, hipocampo e substância negra sobre os níveis de NAG....	28

## LISTA DE ABREVIATURAS

5-HIAA	Ácido hidroxindolacético
5-HT	Serotonina
6-OHDA	6-Hidroxidopamina
ANOVA	Análise de variância
CPFM	Córtex pré-frontal medial
DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina
DHBA	3,4-dihidróxi-benzilamina
DOPAC	3,4-dihidroxifenilacético
DP	Doença de Parkinson
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
LCE	Labirinto em cruz elevado
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
NAG	n-acetil-glucosaminidase
NAT	Transportador de noradrenalina
NEMs	Neurônios espinhosos médios
SHAM	Falso-operado
SN	Substância negra
SNpc	Substância negra <i>pars compacta</i>

## RESUMO

A elucidação dos mecanismos responsáveis pelas manifestações não-motoras da Doença de Parkinson (DP) é fundamental na busca por novas terapias. Especialmente pelo fato destes sintomas, como ansiedade e depressão, estarem presentes nas fases iniciais da doença, antecedendo as manifestações motoras clássicas. O presente estudo teve como objetivo avaliar as possíveis alterações comportamentais e neuroquímicas promovidas pela lesão parcial e retrógrada dos neurônios nigroestriatais, em três intervalos de tempo. O modelo experimental utilizado consistiu na injeção bilateral de 6-OHDA no estriado de ratos. Além disso, analisamos a participação do sistema imunológico inato em diferentes regiões encefálicas e, sua possível relação com as alterações promovidas pela lesão, nos seus respectivos intervalos de tempo. Os resultados, no intervalo de três semanas, mostraram a presença de comportamentos do tipo anedonia e ansiedade, com ausência de comprometimento motor, juntamente com um aumento na quantidade de células microgлияis. Além disso, os níveis estriatais de dopamina e DOPAC foram reduzidos progressivamente ao longo de 25 dias. Também foram observadas alterações nos níveis estriatais de serotonina e seu metabólito, 5-HIAA. Ainda mais, os resultados ilustraram um aumento na quantidade de células microgлияis na substância negra, estriado e hipocampo dos ratos administrados com 6-OHDA. Finalmente, nossos resultados contribuem para a hipótese de que a lesão retrógrada e parcial dos neurônios dopaminérgicos da substância negra pode causar prejuízos comportamentais semelhantes à fase pré-motora da DP, três semanas após a lesão. Em adição, estas manifestações são acompanhadas por alterações neuroinflamatórias, que podem estar influenciando as manifestações comportamentais relatadas, principalmente o efeito anedônico. Além disso, a evidência de neuroinflamação hipocampal, mesmo após 25 dias, pode ser um indicativo de extensão neuroinflamatória da lesão para outras áreas encefálicas, como consequência da degeneração nigroestriatal.

## ABSTRACT

The elucidation of the mechanisms responsible for non-motor manifestations of Parkinson's disease (PD) is crucial in the search for new therapeutic approaches. Specially because some symptoms, such as anxiety and depression, are present in the early stages of the disease, before the classic motor manifestations. The aim of the present study was to evaluate the possible behavioral and neurochemical effects after a retrograde partial lesion of nigrostriatal pathway promoted by 6-OHDA, in three intervals of time. The model used was bilateral injection of 6-OHDA into dorsal striatum. Furthermore, we analyzed the participation of the innate immune system in different brain regions and its relation to the changes promoted by the lesion, in the same time intervals. The results showed that after three weeks, 6-OHDA was able to produce both anhedonic and anxiety behaviors and an increase of microglial density, without motor bias. In addition, striatal levels of dopamine and DOPAC were gradually reduced over 25 days. We also observed changes in the striatal levels of serotonin and its metabolite, 5-HIAA. Furthermore, our data illustrate an increase in the microglial levels in the substantia nigra, hippocampus and striatum in the 6-OHDA-lesioned rats. Finally, our results contribute to the hypothesis that the retrograde and partial damage of dopaminergic neurons in the substantia nigra can resemble premotor symptoms of PD, three weeks after injury. Moreover, these symptoms are accompanied by neuroinflammatory changes, which may be associated with behavioral changes, especially the anhedonic effect. The evidence of hippocampal neuroinflammation may be an indicative of neuroinflammatory extension to other areas of the brain as a consequence of the nigrostriatal degeneration.

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1. Epidemiologia da Doença de Parkinson**

O médico alemão Franciscus de le Bøe, que viveu no século XVI, pode ter sido um dos primeiros a escrever sobre distúrbios relacionados a movimentos involuntários (Pahwa e Lyons, 2007). Muitos relatos aconteceram até que, em 1817, o médico inglês James Parkinson publicou uma curta monografia, chamada “An Essay on the Shaking Palsy”, onde descreveu sistematicamente seis indivíduos com distúrbios de movimento, o qual denominou de Paralisia Agitante. Mas foi o neuropatologista francês, Jean-Martin Charcot, 40 anos após a publicação da monografia, que cunhou o termo Doença de Parkinson (DP), em homenagem a James Parkinson (Mosley e Romaine, 2004).

A DP é uma doença neurodegenerativa que tem se tornado cada vez mais frequente na população mundial. Isto se deve principalmente ao aumento na expectativa de vida mundial, uma vez que ela ocorre principalmente em indivíduos idosos e, aumenta sua incidência com o avanço da idade. Além do mais, é a segunda doença neurodegenerativa mais frequente, ficando atrás apenas da doença de Alzheimer (Wirdefeldt, Adami *et al.*, 2011). Estima-se que a incidência na população acima de 60 anos seja de aproximadamente 1,6% (Barbosa, Caramelli *et al.*, 2006).

No Brasil, há uma carência de pesquisas que expressem uma estimativa geral sobre a ocorrência da DP. No entanto, um estudo publicado em 2006 avaliou a prevalência da DP em uma cidade do interior de Minas Gerais. A incidência total na população maior de 64 anos foi de 3,3%. Já em relação ao sexo, mostrou-se um pouco mais prevalente em pessoas do gênero masculino. Conforme esperado, os dados mostraram um aumento da incidência relacionado com o avanço da idade. A prevalência de 0,8% no grupo entre 64 e 69 anos, foi significativamente menor que o grupo com idade superior a 85 anos, o qual apresentou 14,3% (Barbosa, Caramelli *et al.*, 2006).

## **1.2. Manifestações Clínicas da Doença de Parkinson**

As três principais manifestações motoras da doença incluem: o tremor de repouso, bradicinesia e rigidez muscular, além destas, alterações na marcha e postura também podem se manifestar (Dunnett e

Bjorklund, 1999). Dois grandes subtipos podem ser observados na clínica. No primeiro, a manifestação predominante é o tremor de repouso, que ocorre principalmente nos pacientes mais jovens. Já no segundo subtipo, a instabilidade postural e desequilíbrio na marcha são as formas mais pronunciadas, acometendo os pacientes mais idosos, geralmente acima de 70 anos (Obeso, Rodriguez-Oroz *et al.*, 2010). Portanto, a DP é uma patologia heterogênea, não apresentando um quadro neuropatológico totalmente similar entre os pacientes. Além do mais, estes sintomas motores, que caracterizam a doença, fazem com que ela seja relacionada entre os distúrbios do movimento, no entanto, a dimensão desta patologia vai muito além. Uma extensa gama de sintomas não-motores está presente (Paulus e Trenkwalder, 1998; Bernal-Pacheco, Limotai *et al.*, 2012). Na maioria das vezes, muito antes das manifestações motoras (Stephenson, Siderowf *et al.*, 2009).

Grande parte dos pacientes apresentam alterações psiquiátricas, como ansiedade, depressão e alterações no sono, particularmente durante o sono REM (Weintraub, Moberg *et al.*, 2004; Abbott, Ross *et al.*, 2005; Arabia, Grossardt *et al.*, 2007; Stephenson, Siderowf *et al.*, 2009). Além destes sintomas, disfunções olfativas, gastrointestinais e prejuízos de memória também contribuem para a diminuição da qualidade de vida dos pacientes (Stephenson, Siderowf *et al.*, 2009). A ansiedade é uma das manifestações clínicas não-motoras mais frequentes, atingindo cerca de 40% dos pacientes. Porém, apresenta características clínicas distintas, formando um subtipo de transtorno que é característico dos pacientes com DP (Pontone, Williams *et al.*, 2011). Além disso, este sintoma possui uma alta comorbidade com diagnósticos de depressão, no entanto, a depressão acontece com menor frequência, em comparação aos sintomas de ansiedade (Gaig e Tolosa, 2009; Pontone, Williams *et al.*, 2011). Os transtornos depressivos na DP parecem estar associados aos estágios iniciais da degeneração, apresentando uma elevação na incidência durante o período de 3 a 6 anos antes dos sinais motores (Gaig e Tolosa, 2009).

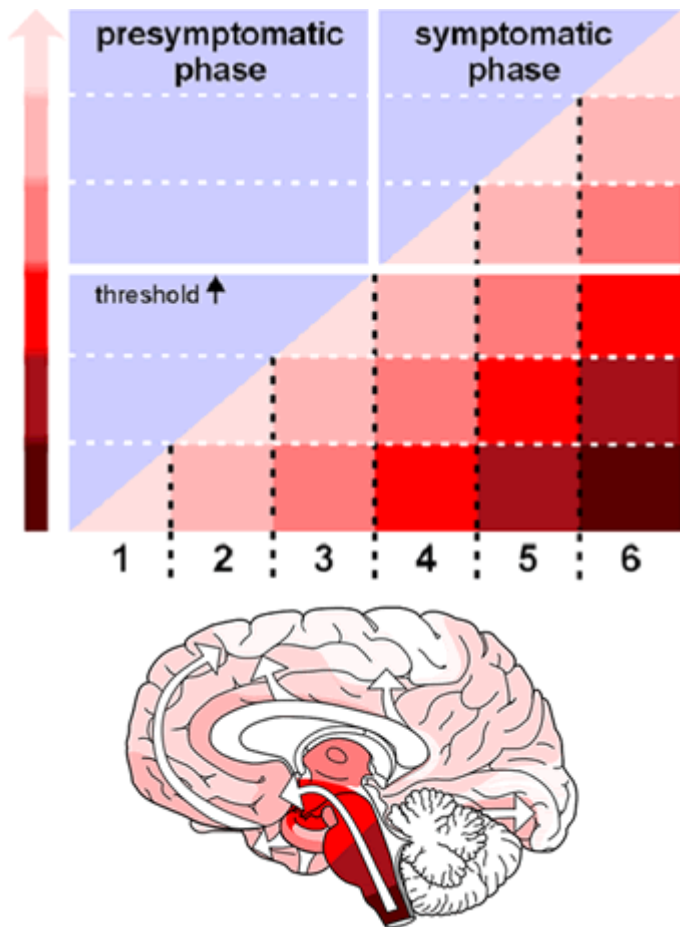
### **1.3. Etiologia e Neuropatologia da Doença de Parkinson**

A principal característica neuropatológica da DP está associada a uma degeneração dos neurônios dopaminérgicos, que contêm melanina, na substância negra *pars compacta* (SNpc), estes neurônios fazem parte da via nigroestriatal. Como consequência da degeneração

desta via, ocorre uma diminuição no conteúdo total de dopamina no estriado promovendo os sintomas motores (Eriksen, Wszolek *et al.*, 2005). Quando os sintomas se tornam visíveis, o conteúdo de dopamina estriatal já está diminuído em cerca de 80% e, aproximadamente 60% das células dopaminérgicas na substância negra já morreram (Vives-Bauza, De Vries *et al.*, 2009). No entanto, alterações também são encontradas em muitas células não-dopaminérgicas, como em alguns grupos de neurônios colinérgicos, do núcleo basal de Meynert, noradrenérgicos do locus cerúleo, serotoninérgicos do núcleo da rafe e neurônios do núcleo dorsal do nervo vago (Vives-Bauza, De Vries *et al.*, 2009). Outra característica marcante é a ocorrência de corpos proteicos, no interior dos neurônios, conhecidos como corpúsculos de Lewy, que se caracterizam por inclusões de agregados eosinófilos compostos por uma série de proteínas como  $\alpha$ -sinucleína, ubiquitina, parkin e neurofilamentos (Davie, 2008; Vives-Bauza, De Vries *et al.*, 2009).

Desde a descrição inicial da DP, tem-se progredido em vários setores: identificando características neuropatológicas, formas de tratamento para minimizar os sintomas, e, ainda, na tentativa de diminuir sua progressão, porém ainda não foi encontrado um tratamento eficaz, capaz de impedir o avanço da doença ou sua regeneração. Além disso, a causa e origem específica da DP ainda são desconhecidas, porém, alguns pesquisadores têm proposto teorias relevantes sobre estes assuntos.

Segundo Braak e colaboradores (Figura 1), as alterações neuropatológicas iniciais são observadas no bulbo raquidiano, tegmento pontino e no bulbo olfatório. Nestes estágios, os pacientes não apresentam nenhum comprometimento motor, portanto, são considerados pré-sintomáticos. Na classificação de Braak, correspondem aos estágios iniciais (1 e 2). Conforme a doença se estende e os sintomas motores começam se manifestar, áreas como a substância negra *pars* compacta e outras áreas do mesencéfalo e prosencéfalo basal são afetadas, correspondendo aos estágios 3 e 4. Finalmente, a neurodegeneração atinge sua maior extensão, afetando o córtex cerebral, nesta etapa (estágios 5 e 6), a doença se manifesta em todas as suas dimensões clínicas (Braak, Ghebremedhin *et al.*, 2004).



**Figura 1:** Esquema ilustrando as fases pré-sintomáticas e sintomáticas (sintomas motores), além das áreas encefálicas afetadas. A intensidade da coloração vermelha indica o aumento da gravidade na região afetada (Braak, Ghebremedhin *et al.*, 2004).

Estudos apontam diversos fatores que podem contribuir para a degeneração celular dopaminérgica. Dentre eles, destaca-se a disfunção mitocondrial (Zhu e Chu, 2010). Esta ideia surgiu com o reconhecimento de que o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) induzia uma síndrome parkinsoniana. Seu metabólito ativo, 1-metil-4-fenilpiridina



(MPP+) se acumula na matriz mitocondrial inibindo a fosforilação oxidativa, devido ao bloqueio da transferência de elétrons no complexo I, levando a uma crise energética e um estresse oxidativo que acaba resultando na morte celular (Vives-Bauza, De Vries *et al.*, 2009; Zhu e Chu, 2010). Outro fato relevante foi relatado em um estudo *post-mortem* que analisou a massa mitocondrial de nove pacientes com DP, mostrando anormalidades mitocondriais semelhantes às induzidas por MPTP (Schapira, Cooper *et al.*, 1990).

Apesar da DP não acometer outras espécies além dos seres humanos, modelos animais contribuem significativamente como ferramentas para elucidar os mecanismos neurobiológicos e neuropatológicos, possibilitando uma melhor compreensão sobre os aspectos relacionados as mais diversas doenças e permitindo o desenvolvimento de novas terapias. Estudos neste sentido suportam a hipótese de uma patogenia relacionada com a disfunção mitocondrial e que, fatores ambientais, como toxinas, poderiam estar favorecendo este evento. Conforme detalhado no item seguinte (1.4), vários estudos foram realizados utilizando o modelo animal com MPTP, inclusive em nosso laboratório, reforçaram a hipótese de que o MPTP é capaz de degenerar células neuronais vulneráveis e, que a via olfativa poderia ser uma porta de entrada para toxinas ambientais capazes de degenerar neurônios dopaminérgicos (Prediger, Rial *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, tem sido proposta uma associação entre neuroinflamação e disfunção mitocondrial. Sabe-se que o sistema imunológico apresenta um importante papel na defesa e reparo do organismo, e que, também é responsável pela produção e liberação de mediadores, como citocinas, óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, que em determinadas ocasiões podem ser nocivos ao tecido nervoso (Nguyen, Julien *et al.*, 2002). Estudos demonstraram que toxinas mitocondriais como, por exemplo, rotenona, MPTP e 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Barnum e Tansey, 2010), podem causar diferentes estágios de reação do sistema imune. Portanto, o dano na cadeia respiratória mitocondrial poderia ser o mecanismo que desencadeia a neuroinflamação (Di Filippo, Chiasserini *et al.*, 2010).

A presença de moléculas do sistema imune inato e adaptativo, bem como a ativação de astrócitos e células microgлияis representam indicativos de inflamação no sistema nervoso central (SNC) (Long-Smith, Sullivan *et al.*, 2009). Estas características estão presentes em pacientes com doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, Huntington e Esclerose Múltipla (Nguyen, Julien *et al.*, 2002). Trabalhando

como uma defesa inicial, a ativação da micróglia tem papel fundamental na defesa das células nervosas. No entanto, sua atividade sustentada pode resultar em efeitos prejudiciais relacionados com o processo de neurodegeneração progressiva.

#### **1.4. Modelos Animais da Doença de Parkinson**

O diagnóstico da DP ainda apresenta um caráter essencialmente clínico, diagnosticado através de sinais motores, que caracterizam o estágio avançado da doença. Portanto, é fundamental a compreensão das alterações patológicas relacionadas com a degeneração inicial da doença, onde os prejuízos motores ainda não são evidenciados, porém, uma série de sintomas não-motores são responsáveis por uma diminuição na qualidade de vida dos pacientes (Stephenson, Siderowf *et al.*, 2009).

Os modelos animais servem tanto para desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, quanto para o avanço no conhecimento e interpretação da fisiopatologia do processo degenerativo. Diversos modelos animais utilizados se baseiam na administração de diferentes toxinas, como por exemplo: 6-OHDA, MPTP, paraquat, rotenona, maneb, reserpina (Morato, Lemos *et al.*, 1989; Betarbet, Sherer *et al.*, 2002; Schober, 2004; Meredith, Sonsalla *et al.*, 2008; Tadaiesky, Dombrowski *et al.*, 2008). No entanto, ainda não foi criado um modelo ideal, pois, para mimetizar a DP com maior similaridade, um modelo deveria apresentar características de neurodegeneração progressiva, lesionar os neurônios dopaminérgicos nigroestriatais e outras populações específicas (como por exemplo, área perirrúbrica e substância tegmental ventral), neurônios noradrenérgicos no lócus cerúleo, serotoninérgicos do núcleo da rafe, colinérgicos no mesencéfalo, GABAérgicos do estriado, além de promover a presença de corpúsculos de Lewy. No entanto, os modelos utilizados atualmente estão longe de abranger todas estas características, acabando por concentrar-se principalmente na lesão dopaminérgica da via nigroestriatal, como é o caso do modelo da 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Apesar da grande quantidade de trabalhos relacionados a modelos animais, ainda há muito por se descobrir sobre as alterações promovidas por estas toxinas, tanto em âmbito bioquímico, celular, como comportamental.

## 1.5. Modelo da 6-hidroxi dopamina (6-OHDA)

A 6-OHDA foi a primeira toxina utilizada como modelo de DP. Esta substância é captada pelos neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos, através de seus relativos transportadores de membrana, DAT e NAT, respectivamente. No entanto, a substância não atravessa a barreira hematoencefálica, necessitando uma administração local. Normalmente, três locais são utilizados para sua injeção: diretamente na substância negra, no feixe prosencefálico medial (FPM) ou no estriado dorsal (complexo caudado-putamen) (Schober, 2004). Ao ser administrada no local desejado, a toxina é transportada para o citoplasma neuronal. Uma vez no interior das células, produz radicais livres e disfunção mitocondrial através da inibição dos complexos I e IV da cadeia respiratória mitocondrial (Alvarez-Fischer, Henze *et al.*, 2008). Mais especificamente, foi relatado que a ativação da proteína quinase pró-apoptótica C $\delta$  (PKC $\delta$ ) parece ser o mecanismo responsável pela indução da morte celular, causada pela 6-OHDA (Hanrott, Gudmunsen *et al.*, 2006).

Ao contrário da administração de 6-OHDA na substância negra ou no FPM, um modelo mais crônico pode ser obtido através da administração da toxina diretamente no estriado dorsal, causando uma morte progressiva dos neurônios da substância negra *pars compacta* (SNpc), como consequência da perda dos terminais axônicos através da degeneração retrógrada (Beal, 2001). Além disso, por ter efeito dose-dependente, tem a possibilidade de ser utilizada para promover uma lesão extensa e mimetizar os efeitos motores ou, uma lesão parcial dos neurônios da SNpc, a qual se assemelha aos estágios iniciais da DP (Bove e Perier, 2011). Além disso, o modelo da 6-OHDA possui algumas vantagens, pois induz uma degeneração estável e permanente por diversas semanas, além de não apresentar uma dependência em relação à linhagem, sexo ou idade do animal (Alvarez-Fischer, Henze *et al.*, 2008). Dependendo do local e dose de injeção, a 6-OHDA pode provocar diferentes perfis de morte celular. Quando administrada na SN ou FPB, os neurônios começam sua degeneração após 24 horas e não exibem uma morfologia apoptótica (Bove e Perier, 2011). No entanto, a administração intraestriatal provoca uma degeneração retrógrada, que pode levar de uma a três semanas para estar completa, com presença de morfologia apoptótica (Sauer e Oertel, 1994; Bove e Perier, 2011). Além disso, um estudo mostrou que após a administração estriatal de 6-OHDA, ocorre a expressão de uma grande quantidade de genes relacionados aos processos inflamatórios (Na, Dilella *et al.*, 2010).

Inicialmente, no estriado, a expressão ocorre com maior vigor nos dias 3 e 7, por outro lado, a expressão gênica nigral atingiu seu máximo nos dias 7 e 14 (Na, Dilella *et al.*, 2010). Portanto, parece que as três primeiras semanas posteriores a lesão são fundamentais para a compreensão do processo degenerativo, fornecendo dados importantes sobre o impacto inicial da toxina, recuperação e estabelecimento da lesão.

Apesar da lesão com 6-OHDA ser direcionada a via dopaminérgica nigroestriatal, a qual está, em grande parte, relacionada com a atividade locomotora, sua degeneração é capaz de causar efeitos comportamentais semelhantes, até certa forma, aos sintomas não motores da DP, como alterações emocionais (ansiedade e depressão) e cognitivas.

Outro fator que pode alterar os efeitos da lesão é o sítio de injeção. Normalmente é utilizada a terminologia estriado referindo-se à região dorsal, pois, anatomicamente, o estriado é dividido em dorsal, que compreende a região do caudado e putamen e, ventral composta pelo núcleo acumbens (Deumens, Blokland *et al.*, 2002). Além disso, por ser uma estrutura relativamente grande, o estriado dorsal pode ser dividido em diversas sub-regiões (dorsal, ventral, medial e lateral). Em pacientes com DP, a região do putamen parece ser o local onde ocorre a maior depleção dopaminérgica (Nyberg, Nordberg *et al.*, 1983). Comparando-se com os roedores, a região ventrolateral do estriado dorsal parece ser equivalente ao putamen de seres humanos, a qual recebe uma grande inervação de áreas do neocórtex e a projeção dopaminérgica da substância negra (Kirik, Rosenblad *et al.*, 1998). Estudos anteriores em nosso laboratório mostraram alterações comportamentais e neuroquímicas promovidas pela injeção bilateral de 6-OHDA na região ventrolateral do estriado dorsal. A dose utilizada não foi suficiente para causar efeitos sobre a locomoção, porém, sintomas do tipo depressivo e ansiogênico foram observados, caracterizando um modelo pré-motor da DP (Tadaiesky, Dombrowski *et al.*, 2008; Tadaiesky, Dombrowski *et al.*, 2010).

Alterações no comportamento tipo ansiedade, em modelos animais, já foram evidenciadas por diversos grupos de pesquisa. Porém, os resultados obtidos ainda não apresentam uma coerência sobre o efeito da 6-OHDA nas diferentes variações do modelo. É provável que as variações dentro do modelo de infusão intraestriatal, como por exemplo, local, dose e tempo de recuperação, sejam fatores relevantes nos resultados sobre o comportamento emocional. Alguns estudos resultaram em efeitos do tipo ansiogênicos (Tadaiesky, Dombrowski *et al.*, 2008; Chen, Liu *et al.*, 2011; Yan, Xu *et al.*, 2011), enquanto outros relataram

comportamentos do tipo ansiolítico (Branchi, D'andrea *et al.*, 2008; Branchi, D'andrea *et al.*, 2010). Portanto, ainda é necessário encontrar os fatores responsáveis por estas divergências, para assim obter um conhecimento mais profundo das alterações neuropatológicas ocasionadas através da lesão nigroestriatal.

Outro fator emocional presente na DP é a redução na capacidade de sentir prazer em eventos normalmente prazerosos, denominada de anedonia, sendo um dos elementos mais importantes nos transtornos de depressão. Este comportamento está relacionado diretamente com estruturas do sistema límbico, como a transmissão dopaminérgica nos núcleos da base (Keedwell, Andrew *et al.*, 2005; Lemke, Brecht *et al.*, 2006). Além disso, a transmissão serotoninérgica tem um papel fundamental neste tipo de transtorno (Haenisch e Bonisch, 2011). No entanto, a resposta destes neurônios em relação à lesão dopaminérgica, bem como seu papel nas alterações comportamentais ainda é controversa. Em diversos estudos realizados desde a utilização do modelo, resultados conflitantes sobre os níveis de serotonina e seus metabólitos foram obtidos. Alguns estudos observaram um aumento nos níveis de 5-HT e 5-HIAA e aumento na inervação serotoninérgica (Luthman, Bolioli *et al.*, 1987; Commins, Shaughnessy *et al.*, 1989; Zhou, Bledsoe *et al.*, 1991; Maeda, Kannari *et al.*, 2003; Carta, Carlsson *et al.*, 2007), outros, uma diminuição (Karstaedt, Kerasidis *et al.*, 1994; Tadaiesky, Dombrowski *et al.*, 2008). Além disso, alguns estudos sugerem que a 5-HT não apresenta alterações em relação à lesão com 6-OHDA (Carta, Carlsson *et al.*, 2007; Eskow Jaunarajs, Dupre *et al.*, 2010; Navailles, Benazzouz *et al.*, 2010). Aliado a isso tudo, estudos mostraram que citocinas pró-inflamatórias podem alterar o metabolismo da serotonina em diferentes modelos animais de inflamação. Por exemplo, a administração de IL-6, IL-1 ou de LPS pode aumentar os níveis de 5-HT e 5-HIAA em algumas regiões do cérebro de roedores (Dunn, 1992; Wang e Dunn, 1999; Zhang, Terreni *et al.*, 2001).

Nos últimos anos, diversos estudos direcionaram seu foco na participação do sistema imunológico na DP (Barnum e Tansey, 2010). A inflamação no SNC geralmente é indicada através do acúmulo de células microgliais, que são os macrófagos residentes no tecido nervoso (Guillemin e Brew, 2004; Long-Smith, Sullivan *et al.*, 2009). Em estado normal de repouso, as células microgliais, distribuídas no sistema nervoso, apresentam uma atividade genômica suprimida (Wood, 2003). Após sua ativação, que pode ser provocada por diversos estímulos, a célula assume uma forma amebóide onde é capaz de produzir uma grande quantidade de mediadores neurotóxicos que são fundamentais para as

funções de defesa e reparo tecidual. Porém, em algumas condições clínicas as células microgliais parecem manter seu estado ativado e ocasionar toxicidade aos neurônios (Wood, 2003). Além disso, estudos têm mostrado que a expressão sustentada de citocinas pró-inflamatórias pode ocasionar prejuízos cognitivos e emocionais (Capuron, Neurauter *et al.*, 2003; Huang, Henry *et al.*, 2008).

No modelo de 6-OHDA, alguns estudos mostraram uma ativação microglial em resposta à administração da toxina (Nagatsu e Sawada, 2005; Na, Dilella *et al.*, 2010). Sabendo-se que a lesão dopaminérgica causada por 6-OHDA é capaz de induzir um aumento na quantidade de mediadores inflamatórios e células microgliais (Barnum e Tansey, 2010), podemos utilizar este modelo para avaliar a participação do processo inflamatório na DP.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Buscamos neste trabalho entender melhor as alterações neuroquímicas e comportamentais promovidas através da lesão parcial da via nigroestriatal avaliando o fator temporal de três semanas consecutivas à lesão. Além disso, foram investigados o comprometimento das células microgliais e uma possível relação entre seu recrutamento e as alterações comportamentais, produzidas através do modelo de 6-OHDA intraestriatal, ao longo do tempo.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar as alterações comportamentais de ratos lesionados através da administração intraestriatal de 6-OHDA nos testes do campo aberto, labirinto em cruz elevado e consumo de sacarose em diferentes intervalos de tempo após a lesão dopaminérgica.

- Investigar o efeito da administração intraestriatal de 6-OHDA sobre os níveis de monoaminas e seus metabólitos no estriado (DA, DOPAC, 5-HT, 5-HIAA) através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em diferentes intervalos de tempo após a lesão dopaminérgica.

- Estudar o efeito da administração intraestriatal de 6-OHDA sobre a acumulação de células microgliais, na substância negra, estriado e hipocampo, através dos níveis da enzima NAG em diferentes intervalos de tempo após a lesão dopaminérgica.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos, com idade aproximada de 3 meses, pesando entre 250 e 300 gramas. Os animais, fornecidos pelo biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), foram mantidos em grupos de 5 animais por caixa de moradia (42 x 34 x 17 cm) e mantidas em condições controladas de temperatura e umidade ( $22 \pm 1$  °C), com ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais tinham livre acesso à água e comida. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA/UFSC), registrados no processo número: 23080.011821/2010-12.

#### **3.2. Drogas**

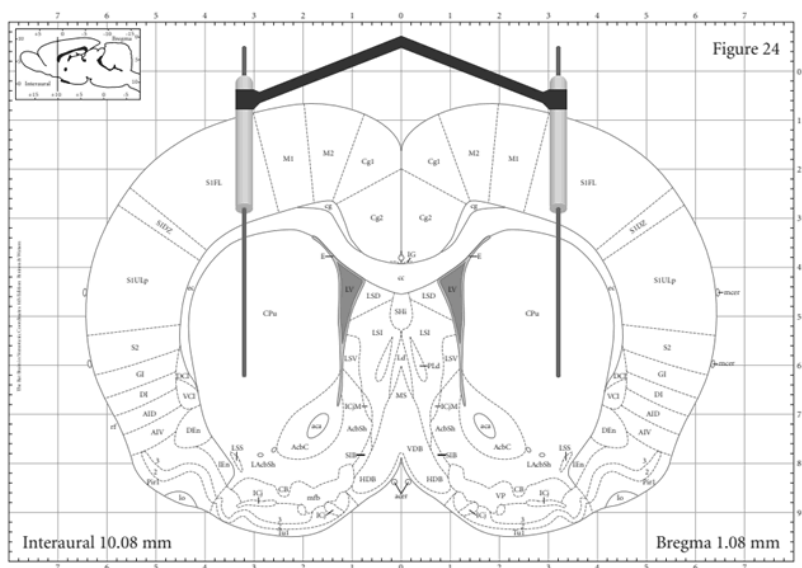
6-OHDA (dissolvida em solução de NaCl 0.9% com ácido ascórbico 0,1%, Sigma, EUA, 149802) e Cloridrato de Desipramina (dissolvida em solução salina, Sigma, EUA, D3900), Xilazina (10 mg/ml; Rompun®, Bayer, Brasil) e Quetamina (58 mg/ml; Dopalen®, Agribands, Brasil). 1-heptanossulfonato de sódio (Sigma-Aldrich, EUA, H2766), 3,4-dihidroxifenilacético (Sigma-Aldrich, EUA, 850217), 3,4-dihidróxi-benzilamina (Sigma-Aldrich, EUA, 858781), Ácido 5-hidroxi-indolacético (Sigma-Aldrich, EUA, H8876), Ácido Cítrico (Sigma-Aldrich, EUA, 251275), Ácido Etilenodiamino tetraacético (Sigma-Aldrich, EUA, E0399), Cloridrato de Dopamina (Sigma-Aldrich, EUA, H8502), Cloridrato de Serotonina (Sigma-Aldrich, EUA, H9523), Fosfato de Sódio Monobásico (Merck, 6346), Metabissulfito de Sódio (Sigma-Aldrich, EUA, 255556).

#### **3.3. Administração intraestriatal de 6-OHDA**

Os animais foram tratados com desipramina (20 mg/kg) 30 minutos antes da injeção de 6-OHDA. Para anestésias os animais foram utilizada uma solução de Xilazina e Quetamina (1:2), administrada via intraperitoneal na dose de 1ml/kg (solução/peso corporal). Após a adaptação do animal ao aparelho estereotáxico, realizou-se a assepsia, com álcool iodado, da área desejada. Uma solução de 2,5 µl contendo 12



$\mu\text{g}$  de 6-OHDA ou apenas  $2,5 \mu\text{l}$  do veículo (grupo sham) foi injetada simultaneamente, através de uma bomba de infusão, em cada estriado (1.1 mm antero-posterior, 3.2mm médio-lateral e 6.2mm dorso-ventral em relação ao Bregma), à uma velocidade de  $0.5 \mu\text{l}/\text{min}$ , utilizando-se uma seringa Hamilton de  $10 \mu\text{L}$  com agulha de calibre 28. Para que a agulha mantivesse sua direção, duas cânulas foram utilizadas, as quais desciam 1,8 mm a partir do Bregma (Figura 2). Após a injeção as agulhas permaneceram no local por 2 min para permitir uma difusão completa da solução, em seguida a agulha e a cânula foram retiradas (Tadaiesky, Dombrowski *et al.*, 2008).

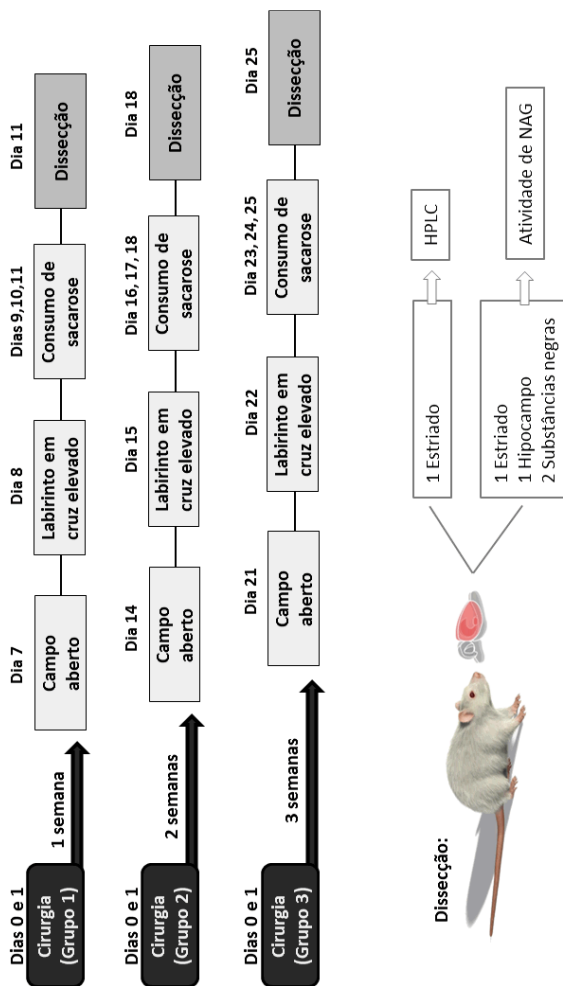


**Figura 2.** Esquema ilustrando o local da injeção da 6-OHDA, bem como o posicionamento das cânulas. Figura adaptada de Paxinos (Paxinos e Watson, 2007).

### 3.4. Cronograma Experimental

Três grupos experimentais distintos foram utilizados, sendo que a única variável entre eles foi o tempo de espera, após a cirurgia, até a sequência de experimentos (Figura 3). Os intervalos foram de 7, 14 e 21 dias. Já a sequência de experimentos consistiu, primeiramente, no teste

do campo aberto, no dia seguinte o teste do labirinto em cruz elevado e, nos três últimos dias foi realizado o teste do consumo de sacarose, sendo que no último dia procedeu-se a eutanásia dos animais.

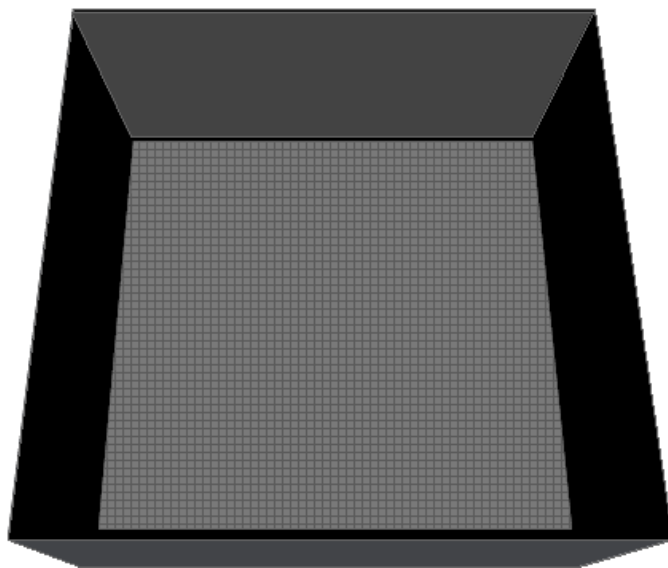


**Figura 3.** Esquema ilustrando a sequência cronológica dos experimentos.

### 3.5. Testes Comportamentais

#### 3.5.1. Teste do Campo Aberto

Para avaliarmos possíveis alterações motoras, os animais foram testados durante 5 minutos no campo aberto (Figura 4). O aparato, feito de madeira e fórmica, é formado por um chão de cor cinza (100 x 100 cm), com paredes brancas de 40 cm de altura. Durante os experimentos, um sistema de câmera de vídeo, posicionado sobre o aparato, capturou as imagens que foram analisadas posteriormente pelo programa ANY-Maze (Stoelting, USA) (Bailoo, Bohlen *et al.*, 2010). A distância percorrida e a velocidade média foram utilizadas como parâmetro de atividade locomotora espontânea.



**Figura 4.** Ilustração representativa do campo aberto.

### 3.5.2. Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O aparato, feito de madeira, consiste de dois braços abertos (50 x 10 cm), opostos a dois braços fechados (50 x 10 x 10 cm), elevados 60 cm acima do chão (Figura 5). Cada animal foi colocado na plataforma central de frente para o um braço fechado e, observados durante um período de 5 min. Os seguintes parâmetros foram mensurados: número de entradas nos braços abertos e nos braços fechados, o tempo de permanência nos braços abertos e nos braços fechados. Foi considerada uma entrada quando as quatro patas do animal estavam no interior do braço. Além disso, será utilizado o número total de entradas nos braços fechados como uma medida de locomoção (Cruz, Frei *et al.*, 1994).



**Figura 5.** Ilustração representativa do Labirinto em Cruz Elevado (LCE).

### 3.5.3. Teste do Consumo de Sacarose

Os animais foram separados individualmente e habituados, durante as 24 horas iniciais, com duas garrafas de água. Em seguida, uma das garrafas foi substituída por uma solução de sacarose (0,8%), permanecendo por 48 h nesta situação. A posição das garrafas foi invertida após as primeiras 24 horas (Figura 6). O consumo foi medido pesando-se as garrafas, no mesmo horário, durante os três dias (Slattery, Markou *et al.*, 2007; Tadaiesky, Dombrowski *et al.*, 2008). A porcentagem de preferência por sacarose foi calculada de acordo com a fórmula: Porcentagem de preferência por sacarose = (Consumo de sacarose/Peso do animal) / Consumo total x 100, onde o consumo total = (Consumo de solução de sacarose/Peso do animal)\*100 + (Consumo de água/Peso do animal)\*100 .



**Figura 6.** Esquema representativo do teste do Consumo de Sacarose.

### 3.6. Testes Neuroquímicos

#### 3.6.1. Determinação dos níveis cerebrais de monoaminas através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Para verificar o efeito da lesão estriatal sobre as concentrações de monoaminas, analisamos o conteúdo estriatal de dopamina (DA),

serotonina (5-HT) e seus metabólitos, o ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) e o ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando-se um método adaptado de Linder e colaboradores (Linder, Diaz *et al.*, 2008). Três grupos, nos intervalos de uma, duas e três semanas após a lesão, foram submetidos à eutanásia por decapitação e seus cérebros removidos. Em seguida, foram submetidos por 5 segundos a uma solução salina a 4°C. Rapidamente, as estruturas foram removidas e congeladas. O estriado de um hemisfério foi selecionado para análise em HPLC e, mantido a -80°C em uma solução de 0,1 M de ácido perclórico contendo 0,02% de metabisulfito de sódio e uma concentração conhecida de dihidroxibenzilamina (DHBA), como padrão interno. Em cada grupo, metade das amostras foi oriunda do hemisfério esquerdo, enquanto que a outra metade foi proveniente do hemisfério direito. Como não houve diferença entre as concentrações de monoaminas entre os hemisférios, os dados foram agrupados em um único grupo.

O equipamento utilizado para quantificação foi um sistema modular de cromatografia líquida de alta eficiência da marca Waters, modelo Alliance e2695, composto por uma bomba quaternária, um degaseificador, um injetor automático refrigerado, além de um aquecedor de coluna, sendo o módulo acoplado a um detector eletroquímico amperométrico modelo Waters 2465 (Waters, Milford, MA, USA). A célula analítica de fluxo é composta de um eletrodo de trabalho de carbono vítreo (GC-WE) com 2 mm de diâmetro e, operado em corrente contínua ajustada a um potencial de oxidação de +400 mV versus a um eletrodo de referência de Ag/AgCl *in situ* (ISAAC) e um eletrodo auxiliar de aço inoxidável. O programa computacional utilizado para controle, aquisição e processamento dos dados foi o Empower 2<sup>®</sup> (Waters Co.).

A fase móvel foi composta por 90 mM de fosfato de sódio monobásico, 50 mM de ácido cítrico, 1,7 mM de 1-heptanosulfonato de sódio, 50 µM de EDTA dissódico, 10% de Acetonitrila (CH<sub>3</sub>CN) e H<sub>2</sub>O ultrapura (Milli-Q, Millipore). A fase móvel teve o pH ajustado para 3,0 com hidróxido de sódio e, em seguida, a fase móvel foi filtrada através de uma membrana de acetato de celulose com porosidade de 0,45 µM (Millipore) e degaseificada a vácuo em banho de ultrassom de 40 kHz por 10 minutos.

O fluxo foi bombeado de modo isocrático a 0,30 mL por minuto, através de uma coluna de fase reversa (C18) modelo Synergi Hydro-RP, 150 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro interno, empacotada com

partículas de 4µM de diâmetro (Phenomenex, Torrance, USA). A coluna foi protegida por uma guarda coluna (C18) com 20 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro interno (Alltech, Deerfield, USA), ambas utilizadas na temperatura de 35°C. Para equilíbrio completo da coluna cromatográfica a fase móvel foi bombeada a um fluxo de 0,1 ml/min. durante 12 horas (“overnight”) antes de iniciar as análises.

As amostras de tecido foram submetidas a um banho de ultrassom, de 40 kHz, por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 15.000 RPMs durante 20 min, a 4°C. O sobrenadante foi mantido em microtubos do autoinjeter a uma temperatura de 4°C e uma alíquota de 20 µL de cada amostra foi injetada no cromatógrafo a cada 8 minutos.

As amostras foram quantificadas através das curvas de calibração construídas como os padrões dos analitos dissolvidos em 0,1 M de ácido perclórico contendo 0,02% de metabisulfito de sódio. As concentrações das curvas foram de 20, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.000 ng/mL de cada analito. A partir da análise das amostras de calibração, a equação da curva de calibração foi determinada por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A curva de calibração foi traçada lançando-se no eixo “x” as diferentes concentrações das soluções padrões versus a área dos picos de cada analito que foi lançada no eixo “y”. Para o cálculo das concentrações dos analitos nas amostras obtidas nos experimentos empregou-se a equação  $y = ax + b$ , onde x é a concentração do analito na amostra (ng/mL) e y é a área extraída dos picos do analito nos cromatogramas, a é a inclinação da reta e b o valor do intercepto. Finalmente, os valores obtidos foram expressos em nanogramas por miligrama de tecido úmido.

### **3.6.2. Determinação da atividade da enzima N-acetilglucosaminidase (NAG)**

A acumulação de macrófagos no tecido nervoso foi quantificada, indiretamente, através da determinação dos níveis da enzima N-acetilglucosaminidase (NAG). Para isso, um hipocampo, um estriado e duas substâncias negra foram coletadas na dissecação, juntamente com a coleta das amostras para análise em HPLC. As amostras foram homogeneizadas em tampão 1 (NaCl 0,1 M; NaPO4 0,02 M; Na/EDTA 0,015 M; pH 7,4) e centrifugadas a 10.000 r.p.m. por 15 minutos a 4 °C. Em seguida, foi adicionado NaCl 0,2 % e após 30

segundos NaCl 1,6 % contendo glicose 5 %. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 10.000 r.p.m. por 15 minutos a 4°C. O precipitado formado foi suspenso em tampão 2 (NaPO<sub>4</sub> 0,5 M e 5 % de hexadeciltrimetilamônio (H-TAB); pH 5,4), as amostras obtidas foram congeladas e descongeladas 3 vezes em nitrogênio líquido. Após o último descongelamento, as amostras foram centrifugadas novamente a 10.000 r.p.m. por 15 minutos a 4°C; e 25 µl do sobrenadante foram utilizados para o ensaio de atividade da NAG. A reação enzimática para NAG foi realizada pela adição de 25 µl de p-nitrofenil-2-acetamida β-D-glucopiranosida 2,25 mM e 100 µl de tampão citrato (pH 4,5). A absorbância foi medida por leitor de microplaca (Elisa) Multiskan FC-Thermo Scientific em 405 nm. Os resultados foram expressos como densidade óptica por miligrama de tecido (Lloret e Moreno, 1995; Pimentel, Pinheiro *et al.*, 2011).

### **3.7. Análise Estatística**

Os valores foram expressos pela média ± erro padrão da média (E.P.M.) e as comparações estatísticas foram realizadas através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. O programa utilizado para análise estatística foi o Statistica versão 8.0 (StatSoft Inc, Tulsa OK, EUA).



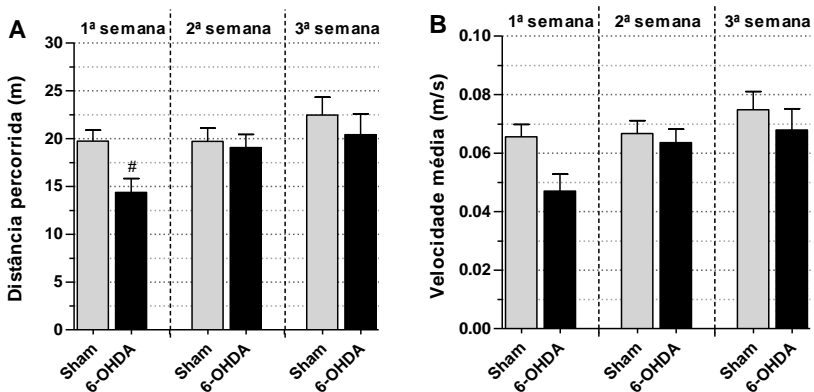
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Testes Comportamentais

#### 4.1.1. Efeito do tratamento com 6-OHDA na atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto

Os resultados do teste do campo aberto, expressos na Figura 7, ilustram o efeito da administração de 6-OHDA sobre a atividade locomotora espontânea dos animais (n=9-17). A análise de variância (ANOVA) de duas vias (tratamento x tempo) sobre a distância percorrida (Figura 7, A) revelou um efeito significativo para o fator tratamento [ $F(5,83) = 4,576$ ;  $P \leq 0,05$ ] e, para o fator tempo [ $F(5,83) = 3,912$ ;  $P \leq 0,05$ ]. Porém, a interação entre os fatores não resultou em significância estatística [ $F(5,83) = 1,405$ ;  $P > 0,05$ ]. A análise subsequente através do teste post-hoc de Newman-Keuls indicou diferença significativa entre o grupo 6-OHDA da primeira semana em relação aos grupos da segunda e terceira semana, mas não com o grupo Sham da primeira.

A ANOVA sobre a velocidade média, durante o teste do campo aberto (Figura 7, B), resultou em um efeito significativo para o fator tratamento [ $F(5,72) = 5,302$ ;  $P \leq 0,05$ ] e, para o fator tempo [ $F(5,72) = 3,320$ ;  $P \leq 0,05$ ], mas não para a interação entre ambos [ $F(5,72) = 0,521$ ;  $P > 0,05$ ]. Após, a análise de Newman-Keuls revelou uma diferença apenas entre o grupo 6-OHDA da primeira semana com o grupo Sham da terceira semana.



**Figura 7.** Efeito da administração bilateral de veículo ou 6-OHDA (12 µg por injeção) sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto. Os valores estão expressos pela média + E.P.M. #P≤0,05 (em comparação com aos grupos da segunda e terceira semana) através da ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Newman-Keuls.

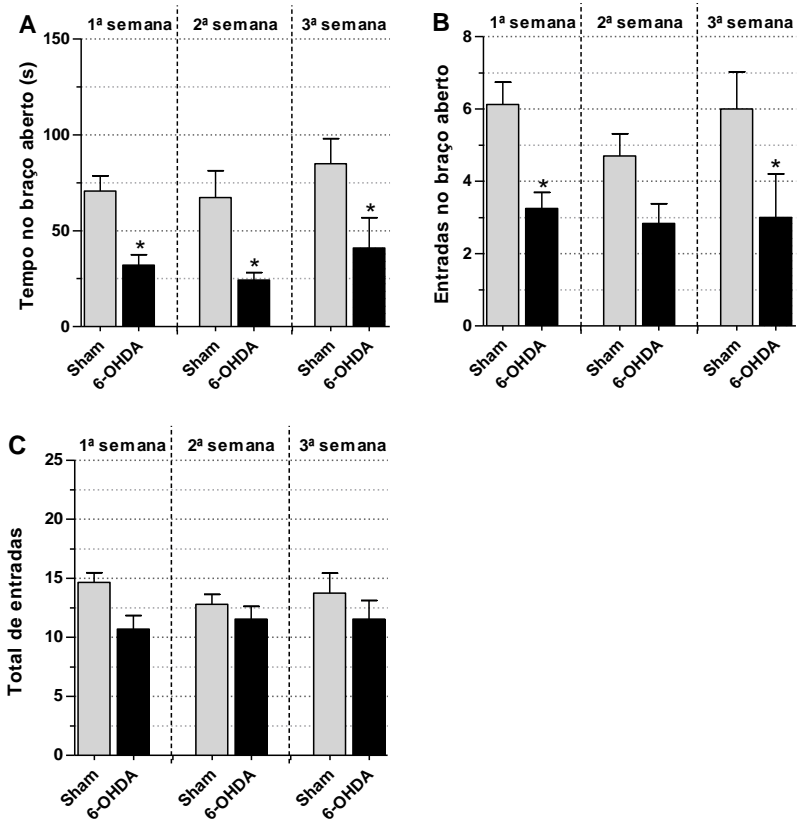
#### 4.1.2. Efeito do tratamento com 6-OHDA no teste do labirinto em cruz elevado (LCE)

A Figura 8 (A) ilustra o efeito da administração de 6-OHDA, no LCE, em relação ao tempo total de permanência no braço aberto (n=10-17). A ANOVA revelou um efeito significativo no fator tratamento [ $F(5,81) = 23,61$ ;  $P \leq 0,001$ ], mas não no tempo [ $F(5,81) = 1,14$ ;  $P > 0,05$ ] ou na interação entre os fatores [ $F(5,81) = 0,03$ ;  $P > 0,05$ ]. No teste de Newman-Keuls, os grupos 6-OHDA diferiram significativamente de seus respectivos grupos Sham.

Em relação ao número de entradas no braço aberto (Figura 8, B), a ANOVA mostrou um efeito significativo no tratamento [ $F(5,81) = 23,61$ ;  $P \leq 0,001$ ], mas não no tempo [ $F(5,81) = 1,14$ ;  $P > 0,05$ ] ou na interação entre os fatores [ $F(5,81) = 0,03$ ;  $P > 0,05$ ]. O subsequente teste de Newman-Keuls revelou uma diferença significativa entre os grupos 6-OHDA da primeira e terceira semana com seus respectivos grupos Sham.

Já o número total de entradas (Figura 8, C), apresentou diferença significativa para o fator tempo [ $F(5,73) = 6,089$ ;  $P \leq 0,05$ ], mas não para os fatores tratamento [ $F(5,73) = 0,101$ ;  $P > 0,01$ ] ou para a

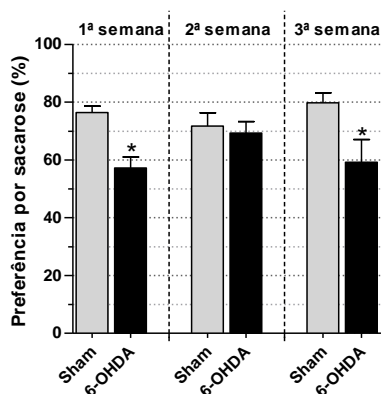
interação entre os fatores [ $F(5,73) = 0,683$ ;  $P > 0,05$ ]. No entanto, o teste de Newman-Keuls não apresentou diferença significativa entre os grupos.



**Figura 8.** Efeito da administração bilateral de veículo ou 6-OHDA (12  $\mu\text{g}$  por injeção) no teste do labirinto em cruz elevado. (A) Tempo total de permanência nos braços abertos, (B) número total de entradas nos braços abertos e (C) número total de entradas. Os valores estão expressos pela média + E.P.M.  $*P \leq 0,05$  (em comparação com o grupo Sham do mesmo dia, através da ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Newman-Keuls).

### 4.1.3. Efeito do tratamento com 6-OHDA no teste do consumo de sacarose

A Figura 9 ilustra os efeitos da administração de 6-OHDA no teste do consumo de sacarose (n=8-10), a ANOVA revelou uma diferença significativa sobre o fator tratamento [ $F(5,48) = 13,13$ ;  $P \leq 0,001$ ], mas não para os fatores tempo [ $F(5,48) = 0,31$ ;  $P > 0,05$ ] e interação entre ambos [ $F(5,48) = 2,33$ ;  $P > 0,05$ ]. O subsequente teste de Newman-Keuls mostrou que os grupos 6-OHDA da primeira e terceira semana diferiram significativamente dos seus respectivos grupos Sham.



**Figura 9.** Efeito da administração bilateral de veículo ou 6-OHDA (12  $\mu$ g por injeção) no teste do consumo de sacarose. Os valores estão expressos pela média + E.P.M. \* $P \leq 0,05$  (em comparação com o grupo Sham do mesmo dia, através da ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Newman-Keuls).

### 4.2. Níveis encefálicos de monoaminas (HPLC)

A figura 10 ilustra os níveis cerebrais de (A) dopamina, (B) DOPAC, (C) serotonina e (D) ácido 5-hidroxiindolacético no estriado dos grupos sham e 6-OHDA (n=6-11).

Sobre os níveis de dopamina (Figura 10, A), a ANOVA revelou uma diferença significativa para o fator tratamento [ $F(5,50) = 65,61$ ;  $P \leq 0,001$ ], mas não para o fator tempo [ $F(5,50) = 2,47$ ;  $P > 0,05$ ] ou a

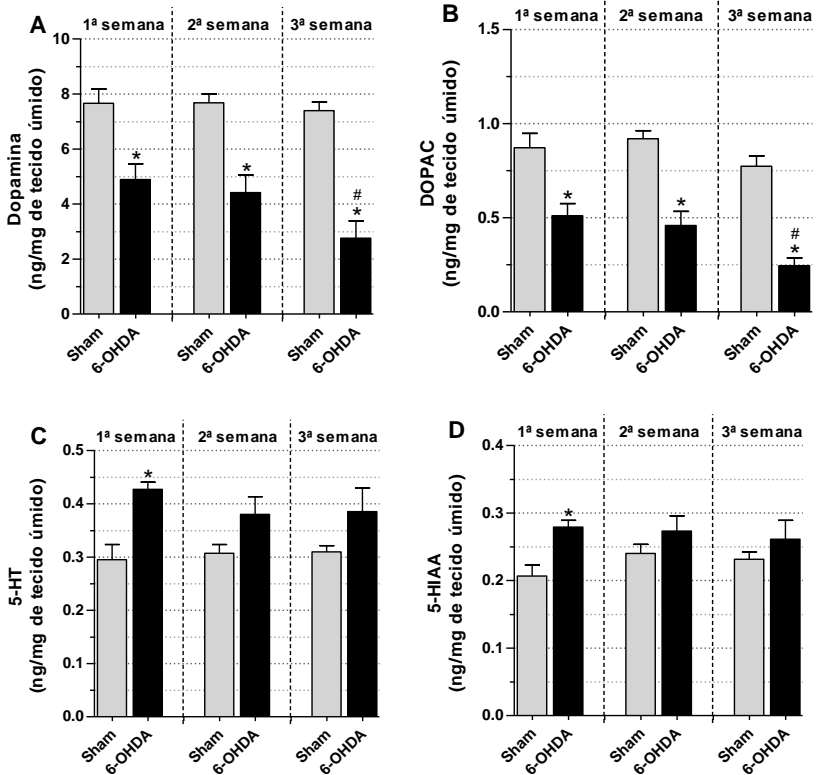
interação entre os fatores [ $F(5,50) = 1,43$ ;  $P > 0,05$ ]. O teste de Newman-Keuls mostrou uma diferença significativa entre todos os grupos 6-OHDA e seus respectivos grupos Sham. Além disso, o grupo 6-OHDA do dia 25 diferiu significativamente dos grupos 6-OHDA dos dia 11 e 18.

Já em relação aos níveis do DOPAC (Figura 10, B), a ANOVA mostrou uma diferença significativa para o fator tratamento [ $F(5,50) = 70,59$ ;  $P \leq 0,001$ ] e para o fator tempo [ $F(5,50) = 4,53$ ;  $P \leq 0,01$ ], mas não para a interação entre ambos [ $F(5,50) = 0,77$ ;  $P > 0,05$ ]. O subsequente teste de Newman-Keuls revelou uma diferença entre todos os grupos 6-OHDA e seus respectivos grupos Sham. Ainda, o grupo 6-OHDA do dia 25 foi diferente dos grupos 6-OHDA do dia 11 e 18.

Sobre os níveis de serotonina (Figura 10, C), a ANOVA revelou uma diferença no fator tratamento [ $F(5,50) = 20,04$ ;  $P \leq 0,001$ ], mas não no fator tempo [ $F(5,50) = 0,28$ ;  $P > 0,05$ ] ou na interação entre ambos [ $F(5,50) = 0,90$ ;  $P > 0,05$ ]. O teste de Newman-Keuls mostrou uma diferença significativa entre o grupo 6-OHDA do dia 11 e seu respectivo grupo Sham.

Na análise sobre os níveis de 5-HIAA (Figura 10, D), a ANOVA resultou em uma diferença no fator tratamento [ $F(5,50) = 10,08$ ;  $P \leq 0,01$ ], mas não no fator tempo [ $F(5,50) = 0,40$ ;  $P > 0,05$ ] ou na interação entre os fatores [ $F(5,50) = 0,97$ ;  $P > 0,05$ ]. Já o teste de Newman-Keuls mostrou uma diferença significativa entre o grupo 6-OHDA do dia 11 e seu respectivo grupo Sham.

## Estriado



**Figura 10.** Efeito da administração de veículo ou 6-OHDA (12  $\mu$ g por injeção) no estriado sobre os (A) níveis de dopamina (DA), (B) ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), (C) serotonina (5-HT) e (D) ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) no estriado de ratos. Os valores estão expressos pela média + E.P.M. \* $P \leq 0,05$  em comparação com o grupo Sham do mesmo dia e # $P \leq 0,05$  em comparação ao grupo 6-OHDA dos dias 11 e 18 (comparados através da ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Newman-Keuls).

### **4.3. Determinação da atividade da enzima N-acetil-glucosaminidase (NAG)**

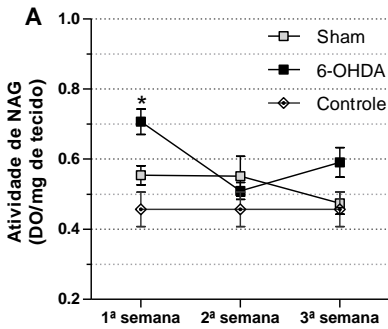
Em relação aos níveis de NAG no estriado (Figura 11, A) de ratos (n=4-5), a ANOVA resultou em uma diferença significativa para os fatores tratamento [ $F(5,23) = 5,652$ ;  $P \leq 0,05$ ], tempo [ $F(5,23) = 4,387$ ;  $P \leq 0,05$ ] e interação entre ambos [ $F(5,23) = 3,431$ ;  $P \leq 0,05$ ]. No teste de Newman-Keuls, os grupos 6-OHDA dos dias 10 e 24 diferiram significativamente dos seus respectivos grupos Sham.

O grupo controle não foi incluído nas comparações estatísticas, pois não passou pelo procedimento cirúrgico e nem pelos testes, servindo apenas como parâmetro de comparação gráfica.

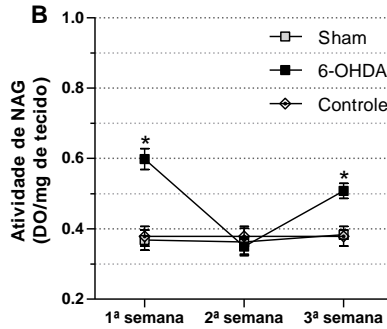
Em relação aos níveis de NAG no hipocampo (Figura 11, B) (n=4-5), a ANOVA também resultou em um efeito significativo para todos os fatores, tratamento [ $F(5,23) = 26,77$ ;  $P \leq 0,001$ ], tempo [ $F(5,23) = 11,81$ ;  $P \leq 0,001$ ] e interação entre os fatores (tratamento x tempo) [ $F(5,23) = 10,20$ ;  $P \leq 0,001$ ]. O teste de Newman-Keuls revelou uma diferença significativa entre os grupos 6-OHDA dos dias 10 e 24 com seus respectivos grupos Sham.

Já na SN (Figura 11, C) (n=4-5), a análise estatística apresentou um efeito significativo apenas para o fator tratamento [ $F(5,20) = 4,693$ ;  $P \leq 0,05$ ]. O fator tempo [ $F(5,20) = 2,798$ ;  $P > 0,05$ ] e a interação dos fatores [ $F(5,20) = 2,666$ ;  $P > 0,05$ ] não apresentaram diferenças significativas.

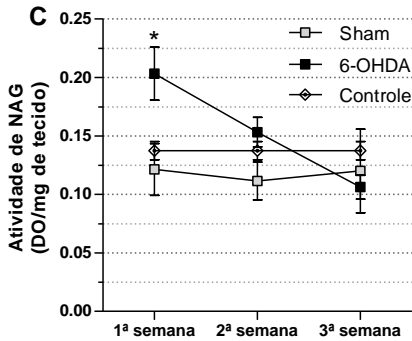
## Estriado



## Hipocampo



## Substância negra



**Figura 11.** Efeito da administração de veículo ou 6-OHDA (12 µg por injeção) no (A) estriado, (B) hipocampo e (C) substância negra sobre os níveis de NAG. Os valores estão expressos pela média ± E.P.M. \* $P \leq 0,05$  (em comparação com o grupo Sham do mesmo dia, através da ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Newman-Keuls).



## 5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo confirmam e estendem resultados da literatura em que a administração bilateral de 6-OHDA no estriado de ratos induz uma queda progressiva nos níveis de dopamina no estriado, bem como alterações nos níveis de serotonina. Esta depleção dopaminérgica se manteve ao longo de 25 dias. Além disso, nossos resultados mostraram variações na emocionalidade relativas ao curso temporal entre a exposição à toxina e os testes comportamentais. Efeitos do tipo ansiogênico também foram detectados em todos os intervalos testados, porém, o comportamento do tipo anedonia foi mais pronunciado durante a primeira e terceira semana. É importante destacar que não foram observadas alterações na atividade locomotora espontânea, sugerindo que os efeitos emocionais representam uma fase pré-motora da DP. Ao menos no nosso conhecimento, acreditamos que o presente estudo é pioneiro em demonstrar um aumento nos níveis de células microgliais no hipocampo de ratos lesionados com 6-OHDA. Estes resultados reforçam as hipóteses sobre a participação de um processo neuroinflamatório associado à degeneração da via nigroestriatal.

Diversos neurotransmissores estão relacionados com os transtornos de ansiedade, e a dopamina é um deles, estando associada com a etiologia e expressão da ansiedade (Taylor, Riblet *et al.*, 1982; De La Mora, Gallegos-Cari *et al.*, 2010). Nossos resultados mostraram uma diminuição, na dopamina estriatal, de 36, 42 e 62% nos dias 11, 18 e 25, respectivamente. No entanto, os mecanismos exatos responsáveis pelas alterações do tipo ansiedade, nos modelos da DP, ainda não estão completamente elucidados. Porém, se sabe que a amígdala basolateral tem um papel fundamental na regulação nos comportamentos relacionados com a ansiedade (Davis, Rainnie *et al.*, 1994; Ledoux, 2000) e, recebe projeções neuronais de diversas áreas, dentre elas a área tegmental ventral. Recentemente, foi mostrado que a lesão estriatal bilateral de 6-OHDA produz morte celular não apenas na substância negra, mas também dos neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral (ATV) (Chen, Liu *et al.*, 2011). Portanto, é muito provável que a administração intraestriatal de 6-OHDA, no presente estudo, possa ter lesionado de forma parcial os neurônios dopaminérgicos da ATV, estes por sua vez, responsáveis pela regulação dos comportamentos de ansiedade através da projeção amigdalár, resultando no comportamento

ansio gênico encontrado em todas as avaliações do labirinto em cruz elevado.

Além disso, o córtex pré-frontal medial (CPFM) pode estar participando deste efeito ansio gênico, pois, se sabe que a depleção dopaminérgica nesta região é capaz de induzir uma diminuição significativa no tempo de permanência de ratos no braço aberto do LCE (Espejo, 1997). Ainda, as projeções dopaminérgicas da ATV são amplamente distribuídas no córtex pré-frontal (Beckstead, Domesick *et al.*, 1979; Albanese e Bentivoglio, 1982) e, como mencionado acima, estas projeções parecem estar comprometidas após a lesão intraestriatal com 6-OHDA. Contudo, ainda são necessários estudos adicionais para identificar qual a participação exata destas estruturas sobre as manifestações ansio gênicas promovidas no modelo de 6-OHDA, pois, se sabe que os sintomas de ansiedade na DP apresentam características clínicas peculiares, formando um subtipo de ansiedade peculiar desta doença (Pontone, Williams *et al.*, 2011).

O estriado dorsal de roedores, que corresponde ao caudado e putamen dos seres humanos, é composto por neurônios GABAérgicos, denominados neurônios espinhosos médios (NEMs), correspondendo cerca de 90% dos neurônios do estriado dorsal. (Mathur e Lovinger, 2012). O modelo clássico do controle do movimento está relacionado com duas projeções paralelas nos gânglios da base, formadas por NEMs. A via direta que se projeta até a substância negra e facilita o movimento, e, a via indireta que atinge o globo pálido e inibe o movimento (Kravitz, Freeze *et al.*, 2010). Este sistema é modulado por duas inervações monoaminérgicas, uma delas é a via dopaminérgica oriunda da substância negra, a outra, com menor densidade de fibras, é a via serotoninérgica que parte do núcleo dorsal da rafe (DeLong e Wichmann, 2009; Mathur e Lovinger, 2012). Portanto, a lesão desta via dopaminérgica esta diretamente relacionada com prejuízos na locomoção espontânea. Além disso, estudos mostram que a dose de 6-OHDA utilizada está diretamente relacionada com a magnitude do prejuízo motor, aumentando conforme à dose e consequentemente à extensão da lesão (Lee, Sauer *et al.*, 1996). Pequenas doses, capazes de degenerar uma branda porção de neurônios, não são capazes de induzir prejuízos motores (Sauer e Oertel, 1994; Lee, Sauer *et al.*, 1996).

Após a administração intraestriatal de 6-OHDA, a toxina é captada pelos transportadores de dopamina e noradrenalina. A administração prévia de desipramina é capaz de inibir sua captação pelas fibras noradrenérgicas. Após a captação de 6-OHDA, o processo

de degeneração retrógrada é iniciado. Estudos mostram que, 24 horas após a injeção estriatal de 6-OHDA, pode-se observar uma densa degeneração dos botões sinápticos dos terminais nigroestriatais (Hokfelt e Ungerstedt, 1973). Neste mesmo período, também ocorre uma diminuição na imunoreatividade a enzima tirosina hidroxilase (presente em neurônios dopaminérgicos), que atinge seu máximo de redução cinco dias após a injeção (Jenkins, O'shea *et al.*, 1993). Porém, estes períodos podem variar conforme a dose da toxina e o local de injeção. Observamos em nosso estudo uma depleção nos níveis de dopamina desde a primeira avaliação, continuando em queda pelo menos 25 dias após a lesão. Esta diminuição foi, provavelmente, devida a degeneração dos terminais dopaminérgicos estriatais e, em última instância, pela morte dos neurônios situados na SNpc, como já está bem relatado na literatura (Sauer e Oertel, 1994; Lee, Sauer *et al.*, 1996). Por outro lado, a serotonina teve seu nível estriatal elevado apenas 11 dias após a cirurgia, apesar da tendência nos intervalos posteriores, não foi significativamente diferente. Por problemas técnicos os níveis de noradrenalina e monoaminas hipocámpais não foram incluídos no presente estudo.

As fibras dopaminérgicas e serotoninérgicas do estriado interagem entre si, sendo a primeira encontrada mais densamente em relação à segunda nesta estrutura (Zhou, Bledsoe *et al.*, 1991). Segundo Zhou, esta diferença na densidade, associada com fatores tróficos, receptores específicos e matriz extracelular, determina as características do sistema de fibras para cada região do sistema nervoso. Assim, a alteração neste equilíbrio dinâmico, como por exemplo, uma desnervação dopaminérgica, pode evocar alterações na densidade e sensibilidade de receptores, além de reorganizar a densidade das fibras e quantidade de neurotransmissores. Em seu trabalho, uma lesão dopaminérgica na substância negra resultou, dois meses após, em um aumento na densidade das fibras serotoninérgicas no estriado, além do aumento nos níveis de serotonina na mesma estrutura (Zhou, Bledsoe *et al.*, 1991). Além disso, administrações intraventriculares de 6-OHDA também aumentam os níveis de serotonina do estriado (Commins, Shaughnessy *et al.*, 1989). Recentemente, um estudo *post-mortem* observou que as pessoas portadoras da DP apresentaram maior quantidade de inervações serotoninérgicas no estriado, avaliada através da imunoreatividade ao transportador de serotonina, provavelmente resultado de um mecanismo de compensação à degeneração dopaminérgica (Bedard, Wallman *et al.*, 2011).

O nível elevado de 5-HT, encontrado 11 dias após a lesão, não foi semelhante ao trabalho anterior realizado em nosso laboratório (Tadaiesky, Dombrowski *et al.*, 2008), porém o local escolhido para a lesão pode ter sido responsável por esta diferença. Como neste trabalho o sítio da injeção foi 1 mm acima e, sabendo que a distribuição das terminações serotoninérgicas no estriado é heterogênea, ao contrário da dopamina, e que os níveis de 5-HT podem variar cerca de 2 a 3 vezes em relação a disposição vertical (ventral-dorsal) do estriado (Beal e Martin, 1985). Podemos sugerir que o local da degeneração dopaminérgica pode influenciar a resposta dos neurônios serotoninérgicos devido a sua distribuição heterogênea, já que dependendo do local da lesão pode haver uma alta ou baixa quantidade de terminações serotoninérgicas no local. Isto poderia explicar porque muitos trabalhos apresentam resultados distintos em relação a resposta serotoninérgica mediante a lesão com 6-OHDA.

Além disso, estudos já relataram diminuição da atividade locomotora espontânea em ratos como resultado do aumento da serotonina, seja através da administração sistêmica do precursor triptofano (Stewart, Growdon *et al.*, 1976), ou através da injeção intraventricular de 5-HT (Green, Gillin *et al.*, 1976; Warbritton, Stewart *et al.*, 1978). Assim, a tendência de diminuição na atividade locomotora observada 7 dias após a cirurgia pode estar relacionada com o aumento dos níveis de serotonina encontrados no estriado, quando avaliados 10 dias após a cirurgia. Tornando assim a primeira semana após a cirurgia um intervalo de tempo ainda passível de algum tipo de influência motora, onde as estruturas afetadas não foram capazes de se reorganizar em resposta a lesão neuronal. Como mencionado na introdução, para que os sinais motores se tornem visíveis, o conteúdo de dopamina estriatal em humanos já deve estar diminuído em cerca de 80% (Vives-Bauza, De Vries *et al.*, 2009), números semelhantes foram encontrados em um modelo de lesão unilateral com 6-OHDA, onde foi necessária uma queda de 80% no conteúdo de dopamina do estriado para que resultasse em prejuízos motores no teste de coordenação da pata (Chang, Wachtel *et al.*, 1999). Portanto, apesar da dopamina apresentar os menores níveis na última semana, com uma diminuição de 62%, ainda assim não foi suficiente para causar um prejuízo na atividade locomotora espontânea.

Embora a queda nos níveis de dopamina tenha sido relativamente elevada, a ausência de um prejuízo na atividade locomotora faz com que possamos descartar uma influência de um prejuízo motor nos subsequentes testes comportamentais do tipo

anedonia e ansiedade, aproximando o modelo a um estágio pré-motor da DP.

Outro sintoma relacionado com fases anteriores ao comprometimento motor são os transtornos depressivos. A falta de prazer em resposta a estímulos anteriormente gratificantes é denominada anedonia, sendo uma característica importante para o diagnóstico de depressão (Keedwell, Andrew *et al.*, 2005). O sistema neural responsável por esta recompensa prazerosa está relacionado com a liberação de dopamina na região ventral do caudado e putamen, em seres humanos e roedores (Breiter, Gollub *et al.*, 1997; Drevets, Gautier *et al.*, 2001; Senior, 2003; Keedwell, Andrew *et al.*, 2005; Van Der Meer e Redish, 2011). Portanto, é provável que a disfunção dopaminérgica provocada pela lesão no estriado ventral seja um dos principais fatores responsáveis pelo aparecimento de comportamento tipo anedônico nos animais lesionados.

Apesar da queda nos níveis de dopamina permanecer durante os 25 dias avaliados, foram encontradas flutuações no comportamento tipo-depressivo ao longo do tempo, o que sugere a participação de outros fatores além da disfunção dopaminérgica. Estas flutuações também são encontradas em diferentes modelos da DP em ratos, como MPTP, 6-OHDA e LPS administradas na substância negra (Santiago, Barbieiro *et al.*, 2010). No entanto, o impacto causado pelo insulto ainda não administrado ou até mesmo por perturbações sutis no comportamento motor, podem ser responsáveis pelas manifestações emocionais durante o período inicial. Assim, uma semana após o tratamento com 6-OHDA no estriado parece ser um período muito curto para se estudar os efeitos do tipo ansiedade e depressão, havendo uma maior influência de outros fatores.

Além da reorganização nas inervações estriatais, a morte celular dopaminérgica também ocasiona uma resposta do sistema imune inato. Um estudo recente mostrou que a necrose de neurônios é capaz de ativar células microgliais responsáveis por respostas pró-inflamatórias e, potencialmente capazes de produzir um efeito neurotóxico (Pais, Figueiredo *et al.*, 2008). Assim, um estímulo danoso, como a administração de 6-OHDA no estriado, pode levar a uma ativação microglial, e consequente, produção de citocinas pró-inflamatórias (Chung, Ko *et al.*, 2010). Aliado a isso, diversos pesquisadores já relataram a atividade microglial aumentada na SN após a administração de 6-OHDA via intraestriatal (He, Appel *et al.*, 2001; Depino, Earl *et al.*, 2003).

Desde que estudos *post-mortem* mostraram níveis elevados de células do sistema imunológico inato no encéfalo de pacientes com DP,

inúmeros estudos foram direcionados nesta linha (Lee, Tran *et al.*, 2009). Sob condições normais, a microglia está distribuída uniformemente no SNC, em estado de repouso, podendo-se deslocar rapidamente ao local afetado, em caso de lesão (Krabbe, Matyiash *et al.*, 2011). Além disso, estudos mostraram que progenitores microgliais na periferia podem ser recrutados em direção ao SNC quando afetado por algum tipo de injúria (Long-Smith, Sullivan *et al.*, 2009). Estímulos extracelulares são capazes de ativar a microglia através da ligação em seus diversos receptores na superfície celular, dentre eles destacam-se: endotoxinas, citocinas, quimiocinas, proteínas malformadas, fatores plasmáticos, ATP, etc (Long-Smith, Sullivan *et al.*, 2009). Ariza e colaboradores demonstraram que a administração intraestriatal de LPS, que é conhecida por induzir reações inflamatórias, causou uma diminuição nos níveis estriatais de dopamina 7 dias após a exposição à neurotoxina, porém, não alterou a atividade locomotora, sugerindo uma relação entre neurinflamação e a fase pré-motora da DP (Ariza, Lima *et al.*, 2010).

Para medir os níveis de células microgliais, utilizamos uma forma indireta de quantificação, através da enzima lisossomal N-acetylglucosaminidase (NAG), que está presente, em grande quantidade, em macrófagos (Belo, Barcelos *et al.*, 2004; Xavier, Amaral *et al.*, 2010). Recentemente, estudos tem utilizado esta técnica para avaliar o acúmulo de macrófagos em estruturas do SNC (Lacerda-Queiroz, Rodrigues *et al.*, 2010; Pimentel, Pinheiro *et al.*, 2011). Em nosso trabalho, o aumento dos níveis microgliais encontrado na substância negra e no estriado, pode ter sido consequência da morte de neurônios e degeneração das terminações estriatais. Sua ativação seria responsável por gerenciar o processo de remoção dos neurônios dopaminérgicos degenerados.

Uma das consequências do recrutamento microglial é a produção e liberação de citocina pró-inflamatórias. Dentre as principais citocinas produzidas destacam-se a IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF $\alpha$ , as quais podem induzir sintomas do tipo depressivo em modelos animais de inflamação (Godbout, Moreau *et al.*, 2008; Huang, Henry *et al.*, 2008). Além disso, um estudo mostrou que o tratamento com minociclina, um antibiótico capaz de diminuir a produção de citocinas pelas células microgliais, é capaz de restaurar o efeito anedônico observado no teste do consumo de sacarose, em camundongos com neuroinflamação induzida por LPS (Henry, Huang *et al.*, 2008). Ainda, o hipocampo parece participar das alterações emocionais provocadas pela DP (Braak, Ghebremedhin *et al.*, 2004; Littelljohn, Mangano *et al.*, 2009). Estudos recentes mostraram que camundongos deficientes da citocina interferon-gama, perdem a vulnerabilidade

hipocampal à toxina Paraquat (toxina capaz de induzir parkinsonismo) (Litteljohn, Mangano *et al.*, 2009). Em nosso trabalho, houve um aumento nos níveis microgliais tanto no hipocampo durante a primeira e terceira semana, mas não durante a segunda, nos animais tratados com 6-OHDA. Neste mesmo período de ativação, o teste do consumo de sacarose resultou em um efeito anedônico no grupo tratado com 6-OHDA. Portanto, o comportamento tipo-depressivo encontrado durante a primeira e terceira semana, pode estar relacionado, ao menos em parte, com a produção de citocinas pró-inflamatórias através da ativação das células microgliais tanto do hipocampo, como do estriado.

Em conclusão, nossos resultados suportam a hipótese de que a lesão retrógrada e parcial dos neurônios dopaminérgicos da substância negra pode causar prejuízos comportamentais do tipo anedonia e ansiedade, sem causar alterações evidentes na atividade locomotora espontânea de ratos. O período da terceira semana após a lesão estriatal parece constituir o intervalo com potencial para estudar melhor os sintomas emocionais, caracterizando-se ainda como um modelo pré-motor da DP. Além disso, estas alterações são acompanhadas pela diminuição na concentração de dopamina e alterações na concentração de serotonina do estriado, bem como o aumento na quantidade de células microgliais no estriado, substância negra e hipocampo, que podem estar influenciando as manifestações comportamentais relatadas, principalmente o efeito anedônico. Além disso, a evidência de ativação microglial no hipocampo, mesmo após 25 dias, pode ser um indicativo de extensão neuroinflamatória da lesão para outras áreas encefálicas, como consequência da degeneração nigroestriatal.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados confirmam que a lesão bilateral induzida por 6-OHDA no estriado é capaz de induzir comportamentos do tipo anedonia e ansiedade, sem alterações na atividade locomotora espontânea dos ratos.

O período após o intervalo de três semanas apresentou o melhor perfil para o estudo dos efeitos pré-motores da DP, pois, ao contrário da segunda semana, observamos alterações comportamentais, em ambos os testes emocionais, neuroquímicos e neuroinflamatórios.

A lesão causou alterações nas concentrações monoaminérgicas estriatais. Uma queda progressiva na concentração de dopamina e seu metabólito (DOPAC) foi observada no estriado ao longo de 25 dias, além de uma elevação na concentração de serotonina 11 dias após a cirurgia.

A administração de 6-OHDA induziu um aumento nos níveis microgliais na SN apenas no intervalo de 11 dias após a cirurgia. Já o estriado e hipocampo apresentaram elevações nos níveis microgliais no período do dia 11 e 25, mas não 18 dias após a lesão.

Mais estudos são necessários para elucidar a relação entre a neuroinflamação induzida pela 6-OHDA e as alterações comportamentais e neuroquímicas promovidas pela degeneração dopaminérgica da via nigroestriatal.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott, R. D., G. W. Ross, L. R. White, C. M. Tanner, K. H. Masaki, J. S. Nelson, J. D. Curb e H. Petrovitch. Excessive daytime sleepiness and subsequent development of Parkinson disease. Neurology, v.65, n.9, Nov 8, p.1442-6. 2005.

Albanese, A. e M. Bentivoglio. The organization of dopaminergic and non-dopaminergic mesencephalo-cortical neurons in the rat. Brain Res, v.238, n.2, Apr 29, p.421-5. 1982.

Alvarez-Fischer, D., C. Henze, C. Strenzke, J. Westrich, B. Ferger, G. U. Hoglinger, W. H. Oertel e A. Hartmann. Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and alpha-synuclein-deleted mice. Exp Neurol, v.210, n.1, Mar, p.182-93. 2008.

Arabia, G., B. R. Grossardt, Y. E. Geda, J. M. Carlin, J. H. Bower, J. E. Ahlskog, D. M. Maraganore e W. A. Rocca. Increased risk of depressive and anxiety disorders in relatives of patients with Parkinson disease. Arch Gen Psychiatry, v.64, n.12, Dec, p.1385-92. 2007.

Ariza, D., M. M. Lima, C. G. Moreira, P. A. Dombrowski, T. V. Avila, A. Allemand, D. A. Mendes, C. Da Cunha e M. A. Vital. Intranigral LPS administration produces dopamine, glutathione but not behavioral impairment in comparison to MPTP and 6-OHDA neurotoxin models of Parkinson's disease. Neurochem Res, v.35, n.10, Oct, p.1620-7. 2010.

Bailoo, J. D., M. O. Bohlen e D. Wahlsten. The precision of video and photocell tracking systems and the elimination of tracking errors with infrared backlighting. J Neurosci Methods, v.188, n.1, Apr 30, p.45-52. 2010.

Barbosa, M. T., P. Caramelli, D. P. Maia, M. C. Cunningham, H. L. Guerra, M. F. Lima-Costa e F. Cardoso. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: a community-based survey in Brazil (the Bambui study). Mov Disord, v.21, n.6, Jun, p.800-8. 2006.

Barnum, C. J. e M. G. Tansey. Modeling neuroinflammatory pathogenesis of Parkinson's disease. Prog Brain Res, v.184, p.113-32. 2010.

Beal, M. F. Experimental models of Parkinson's disease. Nat Rev Neurosci, v.2, n.5, May, p.325-34. 2001.

Beal, M. F. e J. B. Martin. Topographical dopamine and serotonin distribution and turnover in rat striatum. Brain Res, v.358, n.1-2, Dec 9, p.10-5. 1985.

Beckstead, R. M., V. B. Domesick e W. J. Nauta. Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. Brain Res, v.175, n.2, Oct 19, p.191-217. 1979.

Bedard, C., M. J. Wallman, E. Pourcher, P. V. Gould, A. Parent e M. Parent. Serotonin and dopamine striatal innervation in Parkinson's disease and Huntington's chorea. Parkinsonism Relat Disord, v.17, n.8, Sep, p.593-8. 2011.

Belo, A. V., L. S. Barcelos, M. A. Ferreira, M. M. Teixeira e S. P. Andrade. Inhibition of inflammatory angiogenesis by distant subcutaneous tumor in mice. Life Sci, v.74, n.23, Apr 23, p.2827-37. 2004.

Bernal-Pacheco, O., N. Limotai, C. L. Go e H. H. Fernandez. Nonmotor manifestations in Parkinson disease. Neurologist, v.18, n.1, Jan, p.1-16. 2012.

Betarbet, R., T. B. Sherer e J. T. Greenamyre. Animal models of Parkinson's disease. Bioessays, v.24, n.4, Apr, p.308-18. 2002.

Bove, J. e C. Perier. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. Neuroscience, Nov 10. 2011.

Braak, H., E. Ghebremedhin, U. Rub, H. Bratzke e K. Del Tredici. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. Cell Tissue Res, v.318, n.1, Oct, p.121-34. 2004.

Branchi, I., I. D'andrea, M. Armida, D. Carnevale, M. A. Ajmone-Cat, A. Pezzola, R. L. Potenza, M. G. Morgese, T. Cassano, L. Minghetti, P. Popoli e E. Alleva. Striatal 6-OHDA lesion in mice: Investigating early neurochemical changes underlying Parkinson's disease. Behav Brain Res, v.208, n.1, Mar 17, p.137-43. 2010.

Branchi, I., I. D'andrea, M. Armida, T. Cassano, A. Pezzola, R. L. Potenza, M. G. Morgese, P. Popoli e E. Alleva. Nonmotor symptoms in Parkinson's disease: investigating early-phase onset of behavioral dysfunction in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model. J Neurosci Res, v.86, n.9, Jul, p.2050-61. 2008.

Breiter, H. C., R. L. Gollub, R. M. Weisskoff, D. N. Kennedy, N. Makris, J. D. Berke, J. M. Goodman, H. L. Kantor, D. R. Gastfriend, J. P. Riorden, R. T. Mathew, B. R. Rosen e S. E. Hyman. Acute effects of cocaine on human brain activity and emotion. Neuron, v.19, n.3, Sep, p.591-611. 1997.

Capuron, L., G. Neurauter, D. L. Musselman, D. H. Lawson, C. B. Nemeroff, D. Fuchs e A. H. Miller. Interferon-alpha-induced changes in tryptophan metabolism. relationship to depression and paroxetine treatment. Biol Psychiatry, v.54, n.9, Nov 1, p.906-14. 2003.

Carta, M., T. Carlsson, D. Kirik e A. Bjorklund. Dopamine released from 5-HT terminals is the cause of L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats. Brain, v.130, n.Pt 7, Jul, p.1819-33. 2007.

Chang, J. W., S. R. Wachtel, D. Young e U. J. Kang. Biochemical and anatomical characterization of forepaw adjusting steps in rat models of Parkinson's disease: studies on medial forebrain bundle and striatal lesions. Neuroscience, v.88, n.2, Jan, p.617-28. 1999.

Chen, L., J. Liu, Q. J. Zhang, J. J. Feng, Z. H. Gui, U. Ali, Y. Wang, L. L. Fan, C. Hou e T. Wang. Alterations of emotion, cognition and firing activity of the basolateral nucleus of the amygdala after partial bilateral lesions of the nigrostriatal pathway in rats. Brain Res Bull, v.85, n.6, Jul 15, p.329-38. 2011.

Chung, Y. C., H. W. Ko, E. Bok, E. S. Park, S. H. Huh, J. H. Nam e B. K. Jin. The role of neuroinflammation on the pathogenesis of Parkinson's disease. BMB Rep, v.43, n.4, Apr, p.225-32. 2010.

Commins, D. L., R. A. Shaughnessy, K. J. Axt, G. Vosmer e L. S. Seiden. Variability among brain regions in the specificity of 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced lesions. J Neural Transm, v.77, n.2-3, p.197-210. 1989.

Cruz, A. P., F. Frei e F. G. Graeff. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. Pharmacol Biochem Behav, v.49, n.1, Sep, p.171-6. 1994.

Davie, C. A. A review of Parkinson's disease. Br Med Bull, v.86, p.109-27. 2008.

Davis, M., D. Rainnie e M. Cassell. Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. Trends Neurosci, v.17, n.5, May, p.208-14. 1994.

De La Mora, M. P., A. Gallegos-Cari, Y. Arizmendi-Garcia, D. Marcellino e K. Fuxe. Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis. Prog Neurobiol, v.90, n.2, Feb 9, p.198-216. 2010.

DeLong, M. e T. Wichmann. Update on models of basal ganglia function and dysfunction. Parkinsonism Relat Disord, v.15 Suppl 3, Dec, p.S237-40. 2009.

Depino, A. M., C. Earl, E. Kaczmarczyk, C. Ferrari, H. Besedovsky, A. Del Rey, F. J. Pitossi e W. H. Oertel. Microglial activation with atypical proinflammatory cytokine expression in a rat model of Parkinson's disease. Eur J Neurosci, v.18, n.10, Nov, p.2731-42. 2003.

Deumens, R., A. Blokland e J. Prickaerts. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. Exp Neurol, v.175, n.2, Jun, p.303-17. 2002.

Di Filippo, M., D. Chiasserini, A. Tozzi, B. Picconi e P. Calabresi. Mitochondria and the link between neuroinflammation and neurodegeneration. J Alzheimers Dis, v.20 Suppl 2, p.S369-79. 2010.

Drevets, W. C., C. Gautier, J. C. Price, D. J. Kupfer, P. E. Kinahan, A. A. Grace, J. L. Price e C. A. Mathis. Amphetamine-induced dopamine release in human ventral striatum correlates with euphoria. Biol Psychiatry, v.49, n.2, Jan 15, p.81-96. 2001.

Dunn, A. J. Endotoxin-induced activation of cerebral catecholamine and serotonin metabolism: comparison with interleukin-1. J Pharmacol Exp Ther, v.261, n.3, Jun, p.964-9. 1992.

Dunnett, S. B. e A. Bjorklund. Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. Nature, v.399, n.6738 Suppl, Jun 24, p.A32-9. 1999.

Eriksen, J. L., Z. Wszolek e L. Petrucelli. Molecular pathogenesis of Parkinson disease. Arch Neurol, v.62, n.3, Mar, p.353-7. 2005.

Eskow Jaunarajs, K. L., K. B. Dupre, C. Y. Ostrock, T. Button, T. Deak e C. Bishop. Behavioral and neurochemical effects of chronic L-DOPA treatment on nonmotor sequelae in the hemiparkinsonian rat. Behav Pharmacol, v.21, n.7, Oct, p.627-37. 2010.

Espejo, E. F. Selective dopamine depletion within the medial prefrontal cortex induces anxiogenic-like effects in rats placed on the elevated plus maze. Brain Res, v.762, n.1-2, Jul 11, p.281-4. 1997.

Gaig, C. e E. Tolosa. When does Parkinson's disease begin? Mov Disord, v.24 Suppl 2, p.S656-64. 2009.

Godbout, J. P., M. Moreau, J. Lestage, J. Chen, N. L. Sparkman, O. C. J, N. Castanon, K. W. Kelley, R. Dantzer e R. W. Johnson. Aging exacerbates depressive-like behavior in mice in response to activation of the peripheral innate immune system. Neuropsychopharmacology, v.33, n.10, Sep, p.2341-51. 2008.

Green, R. A., J. C. Gillin e R. J. Wyatt. The inhibitory effect of intraventricular administration of serotonin on spontaneous motor

activity of rats. Psychopharmacology (Berl), v.51, n.1, Dec 21, p.81-4. 1976.

Guillemin, G. J. e B. J. Brew. Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. J Leukoc Biol, v.75, n.3, Mar, p.388-97. 2004.

Haenisch, B. e H. Bonisch. Depression and antidepressants: insights from knockout of dopamine, serotonin or noradrenaline re-uptake transporters. Pharmacol Ther, v.129, n.3, Mar, p.352-68. 2011.

Hanrott, K., L. Gudmunsen, M. J. O'Neill e S. Wonnacott. 6-hydroxydopamine-induced apoptosis is mediated via extracellular auto-oxidation and caspase 3-dependent activation of protein kinase Cdelta. J Biol Chem, v.281, n.9, Mar 3, p.5373-82. 2006.

He, Y., S. Appel e W. Le. Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. Brain Res, v.909, n.1-2, Aug 3, p.187-93. 2001.

Henry, C. J., Y. Huang, A. Wynne, M. Hanke, J. Himler, M. T. Bailey, J. F. Sheridan e J. P. Godbout. Minocycline attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. J Neuroinflammation, v.5, p.15. 2008.

Hokfelt, T. e U. Ungerstedt. Specificity of 6-hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurones: an electron and fluorescence microscopic study with special reference to intracerebral injection on the nigro-striatal dopamine system. Brain Res, v.60, n.2, Oct 12, p.269-97. 1973.

Huang, Y., C. J. Henry, R. Dantzer, R. W. Johnson e J. P. Godbout. Exaggerated sickness behavior and brain proinflammatory cytokine expression in aged mice in response to intracerebroventricular lipopolysaccharide. Neurobiol Aging, v.29, n.11, Nov, p.1744-53. 2008.

Jenkins, R., R. O'Shea, K. L. Thomas e S. P. Hunt. c-jun expression in substantia nigra neurons following striatal 6-hydroxydopamine lesions in the rat. Neuroscience, v.53, n.2, Mar, p.447-55. 1993.

Karstaedt, P. J., H. Kerasidis, J. H. Pincus, R. Meloni, J. Graham e K. Gale. Unilateral destruction of dopamine pathways increases ipsilateral striatal serotonin turnover in rats. Exp Neurol, v.126, n.1, Mar, p.25-30. 1994.

Keedwell, P. A., C. Andrew, S. C. Williams, M. J. Brammer e M. L. Phillips. The neural correlates of anhedonia in major depressive disorder. Biol Psychiatry, v.58, n.11, Dec 1, p.843-53. 2005.

Kirik, D., C. Rosenblad e A. Bjorklund. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. Exp Neurol, v.152, n.2, Aug, p.259-77. 1998.

Krabbe, G., V. Matyiash, U. Pannasch, L. Mamer, H. W. Boddeke e H. Kettenmann. Activation of serotonin receptors promotes microglial injury-induced motility but attenuates phagocytic activity. Brain Behav Immun, Dec 17. 2011.

Kravitz, A. V., B. S. Freeze, P. R. Parker, K. Kay, M. T. Thwin, K. Deisseroth e A. C. Kreitzer. Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. Nature, v.466, n.7306, Jul 29, p.622-6. 2010.

Lacerda-Queiroz, N., D. H. Rodrigues, M. C. Vilela, A. S. Miranda, D. C. Amaral, E. R. Camargos, L. J. Carvalho, C. L. Howe, M. M. Teixeira e A. L. Teixeira. Inflammatory changes in the central nervous system are associated with behavioral impairment in Plasmodium berghei (strain ANKA)-infected mice. Exp Parasitol, v.125, n.3, Jul, p.271-8. 2010.

Ledoux, J. E. Emotion circuits in the brain. Annu Rev Neurosci, v.23, p.155-84. 2000.

Lee, C. S., H. Sauer e A. Bjorklund. Dopaminergic neuronal degeneration and motor impairments following axon terminal lesion by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. Neuroscience, v.72, n.3, Jun, p.641-53. 1996.

Lee, J. K., T. Tran e M. G. Tansey. Neuroinflammation in Parkinson's disease. J Neuroimmune Pharmacol, v.4, n.4, Dec, p.419-29. 2009.

Lemke, M. R., H. M. Brecht, J. Koester e H. Reichmann. Effects of the dopamine agonist pramipexole on depression, anhedonia and motor functioning in Parkinson's disease. J Neurol Sci, v.248, n.1-2, Oct 25, p.266-70. 2006.

Linder, A. E., J. Diaz, W. Ni, T. Szasz, R. Burnett e S. W. Watts. Vascular reactivity, 5-HT uptake, and blood pressure in the serotonin transporter knockout rat. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.294, n.4, Apr, p.H1745-52. 2008.

Litteljohn, D., E. Mangano, N. Shukla e S. Hayley. Interferon-gamma deficiency modifies the motor and co-morbid behavioral pathology and neurochemical changes provoked by the pesticide paraquat. Neuroscience, v.164, n.4, Dec 29, p.1894-906. 2009.

Lloret, S. e J. J. Moreno. Effects of an anti-inflammatory peptide (antiflammin 2) on cell influx, eicosanoid biosynthesis and oedema formation by arachidonic acid and tetradecanoyl phorbol dermal application. Biochem Pharmacol, v.50, n.3, Jul 31, p.347-53. 1995.

Long-Smith, C. M., A. M. Sullivan e Y. M. Nolan. The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease. Prog Neurobiol, v.89, n.3, Nov, p.277-87. 2009.

Luthman, J., B. Bolioli, T. Tsutsumi, A. Verhofstad e G. Jonsson. Sprouting of striatal serotonin nerve terminals following selective lesions of nigro-striatal dopamine neurons in neonatal rat. Brain Res Bull, v.19, n.2, Aug, p.269-74. 1987.

Maeda, T., K. Kannari, H. Shen, A. Arai, M. Tomiyama, M. Matsunaga e T. Suda. Rapid induction of serotonergic hyperinnervation in the adult rat striatum with extensive dopaminergic denervation. Neurosci Lett, v.343, n.1, May 29, p.17-20. 2003.

Mathur, B. N. e D. M. Lovinger. Serotonergic action on dorsal striatal function. Parkinsonism Relat Disord, v.18 Suppl 1, Jan, p.S129-31. 2012.



Meredith, G. E., P. K. Sonsalla e M. F. Chesselet. Animal models of Parkinson's disease progression. Acta Neuropathol, v.115, n.4, Apr, p.385-98. 2008.

Morato, G. S., T. Lemos e R. N. Takahashi. Acute exposure to maneb alters some behavioral functions in the mouse. Neurotoxicol Teratol, v.11, n.5, Sep-Oct, p.421-5. 1989.

Mosley, A. D. e D. S. Romaine. The Encyclopedia of Parkinson's Disease. New York: Facts on File. 2004

Na, S. J., A. G. Dilella, E. V. Lis, K. Jones, D. M. Levine, D. J. Stone e J. F. Hess. Molecular profiling of a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. Neurochem Res, v.35, n.5, May, p.761-72. 2010.

Nagatsu, T. e M. Sawada. Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines. Curr Pharm Des, v.11, n.8, p.999-1016. 2005.

Navailles, S., A. Benazzouz, B. Bioulac, C. Gross e P. De Deurwaerdere. High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus and L-3,4-dihydroxyphenylalanine inhibit in vivo serotonin release in the prefrontal cortex and hippocampus in a rat model of Parkinson's disease. J Neurosci, v.30, n.6, Feb 10, p.2356-64. 2010.

Nguyen, M. D., J. P. Julien e S. Rivest. Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? Nat Rev Neurosci, v.3, n.3, Mar, p.216-27. 2002.

Nyberg, P., A. Nordberg, P. Wester e B. Winblad. Dopaminergic deficiency is more pronounced in putamen than in nucleus caudatus in Parkinson's disease. Molecular and Chemical Neuropathology, v.1, n.3, p.193-202. 1983.

Obeso, J. A., M. C. Rodriguez-Oroz, C. G. Goetz, C. Marin, J. H. Kordower, M. Rodriguez, E. C. Hirsch, M. Farrer, A. H. Schapira e G. Halliday. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. Nat Med, v.16, n.6, Jun, p.653-61. 2010.

Pahwa, R. e K. E. Lyons. Handbook of Parkinson's disease. New York: Informa Healthcare. 2007. xi, 500 p. p. (Neurological disease and therapy)

Pais, T. F., C. Figueiredo, R. Peixoto, M. H. Braz e S. Chatterjee. Necrotic neurons enhance microglial neurotoxicity through induction of glutaminase by a MyD88-dependent pathway. J Neuroinflammation, v.5, p.43. 2008.

Paulus, W. e C. Trenkwalder. Imaging of nonmotor symptoms in Parkinson syndromes. Clin Neurosci, v.5, n.2, p.115-20. 1998.

Paxinos, G. e C. Watson. The rat brain in stereotaxic coordinates. Amsterdam ; Boston :: Academic Press/Elsevier. 2007

Pimentel, V. C., F. V. Pinheiro, K. S. De Bona, P. A. Maldonado, C. R. Da Silva, S. M. De Oliveira, J. Ferreira, C. M. Bertoncheli, M. R. Schetinger, S. C. Da Luz e M. B. Moretto. Hypoxic-ischemic brain injury stimulates inflammatory response and enzymatic activities in the hippocampus of neonatal rats. Brain Res, v.1388, May 4, p.134-40. 2011.

Pontone, G. M., J. R. Williams, K. E. Anderson, G. Chase, S. R. Goldstein, S. Grill, E. S. Hirsch, S. Lehmann, J. T. Little, R. L. Margolis, P. V. Rabins, H. D. Weiss e L. Marsh. Anxiety and self-perceived health status in Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord, v.17, n.4, May, p.249-54. 2011.

Prediger, R. D., D. Rial, R. Medeiros, C. P. Figueiredo, R. L. Doty e R. N. Takahashi. Risk is in the air: an intranasal MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) rat model of Parkinson's disease. Ann N Y Acad Sci, v.1170, Jul, p.629-36. 2009.

Santiago, R. M., J. Barbieiro, M. M. Lima, P. A. Dombrowski, R. Andreatini e M. A. Vital. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, v.34, n.6, Aug 16, p.1104-14. 2010.

Sauer, H. e W. H. Oertel. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. Neuroscience, v.59, n.2, Mar, p.401-15. 1994.

Schapira, A. H., J. M. Cooper, D. Dexter, J. B. Clark, P. Jenner e C. D. Marsden. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. J Neurochem, v.54, n.3, Mar, p.823-7. 1990.

Schober, A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. Cell Tissue Res, v.318, n.1, Oct, p.215-24. 2004.

Senior, C. Beauty in the brain of the beholder. Neuron, v.38, n.4, May 22, p.525-8. 2003.

Slattery, D. A., A. Markou e J. F. Cryan. Evaluation of reward processes in an animal model of depression. Psychopharmacology (Berl), v.190, n.4, Mar, p.555-68. 2007.

Stephenson, R., A. Siderowf e M. B. Stern. Premotor Parkinson's disease: clinical features and detection strategies. Mov Disord, v.24 Suppl 2, p.S665-70. 2009.

Stewart, R. M., J. H. Growdon, D. Cancian e R. J. Baldessarini. 5-hydroxytryptophan-induced myoclonus: increased sensitivity to serotonin after intracranial 5,7-dihydroxytryptamine in the adult rat. Neuropharmacology, v.15, n.8, Aug, p.449-55. 1976.

Tadaiesky, M. T., P. A. Dombrowski, C. Da Cunha e R. N. Takahashi. Effects of SR141716A on Cognitive and Depression-Related Behavior in an Animal Model of Premotor Parkinson's Disease. Parkinsons Dis, v.2010, p.238491. 2010.

Tadaiesky, M. T., P. A. Dombrowski, C. P. Figueiredo, E. Cargin-Ferreira, C. Da Cunha e R. N. Takahashi. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. Neuroscience, v.156, n.4, Oct 28, p.830-40. 2008.

Taylor, D. P., L. A. Riblet, H. C. Stanton, A. S. Eison, M. S. Eison e D. L. Temple, Jr. Dopamine and antianxiety activity. Pharmacol Biochem Behav, v.17 Suppl 1, p.25-35. 1982.

Van Der Meer, M. A. e A. D. Redish. Theta phase precession in rat ventral striatum links place and reward information. J Neurosci, v.31, n.8, Feb 23, p.2843-54. 2011.

Vives-Bauza, C., R. L. De Vries, M. A. Tocilescu e S. Przedborski. Is there a pathogenic role for mitochondria in Parkinson's disease? Parkinsonism Relat Disord, v.15 Suppl 3, Dec, p.S241-4. 2009.

Wang, J. e A. J. Dunn. The role of interleukin-6 in the activation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis and brain indoleamines by endotoxin and interleukin-1 beta. Brain Res, v.815, n.2, Jan 9, p.337-48. 1999.

Warbritton, J. D., 3rd, R. M. Stewart e R. J. Baldessarini. Decreased locomotor activity and attenuation of amphetamine hyperactivity with intraventricular infusion of serotonin in the rat. Brain Res, v.143, n.2, Mar 24, p.373-82. 1978.

Weintraub, D., P. J. Moberg, J. E. Duda, I. R. Katz e M. B. Stern. Effect of psychiatric and other nonmotor symptoms on disability in Parkinson's disease. J Am Geriatr Soc, v.52, n.5, May, p.784-8. 2004.

Wirdefeldt, K., H. O. Adami, P. Cole, D. Trichopoulos e J. Mandel. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. Eur J Epidemiol, v.26 Suppl 1, Jun, p.S1-58. 2011.

Wood, P. L. Neuroinflammation : mechanisms and management. Totowa, N.J.: Humana Press. 2003. 419 p. p. (Contemporary neuroscience)

Xavier, D. O., L. S. Amaral, M. A. Gomes, M. A. Rocha, P. R. Campos, B. D. Cota, L. S. Tafuri, A. M. Paiva, J. H. Silva, S. P. Andrade e A. V. Belo. Metformin inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. Biomed Pharmacother, v.64, n.3, Mar, p.220-5. 2010.

Yan, J., Y. Xu, C. Zhu, L. Zhang, A. Wu, Y. Yang, Z. Xiong, C. Deng, X. F. Huang, M. A. Yenari, Y. G. Yang, W. Ying e Q. Wang. Simvastatin prevents dopaminergic neurodegeneration in experimental parkinsonian models: the association with anti-inflammatory responses. PLoS One, v.6, n.6, p.e20945. 2011.

Zhang, J., L. Terreni, M. G. De Simoni e A. J. Dunn. Peripheral interleukin-6 administration increases extracellular concentrations of serotonin and the evoked release of serotonin in the rat striatum. Neurochem Int, v.38, n.4, Apr, p.303-8. 2001.

Zhou, F. C., S. Bledsoe e J. Murphy. Serotonergic sprouting is induced by dopamine-lesion in substantia nigra of adult rat brain. Brain Res, v.556, n.1, Aug 9, p.108-16. 1991.

Zhu, J. e C. T. Chu. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. J Alzheimers Dis, v.20 Suppl 2, p.S325-34. 2010.