

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Luiz e Izabel, e demais familiares, pela educação que vocês me deram e pela formação que vocês me proporcionaram.

À minha esposa Léa. O amor e o carinho que eu recebo de você me dão incentivo, te amo.

Ao meu orientador, Prof Cláudio da Cunha, pela confiança, dedicação, incentivo e amizade.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, pelo trabalho em equipe.

Aos meus amigos fora do laboratório, pelo apoio moral.

Ao professor Newton Sabino Canteras (USP), pelo apoio nos experimentos de imunoistoquímica e nas discussões científicas dos experimentos e resultados.

Aos professores, alunos e técnicos do departamento de Bioquímica da UFPR, pela instrução, auxílio na execução de experimentos e na redação deste trabalho.

Aos professores, alunos e técnicos do departamento de Farmacologia da UFPR, pelo auxílio em experimentos, companheirismo e amizade.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

“Quanto mais se sabe, mais se sabe  
que pouco se sabe”.

Pensamento Zen - budista

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>V</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>VII</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. MODELOS ANIMAIS DE DOENÇA DE PARKINSON EM RATOS .....	1
1.2. DOENÇA DE PARKINSON .....	2
1.3. AS TOXINAS MPTP E 6-OHDA .....	7
1.4. O COMPORTAMENTO ROTATÓRIO .....	11
1.5. ANESTÉSICOS GERAIS .....	12
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>14</b>
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>15</b>
3.1. ANIMAIS .....	15
3.2. DROGAS E SOLUÇÕES .....	15
3.3. PROCEDIMENTOS GERAIS .....	16
3.4. COMPARAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS ENTRE AS LESÕES COM MPTP E COM 6-OHDA .....	20
3.5. TOPOGRAFIA DA LESÃO NA VIA NIGROESTRIATAL POR MPTP .....	23
3.6. INFUSÃO DE MPTP E 6-OHDA NO NÚCLEO MEDIAL DA RAFE .....	25
3.7. COMPARAÇÃO DA NEUROPROTEÇÃO DA MISTURA KETAMINA/ XILAZINA NOS MODELOS MPTP E 6-OHDA .....	28
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
4.1. COMPARAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS ENTRE AS LESÕES COM MPTP E COM 6-OHDA .....	32
4.2. TOPOGRAFIA DA LESÃO POR MPTP .....	39
4.3. INFUSÃO DE MPTP E 6-OHDA NO NÚCLEO MEDIAL DA RAFE .....	41
4.4. COMPARAÇÃO DA NEUROPROTEÇÃO DA MISTURA KETAMINA/ XILAZINA NOS MODELOS MPTP E 6-OHDA .....	44

<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
5.1. COMPARAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS ENTRE AS LESÕES COM MPTP E COM 6-OHDA .....	48
5.2. TOPOGRAFIA DA LESÃO NIGROESTRIATAL .....	50
5.3. INFUSÃO DE MPTP E 6-OHDA NO NÚCLEO MEDIAL DA RAPE .....	51
5.4. COMPARAÇÃO DA NEUROPROTEÇÃO DA MISTURA KETAMINA/ XILAZINA NOS MODELOS MPTP E 6-OHDA .....	53
<b>5.5. CONSIDERAÇÕES GERAIS .....</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>66</b>

## LISTA DE FIGURAS

1. VIA DE SÍNTESE DA DOPAMINA A PARTIR DO AMINOÁCIDO TIROSINA.....	3
2. VIAS DE DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DA DOPAMINA EM NEURÔNIOS NIGRAIS.....	4
3. ESTRUTURA QUÍMICA DO MPTP E DE SEU METABÓLITO MPP <sup>+</sup> .....	8
4. ESTRUTURA QUÍMICA DA 6-OHDA.....	10
5. DESENHOS ESQUEMÁTICOS, ADAPTADOS DO ATLAS DE CÉREBRO DE RATOS, INDICANDO O LOCAL DAS INFUSÕES DE SALINA OU DAS TOXINAS.....	22
6. DESENHO ESQUEMÁTICO INDICANDO A FATIA RETIRADA DO CÉREBRO DO RATO COM LÂMINAS DE BARBEAR.....	24
7. DESENHO ESQUEMÁTICO INDICANDO O CORTE NO PLANO FRONTAL MOSTRANDO O CORPO ESTRIADO.....	25
8. DESENHO ESQUEMÁTICO INDICANDO A VISTA LATERAL DO CÉREBRO DO RATO.....	27
9. DESENHO ESQUEMÁTICO DA INFUSÃO DE TOXINAS NA RAFE MEDIAL	27
10. DESENHO ESQUEMÁTICO DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS.....	30
11. NÚMERO DE ROTAÇÕES IPSILATERAIS E CONTRALATERAIS APÓS DESAFIO COM A POMORFINA .....	33
12. CURVAS DE EVOLUÇÃO TEMPORAL DO NÚMERO DE ROTAÇÕES INDUZIDAS PELA A POMORFINA.....	35
13. COMPORTAMENTO ROTATÓRIO EM FUNÇÃO DA INTENSIDADE DA LESÃO NIGROESTRIATAL.....	38
14. CONCENTRAÇÕES DE DOPAMINA, DOPAC E HVA EM DIFERENTES REGIÕES DO ESTRIADO EM RESPOSTA A LESÕES EM DIFERENTES SÍTIOS DA SNC COM MPTP.....	40

15. DEPLEÇÃO DE SEROTONINA E 5-HIAA NO CÓRTEX, HIPOCAMPO E ESTRIADO DE RATOS QUE RECEBERAM INFUSÃO DE MPTP OU 6-OHDA NO NÚCLEO MEDIAL DA RAPE.....	42
16. DEPLEÇÃO DE DOPAMINA, DOPAC E HVA NO ESTRIADO DE RATOS QUE RECEBERAM INFUSÃO DE MPTP OU 6-OHDA NO NÚCLEO MEDIAL DA RAPE.....	43
17. EFEITO DA ANESTESIA COM KETAMINA/XILAZINA, EM COMPARAÇÃO COM O TIOPENTAL, NO APRENDIZADO DE RATOS LESADOS NA SNC COM MPTP OU COM 6-OHDA.....	44
18. MESENCÉFALOS COM CÉLULAS DOPAMINÉRGICAS MARCADAS POR IMUNOISTOQUÍMICA PARA TIROSINA HIDROXILASE.....	45
19. CONTAGEM DE NEURÔNIOS MARCADOS POR HISTOQUÍMICA PARA TIROSINA HIDROXILASE NA SNc E NA VTA.....	46
20. CONCENTRAÇÕES ESTRIATAIS DE DOPAMINA E DOPAC NOS ESTRIADOS DE RATOS LESADOS COM MPTP OU 6-OHDA SOB ANESTESIA COM TIOPENTAL OU KETAMINA/XILAZINA.....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA	-	6-hidroxi-dopamina
5-HIAA	-	Ácido 5-hidroxiindolacético
ATP	-	Adenosina tri-fosfato
COMT	-	Catecol-O-metil-transferase
DAT	-	Transportador de dopamina
DOPAC	-	Ácido 3,4-diidroxifenilacético
DNA	-	Ácido desoxiribonucléico
DP	-	Doença de Parkinson
DPX	-	Distireno, um plastificante e xileno
EDTA	-	Ácido etileno-diamino-tetracético
FPM	-	Feixe prosencefálico medial
GABA	-	Ácido gama-amino butírico
Gpe	-	Globo pálido externo
Gpi	-	Globo pálido interno
HPLC	-	Cromatografia líquida de alta performance
HVA	-	Ácido homovanílico
IL	-	Interleucina
LCR	-	Líquido céfalo-raquidiano artificial
MAO	-	Monoamino oxidase
MPP <sup>+</sup>	-	1-metil-4- fenilpiridina
MPTP	-	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
NMDA	-	N-metil-d-aspartato
NO <sup>•</sup>	-	Óxido nítrico
•OH	-	Radical hidroxila
ONOO-	-	Peroxinitrito
PPN	-	Núcleo pedúnculo-pontino
QSP	-	Quantidade suficiente para
SNc	-	Substância negra parte compacta
SNr	-	Substância negra parte reticulada
STN	-	Núcleo sub-talâmico
TNF	-	Fator de necrose tumoral
VTA	-	Área tegmental ventral

## RESUMO

Modelos animais de lesão neuroquímica da via nigroestriatal em ratos reproduzem uma importante característica neuropatológica dos pacientes com doença de Parkinson: a depleção de neurônios dopaminérgicos com corpo celular na substância negra compacta (SNc), que projetam para o estriado pelo feixe prosencefálico medial (FPM). A toxina 6-OHDA produz lesões severas quando infundida no FPM de ratos, enquanto o MPTP é pouco citado em usos nesses animais, dada a menor efetividade de lesão nessa espécie. Porém, a infusão de MPTP na SNc pode simular estágios iniciais da doença, antes do aparecimento dos sinais motores incapacitantes. O objetivo deste trabalho foi comparar as características bioquímicas e funcionais da lesão com as toxinas 6-OHDA e MPTP em ratos, considerando seus efeitos motores e comportamentais. Ratos Wistar machos adultos foram lesados por infusão de uma das toxinas em determinadas regiões da SNc ou no FPM e submetidos a ensaios de rotação por desafio com apomorfina ou aprendizado em labirinto aquático de Morris. Os animais foram então mortos por guilhotina e seus cérebros foram dissecados. Nas amostras de estriado, córtex ou hipocampo, foram determinadas as concentrações de dopamina e seu metabólitos por HPLC com detecção eletroquímica. No mesencéfalo, os neurônios dopaminérgicos da SNc e da área tegmental ventral foram quantificados por imunistoquímica para tirosina hidroxilase. Também caracterizou-se a topografia da via nigroestriatal lesada e a especificidade das toxinas frente a neurônios não dopaminérgicos. O efeito neuroprotetor da ketamina/xilazina sobre as lesões causadas pelas duas neurotoxinas foi avaliado pelo ensaio de aprendizado no Labirinto Aquático de Morris, pela mensuração neuroquímica da dopamina e metabólitos e por imunohistoquímica para tirosina hidroxilase. Os resultados indicam que o perfil de rotações em resposta a apomorfina é diferente para as duas toxinas, mas não é exatamente oposto. O sentido das rotações parece depender mais da intensidade da lesão do que do local de infusão das toxinas. A 6-OHDA causa morte de neurônios dopaminérgicos de forma potente e pode ser captada por fibras de passagem, causando lesão retrógrada. Enquanto isso, o MPTP produz morte neuronal mais localizada no ponto de infusão, sendo sua lesão mais moderada. Ambas as toxinas foram capazes de lesar neurônios serotoninérgicos. A menor potência do MPTP ficou evidenciada quando o efeito de sua infusão foi totalmente revertido pela anestesia com ketamina/xilazina, o que não aconteceu com a 6-OHDA. Foram evidenciadas diferenças de potência e mecanismo de ação que podem ser responsáveis pelas particularidades de cada modelo. Essas diferenças devem ser consideradas no planejamento dos experimentos, levando em consideração que fase da doença ou extensão de lesão se deseja estudar. O conhecimento das características de cada modelo permite a maior exatidão na sua aplicação e na interpretação dos resultados. Dessa forma, os modelos da 6-OHDA e do MPTP em ratos contribuem como ferramentas importantes para o estudo das alterações observadas nas fases final e inicial da doença de Parkinson, bem como na seleção de drogas usadas no seu tratamento.

## ABSTRACT

Animal models using neurochemical lesions of the nigrostriatal pathway mimic an important pathologic feature of Parkinson's disease, which is the depletion of dopaminergic neurons located on the *substantia nigra, pars compacta* (SNc), which project to the striatum by the medial prosencephalic bundle (MPB). The toxin 6-OHDA causes severe damage when infused into the rats' MPB, while MPTP is less cited on studies using rats, due to the lower effectiveness of MPTP on this species. However, the MPTP infusion into the SNc of rats can mimic the initial stages of the disease, before the appearance of disabling motor signs. The objective of this work was to compare the biochemical characteristics of the lesion using the toxins 6-OHDA or MPTP in rats, considering their motor and behavioral effects. Adult male Wistar rats were lesioned by infusion of each toxin into specific regions of the SNc or in the MPB and then submitted to rotation tests by apomorphine challenge. The rats were then killed and their brains were dissected. Dopamine and its metabolites were evaluated in samples of striatum, hippocampus and cortex, by HPLC with electrochemical detection. On the mesencephalum samples, SNc and ventral tegmental area dopaminergic neurons were quantified by immunohistochemistry for tyrosine hydroxylase. The topography of the lesioned nigrostriatal pathway and the specificity of each toxin on lesioning dopaminergic neurons were also studied. The potency of lesioning dopaminergic neurons was also measured by learning tests on the Morris water maze, neurochemical and histological analysis after surgeries under different anesthetics (thiopental x ketamin/xylazin). The results indicate that the turning behavior in response to apomorphine is different, but not opposite, for each toxin. The direction of the rotations seems to depend more on the lesion intensity than on the spot of toxin infusion. 6-OHDA potently causes death of dopaminergic neurons and can be taken by passage fibers, causing retrograde lesion. On the other hand, MPTP induces more modest neuronal death, and rather restricted to the site of infusion. Both toxins showed capability to lesion serotonergic cells. The lower potency of MPTP became evident when its effect was totally reverted when the surgery was performed under ketamin/xylazin anesthesia, while this did not happen on the 6-OHDA group. Differences on potency and action mechanisms were pointed as the causes for these toxins particularities. These differences must be taken in consideration while planning the experiments using these models. The knowledge of the characteristics of each model allows higher sharpness on its application and on the results interpretation. They are important tools on the study of different phases of Parkinson's disease as well as on the screening of potential drugs for its treatment.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. MODELOS ANIMAIS DE DOENÇA DE PARKINSON EM RATOS.

Os modelos animais são de grande auxílio na medicina experimental, pois permitem o estudo dos mecanismos fisiológicos da evolução de patologias e dos seus princípios de tratamento. Uma vez que o mecanismo fisiológico que causa a patologia é compreendido, o modelo é útil para a determinação de estratégias terapêuticas. Esses modelos são válidos desde que reproduzam, com considerável fidelidade, o estado da doença quando esta acomete humanos (GERLACH; RIEDERER, 1996).

Um modelo animal pode ser definido como uma preparação experimental desenvolvida com o propósito de estudar uma condição patológica na mesma ou em diferentes espécies. São preparações que tentam reproduzir condições humanas, incluindo neuropatologias. Apesar de não seguirem o mesmo curso evolutivo da patologia de referência, os modelos permitem estudos invasivos, que são eticamente inviáveis em cérebros de pacientes humanos (RODRIGUEZ et al., 2001).

Em um extremo, pode-se tentar desenvolver um modelo que reproduza uma patologia em toda sua extensão, o que obviamente é uma tarefa muito complexa (GEYER; MARKOU, 1995). Outra proposta, mais limitada, promove uma maneira de sistematicamente estudar os efeitos de potenciais estratégias terapêuticas. Nesse caso, o modelo pode ou não reproduzir fielmente todas as características da patologia, mas reflete características como a eficácia de agentes terapêuticos, levando ao desenvolvimento de novos tratamentos farmacológicos. (GEYER; MARKOU, 1995, DEUMENS et al., 2002).

Desde os primeiros estudos neuroquímicos *post mortem* em pacientes de Doença de Parkinson (DP), muitos modelos animais foram desenvolvidos com objetivo de reproduzir diferentes aspectos anatômicos e sintomáticos da doença (BEAL, 2001). Tais modelos vêm contribuindo para consideráveis avanços no conhecimento da fisiopatologia das doenças neurodegenerativas, e são extremamente necessários na pesquisa atual (GHORAYEB et al., 2002), pois um modelo que reproduzisse exatamente o padrão de morte celular da DP seria

muito útil para estudar a causa da maior vulnerabilidade de algumas células em relação a outras (RODRÍGUEZ et al., 2001, DEUMENS, et al., 2002).

## 1.2. DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson foi cientificamente descrita pela primeira vez pelo médico inglês James Parkinson em 1817. Sua publicação foi intitulada “Ensaio da Paralisia Agitante”, nome que originariamente deu à doença. Nesse ensaio, descreveu quatro casos clínicos de pacientes que apresentavam tremor de repouso nos membros superiores, mas permaneciam com forte rigidez muscular, lentidão de movimentos e instabilidade postural, o que proporcionava muitas quedas (MENEZES; TEIVE, 2003). No início do século XX, outros neurologistas estudaram a doença de forma mais aprofundada e sistemática, e a batizaram como doença de Parkinson em homenagem a sua primeira descrição. James Parkinson se ateu aos sinais motores da doença, comentando que os pacientes não sofriam perda de capacidade intelectual. Contudo, posteriormente foram descritas alterações em determinados tipos de memória e o aparecimento de sintomas afetivos, principalmente depressivos. Esses sinais e sintomas podem aparecer tanto com o desenvolvimento do quadro motor, como antes mesmo destes aparecerem (MENEZES; TEIVE, 2003).

Estudos *post mortem* em cérebros de pacientes positivamente diagnosticados mostraram a perda de neurônios da substância negra *pars compacta* (SNc), localizada no mesencéfalo. A região possui esse nome porque possui coloração escura, o que visualmente a destaca. Isso ocorre porque a região possui alta concentração de células produtoras de dopamina. Este neurotransmissor se auto-oxida facilmente gerando a melanina, pigmento de coloração escura (MENEZES; TEIVE, 2003, MORI et al., 2006).

A dopamina é uma catecolamina sintetizada a partir da tirosina pela reação mostrada na Figura 1.

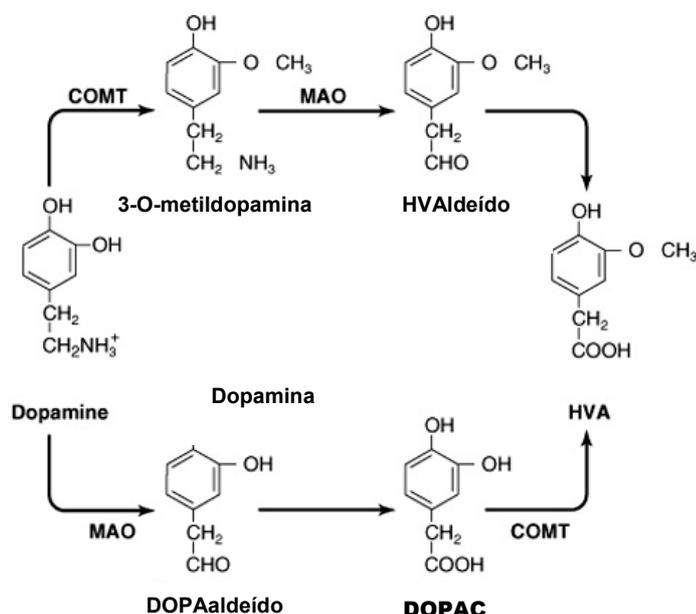
FIGURA 1: VIA DE SÍNTESE DA DOPAMINA A PARTIR DO AMINOÁCIDO TIROSINA



FONTE: SIEGEL et al., (2006).

Esta maquinaria enzimática é encontrada em neurônios que podem ser divididos em quatro grupos principais: nigroestriatal, mesocortical, mesolímbico e tuberoinfundibular. O nigroestriatal é o maior e concentra cerca de 80% da dopamina encefálica. A sua degradação é mediada pelas enzimas mono-amino-oxidase (MAO) e catecol-o-metil-transferase (COMT), produzindo vários metabólitos, entre eles o ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA) (ZIGMOND, 1999, KANDEL et al., 2000, SIEGEL et al., 2006) (Figura 2).

FIGURA 2. VIAS DE DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DA DOPAMINA EM NEURÔNIOS NIGRAIS



FONTE: SIEGEL et al., (2006).

Os efeitos da dopamina são mediados pela interação com receptores das famílias D1 (englobando os tipos D1 e D5) e D2 (D2, D3 e D4). Todos estes receptores são metabotrópicos (atuam via proteína G), sendo que os D1 ativam a cascata de síntese do AMPc, enquanto os D2 inibem a adenilil ciclase (SIEGEL et al., 2006). A SNc, junto com a área tegmental ventral (VTA), no mesencéfalo, são as principais concentrações de neurônios dopaminérgicos do encéfalo. Os neurônios da SNc e da VTA deixam o mesencéfalo principalmente pelo feixe prosencefálico medial formando as três vias dopaminérgicas principais: nigroestriatal (a maior), mesocortical e a mesolímbica. A via nigroestriatal é responsável pela modulação dos núcleos da base, um grupo de estruturas subcorticais que modula os impulsos córtico-espinhais para início dos movimentos (OBESO et al., 2000).

O córtex envia projeções glutamatérgicas ao estriado, que é a principal porta de entrada dos núcleos da base. O estriado envia projeções GABAérgicas a outros núcleos, como o globo pálido e a substância negra reticulada. Esses núcleos modulam o tálamo, que por sua vez envia projeções glutamatérgicas

estimulatórias de volta ao córtex, facilitando com maior ou menor intensidade o início do movimento (OBESO et al., 2000, GERFEN, 2004).

Essa modulação é realizada pelo balanço entre dois circuitos que ligam o estriado ao globo pálido, a via direta e a via indireta. A dopamina estimula a via direta e inibe a via indireta. Desta forma ela funciona como um modulador dos núcleos da base, pois quando liberada no estriado facilita o movimento. Isso explica a lentidão de movimentos e a rigidez muscular do paciente parkinsoniano, já que a morte dos neurônios nigroestriatais causa a depleção dopaminérgica no estriado, o que causa a dificuldade de se movimentar. Por outro lado, o excesso de dopamina ou a supersensibilização de receptores dopaminérgicos no estriado causa aumento dos movimentos, fazendo com que esses sejam executados de forma descontrolada, como no caso de discinesias, causada pelo tratamento com agonistas dopaminérgicos, ou da Coreia de Huntington. A dopamina modula os núcleos da base através de seu efeito nos receptores D1 e D2. Os receptores D1 modulam principalmente as fibras da via direta, enquanto os D2 são localizados em neurônios estriado-palidais da via indireta. Com isso, a ativação de D1 ativa a via excitatória e a ativação de D2 inibe a via inibitória (OBESO et al., 2000, GERFEN, 2004, SIEGEL, 2006).

Estudos anatômicos classificam duas porções da substância negra, no mesencéfalo, a parte compacta e a parte reticulada. A parte compacta da substância negra (SNc) concentra corpos de neurônios dopaminérgicos que projetam principalmente para o corpo estriado. Esta liberação de dopamina no estriado possui organização complexa, nos sentidos látero-lateral, dorso-ventral e antero-posterior. Estudos histológicos em ratos, com técnica de traçador retrógrado, mostram que neurônios da região medial da SNc projetam axônios para regiões mediais, ventrais e anteriores do estriado, enquanto neurônios da extremidade lateral da SNc projetam para porções laterais e posteriores do estriado. Existem ainda regiões do estriado conhecidas como estriossomas, diferenciados da matriz estriatal. Essas regiões são diferentemente inervadas por neurônios dopaminérgicos, sendo que os neurônios de regiões ventrais da SNc inervam os estriossomas enquanto neurônios da SNc dorsal projetam axônios para a matriz estriatal (FALLON; LOUGHLIN, 1985, SCHWARTING; HUSTON, 1996, GERFEN, 2004).

A literatura descreve que, quando o paciente parkinsoniano começa a apresentar os sinais motores da doença, já perdeu mais de 70% dos neurônios nigroestriatais. Com isso, fica muito difícil reverter o quadro, o que faz com que a maioria dos tratamentos, tanto cirúrgicos como farmacológicos, reduzam a sintomatologia, não permitindo um prognóstico de cura (MENEZES; TEIVE, 2003). Isso ocorre devido à alta eficiência da sinapse nigroestriatal. No início da evolução da doença, a morte de alguns neurônios não causa diferença significativa na transmissão do sinal. Como a doença é evolutiva, a progressão da morte neuronal causa diminuição importante na concentração de dopamina junto aos receptores estriatais. Em resposta, os neurônios estriatais sintetizam e expõem mais receptores na membrana plasmática, aumentando a eficiência da sinapse e mascarando os efeitos da depleção. Na fase mais avançada da doença, essa regulação positiva de receptores não é suficiente para manter a conexão em níveis normais, causando o déficit motor (OBESO et al., 2000).

Relatos mais recentes descrevem pacientes com sintomas depressivos e déficit de memória que posteriormente desenvolveram sintomas parkinsonianos. Isso levanta a hipótese de que estas deficiências sejam causadas por mau funcionamento em sistemas neuronais comuns (MENEZES; TEIVE, 2003). Assim, pode-se planejar estudar a doença em diversos níveis, em diferentes estágios. Os modelos animais descritos na literatura são voltados principalmente para a fase tardia, buscando tratamentos que revertam os sinais motores. Poucos modelos visam estudar os fenômenos das fases iniciais, antes do aparecimento desses sinais (SCHWARTING; HUSTON, 1996; DA CUNHA et al., 2002).

Dos modelos de DP encontrados na literatura, os mais citados são os que utilizam macacos, ratos ou camundongos. Os modelos por lesão neurotóxica de células são muito utilizados por serem facilmente reprodutíveis e de custo menor em relação aos modelos genéticos, por exemplo. Várias toxinas são utilizadas para causar a lesão da via nigroestriatal. Dentre essas, este trabalho destaca a 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) e a 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (GIOVANNI et al., 1994 a;b, BLUM et al., 2001, DEUMENS et al., 2002). Em primatas, a infusão da toxina MPTP por via intravenosa é capaz de reproduzir a DP de forma muito similar à encontrada em humanos, com desenvolvimento de corpos de Lewy (inclusões protéicas citoplasmáticas que causam morte

neuronal), déficit motor e comportamental. Camundongos também são sensíveis a essa toxina administrada desta forma, porém os ratos parecem exibir forte resistência à lesão por essa toxina, sendo a infusão intravenosa pouco efetiva (GIOVANNI et al., 1994a, BLUM et al., 2001).

Contudo, a possibilidade de se realizar a infusão intracerebral de toxinas, com auxílio de aparelhos estereotáxicos, permitiu o desenvolvimento de modelos mais práticos e mais específicos em relação ao local e ao tipo de lesão. Toxinas que não atravessam a barreira hematoencefálica por serem pouco lipossolúveis, como a 6-OHDA, podem ser infundidas diretamente em vários pontos da via nigroestriatal, como a SNc, a VTA, o feixe prosencefálico medial (FPM) e o estriado. A administração desta toxina em ratos mostrou-se um potente depletor de neurônios dopaminérgicos na SNc e de dopamina e metabólitos no estriado. Ainda, a cirurgia estereotáxica permitiu a demonstração de que a infusão de MPTP diretamente na SNc de ratos produz lesão significativa de neurônios, porém de forma mais moderada do que a 6-OHDA (HARRIK, et al., 1987, GIOVANNI et al., 1994b, DA CUNHA et al., 2001, 2002, FERRO et al., 2005).

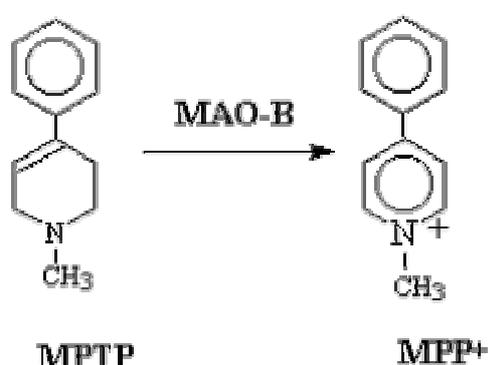
### 1.3. AS TOXINAS MPTP E 6-OHDA

O modelo animal de DP melhor caracterizado é o que utiliza a neurotoxina MPTP. Esta é útil para gerar modelos tanto em camundongos quanto em primatas (BEAL, 2001; LEENDERS et al., 1988). O MPTP (mostrado na figura 3) é altamente lipofílico e atravessa prontamente a barreira hemato-encefálica. Então, é captado por células da glia, que contém alta concentração de monoamino-oxidases. O MPTP é então convertido para a sua forma ativa, a 1-metil-4-fenilpiridina ( $MPP^+$ ) pela monoamino oxidase B (MAO-B), enzima envolvida na degradação de catecolaminas.

O  $MPP^+$ , por causar o aumento da síntese de interleucinas (TNF $\alpha$ , IL-1B e IL-6), estimula indiretamente a expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS). As isoformas induzível e neuronal da NOS são responsáveis pelo aumento da produção de  $NO^\bullet$ , o que parece contribuir para a toxicidade do MPTP. O  $NO^\bullet$  é um gás altamente lipofílico, que por isso pode atravessar membranas facilmente, atingindo neurônios vizinhos aos lesados. O  $MPP^+$  é

liberado no interstício por mecanismo ainda desconhecido. Este metabólito é então captado pelo transportador de dopamina de membrana, pelo qual possui grande afinidade. Por isso, animais deficientes desse sistema de transporte são resistentes à toxicidade do MPTP (GHORAYEB et al., 2002, SMEYENE; JACKSON-LEWIS, 2005). Como os neurônios da SNc possuem concentração de transportador de dopamina extremamente alta, isto torna a região altamente susceptível à lesão por esta toxina.

FIGURA 3. ESTRUTURA QUÍMICA DO MPTP E DE SEU METABÓLITO MPP<sup>+</sup>.



O MPP<sup>+</sup> captado pelo neurônio se concentra na mitocôndria, onde inibe o complexo I da cadeia transportadora de elétrons, reduzindo a produção de ATP (BEAL, 2001, SMEYENE; JACKSON-LEWIS, 2005). Sua entrada nesta organela parece ocorrer por difusão através da membrana interna, num processo direcionado pelo gradiente elétrico desta. O dano causado no neurônio dopaminérgico é provavelmente resultante de compostos gerados na própria célula, secundários à depleção de energia. A formação do radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) é um exemplo desse processo (OBATA, 2002, SMEYENE; JACKSON-LEWIS, 2005). Embora o O<sub>2</sub><sup>-</sup> não seja muito danoso, pode reagir rapidamente com o óxido nítrico (NO<sup>•</sup>), gerado na glia e difundido para o neurônio, para formar a espécie mais intensamente reativa, o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), o qual se decompõe, em pH fisiológico, gerando radicais (•OH) (GIOVANNI et al., 1994b, LEE et al., 2000, BEAL, 2001). Ainda, a falta de energia promovida pela falência mitocondrial pode levar a despolarização e ativação secundária voltagem-dependente de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) do glutamato, o que causaria a síntese de mais NO<sup>•</sup>. Um alvo em potencial para o ONOO<sup>-</sup> é a enzima tirosina hidroxilase (TH), a

enzima passo-limitante na síntese da dopamina (Fig 1). Sendo assim, o papel principal do MPP<sup>+</sup> na morte neuronal pode ser o de aumentar a vulnerabilidade da célula a um estresse oxidativo, ao invés de mediar diretamente este processo (LEE et al., 2000). As espécies reativas de oxigênio causam degeneração das macromoléculas celulares, como a membrana plasmática ou o DNA. Esta degeneração inicia um ciclo que aumenta a síntese de compostos reativos, e causa morte por necrose. Paralelamente, são ativadas na célula enzimas que causam a morte celular programada ou a apoptose, que diminuem a influência da morte de uma célula nas células vizinhas.

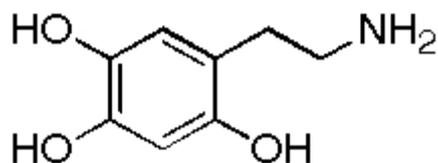
Segundo HARRIK e colaboradores (1987), uma depleção parcial, mas significativa nos níveis de dopamina no estriado de ratos pode ser atingida com MPTP após administração de altas concentrações de MPTP diretamente na SNc. Mais recentemente, o Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Sistema Nervoso Central da Universidade Federal do Paraná publicou resultados mostrando que ratos que receberam infusão intranigral de MPTP desenvolveram lesões da SNc mais moderadas em relação a animais lesados com toxinas mais potentes, como a 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Isso oferece uma opção para a estudos com lesões nigrais localizadas (Da CUNHA et al.,2002, FERRO et al., 2005).

A resistência dos ratos à completa lesão da SNc pelo MPTP oferece um modelo útil para o estudo de lesões parciais, reproduzindo aspectos da fase inicial da doença (DA CUNHA et al., 2001).

A 6-hidroxidopamina (6-OHDA) é uma das neurotoxinas mais comuns utilizadas experimentalmente em modelos de degeneração da SNc, tanto *in vitro* como também *in vivo* (BLUM, 2001) (Figura 4). É incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica, sendo necessária a administração diretamente na estrutura cerebral que se deseja lesar. A injeção bilateral de 6-OHDA na SNc ou em outras regiões cerebrais provoca uma elevada mortalidade neuronal, principalmente de neurônios catecolaminérgicos (GLINKA et al.,1997). Esta droga apresenta similaridade estrutural com as catecolaminas e tem alta afinidade pelo sistema de transporte das mesmas, mostrando assim a sua seletividade por neurônios catecolaminérgicos. Produz lesões na SNc pela indução da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e radicais livres, como radicais •OH, e é mais tóxica que a MPP<sup>+</sup> para o complexo I

mitocondrial (UNGERSTEDT; ARBUTHNOTT, 1970, GERLACH; RIEDERER, 1996, BLUM et al., 2001, BETARBET *et al.*, 2002).

FIGURA 4. ESTRUTURA QUÍMICA DA 6-HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA).



Animais lesados bilateralmente com 6-OHDA demonstram os sintomas motores parkinsonianos, o que prejudica sua alimentação e por isso causa alta mortalidade dos animais, podendo prejudicar experimentos comportamentais e crônicos. (FERRO et al., 2005). A 6-OHDA é usualmente injetada unilateralmente, enquanto que o hemisfério intacto funciona como um controle interno, constituindo um modelo de hemiparkinsonismo, que é caracterizado por um comportamento motor assimétrico após a administração de drogas dopaminérgicas, devido a um desequilíbrio entre o lado lesado e não-lesado (BETARBET et al., 2002). A injeção unilateral de 6-OHDA na SNc ou no FPM provoca a morte de todos os neurônios dopaminérgicos no mesencéfalo do lado aplicado e a diminuição de dopamina no lado correspondente do estriado, gerando um modelo válido de uma fase adiantada da DP com pronunciadas alterações motoras. Esses animais apresentam comportamento rotatório contralateral em relação à lesão quando desafiados com agonistas D1/D2 da dopamina, tais como a apomorfina e a bromocriptina. Drogas que induzem a liberação de dopamina, tais como a anfetamina, causam rotações ipsilaterais à lesão (METZ; WHISAW, 2002). Esse comportamento pode ser explicado pela hiperexpressão dos receptores dopaminérgicos na porção lesada do estriado. Ou seja, as drogas agonistas terão seu efeito potencializado pela hipersensibilização dos receptores (GERLACH; RIEDERER, 1996). A 6-OHDA é uma toxina efetiva em camundongos, ratos, gatos e primatas (SCHWARTING; HUSTON, 1996).

O modelo animal de ratos lesados com 6-OHDA é o mais utilizado para testar o comportamento rotatório dos animais. Não existem muitos estudos utilizando a neurotoxina MPTP para avaliar o comportamento motor na rotação (SCHWARTING; HUSTON, 1996, FERRO et al., 2005).

A 6-OHDA parece ser menos específica do que o MPTP. Enquanto a primeira destrói neurônios catecolaminérgicos de maneira geral (dopaminérgicos e noradrenérgicos), o MPTP parece ser captado apenas por neurônios dopaminérgicos, deixando outros intactos (GLINKA et al., 1997).

#### 1.4. O COMPORTAMENTO ROTATÓRIO

O modelo de comportamento rotatório em ratos desafiados com drogas dopaminérgicas, após lesão unilateral da SNc induzido pela infusão intracerebral de 6-OHDA, foi proposto como modelo da DP por UNGERSTEDT em 1968. Desde então, este tem sido um dos modelos mais populares para o estudo de drogas potencialmente úteis para tratar essa doença (GERLACH; RIEDERER, 1996; SCHWARTING; HUSTON, 1996; YUAN et al., 2005). Apesar da aceitação do modelo, ainda não existe consenso sobre qual é o mecanismo exato deste fenômeno, o que explicaria, entre outras características, a direção de rotação tomada pelo animal.

A maioria dos estudos com administração unilateral de 6-OHDA na via nigroestriatal apresentam resultados de rotações contralaterais, ou seja, os animais rodam em direção oposta a qual recebeu a infusão da toxina. Porém, muitos autores interpretam que o aparecimento de rotações ipsilaterais (para o mesmo lado lesado), ou ausência de rotação após o desafio seriam resultantes de cirurgias ou infusões de toxinas praticadas de forma incorreta e esses animais não deveriam ser considerados no experimento. Entretanto, alguns trabalhos apresentam resultados de animais com rotações ipsilaterais ou com poucas rotações para os dois sentidos quando lesados com 6-OHDA (UNGERSTEDT, 1971, COSTALL et al., 1976, REDGRAVE; MITCHELL, 1982; ANNET et al., 2006; OLDS et al., 2006), ou ainda rotações como resultado da lesão com outras neurotoxinas como a rotenona e o MPP<sup>+</sup> infundidos em diversos pontos da via nigroestriatal. (JASSO-LÓPEZ; TAPIA, 1995; KONDO et al., 2004; SINDHU et al., 2006). A causa do comportamento rotatório parece estar relacionada ao desequilíbrio entre as sinapses dopaminérgicas nigroestriatas entre os lados direito e esquerdo do cérebro. Este desbalanço prejudica os impulsos para iniciar os movimentos promovidos pela conexão estriado-tálamo-córtex motor, os quais

são modulados pela via nigroestriatal (NICOLA et al., 2000). Um ponto crítico para definir o aparecimento e a direção das rotações parece ser o local de infusão da toxina. O FPM é apontado como o ponto onde a lesão das fibras causa maior número de rotações contralaterais após o desafio com apomorfina (UNGERSTEDT, 1971). A supersensibilidade dos receptores dopaminérgicos no estriado também é sugerida como fator determinante no aparecimento de rotações contralaterais (THAL et al., 1979). Outros autores ainda sugerem o envolvimento de outros sistemas de neurotransmissores além da dopamina (HIRSCHHORN et al., 1983, LANE et al., 2005).

## 1.5. ANESTÉSICOS GERAIS

Os anestésicos gerais são indispensáveis na pesquisa invasiva com animais. Como são fortes depressores do sistema nervoso central, influem diretamente na atividade e no metabolismo neuronal. Ainda, devido a suas propriedades inibitórias na transdução do sinal nervoso, podem atuar como neuroprotetores. A possibilidade de proteção contra a lesão por MPTP ou por 6-OHDA foi avaliada nesse estudo, de forma comparativa para os anestésicos tiopental e a mistura ketamina/xilazina. Com isso, deve-se considerar que esses compostos, por seus mecanismos de ação, podem interferir com os resultados procedimentos experimentais que envolvem o efeito de drogas injetadas no animal durante o seu efeito.

### 1.5.1. Tiopental

O tiopental é o derivado do ácido barbitúrico (2,4,6-trioxoexaidroxipirimidina) utilizado com mais frequência na clínica para indução de anestesia. Este fármaco facilita a transmissão em sinapses inibitórias, por aumentar o limiar elétrico para a geração de um potencial de ação na membrana do axônio. Este efeito é consequência da ligação da molécula da droga com um sítio alostérico ao sítio de ligação do ácido gama-amino-butírico (GABA) em seu receptor ionotrópico (GABA<sub>A</sub>). Este receptor é uma proteína transmembrana que forma um canal, que quando ativado é permeável à passagem de Cl<sup>-</sup> do interstício para o citosol, hiperpolarizando o neurônio. O aumento da eficiência das sinapses

inibitórias causa sedação e perda da consciência, assim como redução do ritmo respiratório e de batimentos cardíacos (KANDEL et al., 2000, SIEGEL et al., 2006).

### **1.5.2. Ketamina e xilazina**

A ketamina (arilcicloexilamina) é um anestésico geral de uso pediátrico e veterinário que, ao contrário da maioria dos anestésicos gerais utilizada na clínica, não possui efeito significativo no receptor GABA<sub>A</sub>. Este agente inibe o receptor excitatório NMDA do glutamato, que é um canal de membrana permeável ao Ca<sup>++</sup>. Este mecanismo de ação faz com que o estado de hipnose do animal seja diferente dos anestésicos GABAérgicos. A associação da ketamina com agonistas de receptores noradrenérgicos  $\alpha$ 2 centrais, como a xilazina, é comum na clínica veterinária. A xilazina é miorrelaxante e causa forte analgesia e sedação, o que permite a redução da dose do anestésico local. Além disso, causa forte relaxamento muscular. Esta mistura anestésica é muito utilizada em experimentação invasiva em ratos, pois possui janela de segurança terapêutica maior que a do tiopental. Por causar menos depressão respiratória, é mais segura na necessidade de aumento de dose (SIEGEL et al., 2006).

Com isso, o conhecimento detalhado das características do modelo animal a ser utilizado pode ajudar a definir qual modelo é mais adequado para se estudar uma fase específica ou uma característica particular da doença. Ainda, pode ajudar a interpretar de forma mais objetiva e concreta os resultados obtidos com os testes realizados, tanto comportamentais como bioquímicos.

## 2. OBJETIVO

verificar se a intensidade da lesão com MPTP ou com 6-OHDA em ratos tem influência diferente dos pontos de vista bioquímico e funcional.

### 2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se as lesões com 6-OHDA ou MPTP em ratos podem reproduzir características de diferentes estágios da doença de Parkinson.
- Mensurar as depleções de dopamina e de seus metabólitos no estriado em resposta a lesões da via nigroestriatal com MPTP ou com 6-OHDA.
- Comparar a extensão da morte de neurônios da SNc por imunistoquímica, causada pela infusão das toxinas MPTP ou 6-OHDA em diferentes sítios da via nigroestriatal.
- Determinar a topografia da depleção dopaminérgica em função do sítio de injeção da toxina MPTP.
- Caracterizar as diferenças no padrão de rotações provocadas por lesões unilaterais da SNc com MPTP ou com 6-OHDA.
- Caracterizar as diferenças entre o efeito neuroprotetor dos anestésicos gerais ketamina e xilazina sobre a lesão da via nigroestriatal por MPTP ou 6-OHDA.
- Avaliar a seletividade do MPTP e da 6-OHDA em lesar neurônios serotoninérgicos, pela infusão destas no núcleo medial da rafe, fora da via nigroestriatal.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. ANIMAIS

Ratos Wistar machos pesando entre 280 e 310 g no dia da cirurgia foram utilizados nestes experimentos. Os animais foram obtidos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas dessa Universidade. Os ratos foram mantidos em sala com temperatura a  $22 \pm 2^\circ \text{C}$  e ciclo claro-escuro de 12h, sendo as luzes acesas as 7h. Todos os cuidados foram tomados para minimizar o sofrimento causado nos animais durante os experimentos, de acordo com as normas Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, processo nº 23075.030482/ 2006-2, certificado nº 185 (Anexo 1).

#### 3.2. DROGAS E SOLUÇÕES

A água utilizada no preparo de todas as soluções deste trabalho foi previamente destilada, deionizada e microfiltrada (poro de membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ ).

Soluções a partir de substâncias adquiridas da SIGMA chemicals (St Louis, MO):

- A solução de cloreto de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) foi preparada por dissolução em solução salina 0,9%, em concentração de 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .
- A solução de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) foi preparada na concentração de 8 mg/  $\mu\text{L}$  por dissolução em líquido cefaloraquidiano artificial, composto por: 8,66 g de cloreto de sódio; 0,205 mg de cloreto de potássio; 0,176 g cloreto de cálcio di-hidratado; 0,173 g de cloreto de magnésio hexa-hidratado; água QSP 1 L. Foi adicionado ácido ascórbico a 0,2 %, para evitar oxidação prematura da droga. A solução foi preparada no dia da cirurgia e foi mantida resfriada e protegida da luz durante o uso.

- A solução de sulfato de atropina foi preparada em solução salina na concentração de 0,4 mg/mL.
- A solução de acetaldeído foi preparada em solução salina na concentração de 120 mg/ mL.
- A solução de desipramina foi preparada em solução salina na concentração de 25 mg/mL.
- A solução saturada de bicarbonato de sódio foi preparada em água.
- A solução de apomorfina foi preparada em solução salina na concentração de 1 mg/mL.

Drogas adquiridas dos laboratórios e usadas em sua forma comercial:

- Tiopental sódico 25 mg/mL. Abbott Laboratories. Abbott Park, Illinois, U.S.A.
- Cloridrato de Ketamina 0,11 mg/mL. Vetbrands Brasil
- Cloridrato de Xilazina 23 mg/ mL. Konig Brasil.

Solução de Equitesin (Bellissimo et al., 2004):

- A solução Equitesin conteve: tiopental sódico 1 %; hidrato de cloral 4,25 %; sulfato de magnésio 2,13 %; propilenoglicol 42,8 %; etanol 3,7 %; em água.

### 3.3. PROCEDIMENTOS GERAIS

#### 3.3.1. Cirurgias

O método de cirurgia estereotáxica foi adotado para garantir a reprodutibilidade da concentração e localização das infusões das toxinas na via nigroestriatal.

Os ratos receberam anestésicos gerais por via intra-peritoneal (i.p.) Para o teste de neuroproteção pela anestesia, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (40 mg/kg) ou com a mistura Ketamina/xilazina (85mg/kg; 3mg/kg). Para os demais experimentos, os animais foram anestesiados com a

mistura equitesin. Os ratos receberam também sulfato de atropina i.p. (0,4 mg/Kg) para minimizar efeitos parassimpáticos da anestesia. Nos animais lesados com MPTP, foi administrado acetaldeído i.p. (3 doses de 120 mg/ kg: 10 minutos antes do anestésico, junto com o anestésico e logo após a cirurgia) para potenciar a ação tóxica do MPTP. Esta substância aumenta o tempo de meia vida do metabólito MPP<sup>+</sup>, por efeito inibitório na enzima aldeído desidrogenase (VAGLINI et al., 1996). Os animais que foram lesados por 6-OHDA receberam desipramina 25 mg/Kg i.p. para evitar a captação da toxina por neurônios noradrenérgicos (DAY et al., 2002).

Com os animais anestesiados, foi feita a tricotomia dos crânios e os animais foram fixados em aparelho estereotáxico de Kaupf. Com auxílio de bisturi, os músculos do crânio foram afastados para a exposição dos ossos da caixa craniana, em seguida foram feitas perfurações nos crânios dos animais com auxílio de uma broca de baixa rotação, segundo coordenadas estereotáxicas das estruturas-alvo (PAXINOS & WATSON, 2005). Após a ruptura da dura-máter, uma agulha gengival de 30 Gauge foi introduzida no encéfalo, passando pela perfuração feita com a broca, atingindo a estrutura cerebral desejada. A esta agulha foi conectada uma microseringa Hamilton de 10 µL por um tubo de polietileno (1mm DI). Com auxílio de uma bomba microinfusora (Harvard Apparatus, USA); solução salina (0,9%), ou as toxinas MPTP (100mg/ mL) ou 6-OHDA (8 mg/ mL) foram infundidas na velocidade de 0,250 mL/min em uma das regiões dos cérebros dos animais, determinada em cada experimento em particular. Depois de terminada a infusão, a agulha foi mantida na região infundida por mais 2 minutos para evitar o refluxo da solução, e então foi lentamente removida dos crânios.

Finalizada a infusão, os animais foram suturados e receberam 1 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio i.p., para facilitar a eliminação do anestésico e, conseqüentemente, a recuperação da anestesia. Os animais foram então acondicionados por 24 horas em gaiolas individuais, com acesso a ração moída e umedecida, para que se recuperassem da cirurgia. Após esse período, os animais foram reagrupados em suas gaiolas originais.

### **3.3.2. Teste de rotação por desafio com apomorfina**

Os animais que foram submetidos ao teste de rotação foram tratados com o agonista dopaminérgico apomorfina na dose de 1 mg/ Kg s.c. e imediatamente posicionados no centro de cubas de PVC cilíndricas, dispostas sobre uma bancada de madeira. Uma câmara de vídeo registrou o experimento para posterior avaliação do comportamento rotatório. Durante uma hora foram contados o número de voltas que os animais fizeram em torno do próprio eixo, em ambos os sentidos horário e anti-horário (LANE et al., 2006).

### **3.3.3. Dissecção**

Logo após o teste da rotação, os animais foram guilhotinados. Os cérebros foram removidos por inteiro e imediatamente resfriados em béquer com água gelada por 1 minuto. Os cérebros foram divididos em dois por um corte coronal com uma lâmina de barbear.

A porção caudal dos cérebros, contendo os mesencéfalos, foi preparada para os testes de imunistoquímica. Essas amostras foram acondicionadas em formol 4% para fixação do material. Esta solução foi trocada três vezes em intervalos de 2 dias, e então substituída por uma solução de sacarose 10% em formol 4%.

A região anterior dos cérebros foi preparada para a análise neuroquímica. As estruturas cerebrais foram dissecadas com base no Atlas PAXINOS e WATSON (2005) para cérebro de ratos, com auxílio de pinças curvas e bisturi, sobre placa de petri em gelo picado. Essas amostras foram individualmente acondicionadas em tubos de microcentrifuga de 1,5 mL e armazenadas a -70°C até o dia da análise.

### **3.3.4. Neuroquímica**

As amostras foram suspensas com ácido perclórico 0,1 M contendo 0,02% de metabissulfito de sódio como anti-oxidante, em concentração de 15

$\mu\text{L}/\text{mg}$  de tecido cerebral. Este material foi fragmentado com sonda de ultra-som e centrifugado a  $10\,000 \times g$  por 30 min a  $4^\circ\text{C}$ .

Do sobrenadante, 20  $\mu\text{L}$  foram injetados em uma estação de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) composta por bomba LC10AD, controlada por uma CBM LC10 (Shimadzu Corporation, Japão), um detector eletroquímico (EC) L-ECD-6A (Shimadzu), com potencial de oxidação ajustado para + 800 mV. As separações foram realizadas em uma coluna de fase reversa Fusion RP C-18 (Phenomenex, EUA), dimensões 150 x 4,6 mm, partículas de 4 $\mu\text{m}$ , em temperatura de  $30^\circ\text{C}$ . Os cromatogramas da dopamina e de seus metabólitos, ácido di-hidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA); assim como a serotonina (5-HT) e seu metabólito, ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) foram integrados e analisados pelo software LC Solutions (Shimadzu).

A fase móvel utilizada na análise das aminas biogênicas foi constituída de solução aquosa de: ácido cítrico 4,6 g/L; ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) 44 mg/L; ácido octanossulfônico 200 mg/L; metanol 10 %; pH ajustado em 3,5; fluxo de 1,0 mL/min (BELLISSIMO et al., 2004).

As áreas dos picos foram comparadas às áreas dos padrões externos dos mesmos neurotransmissores e metabólitos (SIGMA), para sua identificação e quantificação. Os resultados foram expressos como ng das aminas analisadas por massa de tecido fresco (g) ou como porcentagem em relação ao controle.

### **3.3.5. Imunoistoquímica**

Os mesencéfalos foram cortados no plano frontal, em quatro séries de secções de 30  $\mu\text{m}$  de espessura em micrótomo. Os cortes foram montados em lâminas e analisados do diencéfalo caudal ao mesencéfalo caudal. As secções foram imunomarcadas com anticorpo monoclonal para tirosina hidroxilase (TH) obtidos de camundongo (diluição de 1:500). Os complexos antígeno-anticorpo foram localizados com uma variação do sistema ABC usando um kit comercial (ABC elite kit, Vector laboratories, Burlingame, CA). As lâminas foram desidratadas e cobertas com o polímero de montagem DPX. O número de neurônios imunorreativos foi determinado usando um microscópio Nikon Eclipse

E600, em objetiva de 10x, equipado com câmara lúcida. A contagem dos neurônios foi realizada nos dois lados da SNc e VTA, em 8 séries de secções coronais a cada 360  $\mu\text{m}$ , e foi estimada por extrapolação usando o método de ABERCROMBIE (1946).

### 3.4. COMPARAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS ENTRE AS LESÕES COM MPTP E COM 6-OHDA

Para se descrever as características particulares da lesão da via nigroestriatal para cada uma das duas toxinas testadas, foram comparados os efeitos de lesões em diversos pontos desta via. As lesões foram feitas em diferentes posições da SNc, em várias posições simultaneamente ou no feixe prosencefálico medial.

#### 3.4.1. Cirurgias

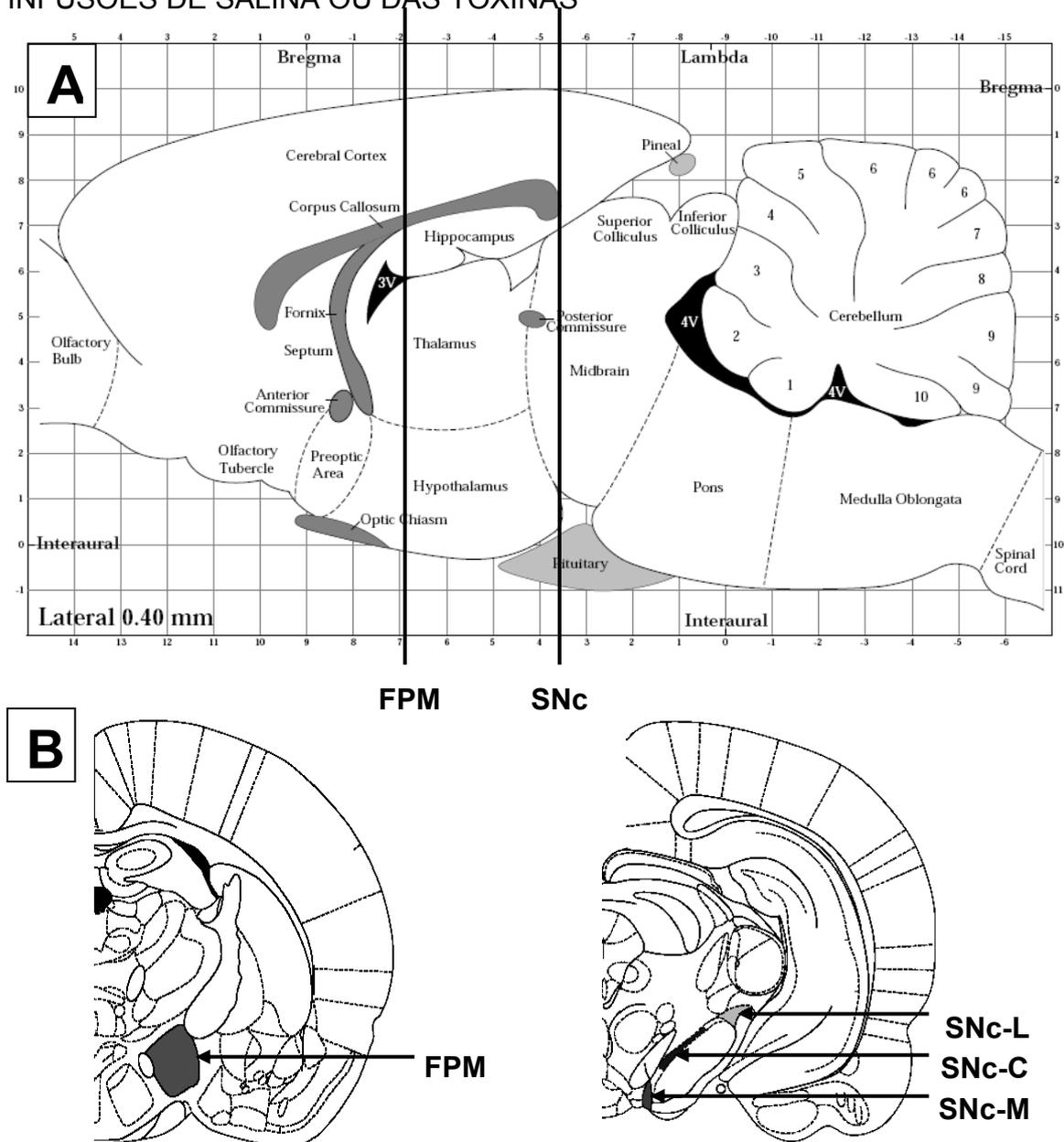
Os animais foram divididos em grupos de acordo com o local da lesão. Para cada local, um grupo de quinze animais recebeu infusão de MPTP (100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e outro de 6-OHDA. Os animais foram anestesiados com equitesin (0,3 mL/kg) i.p. e operados de acordo com as coordenadas, ilustradas na figura 5:

- Lesão na SNc medial (M) - ântero-posterior (AP): - 0,60 cm para trás do bregma; látero-lateral (LL): + 0,11 cm à esquerda da linha média; dorso-ventral (DV): - 0,86 cm abaixo do crânio.
- Lesão na SNc central (C) – AP: - 0,50 cm; LL: + 0,21 cm; DV: - 0,77 cm.
- Lesão na SNc lateral (L) - AP: - 0,61 cm; LL: + 0,26 cm; DV: - 0,73 cm.
- Lesão nas três coordenadas da SNc – uma infusão das toxinas em cada uma das três coordenadas: (M,C,L).
- Lesão no feixe prosencefálico medial (FPM) - AP, -1.9 mm LL, - 1.9 mm; DV, -7.2 mm.
- Dois grupos adicionais receberam infusão intracerebral de solução salina (NaCl 0,9 %), formando os grupos Sham. O grupo Sham para comparação com os grupos MPTP recebeu infusão de salina nas três regiões da SNc ,

enquanto no grupo Sham para comparação com os grupos 6-OHDA, a solução foi infundida no FPM.

Todos os grupos receberam infusão das toxinas unilateralmente (esquerda) para provocar o comportamento rotatório e permitir a comparação química entre o lado lesado e o não-lesado. Todos os grupos receberam infusão de 1  $\mu\text{L}$  de toxina ou salina, salvo nos casos de infusão no FPM (2  $\mu\text{L}$ ) e no centro das três posições da SNc (5  $\mu\text{L}$ ).

FIGURA 5. DESENHOS ESQUEMÁTICOS INDICANDO O LOCAL DAS INFUSÕES DE SALINA OU DAS TOXINAS



(A): vista lateral, indicando o posicionamento das estruturas lesadas, no sentido antero-posterior. (B): cortes no plano frontal, indicando o posicionamento lateral e dorso-ventral das posições. FPM: feixe prosencefálico medial; SNc: substância negra pars compacta; L: lateral, C: central e M: medial.

FONTE: Atlas PAXINOS e WATSON, (2005).

### 3.4.2. Comportamento rotatório

Uma semana após a cirurgia, os animais foram submetidos ao teste de rotação por apomorfina, conforme descrito no item 3.3.2. Um grupo de 10 animais

que não sofreram cirurgia foi submetido ao mesmo teste para comparação com o grupo Sham.

### **3.4.3. Preparo das amostras para neuroquímica e imunoistoquímica**

Após a remoção dos encéfalos, os mesencéfalos foram armazenados em formol e posteriormente submetidos aos ensaios de imunoistoquímica, conforme item 3.3.3. Da região anterior, os estriados foram imediatamente removidos com auxílio de pinças curvas e individualmente acondicionados em tubos de microcentrifuga (Eppendorf) de 1,5 mL para os ensaios neuroquímicos por HPLC-EC. As concentrações de dopamina, serotonina e de seus metabólitos (DOPAC, HVA e HIAA) foram expressos em ng/g de tecido.

## **3.5. TOPOGRAFIA DA LESÃO NA VIA NIGROESTRIATAL POR MPTP**

Para mapear a topografia da lesão dopaminérgica por MPTP nos modelos, foram realizadas infusões dessa toxina em diferentes pontos da SNc. Posteriormente, o estriado foi dividido em regiões para se delimitar e mapear as regiões estriatais mais afetadas.

### **3.5.1. Cirurgia**

Os ratos foram anestesiados com equitesin i.p. na dose de 0,3 mL/ 100g e foram divididos em três grupos: Medial (N=12), Central (N=12) e Lateral (N=12); de acordo com a região da SNc lesada.

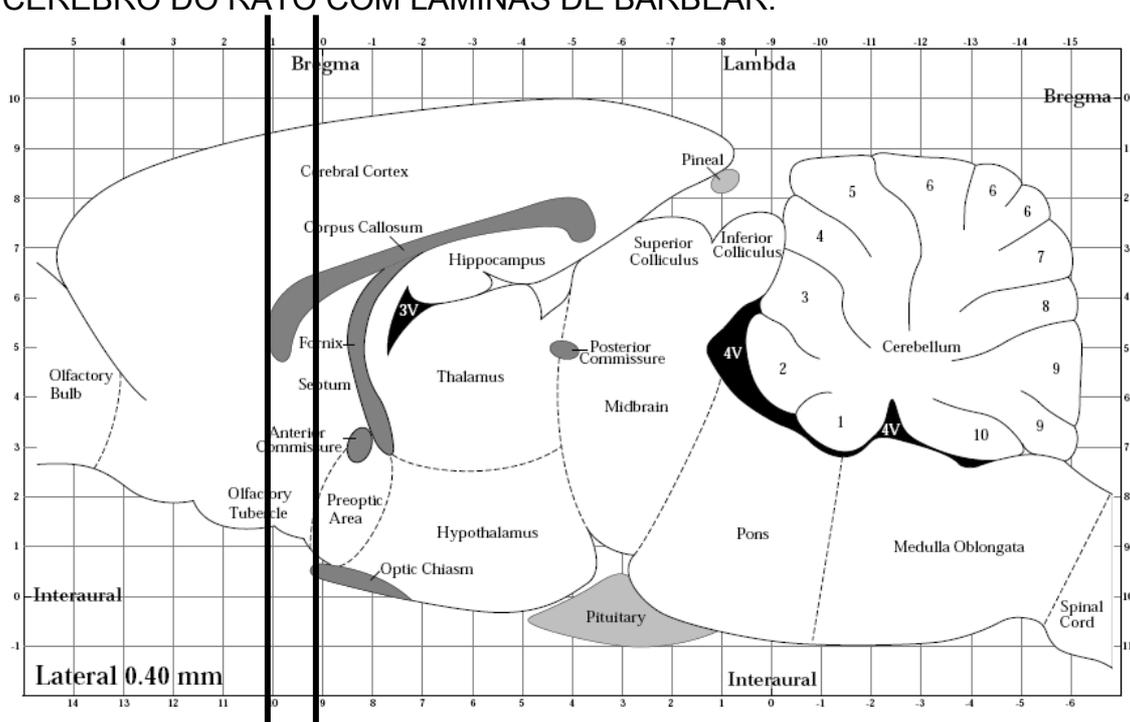
Em cada grupo, 100 µg de MPTP foram unilateralmente infundidos de acordo com as seguintes coordenadas:

- Medial: AP: - 0,60 cm; LL: + 0,11 cm; DV: - 0,86 cm.
- Central: AP: - 0,50 cm; LL: + 0,21 cm; DV: - 0,77 cm.
- Lateral: AP: - 0,61 cm; LL: + 0,26 cm; DV: - 0,73 cm.

### 3.5.2. Preparo das amostras para as análises neuroquímicas

Sete dias após as cirurgias, os encéfalos foram removidos e foram resfriados em béquer com água a 4° C para inativação enzimática. Após um minuto, esses foram retirados do béquer e colocados sobre placas de petri a -20° C por 20 min para enrijecimento. Os cérebros foram fatiados no plano frontal, por duas lâminas de barbear paralelas fixadas em chapas de alumínio, com 1 mm de distância. Essas fatias foram feitas na região do estriado, imediatamente anterior ao quiasma ótico, como esquematizado na figura 6.

FIGURA 6. DESENHO ESQUEMÁTICO INDICANDO A FATIA RETIRADA DO CÉREBRO DO RATO COM LÂMINAS DE BARBEAR.

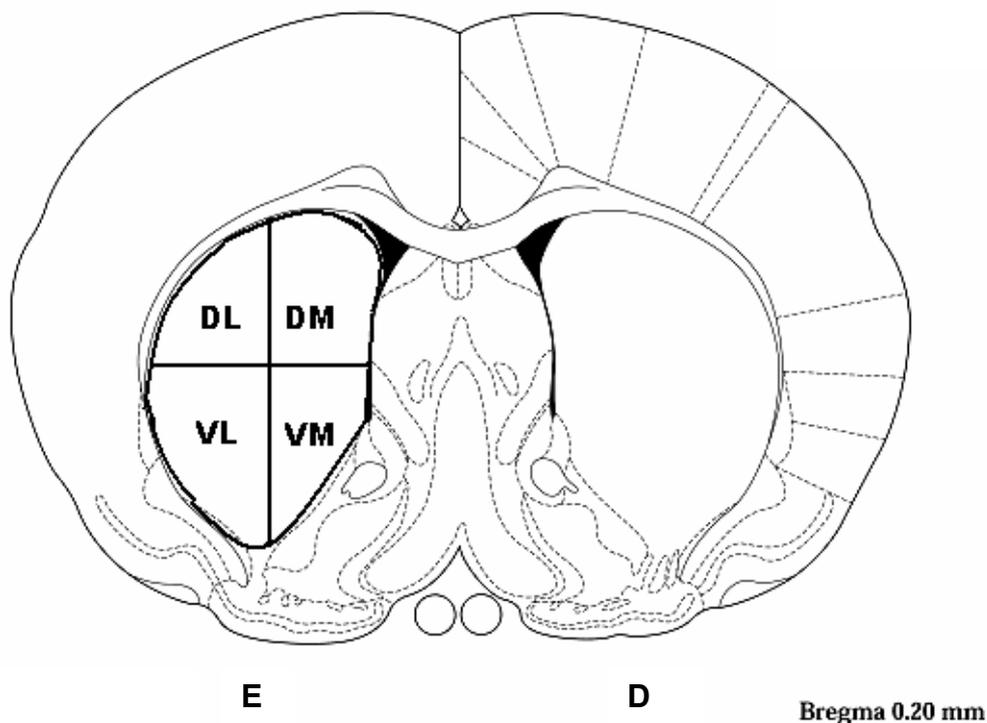


A região retirada com as lâminas está indicada pelas linhas escuras.

FONTE: Atlas Paxinos e Watson (2005).

As fatias foram então colocadas em placa de petri sobre gelo picado e os estriados direito e esquerdo foram cortados com bisturi, de modo a se obter 4 amostras de cada estriado, uma amostra dorso-medial (DM), uma dorso-lateral (DL), uma ventro-medial (VM) e uma ventro-lateral (VL) (figura 7).

FIGURA 7. DESENHO ESQUEMÁTICO INDICANDO O CORTE NO PLANO FRONTAL MOSTRANDO O CORPO ESTRIADO.



O estriado está realçado com linhas mais escuras, com linhas retas dividindo-o em dorso-medial (DM), dorso-lateral (DL), ventro-medial (VM) ventro-lateral (VL). E: lado esquerdo (lesado); D: lado direito (controle).

FONTE: Atlas PAXINOS e WATSON (2005).

As amostras foram acondicionadas individualmente em microtubos de centrífuga de 1,5 mL e armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  até a análise neuroquímica.

As concentrações das monoaminas foram dosadas por HPLC-EC, conforme item 3.3.4. e os resultados foram expressos como porcentagem de depleção em relação ao lado contralateral (controle).

### 3.6. INFUSÃO DE MPTP E 6-OHDA NO NÚCLEO MEDIAL DA RAPE

Para avaliar a toxicidade do MPTP e da 6-OHDA sobre neurônios não dopaminérgicos, ambas as toxinas foram infundidas no núcleo medial da rafe, núcleo com alta concentração de neurônios serotoninérgicos que projeta

neurônios para todo o encéfalo, principalmente ao hipocampo e ao córtex (SIEGEL, 2006).

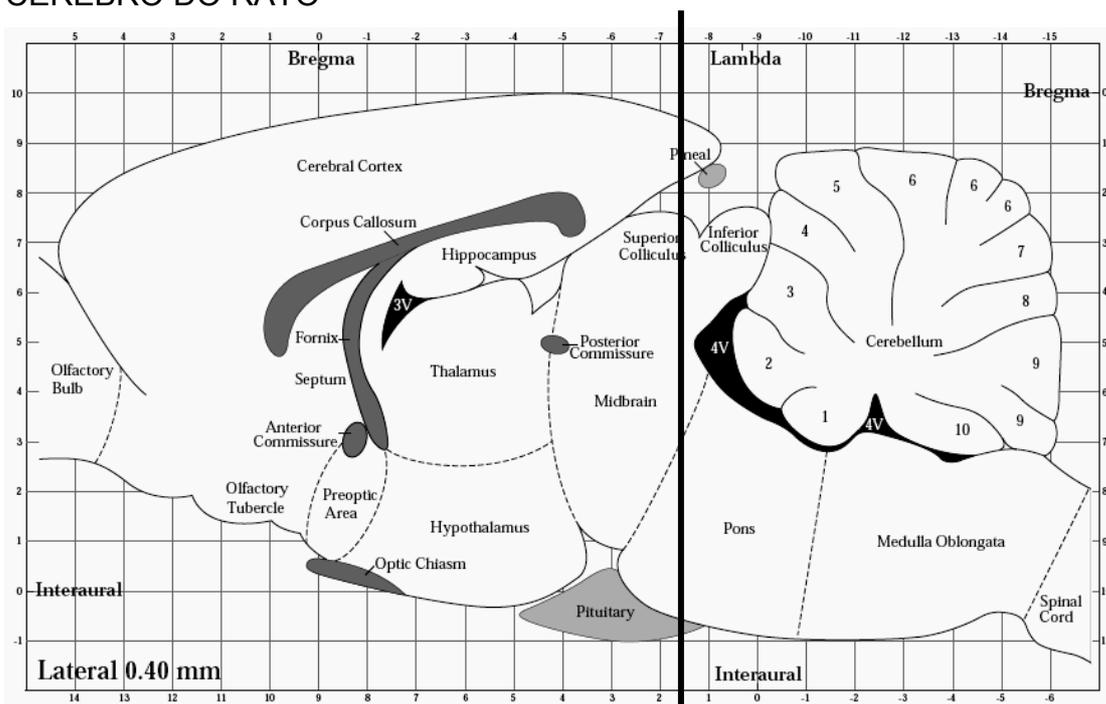
### **3.6.1. Cirurgia**

Os animais foram divididos em grupo Sham (N=6), MPTP (N=5) e 6-OHDA (N=5). Após serem anestesiados com equitesin (0,3 mL/kg) e fixados no estereotáxico, 0,25  $\mu$ L de salina (grupo Sham) ou das toxinas (grupos MPTP 100  $\mu$ g/ $\mu$ L ou 6-OHDA 8  $\mu$ g/ $\mu$ L) foram infundidas no núcleo ventral da rafe, nas seguintes coordenadas:

- AP: 0,16 cm para frente da linha intra-aural (lâmbda)
- LL: 0,27 cm à esquerda da linha média
- DV: 0,84 cm abaixo do crânio

A barra vertical que suporta a agulha de infusão foi inclinada em ângulo de 20° no sentido lateral, para permitir a introdução da agulha sem atingir o aqueduto cerebral, o que difundiria as toxinas por todo o encéfalo (ver Figuras 8 e 9).

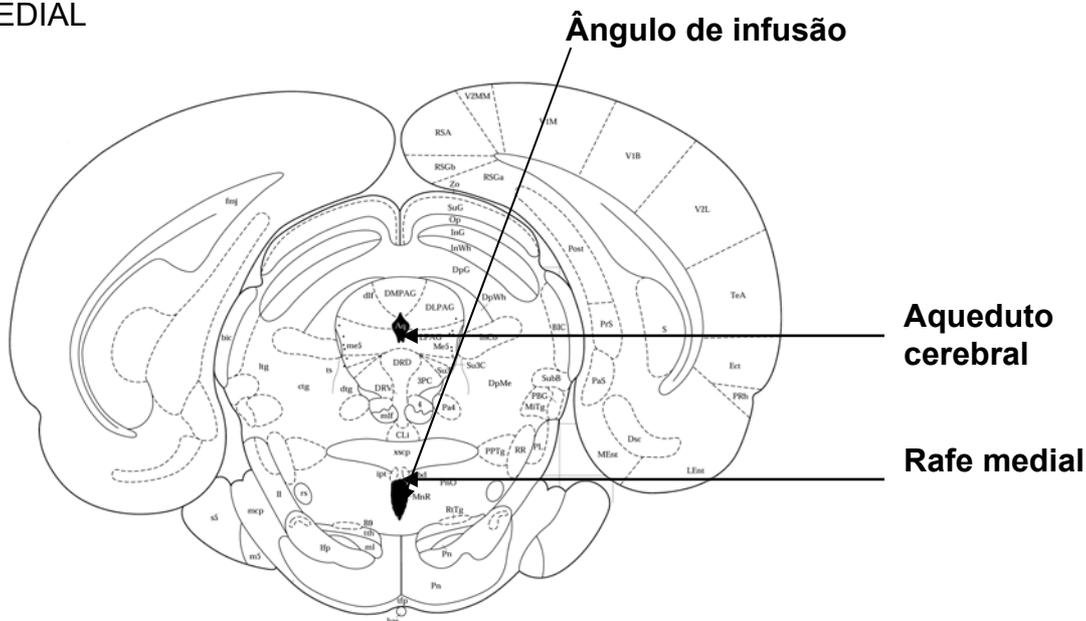
FIGURA 8. DESENHO ESQUEMÁTICO INDICANDO A VISTA LATERAL DO CÉREBRO DO RATO



A barra escura na figura indica a coordenada ântero-posterior do núcleo da rafe onde foram infundidas as toxinas (barra escura).

FONTE: Atlas Paxinos e Watson (2005).

FIGURA 9. DESENHO ESQUEMÁTICO DA INFUSÃO DE TOXINAS NA RAFE MEDIAL



A figura indica a localização do núcleo medial da rafe (cinza escuro), do aqueduto cerebral e do trajeto realizado pela agulha de infusão, com ângulo de 20°.

### **3.6.2. Dissecção e neuroquímica.**

Uma semana depois da cirurgia, os animais foram mortos, seus cérebros foram removidos e imediatamente dissecados com auxílio de pinças curvas e bisturi. Foram dissecados bilateralmente o córtex pré-frontal, o estriado e o hipocampo. As duas amostras de cada estrutura foram armazenadas em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL para análise no HPLC conforme item 3.3.4. As concentrações de dopamina, serotonina e de seus metabólitos (DOPAC, HVA e HIAA) foram expressos em ng/g de tecido, conforme item 3.3.4.

### **3.7. COMPARAÇÃO DA NEUROPROTEÇÃO DA MISTURA KETAMINA/ XILAZINA NOS MODELOS MPTP E 6-OHDA**

Para determinar se a mistura anestésica ketamina/ xilazina (KX) exerce efeito protetor sobre as lesões na SNc; e se esse efeito é influenciado pelas propriedades das toxinas, as lesões por MPTP ou 6-OHDA foram realizadas sob efeito desses anestésicos. Lesões sob anestesia com tiopental sódico (T) foram realizadas para fins de comparação.

#### **3.7.1. Cirurgias**

Para este teste, os ratos foram divididos nos grupos controle (N=10), Sham KX (N=10), MPTP KX (N=15), 6-OHDA KX (N=15), Sham T (N=10), MPTP T (N=15) e 6-OHDA T (N=15).

O grupo controle não foi operado. Os demais grupos receberam infusão bilateral das toxinas no centro das SNc. Os grupos Sham sofreram o mesmo procedimento cirúrgico, mas receberam infusão de solução salina. Os animais dos grupos KX foram operados sob anestesia com a mistura ketamina 85 mg/kg/ xilazina 3 mg/kg i.p. Os animais dos grupos T foram operados sob anestesia com tiopental sódico 40mg/kg i.p.

As coordenadas utilizadas para lesar a SNc central foram:

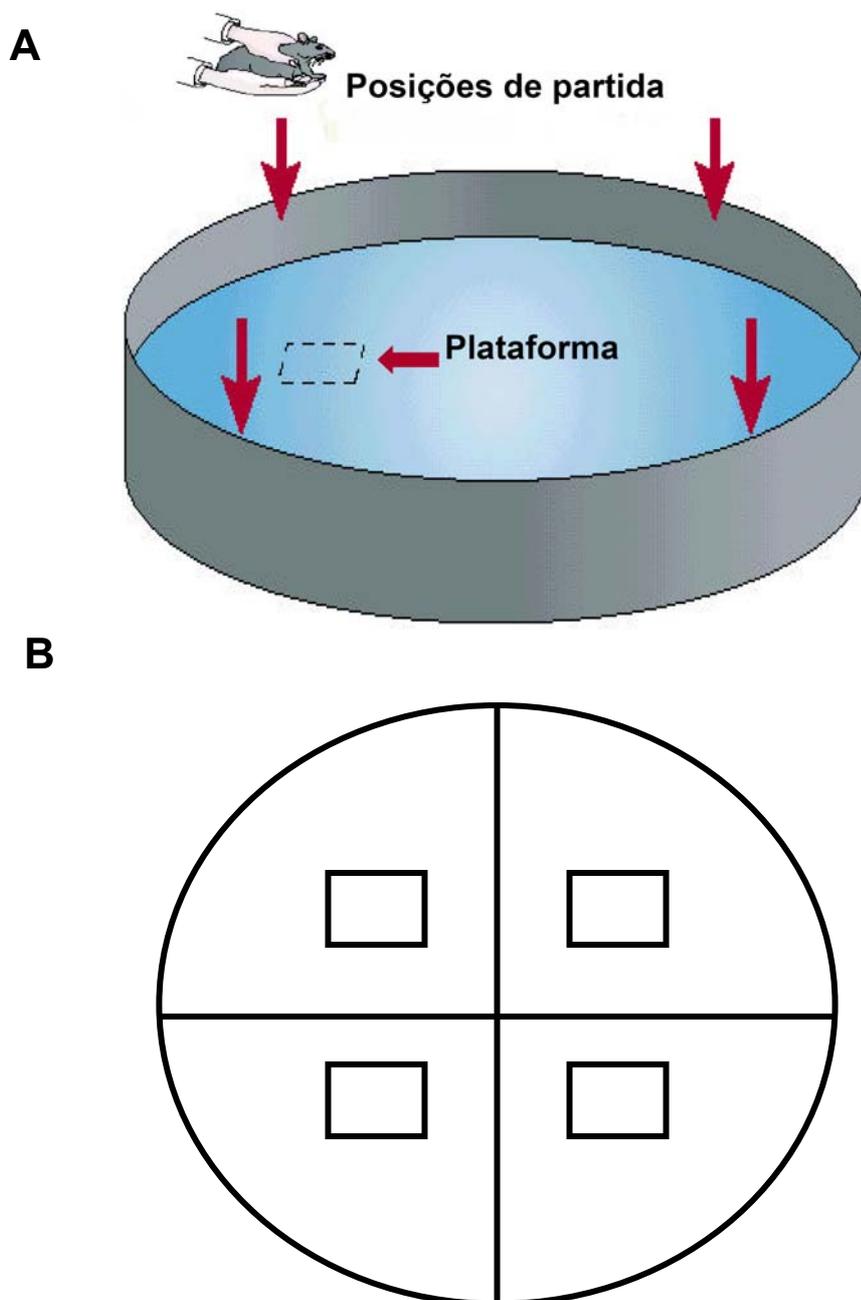
- Antero-posterior: 5,0 mm para trás do bregma.
- Látero-lateral: 2,1 mm para os dois lados da linha média.
- Dorso-ventral: 7,7 mm abaixo do crânio.

### **3.7.2. Teste de memória no Labirinto Aquático de Morris**

O efeito da lesão da SNc ratos sobre o seu comportamento de aprendizado de tarefas estímulo-resposta e de memória de trabalho é bastante conhecido (MIYOSHI et al., 2002). Assim, os testes que avaliam estes tipos de memória são úteis na mensuração da lesão induzida pelas toxinas nos animais.

O teste de memória utilizado neste trabalho é uma das versões do Labirinto Aquático de Morris. Conforme demonstrado na figura 10, o labirinto consiste de um tanque circular preto, de 1,5 m de diâmetro e 50 cm de altura, preenchido com água. No centro de cada um dos quadrantes, existe encaixe para uma plataforma retangular de acrílico transparente, com 15 cm de comprimento, que quando instalada, fica a 2 cm abaixo do nível da água, invisível para o rato. Ao redor do tanque existem figuras geométricas fixadas para facilitar ao animal sua orientação espacial.

FIGURA 10. DESENHO ESQUEMÁTICO DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS.



Desenho esquemático do Labirinto Aquático de Morris. (A) As setas indicam os pontos de partida. A plataforma de escape se encontra a 2 cm de profundidade. (B) vista aérea indicando as posições das plataformas.

Os animais foram liberados para nadar livremente na piscina, de posições pré-determinadas, quatro vezes por dia. Cada vez que o animal encontrava a plataforma, permanecia sobre ela por 30 segundos e era removido para ser imediatamente liberado de uma posição diferente. Caso o animal não encontrasse

a plataforma num tempo máximo de 60 segundos, era gentilmente conduzido até esta pelo experimentador.

Para verificar o efeito das lesões sobre a capacidade de atenção e aprendizado dos animais, foram avaliados: o tempo que os animais levaram para encontrar as plataformas e a suas velocidades de natação. Os grupos foram submetidos ao teste por cinco dias consecutivos, iniciando no vigésimo primeiro dia após a cirurgia. A cada dia, a plataforma foi transferida para outra posição, para forçar o animal a aprender novamente onde ela se encontrava e lembrar-se pelas próximas três tentativas, usando para isso a memória de trabalho. A latência para encontrar a plataforma submersa foi usada como medida do aprendizado. Os resultados foram apresentados como média de cada tentativa nos cinco dias. Esse aparato vem sendo utilizado com sucesso na determinação de déficits de memória em ratos (DA CUNHA et al., 2001, 2003).

### **3.7.3. Preparo das amostras para análises imunoistoquímica e neuroquímica**

Após o teste de memória, os animais foram guilhotinados. Os mesencéfalos foram analisados por imunoistoquímica para TH, conforme descrito no item 3.3.5. Ambos os estriados foram completamente removidos com auxílio de pinças curvas e acondicionados em tubos de microcentrifuga de 1,5 mL. Posteriormente, foram processados e analisados por HPLC-EC, sendo as concentrações de dopamina e seus metabólitos expressas em ng/ g de tecido, conforme item 3.3.4.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. COMPARAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS ENTRE AS LESÕES COM MPTP E COM 6-OHDA

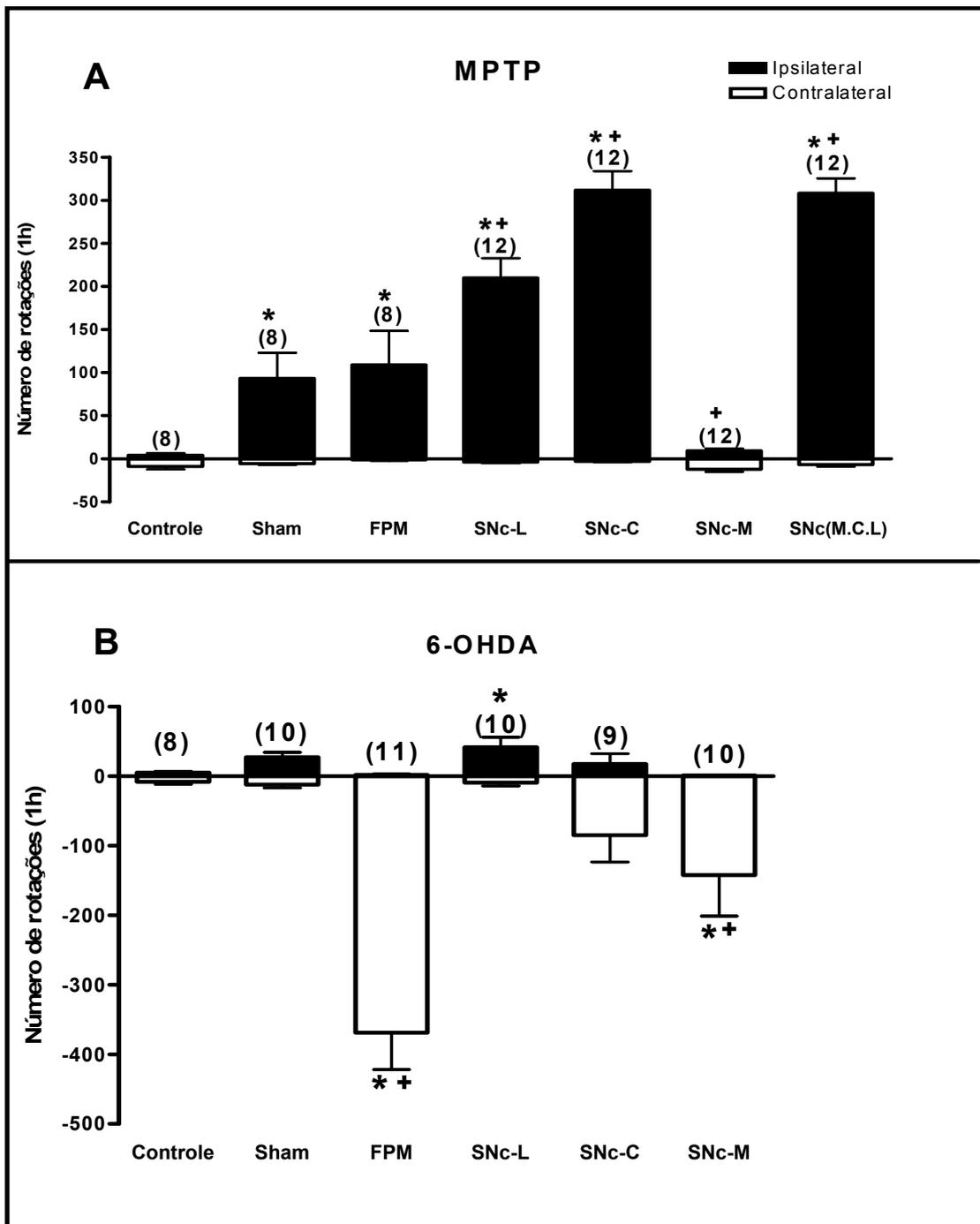
#### 4.1.1. Efeitos sobre o comportamento rotatório

Os efeitos das lesões da via nigroestriatal com 6-OHDA ou MPTP no comportamento rotatório dos ratos estão mostrados nas Figuras 11 e 12. A infusão de salina (grupo Sham) na via nigroestriatal provocou rotações ipsilaterais, comparadas com os grupos controle ( $p < 0,01$ , Newman-Keuls). Conforme pode ser visto na figura 11A, as infusões de MPTP nas regiões central (C), lateral (L) ou medial + central + lateral (MCL) da SNc causaram mais rotações ipsilaterais do que os grupos controle e Sham ( $p < 0,05$ , Neuman-Keuls). Por outro lado, a infusão de MPTP na região medial (M) da SNc causou menos rotações do que o grupo Sham, sendo essas em número similar ao grupo controle. O grupo MPTP FPM não apresentou diferença no número de rotações ipsilaterais em relação ao grupo Sham.

Como pode ser visto na figura 11B, os ratos lesados com 6-OHDA no FPM ou na SNc-M apresentaram comportamento rotatório contralateral diferente dos grupos salina e controle ( $F(5,52) = 14,65$ ,  $p < 0,01$ , ANOVA de uma via, Newman Keuls). Rotações contralaterais também foram observadas na maioria, mas não em todos os animais que receberam 6-OHDA na SNc-C. Entretanto, não houve diferenças significantes entre este grupo ou o que recebeu 6-OHDA na SNc-L quando comparados ao grupo Sham (Newman-Keuls). Ainda, a infusão de 6-OHDA na SNc-L provocou mais rotações ipsilaterais do que o grupo controle, mas não do que o grupo Sham.

Enquanto os animais lesados com MPTP tendem a rodar para o lado onde foi feita a infusão (ipsilateral), os ratos que receberam infusão de 6-OHDA apresentam rotação predominantemente no sentido contrário ao da lesão (contralateral) (Figura 11 B). Além disso, o número de rotações varia de acordo com a localização da infusão da toxina.

FIGURA 11: NÚMERO DE ROTAÇÕES IPSILATERAIS E CONTRALATERAIS AO SÍTIO DE INFUSÃO DE MPTP OU 6-OHDA APÓS DESAFIO COM APOMORFINA.

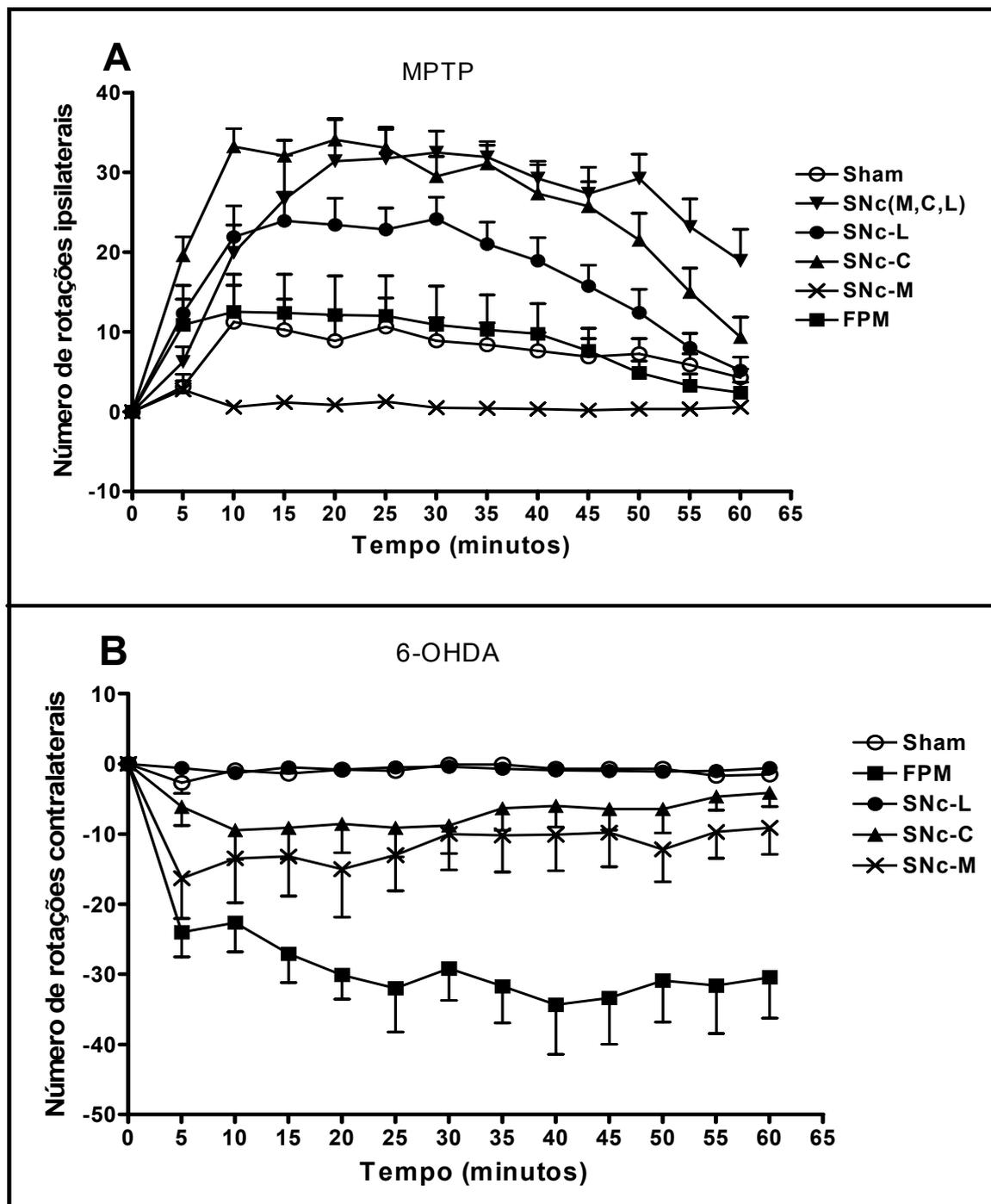


Os dados representam média  $\pm$  EPM do número de rotações ipsilaterais (preto) e contralaterais (branco) em torno do próprio eixo em uma hora de observação. Os animais foram lesados com as respectivas toxinas em diferentes pontos da SNc ou no FPM e desafiados com apomorfina 1 mg/Kg s.c. \* $p < 0,01$  em comparação com o grupo controle. + $P < 0,05$  em comparação com o grupo Sham (ANOVA de duas vias seguida de Neuman-Keuls).

Resultados equivalentes foram encontrados pela comparação da evolução temporal do número de rotações dos mesmos grupos a cada 5 minutos de observação, mostrando a evolução temporal do comportamento (Figura 12). Nos primeiros 40 minutos, o número de rotações dos grupos MPTP SNc-L, SNc-C e SNc-MCL permaneceu constante e diferente dos grupos controle (não mostrado na figura) e Sham (Figura 12A)  $F(6,65) = 37.99$ ,  $p < 0.001$  (ANOVA de duas vias).

As curvas de rotação em função do tempo para os animais lesados com 6-OHDA no FPM e SNc-M foram diferentes das dos animais Sham  $F(5,52) = 13.44$ ,  $p < 0.001$  (ANOVA de duas vias) durante todos os 60 minutos de observação (Figura 12 B).

FIGURA 12. CURVAS DE EVOLUÇÃO TEMPORAL DO NÚMERO DE ROTAÇÕES INDUZIDAS PELA APOMORFINA.



Os dados indicam média  $\pm$  EPM do número de rotações (A): ipsilaterais (MPTP) e (B): contralaterais (6-OHDA) registradas a cada 5 minutos, em uma hora de avaliação.

#### 4.1.2. Efeitos do tamanho da lesão sobre o comportamento rotatório

Os resultados apresentados no item 4.1.1. mostraram que as lesões induzidas pelo MPTP causaram comportamento rotatório ipsilateral ao sítio de lesão ou nenhum comportamento rotatório em resposta à administração de apomorfina. Por outro lado, a 6-OHDA provocou respostas contralaterais, ipsilaterais ou nenhuma, dependendo do local de sua infusão. É possível que as toxinas possuam mecanismos de ação diferentes, e quando infundidas em sítios diferentes, causem efeitos diversos. Para avaliar se o tamanho da lesão influenciou no sentido das rotações, os resultados de imunohistoquímica e de neuroquímica foram agrupados pelo seu comportamento rotatório, independente do local de infusão das toxinas (Fig 13).

A figura 13 representa o número de neurônios imunorreativos a TH analisados por imunohistoquímica e computados na SNc (A e A') e as concentrações de dopamina (B e B') e de seus metabólitos DOPAC (C e C') e HVA (D e D') medidas por HPLC-EC nos estriados de todos os animais lesados com 6-OHDA ou com MPTP. Independente do local onde foi infundida a toxina, os dados foram agrupados representando os animais que não rodaram com o desafio por apomorfina (branco); os animais que rodaram no sentido ipsilateral ao ponto de infusão da toxina (cinza); ou os animais que rodaram no sentido contralateral ao ponto de infusão (preto).

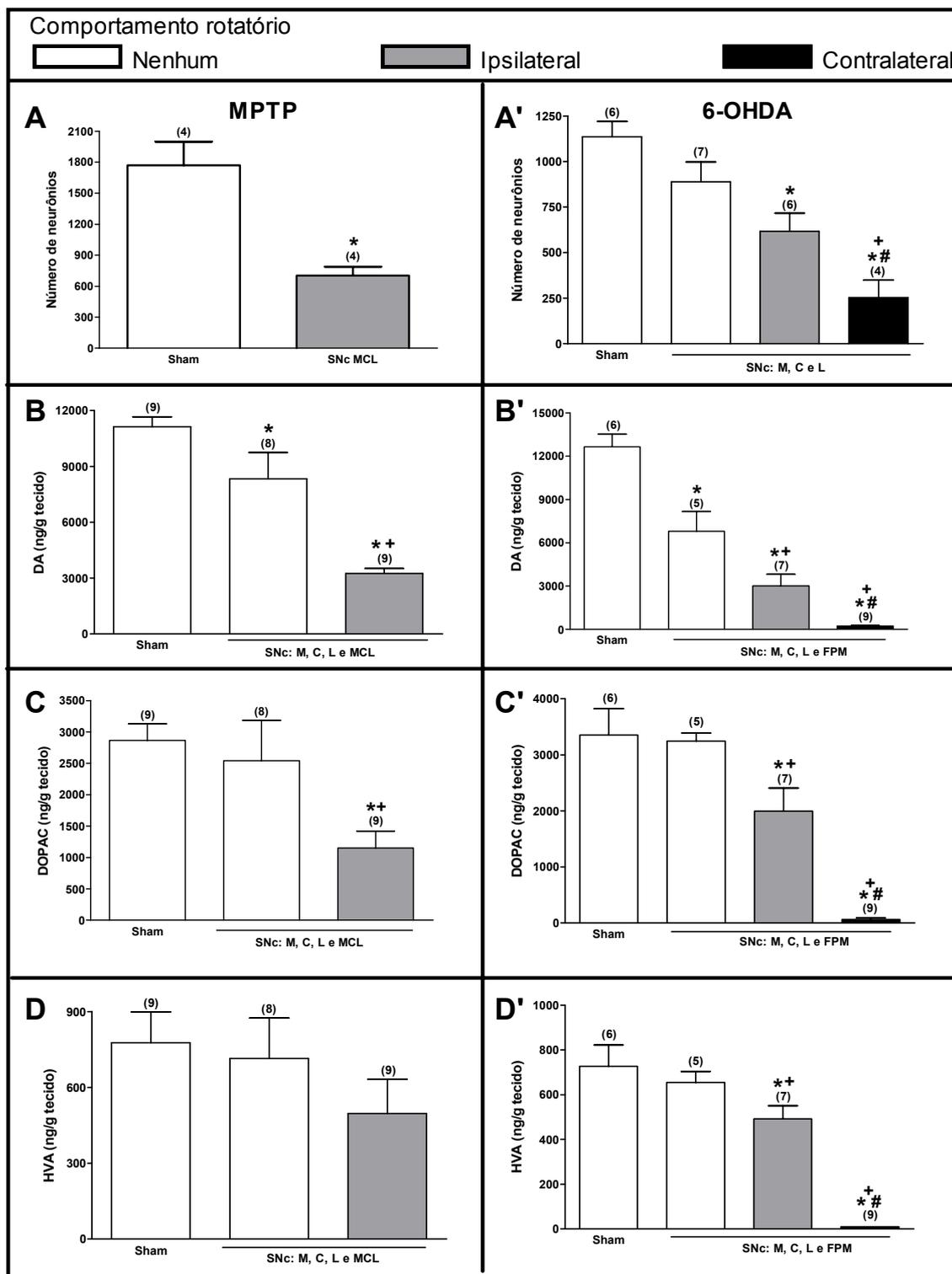
Para comparar a mortalidade de neurônios da SNc (Fig 13 A e A'), foram considerados os grupos de uma infusão de toxina na SNc. Para as comparações neuroquímicas, foram incluídos os ratos lesados na SNc MCL (Fig 13 B, C e D) e os lesados no FPM (B', C', D').

Independente da toxina e do sítio de infusão, grupos com lesões na SNc que não tiveram diminuição significativa no número de neurônios ou na depleção de DA e seus metabólitos apresentaram comportamento rotatório ipsilateral, enquanto lesões que provocaram diminuição de 75% no número de neurônios e depleção de 90% na concentração de dopamina estriatal apresentaram rotações contralaterais.

Houve diferença significativa entre esses grupos tanto na contagem de neurônios quanto da quantificação de dopamina e DOPAC. Imunohistoquímica: Fig A: ( $F(1,6) = 18,93, p < 0,01$ ); Fig A': ( $F(3,19) = 11,89, p < 0,01$ ); Dopamina

MPTP: Fig. 3B:  $F(2,23) = 24,0$ ,  $p < 0,01$ ; Dopamina 6-OHDA: Fig. 3B':  $F(3,23) = 52,45$ ,  $p < 0,01$ ; DOPAC MPTP: Fig. 3C:  $F(2,23) = 5,10$ ,  $p < 0,05$ ; DOPAC 6-OHDA: Fig. 3C':  $F(3,23) = 27,92$ ,  $p < 0,01$ . Diferenças significantes entre os grupos também foram observadas para o HVA 6-OHDA: Fig. 3D':  $F(3,23) = 40,64$ ,  $p < 0,01$ ; mas não no HVA MPTP: Fig. 3D:  $F(2,23) = 1,16$ ,  $p = 0,33$  (ANOVA seguida de Newman-Keuls).

FIGURA 13. COMPORTAMENTO ROTATÓRIO EM FUNÇÃO DA INTENSIDADE DA LESÃO NIGROESTRIATAL

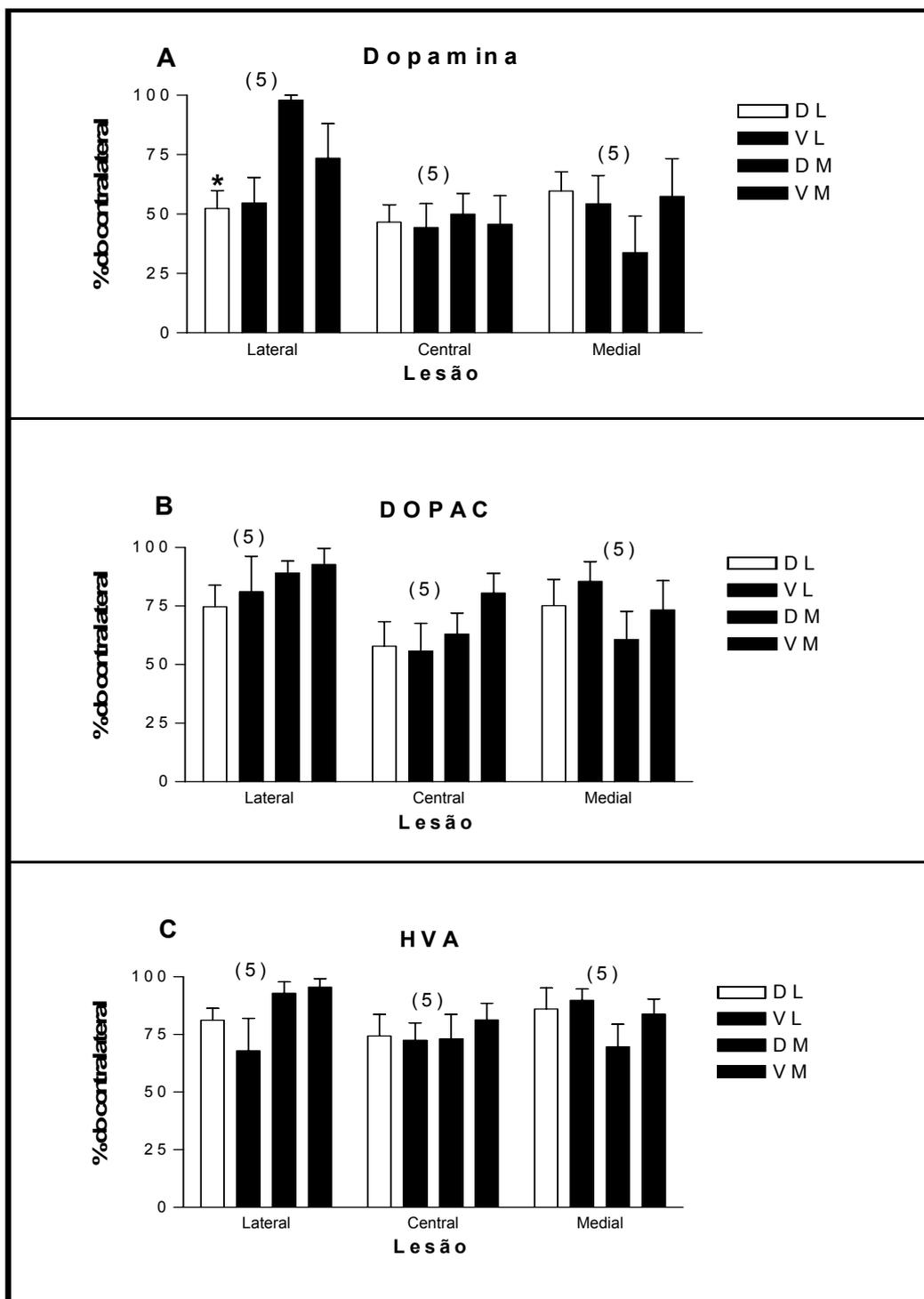


Os dados representam média  $\pm$  EPM do número de neurônios imunorreativos a tirosina hidroxilase (A e A') e da concentração estriatal de dopamina e de seus metabólitos (B, C, D, B', C', D'). \* $p < 0,01$  em relação ao grupo Sham. + $p < 0,05$  em relação ao grupo lesado sem comportamento rotatório. # $p < 0,05$  comparado ao grupo rotação ipsilateral (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).

#### 4.2. TOPOGRAFIA DA LESÃO POR MPTP

Conforme pode ser observado na Figura 14, os ratos lesados com MPTP na SNc central tiveram depleção homogênea de dopamina nas regiões estriatais avaliadas, enquanto os animais lesados na posição medial mostraram maior redução da concentração de dopamina em relação ao lado controle nas regiões estriatais mediais, principalmente na porção dorsal. Da mesma forma, os animais lesados na SNc lateral mostraram menor concentração de dopamina na região dorso-lateral do estriado ( $p < 0,05$ , Duncan). As concentrações dos metabólitos DOPAC e HVA não apresentaram redução significativa nas regiões avaliadas.

FIGURA 14. CONCENTRAÇÕES DE DOPAMINA, DOPAC E HVA EM DIFERENTES REGIÕES DO ESTRIADO EM RESPOSTA A LESÕES EM DIFERENTES SÍTIOS DA SNC COM MPTP.



Concentração de dopamina (A) e seus metabólitos DOPAC (B) e HVA (C) nas regiões dorso-lateral (DL); ventro-lateral (VL); dorso-medial (DM) e ventro-medial (VM) do estriado, em resposta a lesão da SNC com MPTP nas diferentes posições: lateral, central e medial. As barras indicam média  $\pm$  EPM da porcentagem de substância analisada do lado da SNC lesada em relação ao lado controle. \*p < 0,05 em relação ao grupo DM.

#### 4.3. INFUSÃO DE MPTP E 6-OHDA NO NÚCLEO MEDIAL DA RAFE

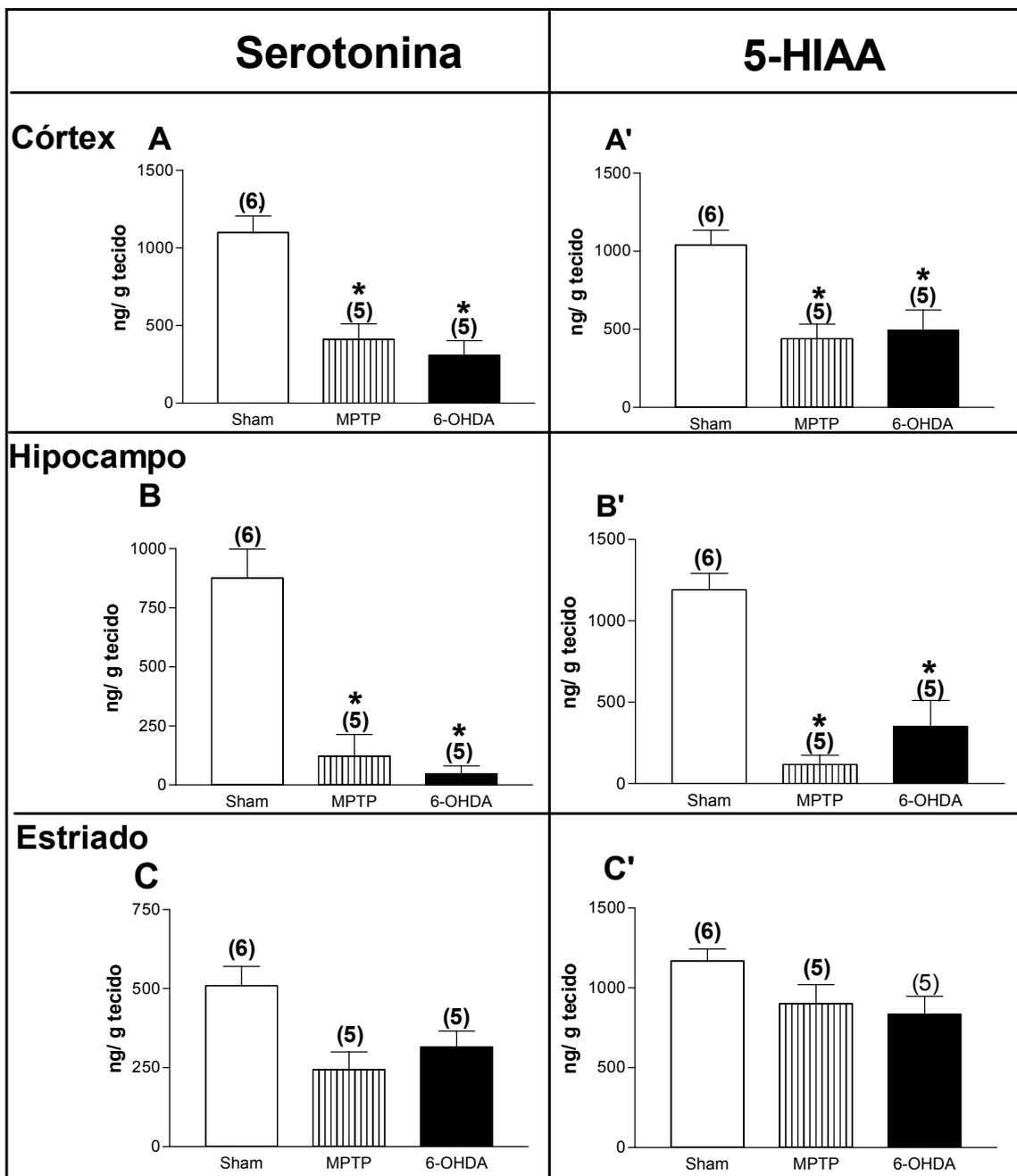
Como pode ser visto na Figura 15, tanto a infusão de MPTP quanto de 6-OHDA no núcleo medial da rafe provocaram redução significativa na concentração de serotonina (15A) ( $F(2,39)= 48,12$ ;  $p<0,01$ , ANOVA de duas vias) e de 5-HIAA (15A') ( $F(2,36)= 34,07$ ;  $p<0,01$ , ANOVA de duas vias) no córtex, quando comparados à concentração das aminas no grupo Sham ( $p< 0,01$ , Newman-Keuls).

Esse efeito foi ainda mais pronunciado no hipocampo (Figuras 15B e B'), aonde a redução da concentração de serotonina chegou a 86% com a infusão de MPTP e a 94% com a lesão por 6-OHDA ( $p< 0,01$ , Neuwman-Keuls).

Tanto no córtex quanto no hipocampo, não houve diferença entre as depleções provocadas pela 6-OHDA comparadas com as provocadas pelo MPTP.

No estriado, não houve redução significativa na concentração de serotonina e HIAA em relação ao grupo Sham (Figuras 15C e C').

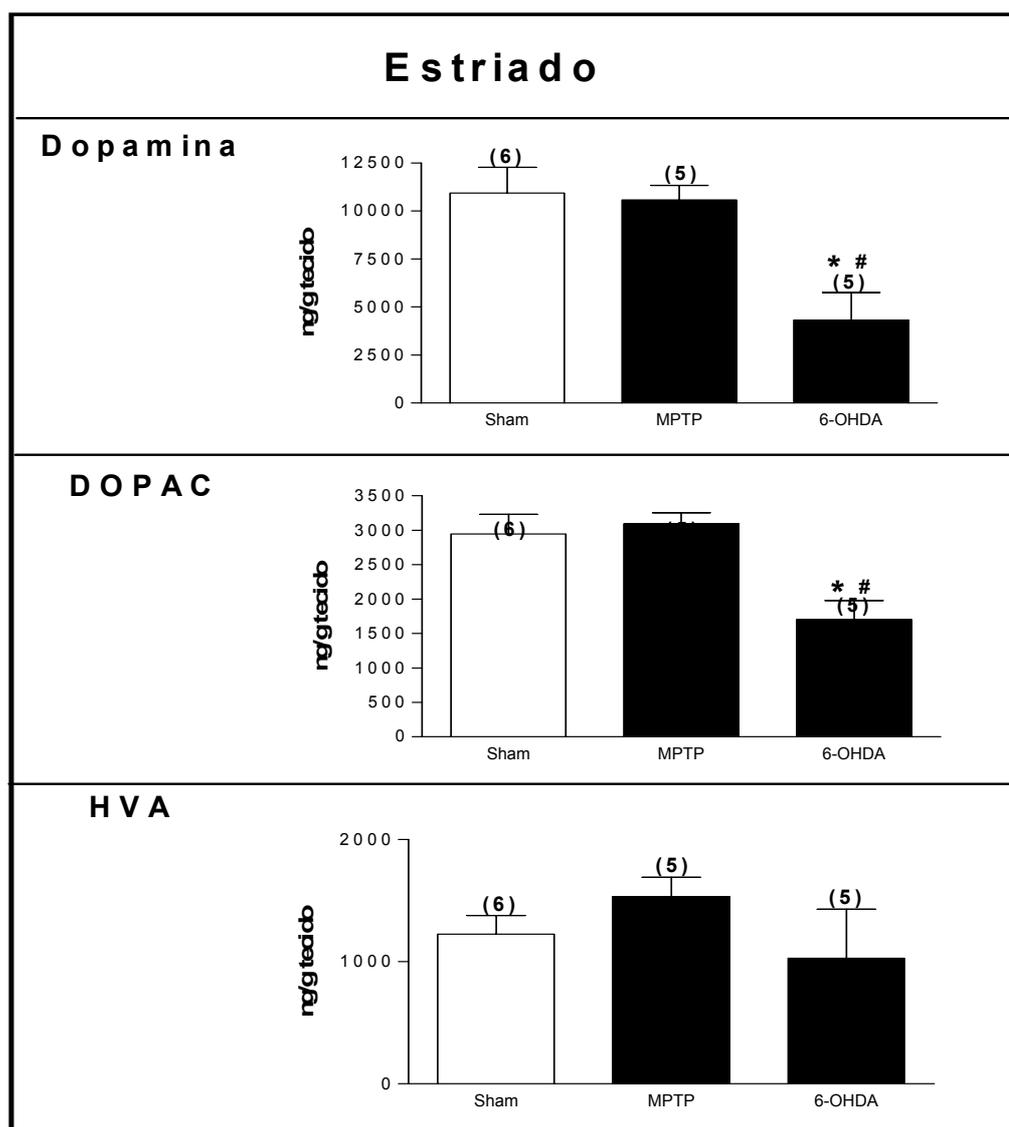
FIGURA 15. DEPLEÇÃO DE SEROTONINA E 5-HIAA NO CÓRTEX, HIPOCAMPO E ESTRIADO DE RATOS QUE RECEBERAM INFUSÃO DE MPTP OU 6-OHDA NO NÚCLEO MEDIAL DA RAFE.



Os dados representam média  $\pm$  EPM das concentrações de serotonina e 5-HIAA. \* $p < 0,01$  em comparação com o grupo Sham (ANOVA de duas vias seguida de pos-hoc de Newman-Keuls).

A 6-OHDA provocou depleção significativa de dopamina (Figura 16A) ( $F(2,33)= 11,27$ ;  $p < 0,01$ , Newman-Keuls) e DOPAC (Figura 16B) ( $F(2,33)= 2,83$ ;  $p < 0,05$ ) em relação aos grupos Sham e MPTP, sendo que a concentração de HVA (Figura 16C) não foi significativamente alterada.

FIGURA 16. DEPLEÇÃO DE DOPAMINA, DOPAC E HVA NO ESTRIADO DE RATOS QUE RECEBERAM INFUSÃO DE MPTP OU 6-OHDA NO NÚCLEO MEDIAL DA RAFE.



Concentração de dopamina no estriado de ratos submetidos à infusão de salina, MPTP ou 6-OHDA no núcleo medial da rafe. Dados representam média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,01$  em comparação com o grupo Sham, #  $p < 0,01$  comparado com o grupo MPTP (ANOVA de duas vias seguida de pos-hoc de Newman-Keuls).

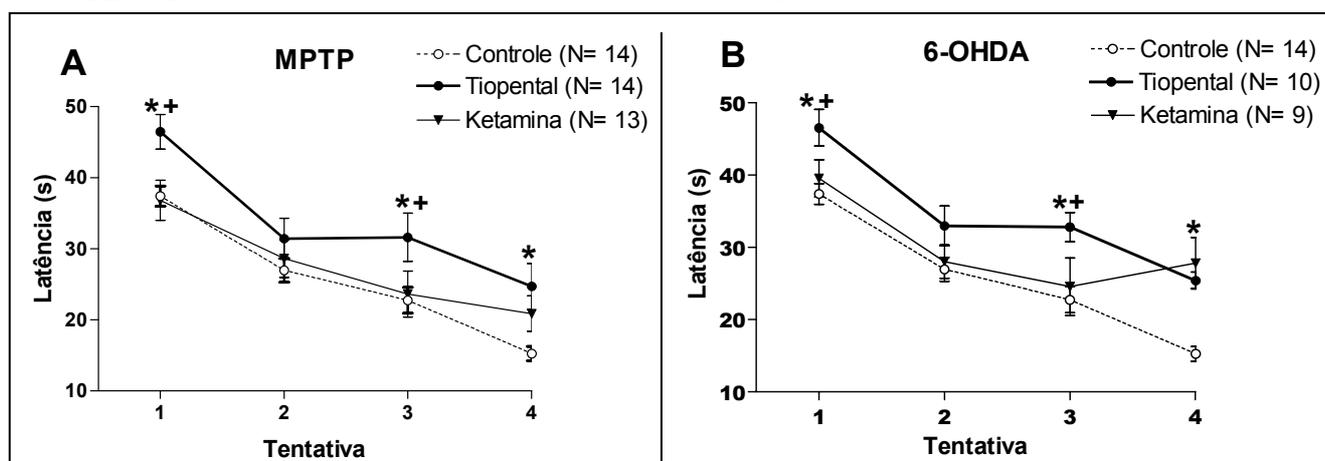
#### 4.4. COMPARAÇÃO DA NEUROPROTEÇÃO DA MISTURA KETAMINA/XILAZINA NOS MODELOS MPTP E 6-OHDA

##### 4.4.1. Comportamento

O efeito neuroprotetor da mistura ketamina/xilazina (KX) foi confirmado pelo teste de memória de trabalho dos animais lesados. Os dados da figura 17 são mostrados em separado (A e B) para facilitar a visualização, mas os dados de todos os grupos foram analisados em conjunto. Como pode ser visto, tanto os animais lesados com MPTP quanto os lesados com 6-OHDA apresentaram piores índices de aprendizado em relação ao grupo controle quando anestesiados com tiopental (T) ( $F(4,71) = 5.13$ ,  $P \leq 0.001$ , ANOVA de duas vias;  $P \leq 0.05$  Newman-Keuls).

Por outro lado, os ratos anestesiados com KX apresentaram escores de aprendizado similares aos dos grupos controle. Ambos os grupos T apresentaram maiores latências e percorreram maiores distâncias de natação para encontrar a plataforma. Não foram encontradas diferenças entre as velocidades médias de natação entre os grupos ( $P > 0.2$ , ANOVA).

FIGURA 17. EFEITO DA ANESTESIA COM KETAMINA/XILAZINA, EM COMPARAÇÃO COM O TIOPENTAL, NO APRENDIZADO DE RATOS LESADOS NA SNC COM MPTP OU COM 6-OHDA.

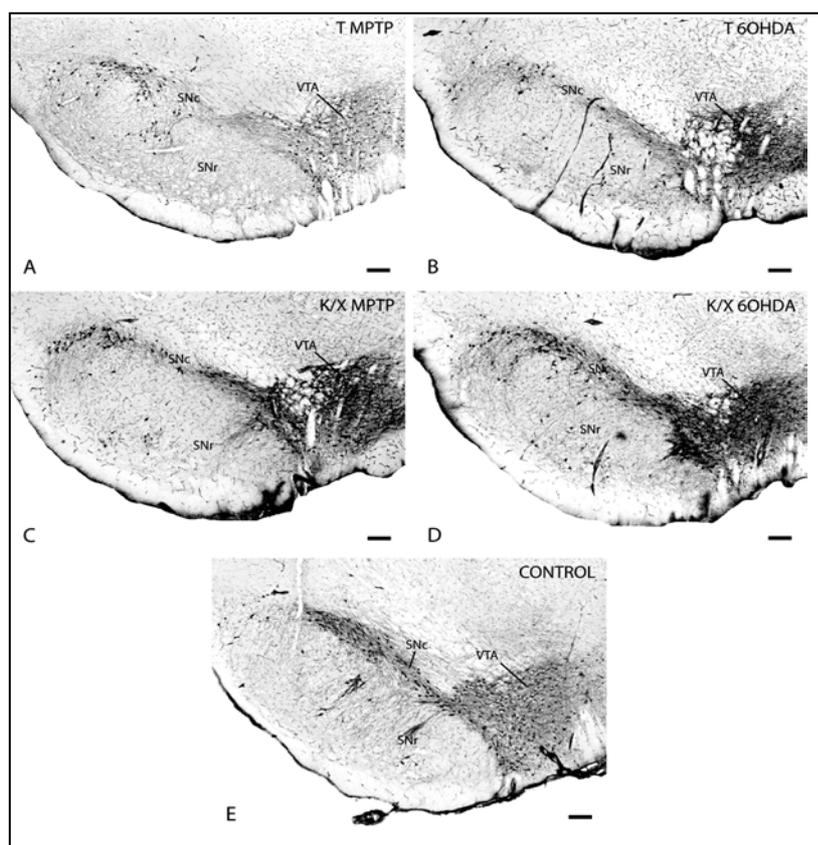


Os dados representam média  $\pm$  EPM da latência (s) de cada tentativa nos 5 dias de teste dos ratos para encontrar a plataforma submersa na versão de memória de trabalho do labirinto aquático de Morris. Em A, animais lesados com MPTP. Em B, animais lesados com 6-OHDA. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle; +  $p < 0,05$  comparado ao grupo KX (ANOVA de duas vias seguido de pós teste de Newman-Keuls).

#### 4.4.2. Imunoistoquímica

Os resultados apresentados nas Figuras 18 e 19 sugerem um efeito neuroprotetor da mistura KX. A infusão perinigral de MPTP ou de 6-OHDA causou redução significativa do número de neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase principalmente na SNc e, de forma mais modesta, na VTA ( $F(4,25) = 22.93$ ,  $P < 0.001$ , ANOVA de uma via). A 6-OHDA causou maior perda celular na SNc quando comparada ao MPTP ( $P < 0.05$ , pos-hoc de Newman-Keuls) quando os animais foram anestesiados com o tiopental. Uma perda menos significativa de neurônios na SNc foi observada quando os animais foram lesados sob anestesia com KX ( $P < 0.05$ , Newman-Keuls).

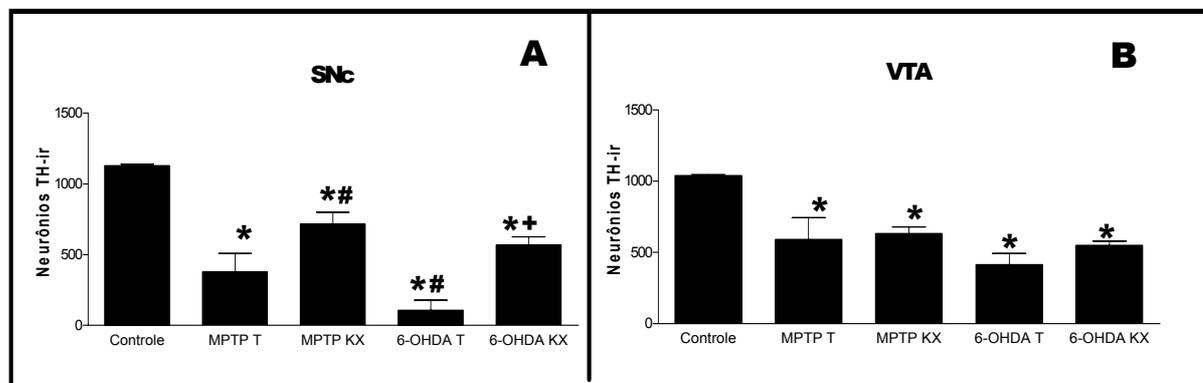
FIGURA 18. MESENCÉFALOS COM CÉLULAS DOPAMINÉRGICAS MARCADAS POR IMUNOISTOQUÍMICA PARA TIROSINA HIDROXILASE.



Fotomicrografias de campo claro de cortes representativos de mesencéfalos dos ratos lesados com MPTP (A e C) ou 6-OHDA (B e D), anestesiados com Ketamina/xilazina (KX) (C e D) ou tiopental (T) (A e B), comparados com um corte de animal controle (E). Pontos escuros

representam células imunorreativas a tirosina-hidroxilase ao longo da SNc e da VTA. Barra de escala = 200  $\mu$ m.

FIGURA 19. CONTAGEM DE NEURÔNIOS MARCADOS POR HISTOQUÍMICA PARA TIROSINA HIDROXILASE NA SNc E NA VTA.



Contagem unilateral de neurônios imunorreativos a tirosina hidroxilase em séries completas através da SNc (A) e da VTA (B). As barras representam média  $\pm$  EPM de cada grupo experimental em 6 animais. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle; + $p < 0,05$  comparado ao grupo 6-OHDA T; # $p < 0,05$  comparado ao grupo MPTP T (ANOVA de uma via seguida de pos teste de Newman-Keuls).

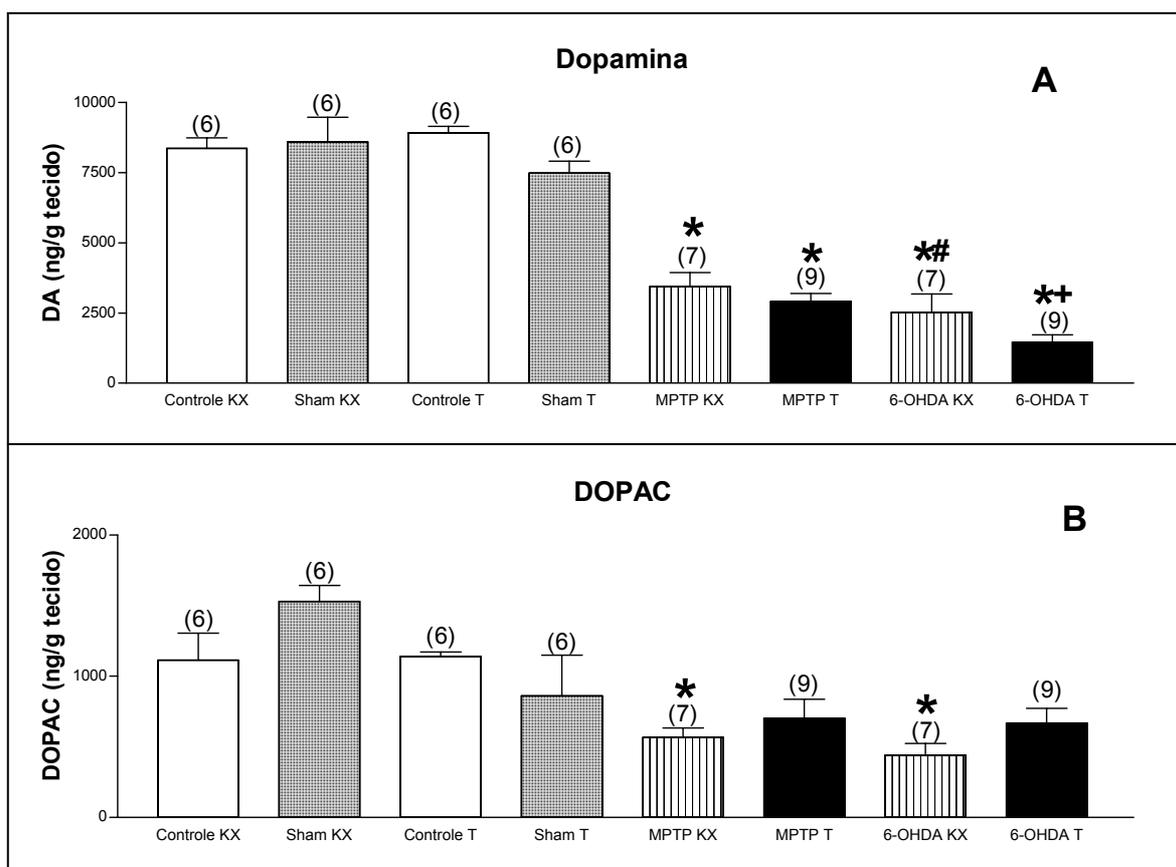
#### 4.4.3. Neuroquímica

A análise da depleção dopaminérgica estriatal também sugere um efeito protetor da mistura KX, na lesão com 6-OHDA. Como pode ser observado nos resultados apresentados na Figura 20, o MPTP e a 6-OHDA causaram redução significativa dos níveis estriatais de dopamina (Fig 20A) nos animais anestesiados com ambas as soluções anestésicas ( $F(4,48) = 83.15$ ,  $P < 0.001$ , ANOVA de uma via;  $P < 0.001$ , Newman-Keuls); enquanto a redução de DOPAC (Fig 20B) foi significativa nos grupos anestesiados com K/X ( $F(4,48) = 12.48$ ,  $P < 0.001$ , ANOVA de uma via;  $P < 0.001$ , Newman-Keuls).

A 6-OHDA foi mais efetiva do que o MPTP em reduzir os níveis de dopamina nos animais anestesiados com tiopental ( $P < 0.05$ , Newman-Keuls), mas não houve diferença significativa entre os grupos MPTP e 6-OHDA quando os animais foram lesados sob anestesia com KX ( $P = 0.21$ , Newman-Keuls). Uma depleção significativamente maior foi observada na depleção de dopamina

causada no grupo 6-OHDA T, comparada ao grupo 6-OHDA KX ( $P < 0.05$ , Newman-Keuls). Entretanto, diferença similar não foi observada entre a depleção de dopamina nos grupos lesados com MPTP KX e MPTP T ( $P = 0.33$ , Newman-Keuls).

FIGURA 20. CONCENTRAÇÕES ESTRIATAIS DE DOPAMINA E DOPAC NOS ESTRIADOS DE RATOS LESADOS COM MPTP OU 6-OHDA SOB ANESTESIA COM TIOPENTAL OU KETAMINA/XILAZINA



Concentrações estriatais de dopamina (A) e DOPAC (B) em cérebros de ratos lesados com MPTP ou 6-OHDA, sob anestesia com tiopental (T) ou ketamina/xilazina (KX). Dois grupos operados com infusão de salina (Sham) são mostrados para comparação. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle; #  $p < 0,05$  comparado ao grupo 6-OHDA T; +  $p < 0,05$  comparado ao grupo MPTP T (ANOVA de uma via seguida de pós teste de Newman-Keuls).

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. COMPARAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS ENTRE AS LESÕES COM MPTP E COM 6-OHDA

Os resultados dos testes de rotação, neuroquímica e imunoistoquímica realizados nesse experimento sugerem que a intensidade da lesão, ou a quantidade de morte neuronal, é o principal determinante do aparecimento e do sentido das rotações induzidas pela apomorfina, e não o sítio de infusão da toxina.

Quando se avaliam os resultados de lesão com uma única toxina (Fig 11), o sítio de infusão parece ser determinante, mas a infusão de outra toxina no mesmo sítio causa respostas diferentes, dificultando a correta previsão do padrão que será seguido pelo animal.

De acordo com os pontos de infusão nas cirurgias e as análises histológicas, pode-se dizer que a área atingida pela infusão de MPTP nas três posições e de 6-OHDA no FPM foi similar. Porém o número de neurônios mortos pelo MPTP foi menor (Fig 13A). Isso indica menor potência do MPTP em lesar o neurônio, confirmando os estudos que mostram que o rato é mais resistente ao MPTP do que à 6-OHDA (GIOVANNI et al., 1994; BLUM et al., 2001).

As diferentes respostas das toxinas quando infundidas em um mesmo ponto sugerem que, além da potência, o mecanismo de lesão das toxinas também pode ser diferente. Em caso de mecanismos similares, mas potência menor, a infusão de MPTP causaria comportamentos rotatórios similares mas com menor intensidade, ou ainda comportamentos opostos. Porém, a infusão de MPTP na SNC medial (Fig 11A) não causou rotações significantes (menos do que a infusão de salina nas três posições), enquanto a infusão de 6-OHDA na mesma posição foi a que causou maior número de rotações contralaterais, depois da lesão no FPM (Fig 11B). Inversamente, a infusão de MPTP na SNc (Fig 11A) lateral causou grande número de rotações ipsilaterais, enquanto a 6-OHDA na mesma posição provocou menor número de rotações também ipsilaterais. Ainda, a infusão de MPTP no FPM não foi diferente da infusão de salina na SNc MCL (Sham). Esses resultados indicam que devem existir diferenças entre a forma de captação dessas duas toxinas pelos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais e

também entre os mecanismos pelos quais as duas toxinas matam esses neurônios (KONDO et al., 2004). Corroboram com essa hipótese resultados que demonstram que a funcionalidade do captador de dopamina do neurônio é essencial para a toxicidade do MPTP (SMEYENE; JACKSON-LEWIS, 2005), enquanto a 6-OHDA é capaz de gerar espécies reativas de oxigênio do lado de fora da membrana celular e causar o estresse oxidativo mesmo com o bloqueio deste captador (HANROTT et al., 2006). Tais captadores estão presentes em corpos e terminais neuroniais, mas são quase inexistentes ao longo do axônio (SIEGEL, 2006).

A forma utilizada de apresentar os resultados de rotação em relação ao tamanho da lesão (Fig 13) permitiu uma comparação mais esclarecedora dos resultados das duas toxinas. Quando a 6-OHDA é infundida em sítios ricos em fibras dopaminérgicas, causa lesão nos corpos dos neurônios dos quais essas fibras se originaram, como no caso da infusão no FPM, que não possui corpos celulares, apenas fibras (SCHWARTING; HUSTON, 1986). A contagem de neurônios na SNc (Fig 13A') e a quantificação de dopamina no estriado (Fig 13B') indicam que a lesão das células na SNc foi quase total. As fibras dos neurônios que se originam nas posições mediais e centrais da SNc deixam o mesencéfalo passando pela região medial e ventral da SNc, entrando no FPM. Já os neurônios localizados em posições mais laterais da SNc projetam fibras lateralmente ao mesencéfalo, não fazem parte do FPM (FALLON; LOUGHLIN, 1985). Assim, quanto mais medial e ventral o sítio de infusão da 6-OHDA, maior o número de neurônios que a toxina lesa (REDGRAVE; MITCHELL, 1982).

Por outro lado, o MPTP não causa lesões grandes quando infundido em sítios ricos em fibras, como o FPM e a SNc medial (Fig 11A). A lesão mais intensa foi produzida quando a infusão foi feita em alta concentração, nos três sítios da SNc (Fig 11A). Mesmo assim, essa lesão foi mais moderada do que a causada pela 6-OHDA no FPM, que foi a única a atingir 90% de morte neuronal e de depleção dopaminérgica no estriado (Figura 13B').

Os dados parecem indicar que o MPTP lesa apenas os neurônios cujo corpo celular esteja exatamente no local onde a toxina é infundida, causando uma lesão mais pontual. Por outro lado, a 6-OHDA parece ser também captada ou

atacar fibras dopaminérgicas, provocando uma lesão retrógrada, atingindo células cujo soma está em outro ponto da via, causando lesão maior.

A diferença de mecanismos de ação também pode ser evidenciada pela diferença nas curvas temporais das rotações (Figura 12). Nos animais 6-OHDA, pode-se perceber que em uma hora de avaliação, os animais lesados com 6-OHDA ainda estão apresentando comportamento rotatório na intensidade máxima. Por outro lado, os animais que receberam infusão de MPTP nas três posições da SNc diminuem significativamente o número de rotações por minuto após 45 minutos da administração de apomorfina.

Dados anteriores do laboratório indicam também que a dose de apomorfina necessária para que os animais MPTP apresentem número de rotações significativas é maior do que a dose para os animais 6-OHDA (WIETZIKOSKI et al., submetido).

## 5.2. TOPOGRAFIA DA LESÃO NIGROESTRIATAL

A diferença encontrada entre as regiões dos estriados analisados em relação ao ponto de infusão do MPTP (Fig. 14) está de acordo com as descrições anatômicas da via estriatal em ratos produzidas com estudos de marcação retrógrada (FALLON; LOUGHLIN, 1985). O método de lesão química usado nesse experimento é um tanto grosseiro para se tentar mapear com exatidão as conexões neuronais. Lesões severas (6-OHDA) causam morte de quase todos os neurônios da SNc, e isto causa depleção de dopamina em todo o estriado (SCHWARTING; HUSTON, 1996). Por outro lado, lesões muito moderadas, como a do MPTP, provocam variabilidade de resultados muito alta, isto pela grande dificuldade em se lesar exatamente a região desejada em todos os ratos do experimento. Este fato pode explicar a ausência e diferenças estatísticas entre os resultados. Ainda, existe uma pequena projeção de axônios de uma SNc para o estriado contralateral, fazendo com que lesões mais leves possam causar aumento da concentração de dopamina no lado controle (GERFEN, 2004). Deve ser considerada também a dificuldade de se reproduzir a lesão em todos os animais operados. A SNc é uma estrutura muito pequena e diferenças de décimos de milímetro em qualquer eixo (dorso-ventral, antero-posterior e látero-lateral) dos

pontos de infusão entre um animal ou em outro podem significar lesões em neurônios com projeções para pontos diferentes.

De uma maneira geral, pode-se sugerir diferenças entre a lesão da SNc medial e lateral (Fig 14 A). Ambas causaram maior depleção de dopamina no estriado medial e lateral, respectivamente, de acordo com estudos anatômicos. Isso mostra que, para a utilização do modelo animal de Doença de Parkinson em ratos, deve-se infundir o MPTP na região central da SNc, visando uma depleção mais homogênea. Outra estratégia seria aumentar a quantidade de toxina infundida por animal, mas isso aumentaria o risco de mortalidade do animal (SCHWARTING et al., 1991, FERRO et al., 2005).

Nos estudos com 6-OHDA, seria mais difícil avaliar o efeito do ponto de lesão, uma vez que a alta potência desta droga mataria todos os neurônios da SNc infundida, não apenas os da região injetada (SCHWARTING; HUSTON, 1996). O MPTP parece ser captado apenas pelo soma do neurônio, lesando apenas o ponto de infusão. Isto permite um controle mais fino do ponto de lesão (DEUMENS et al., 2002).

### 5.3. INFUSÃO DE MPTP E 6-OHDA NO NÚCLEO MEDIAL DA RAPE

Trabalhos anteriores da literatura apontam a 6-OHDA como sendo uma toxina específica para neurônios catecolaminérgicos, e o MPTP apenas para neurônios dopaminérgicos. Essas descrições são baseadas nos trabalhos de infusão das toxinas na via nigroestriatal, que mostram que não há depleção significativa de serotonina ou de noradrenalina no estriado (SCHWARTING; HUSTON, 1996, BLUM et al., 2001, GEVAERD et al., 2001). Porém, os resultados aqui apresentados mostram que, quando infundidas em um núcleo rico em neurônios serotoninérgicos como a rafe medial, ambas foram capazes de lesar esses neurônios, conforme demonstrado pela depleção de serotonina no córtex e no hipocampo (Fig 15).

A infusão de 6-OHDA também provocou redução de dopamina no estriado, o que não aconteceu com os animais lesados com MPTP (Fig. 16). Cerca de 45% dos neurônios da rafe são serotoninérgicos (SIEGEL, 2006). Corpos celulares de neurônios dopaminérgicos já foram identificados tanto na rafe dorsal quanto

medial (TRULSON et al., 1985). Um estudo publicado em 1984 por GUPTA e colaboradores mostra que camundongos tratados com MPTP intravenoso por três dias sofreram lesão dopaminérgica no estriado e redução de células catecolaminérgicas na rafe, mas os neurônios serotoninérgicos da rafe medial e dorsal permaneceram intactos.

Porém, a idéia de que a lesão de neurônios dopaminérgicos na rafe medial possa ter causado a depleção de dopamina no estriado é menos provável, pois o MPTP não causou lesão similar (Fig 16A). De acordo com os dados de lesão na SNc, se a depleção fosse causada pela lesão de corpos celulares de neurônios dopaminérgicos originados na rafe, o MPTP teria efeito depletor de dopamina significativo no estriado, mesmo que em menor escala em relação ao MPTP. Ainda, a rafe medial projeta neurônios serotoninérgicos principalmente para o hipocampo, enquanto a rafe dorsal os projeta com mais intensidade para o estriado (SIEGEL 2006). A depleção hipocampal mais intensa do que a estriatal mostrada nos resultados também está de acordo com esse dado anatômico.

A depleção dopaminérgica no estriado é mais difícil de ser explicada com base na anatomia. A SNc e a VTA estão situadas em uma região rica em fibras e as tentativas de se determinar as conexões aferentes a estas estruturas usando técnicas de traçadores encontram dificuldades. Essas substâncias são facilmente captadas por fibras de passagem e sua condução pode ser interrompida ou desviada por outras fibras e estruturas (FALLON; LOUGHLIN, 1985). Por outro lado, são descritas projeções dopaminérgicas descendentes da VTA para o núcleo medial da rafe, que são moderadas em termos de número de neurônios e quantidade de dopamina, além de projeções da VTA e da rafe medial para a rafe dorsal (KALÉN et al, 1988).

Esses dados, mais os resultados desse trabalho, apóiam a hipótese de que a 6-OHDA pode ser captada por fibras de passagem, e assim lesar neurônios que comunicam a rafe com a SNc e a VTA, matando neurônios dopaminérgicos. Por outro lado, o MPTP possui efeito tóxico em neurônios serotoninérgicos, mas parece lesar apenas os neurônios no local onde foi infundido.

#### 5.4. COMPARAÇÃO DA NEUROPROTEÇÃO DA MISTURA KETAMINA/XILAZINA NOS MODELOS MPTP E 6-OHDA

O efeito protetor da mistura KX foi demonstrado no comportamento de aprendizado (Fig. 17), na avaliação de imunistoquímica para neurônios dopaminérgicos (Fig 18 e 19) e na concentração estriatal de dopamina e metabólitos (Fig 20), de acordo com trabalhos anteriores (DA CUNHA et al., 2003, FERRO et al., 2005). No caso da depleção dopaminérgica estriatal causada pelo MPTP, esse efeito protetor não foi significativo. Como a lesão causada por esta toxina é mais branda do que a por 6-OHDA, é possível que o efeito protetor da mistura KX na lesão do MPTP não tenha ficado evidente como no caso da 6-OHDA.

O bloqueio de receptores NMDA pela ketamina é um mecanismo que explica a proteção deste anestésico sobre a lesão da SNc, como já foi demonstrado em células da SNc em contato com o MPTP ou MPP<sup>+</sup> (TABATABEI et al., 1992, LANGE et al., 1993, ZUDDAS et al., 1992, OSSOWSKA, 1994). Entretanto, existem relatos de que o MK-801, um antagonista NMDA, falhou em proteger ratos e camundongos contra a neurotoxicidade do MPTP (MICHEL; AGID, 1992, SONSALLA et al., 1992, FINIELS-MARLIER et al., 1993). O efeito neuroprotetor observado da ketamina também pode ser mediado por seu efeito agonista D<sub>2</sub>, como no caso de outros agonistas, como o pramipexol, descrito como neuroprotetor contra lesões causadas por MPTP ou por 6-OHDA (SCHAPIRA, 2002). Além disso, em outro mecanismo recentemente descrito para a ketamina, esta pode agir como inibidora da captação de 6-OHDA e como inativador de radicais livres em neurônios dopaminérgicos de ratos (DATLA, 2006).

Este efeito neuroprotetor foi suficiente para reduzir a perda de memória provocada tanto pelo MPTP quanto pela 6-OHDA (Fig. 17). Este aumento no tempo para achar a plataforma no labirinto aquático não é devido a prejuízos motores provocados pelas lesões, uma vez que as velocidades de natação ( $F(4,71) = 0.07$ ,  $P > 0.2$ , ANOVA) e a latência na primeira tentativa do primeiro dia ( $F(4,71) = 0.10$ ,  $P > 0.2$ , ANOVA) são iguais aos do grupo controle.

As intensidades de perda de neurônios dopaminérgicos nigrais e de dopamina no estriado não são similares (Figs. 19 e 20). É possível que as células da SNc tenham aumentado a síntese e/ou a liberação de dopamina no estriado. Durante os primeiros estágios da doença em humanos, as células sobreviventes mantêm a função nigroestriatal em níveis fisiológicos normais. Isto explica porque os pacientes com doença de Parkinson apresentam os sinais motores da doença apenas quando em torno de 75 % desses neurônios morrem (MENESES; TEIVE, 2003).

Déficits cognitivos já foram descritos em modelos de doença de Parkinson em ratos (DA CUNHA et al., 2002, MIYOSHI et al., 2002, HEFCO et al., 2003, BELLISSIMO et al., 2004, FERRO et al., 2005) e em pacientes em estágios anteriores ao agravamento dos sinais motores (REICHMANN et al., 2001).

## 5.5. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O MPTP é um modelo útil para o estudo de drogas com potencial para o desenvolvimento de novos fármacos. Isto porque permite o teste de drogas que podem ser utilizadas em pacientes em estágios iniciais da doença, havendo perspectiva de retardar o avanço da doença e o aparecimento dos sinais motores. Esta toxina se mostrou eficiente em reduzir a concentração de dopamina estriatal como em estudos anteriores (MIYOSHI et al., 2001, Da CUNHA et al., 2002, FERRO et al., 2005). Deve-se considerar que o rato é mais resistente ao MPTP do que a 6-OHDA, mas não totalmente resistente, visto que a depleção dopaminérgica no estriado é menor, mas existe. Isto valida o MPTP como neurotoxina na pesquisa em modelos animais da fase inicial da doença de Parkinson em ratos, onde a lesão mais moderada pode ser desejada, como no caso de estudos comportamentais (GEVAERD et al., 2001, FERRO et al., 2005).

O conhecimento mais detalhado dos mecanismos de ação e das diferenças em potência e especificidade das duas toxinas, 6-OHDA e MPTP, permitem maior refinamento na construção do modelo animal para melhor reproduzir a fase e a característica da doença que se deseja estudar. Fica evidenciado que a 6-OHDA é mais potente e deve ser usada como modelo

quando se deseja lesões mais extensas, enquanto o MPTP é mais restrita menos potente e mais útil para estudos mais localizados.

O modelo de rotação por desafio com drogas é um modelo simples, preditivo e quantitativo do efeito de drogas dopaminérgicas sobre os sintomas da doença de Parkinson. Com isso, o modelo do MPTP pode ser mais sensível do que a 6-OHDA em detectar o efeito de drogas com uso potencial na fase inicial da doença. Essas diferenças podem também ajudar a caracterizar e melhor compreender quais os limiares biológicos que diferenciam cada estágio da doença.

Considerando que o equitesin é a base de tiopental, pode-se interpretar os resultados dos experimentos onde a lesão foi realizada sob a anestesia com essa solução como resultantes da lesão em si, não havendo indícios de falsos-negativos em relação a intensidade de lesão promovida com a toxina.

## 6. CONCLUSÕES

- Ambas as toxinas MPTP e 6-OHDA provocam depleção dopaminérgica no estriado quando infundidas na via nigroestriatal. A 6-OHDA é mais potente em causar a lesão e o faz mesmo quando infundida no feixe procefálico medial, propriedade não observada com o MPTP.
- Assim como na neuroquímica, o número de neurônios lesados pela infusão de 6-OHDA é maior do que o do MPTP. Ainda, quanto mais medial a infusão de 6-OHDA, maior a quantidade de neurônios lesados. Por outro lado, o MPTP lesa especificamente os neurônios com corpo celular no local da infusão.
- O MPTP provoca lesão puntual, o que permite estudar as características fisiológicas de vias neuronais específicas.
- De acordo com o local da infusão, a 6-OHDA causa lesões de tamanho gradual, chegando a mais de 90% de morte celular. Com isso, essa toxina é capaz de provocar rotações contralaterais ao ponto de infusão quando o animal é desafiado com apomorfina. O MPTP, pelo seu mecanismo de lesão, não provoca rotações contralaterais no mesmo modelo, mesmo com infusões múltiplas (MCL).
- A ketamina exerce efeito neuroprotetor significativo na lesão provocada pelo 6-OHDA. A lesão com MPTP parece não ser afetada por este protetor. Isto pode ser um indicativo de que drogas com efeito inibidor do receptor NMDA do glutamato possam ser utilizadas como medicação preventiva para doença de Parkinson, oferecendo proteção contra lesões intensas.
- Tanto o MPTP como a 6-OHDA são capazes de lesar neurônios serotoninérgicos quando infundidos no núcleo dorsal da rafe, fora da via nigroestriatal. A especificidade de lesão desejada em um experimento deve ser atingida com métodos alternativos, como a localização da infusão ou administração de drogas auxiliares durante a infusão.

## REFERÊNCIAS

ABERCROMBIE M. Estimation of nuclear population of microtome sections. **Anat. Rec.**, v. 94, p. 239-247, 1946.

ANNETT, L. E.; WANNERTON, L. A.; WATT, C. A.; THIEMANN, G.; HASENOHRL, R. U. Behavioral responses directed into contralateral compared with ipsilateral space spare dopamine in the striatum following a unilateral 6-OHDA lesion of the medial forebrain bundle in rats. **Cell Transplant.**, v. 15, p. 549–550, 2006.

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

BELLISSIMO, M. I.; KOUZMINE, I.; FERRO, M. M.; DE OLIVEIRA, B. H.; CANTERAS, N. S.; DA CUNHA, C. Is the unilateral lesion of the substantia nigra pars compacta sufficient to induce working memory impairment in rats? **Neurobiol. Learn. Mem.**, v. 82, p. 150-158, 2004.

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

BLUM, D.; TORCH, S.; LAMBENG, N.; NISSOU, M. F.; BENABID, A. L.; SADOUL, R.; VERNA, J. M. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. **Prog. Neurobiol.**, v. 65, p. 135-172, 2001.

COSTALL, B.; MARSDEN, C. D.; NAYLOR, R. J.; PYCOCK, C. J. Relationship between striatal and mesolimbic dopamine dysfunction and nature of circling responses following 6-hydroxydopamine and electrolytic lesions of ascending dopamine systems of rat-brain. **Brain Res.**, v. 118, p. 87–113, 1976.

DA CUNHA, C.; ANGELLUCCI, M. E. M.; CANTERAS, N. S.; WONNACOTT, S.; TAKAHASHI, R. N. The lesion of the rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons as a model for Parkinson's disease memory disabilities. **Cell Mol. Neurobiol.**, v. 22, p. 227–237, 2002.

DA CUNHA, C.; WIETZIKOSKI, S.; WIETZIKOSKI, E. C.; MIYOSHI, E.; FERRO, M. M.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; CANTERAS, N. Evidence for the substantia nigra pars compacta as an essential component of a memory system independent of the hippocampal memory system. **Neurobiol. Learn. Mem.**, v. 79, p. 236-242, 2003.

DA CUNHA, C.; GEVAERD, M. S.; VITAL, M. A. B. F.; MIYOSHI, E.; ANDREATINI, R.; SILVEIRA, R.; TAKAHASHI, R. N.; CANTERAS, N. S. Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's Disease amnesia. **Behav. Brain. Res.**, v. 124, p. 9-18, 2001.

DATLA, K. P.; ZBARSKY, V.; DEXTER, D. T. Effects of anaesthetics on the loss of nigrostriatal dopaminergic neurons by 6-hydroxydopamine in rats. **J. Neural Transm.**, v. 113, p. 583-591, 2006.

DAY, H. E. W.; VITTOZ, N. M.; OATES, M. M.; BADIANI, A.; WATSON JR., S. J.; ROBINSON, T. E.; AKIL H. A 6-Hydroxydopamine lesion of the mesostriatal dopamine system decreases the expression of corticotropin releasing hormone and neurotensin mRNAs in the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis. **Brain Res.**, v. 945, p. 151–159, 2002.

DEUMENS, R.; BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J. Modeling Parkinson's disease in rats: An evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Exp. Neurol.**, v. 175, p. 303-317, 2002.

FALLON, J. F.; LOUGHLIN, S. E. Substantia nigra, in: PAXINOS, G. **The rat nervous system**. Academic press, Australia. 1985. p 353 – 374.

FERRO, M. M.; BELLISSIMO, M. I.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; ANGELLUCCI, M. E.; CANTERAS, N. S.; DA CUNHA, C. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations. **J. Neurosci. Meth.**, v. 148, p. 78-87, 2005.

FINIELS-MARLIER, F.; MARINI, A. M.; WILLIAMS, P.; PAUL, S. M. The N-methyl-D-aspartate antagonist MK-801 fails to protect dopaminergic neurons from 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity *in vitro*. **J. Neurochem.**, v. 60, p. 1968-1971, 1993.

GERFEN, C. R. Basal ganglia. In: PAXINOS, G. **The rat nervous system**. 3<sup>th</sup> edition, Australia: Academic press, 2004. p. 455-508.

GERLACH, M.; RIEDERER, P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. **J. Neural Transm.**, v. 103, p. 987-1041, 1996.

GEVAERD, M. S.; MIYOSHI, E.; SILVEIRA, R.; CANTERAS, N. S.; TAKAHASHI, R. N.; Da CUNHA, C. Levodopa treatment restores the striatal level of dopamine but fails to reverse memory deficits in rats treated with MPTP, an animal model of Parkinson's disease. **Int. J. Neuropsychop.**, v. 4, p. 361-370, 2001.

GEYER, M. A.; MARKOU, A. Animal models of psychiatric disorders. **Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress**. New York, Raven Press, 1995.

GHORAYEB, I.; FERNAGUT, P. O.; HERVIER, L.; LABATTU, B.; BIOULAC, B.; TISON, F. A single toxin-double lesion rat model of striatonigral degeneration by intrastriatal 1-methyl-4-phenylpyridinium ion injection: a motor behavioural analysis. **Neuroscience**, v. 115, p. 533-546, 2002.

GIOVANNI A.; SIEBER, B. A.; HEIKKILA, R. E.; SONSALLA, P. K. Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine Part 1. Systemic administration. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 270, p. 1000-1007, 1994a.

GIOVANNI, A.; SONSALLA, P. K.; HEIKKILA, R. E. Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Part 2. Central administration of 1-methyl-4-phenylpyridinium. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 270, p. 1008-1014, 1994b.

GLINKA, Y.; GASSEN, M.; YODIM, M. B. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. **J. Neural Transm.**, v. 50, p. 55-66, 1997.

GUPTA, M.; FELTEN, D. L.; GASH, D. M. MPTP alters central catecholamine neurons in addition to the nigrostriatal system. **Brain Res. Bull.**, v. 13, p. 737-742, 1984.

HANROTT, K.; GUDMUSSEN, L.; O'NEILL, M. J.; WONNACOTT, S. 6-Hydroxydopamine-induced apoptosis is mediated via extracellular auto-oxidation and caspase 3-dependent activation of PKCdelta. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 5373-5382, 2006.

HARRIK, S. I.; SCHMIDLEY, J. W.; IACOFANO, L. A.; BLUE, P.; ARORA, P. K.; SAYRE, L. M. On the mechanisms underlying 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity: the effect of perinigral infusion of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, its metabolite and their analogs in rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 241, p. 669-676, 1987.

HEFCO V; YAMADA, K; HEFCO, A; HRITCU, L; TIRON, A; NABESHIMA, T. Role of the mesotelencephalic dopamine system in learning and memory processes in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 475, p. 55-60, 2003.

HIRSCHHORN, I. D.; HITTNER, D.; GARDNER, E. L.; CUBELLS, J; MAKMAN, M. H. Evidence for a role of endogenous opioids in the nigrostriatal system - influence of naloxone and morphine on nigrostriatal dopaminergic super-sensitivity. **Brain Res.**, v. 270, p.109-117, 1983.

JASSO-LOPEZ, D.; TAPIA, R. Neurotoxic effect of intranigral injection of 1-methyl-4-phenylpyridinium on GABA-containing neurons and its relation to circling behaviour. **J. Neurochem.**, v. 64, p. 794-801, 1995.

KALÉN, P.; SKAGERBERG, G.; LINDVALL, O. Projections from the ventral tegmental area and mesencephalic raphe to the dorsal raphe nucleus in the rat. **Exp. Brain Res.**, v. 73, p 69-77, 2004.

KANDEL, E. R. **Principles of neural science**. 4<sup>th</sup> edition. London: Appleton & Lange, 2000.

KONDO, J.; KITANURA, Y.; INDEN, M.; TANIGUCHI, T. Hemiparkinsonian rat models: different sensitivity of dopaminergic neurotoxins. **Int. Congr. Ser.**, v. 1260, p. 281-285, 2004.

LANE, E. L.; CHEETHAM, S. C.; JENNE, P. Does contraversive circling in the 6-OHDA-lesioned rat indicate an ability to induce motor complications as well as therapeutic effects in Parkinson's disease? **Exp. Neurol.**, v. 197, p. 284-290, 2006.

LANE, E. L.; CHEETHAM, S. C.; JENNE, P. Dopamine uptake inhibitor-induced rotation in 6-hydroxydopamine-lesioned rats involves both D1 and D2 receptors but is modulated through 5-hydroxytryptamine and noradrenaline receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 312, p. 1124–1131, 2005.

LANGE, K. W.; LOSCHMANN, P. A.; SOFIC, E.; BURG, M.; HOROWSKI, R.; KALVERAM, K. T.; RIEDERER, P. The competitive NMDA antagonist CPP protects substantia nigra neurons from MPTP-induced degeneration in primates. **N-S Arch. Pharmacol.**, V. 348, p 586-592, 1993.

LEE, H.; PARK, C.; KIM, Y. MPP<sup>+</sup> increases the vulnerability to oxidative stress rather than directly mediating oxidative damage in human neuroblastoma cells. **Exp. Neurol.**, v. 165, p. 164–171, 2000.

LEENDERS, K. L.; AQUILONIUS, S. M.; BERGSTROM, K.; BJURLING, P.; CROSSMAN, A. R.; ECKERNAS, S. A.; GEE, A. G.; HARTVIG, P.; LUNDQVIST, H.; LANGSTROM, B. Unilateral MPTP lesion in a rhesus monkey: effects on the striatal dopaminergic system measured in vivo with PET using various novel tracers. *Brain Research*, v. 445, p 61-67, 1998.

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

METZ, G. A.; WHISHAW, I. Q. Drug-induced rotation intensity in unilateral dopamine-depleted rats is not correlated with end point or qualitative measures of forelimb or hindlimb motor performance. **Neuroscience**, v. 3, p. 325-336, 2002.

MICHEL, P. P.; AGID, Y. The glutamate antagonist, MK-801, does not prevent dopaminergic cell death induced by the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>) in rat dissociated mesencephalic cultures. **Brain Res.**, v. 597, p. 233-240, 1992.

MIYOSHI, E.; WIETZIKOSKI, S.; CAMPLESSEI, M.; SILVEIRA, R.; TAKAHASHI, R. N.; DA CUNHA, C. Impaired learning in a spatial working memory version and in a cued version of the water maze in rats with MPTP-induced mesencephalic dopaminergic lesions. **Brain Res. Bull.**, v. 58, p. 41-47, 2002.

MORI, F.; NISHIE, M.; KAKITA, A.; YOSHIMOTO, M.; TAKAHASHI, H.; WAKABAYASHI, K. Relationship among alpha-synuclein accumulation, dopamine synthesis, and neurodegeneration in Parkinson disease substantia nigra. **J. Neuropath. Exp. Neur.**, v. 65, p. 808-815, 2006.

NICOLA, S. M.; SURMEIER, D. T.; MALENKA, R. C. Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 23, p. 185-215, 2000.

OBATA, T. Dopamine efflux by MPTP and hydroxyl radical generation. **J. Neural Transm.**, v. 109, p. 1159-1180, 2002.

OBESO, J. A.; RODRIGUEZ-OROZ, M. C.; RODRÍGUEZ, M.; LANCIEGO, J. L.; ARTIEDA, J.; GONZALO, N.; OLANOW, C. W. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. **Trends Neurosci.**, v. 23, p. s8-s19, 2000.

OLDS, M. E.; JACQUES, D. B.; KOPYOV, O. Relation between rotation in the 6-OHDA lesioned rat and dopamine loss in striatal and substantia nigra subregions. **Synapse**, v. 59, p. 532-544, 2006.

OSSOWSKA, K. The role of excitatory amino acids in experimental models of Parkinson's disease. **J. Neural Transm-Park.**, v. 8, p. 39-71, 1994.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 3<sup>a</sup> ed. San Diego: Academic Press, 2005.

REDGRAVE, P.; MITCHELL, I. Functional validation of projection topography in the nigrostriatal dopamine system. **Neuroscience**, v. 7, p. 885–894, 1982.

REICHMANN, H.; SUMMER, U.; GERLACH, M.; RIEDERER, P. Pharmacotherapy of idiopathic Parkinson's syndrome with special focus on neuroprotection. **Dtsch. Z. Nervenheilkd.**, v. 20, p. 227-310, 2001.

RODRÍGUEZ, M.; BARROSO-CHINEA, P.; ABDALA, P.; OBESO, J.; GONZÁLES-HERNÁNDEZ, T. Dopamine cell degeneration induced by intraventricular administration of 6-hydroxydopamine in rat: similarities with cell loss in Parkinson's Disease. **Exp. Neurol.**, v. 169, p. 163-181, 2001.

SCHAPIRA, A. H. Neuroprotection and dopamine agonists. **Neurology**, v. 58, p. S9-S18, 2002.

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

SCHWARTING, R. K.; BONATZ, A. E.; CAREY, R. J.; HUSTON, J. P.; Relationships between indices of behavioral asymmetries and neurochemical changes following mesencephalic 6-hydroxydopamine injections. **Brain Res.**, v. 554, p. 46–55, 1991.

SIEGEL, G. J. **Basic Neurochemistry**. Molecular, Cellular and Medical Aspects. 7<sup>th</sup> edition. London: ed Elsevier, 2006.

SINDHU, K. M.; BANERJEE, R.; SENTHILKUMAR, K. S.; SARAVANAN, K. S.; RAJU, B. C.; RAO, J. M.; MOHANAKUMAR, K. P. Rats with unilateral median forebrain bundle, but not striatal or nigral, lesions by the neurotoxins MPP<sup>+</sup> or rotenone display differential sensitivity to amphetamine and apomorphine. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 84, p. 321–329, 2006.

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

SONSALLA, P. K.; ZEEVALK, G. D.; MANZINO, L.; GIOVANNI, A.; NICKLAS, W. J. MK-801 fails to protect against the dopaminergic neuropathology produced by systemic 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice or intranigral 1-methyl-4-phenylpyridinium in rats. **J. Neurochem.**, v. 58, p. 1979-1982, 1992.

TABATABAEI, A.; PERRY, T. L.; HANSEN, S.; KRIEGER, C. Partial protective effect of MK-801 on MPTP-induced reduction of striatal dopamine in mice. **Neurosci. Lett.**, v. 141, p. 192-194, 1992.

THAL, L.; MISHRA, R. K.; GARDNER, E. L.; HOROWITZ, S. G.; VARMUZA, S.; MAKMAN, M. H. Dopamine antagonist binding increases in 2 behaviorally distinct striatal denervation syndromes. **Brain Res.**, v. 170, p. 381–386, 1979.

TRULSON, M. E.; CANNON, M. S.; RAESE, J. D. Identification of dopamine-containing cell bodies in the dorsal and median raphe nuclei of the rat brain using tyrosine hydroxylase immunocytochemistry. **Brain Res. Bull.**, v. 15, p. 229-234, 1985.

UNGERSTEDT, U. 6-hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurons. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 5, p.107–110, 1968.

UNGERSTEDT, U. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxydopamine induced degeneration of nigro-striatal dopamine system. **Acta Physiol. Scand.**, v. 367, p. 69–93, 1971.

UNGERSTEDT, U.; ARBUTHNOTT, G. W. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. **Brain Res.**, v. 24, p. 485-493, 1970.

VAGLINI, F.; FASCETTI, F.; TEDESCHI, D.; CAVALLETTI, M.; FORNAI, F.; CORSINI, G. U. Striatal MPP<sup>+</sup> Levels do not Necessarily Correlate with Striatal Dopamine Levels after MPTP Treatment in Mice. **Neurodegeneration**, v. 5, p 129–136, 1996.

WIETZIKOSKI, E. C.; KOUZMINE, I.; GREGORIO M. L.; FERRO, M. M.; SILVEIRA, J. L. M.; CANTERAS, N. S.; VITAL, M. A. B. F. DA CUNHA, C.

Ipsilateral turning behaviour of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-lesioned rats as a model of early-stage Parkinson's disease. **Brit. J. Pharmacol.** Submetido.

YUAN, H.; SARRE, S.; EBINGER, G.; MICHOTTE, Y. Histological, behavioural and neurochemical evaluation of medial forebrain bundle and striatal 6-OHDA lesions as rat models of Parkinson's disease. **J Neurosci. Meth.**, v. 144, p. 35–45, 2005.

ZIGMOND, M. J.; BLOOM, F. E.; LANDIS, S. C.; ROBERTS, J. L.; SQUIRE, L. R. **Fundamental Neuroscience**. San Diego: Academic Press, 1999.

ZUDDAS, A.; OBERTO, G.; VAGLINI, F.; FASCETTI, F.; FORNAI, F.; CORSINI, G. U. MK-801 prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in primates. **J. Neurochem.**, v. 59, p. 733-739, 1992.

## ANEXOS

1. Certificado do comitê de Ética em Pesquisa com Animais do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.
2. Artigo publicado: Ferro, M.M.; Angelucci, M.E.M.; Anselmo-Franci, J.A.; Canteras, N.S.; Da Cunha, C. Neuroprotective effect of ketamine/xylazine on two rat models of Parkinson's disease. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 40, p 89-96, 2007.

MARCELO MACHADO FERRO

CARACTERIZAÇÃO NEUROQUÍMICA E COMPORTAMENTAL DA LESÃO DA  
VIA NIGROESTRIATAL COM 1-METIL-4-FENIL-1,2,3,6-  
TETRAIDROPIRIDINA (MPTP) E 6-HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA) EM  
RATOS

Tese apresentada ao Curso de Pós  
Graduação em Ciências - Bioquímica,  
Setor de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Paraná, como  
requisito parcial para obtenção do título  
de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio da Cunha

Curitiba

2007