

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

JÉSSICA LOPES FONTOURA

**EFEITOS DE BLOQUEADORES DA RECAPTAÇÃO DE
NEUROTRANSMISSORES MONOAMINÉRGICOS NOS SINTOMAS NÃO-
MOTORES DA DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDA POR 6-OHDA EM RATOS**

PONTA GROSSA

2016

JÉSSICA LOPES FONTOURA

**EFEITOS DE BLOQUEADORES DA RECAPTAÇÃO DE
NEUROTRANSMISSORES MONOAMINÉRGICOS NOS SINTOMAS NÃO-
MOTORES DA DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDA POR 6-OHDA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Machado Ferro

PONTA GROSSA

2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

F684 Fontoura, Jéssica Lopes

Efeitos de bloqueadores da recaptação de neurotransmissores monoaminérgicos nos sintomas não-motores da Doença de Parkinson induzida por 6-OHDA em ratos/ Jéssica Lopes Fontoura. Ponta Grossa, 2016.
77f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas - Área de Concentração: Fisiologia e Fisiopatologia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Machado Ferro.

1. Doença de Parkinson, .
2. Neurotransmissores monoaminérgicos.
3. Comportamento. I. Ferro, Marcelo Machado.
II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Ciências Biomédicas.
III. T.

CDD: 616.858



Universidade Estadual
de Ponta Grossa



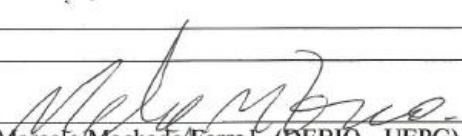
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FISIOLÓGIA E FISIOPATOLOGIA, NÚMERO DA ATA 04/2016, DA MESTRANDA JÉSSICA LOPES FONTOURA REALIZADO NO DIA 25 DE FEVEREIRO DE 2016, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

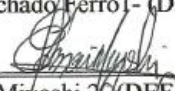
Aos vinte e cinco dias de fevereiro de dois mil e dezesseis, às 14h00min no auditório PPG em odontologia, Bloco M, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em seção pública sob a presidência do **Professor Dr. Marcelo Machado Ferro** reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas da mestranda **Jéssica Lopes Fontoura** na linha de pesquisa; Fisiologia do Sistema Nervoso Central, constituída pelos demais Doutores (membros titulares): **Professor Dr. Edmar Miyoshi (UEPG/PR)** e **Professora Dra. Maria Aparecida Barbato Frasso Vital (UFPR/PR)**. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e a candidata das normas que regem a defesa da dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título da dissertação avaliada foi: **Efeitos de bloqueadores da recapitação de neurotransmissores monoaminérgicos nos sintomas não - motores da doença de Parkinson induzida por 6 - OHDA em ratos**. Encerrada a defesa, e após reunião, a banca comunicou o resultado final da avaliação da dissertação como Aprovada, considerado requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas. A aluna deverá entregar, no prazo estipulado no item 8 da IN 01/2015, referente a defesa de dissertação do programa com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Para a obtenção do título de mestre, a aluna terá até 6 meses, após a data da defesa da sua dissertação, para apresentar ao colegiado a carta de submissão do seu artigo em revista indexada no estrato mínimo B3 dentre os periódicos indicados pela área de Ciências Biológicas II vigente. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

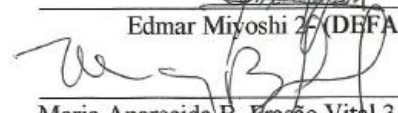
Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____


Marcelo Machado Ferro 1 - (DEBIO - UEPG) - Presidente


Edmar Miyoshi 2 - (DEFAR - UEPG) - Titular


Maria Aparecida B. Frasso Vital 3 - (DEFAR - UFPR) - Titular

Ponta Grossa, 25 de Fevereiro de 2016.

***Dedico este trabalho aos meus pais,
Wilson e Eliana, por não medirem
esforços para que eu chegasse até
aqui, muitas vezes priorizando
minhas necessidades e esquecendo
as suas. Amo vocês!***

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por sempre iluminar meu caminho e por permitir que eu chegasse até aqui.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Marcelo Machado Ferro**, por aceitar me orientar antes mesmo de me conhecer, pela oportunidade, pela paciência, por todos os conhecimentos que dividiu comigo, por estar sempre presente e disposto. Agradeço pela amizade e por me incentivar a continuar no caminho da pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Edmar Miyoshi**, por estar sempre disposto a ajudar. Agradeço a amizade e os conhecimentos compartilhados.

Aos membros da banca, **Prof. Dr. Edmar Myoshi e Profa. Dra. Maria Aparecida Barbato Frazão Vital**, pelo aceite e disponibilidade.

Aos meus pais, **Wilson e Eliana**, partes fundamentais na minha vida, pelo amor e carinho com que me criaram, pela educação que me proporcionaram e incentivo. Agradeço por apoiarem sempre minhas escolhas. Amo vocês!

Aos meus irmãos, **Lucas e Augusto**, meus primeiros amigos, por todo companheirismo. Amo vocês!

A minha avó **Claudete**, por todas as orações nas vésperas de provas e apresentações desde a graduação. Amo você!

Ao meu namorado, **Renan**, meu companheiro nestes últimos 7 anos, pelo amor e carinho e por me dar força para seguir em frente sempre. Agradeço por muitas vezes compreender minha ausência, por todo incentivo e por acreditar em mim. Você foi fundamental! Amo você!

À **Camila Baptista**, minha companheira de laboratório e amiga, pelo auxílio nos experimentos e por tornar os dias de laboratório divertidos. Agradeço por estar sempre disposta a ajudar, pelas risadas e almoços. Sentirei saudades! Espero que em breve possamos dividir o laboratório de novo!

Aos meus companheiros de laboratório, **Flávia e José**, pelo auxílio nos experimentos, pela convivência e disponibilidade.

Às alunas de iniciação científica, Bruna Pobb, Bruna de Oliveira e Larissa, pelo auxílio nos experimentos.

À **MSc.Débora Dalla Vecchia**, pelo auxílio nos experimentos.

À **Caroline Belló**, minha vizinha de laboratório e amiga, por dividir comigo as alegrias e frustrações da pesquisa, por estar sempre disposta a ouvir e ajudar. Agradeço por ser minha companheira em todas as disciplinas, sempre com bom humor, tornando tudo mais leve.

Ao **Prof. Dr. José Carlos Rebuglio Velloso**, pela amizade e pelas palavras de incentivo.

Às minhas amigas **Amanda, Ana Carolina, Isabelle e Vivian**, por todos os anos de amizade, pelos momentos de descontração, por me incentivarem e muitas vezes compreenderem minha ausência.

Às funcionárias do biotério, **Maria e Marilene**, pelo cuidado com os animais utilizados neste estudo. Agradeço por serem tão gentis e estarem sempre dispostas a ajudar.

Aos **Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas** pelas disciplinas ministradas e pela motivação.

Aos **colegas de turma** do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas.

À **Universidade Estadual de Ponta Grossa**, que foi minha segunda casa nos últimos 7 anos.

À **CAPES**, pelo apoio financeiro.

A **todos** aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para que fosse possível a realização deste trabalho, muito obrigada!

*“Sua tarefa é descobrir o seu trabalho e, então, com todo coração,
dedicar-se a ele.”*

Buda

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais frequente relacionada à idade. A depressão e a ansiedade são distúrbios psicológicos comuns em pacientes acometidos pela DP. Na literatura, muito se discute sobre o provável mecanismo que leva a depressão na DP e se está relacionada a outros sintomas psiquiátricos, como ansiedade. Ainda não está claro quais neurotransmissores ou quais vias neurais estão alteradas no desenvolvimento desses sintomas não-motores. Este estudo teve como objetivo testar como o bloqueio de recaptadores de neurotransmissores monoaminérgicos interfere nas alterações comportamentais provocadas pela lesão da via nigroestriatal com 6-OHDA em ratos. Para testar esta hipótese, os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica para infusão de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial (FPM) ou na substância negra (SN). Estes animais foram divididos em grupos, sendo que um recebeu bupropiona (inibidor da recaptação de dopamina), fluoxetina (inibidor da recaptação de serotonina) ou nortriptilina (inibidor da recaptação de noradrenalina), além de um grupo sem inibidores e outro controle, com infusão de salina 0,9% no lugar da 6-OHDA. No 21º dia após a cirurgia, os testes comportamentais tiveram início. A atividade locomotora foi avaliada através do teste de campo aberto e o comportamento tipo depressivo e de ansiedade pelos testes da natação forçada, preferência à sacarose e labirinto em cruz elevado. Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguida de teste post hoc Newman-Keuls. A lesão pela infusão da toxina na SN foi capaz de causar sintomas não-motores da DP, como depressão e ansiedade, sem que houvesse apresentação de prejuízo motor pelos animais, enquanto que a lesão no FPM não causou os mesmos sintomas. Nos animais lesados na SN, a administração de nortriptilina e a de bupropiona foram capazes de reverter o efeito da 6-OHDA no tempo de permanência no braço aberto do labirinto em cruz. Nesses mesmos animais, a bupropiona, a nortriptilina e a fluoxetina foram capazes de reverter os comportamentos de número de entradas no centro e no braço aberto desse labirinto, assim como de evitar a redução do tempo de natação e o aumento do tempo de imobilidade na natação forçada, também causados pela lesão com 6-OHDA. Esses dados indicam que a lesão na SN provoca mais alterações do que a do FPM em ratos, além de demonstrar que essas alterações dependem de efeitos dessa toxina em neurônios dopaminérgicos, noradrenérgicos e serotoninérgicos. Isto então contribui para a caracterização do modelo de alterações comportamentais ligados à lesão nigroestriatal.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, neurotransmissores monoaminérgicos, comportamento.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most common age-related neurodegenerative disease. Depression and anxiety are common psychological disorders in patients suffering from PD. In the literature, there is much discussion about the probable mechanism leading to depression in PD and if it is associated with other psychiatric symptoms such as anxiety. It is still unclear which neurotransmitters and which neural pathways alterations could be related to the development of these non-motor symptoms. This study aimed to test how distinct monoamine neurotransmitters reuptake inhibitors interfere in the behavioral changes caused by damage to the nigrostriatal pathway with 6-OHDA in rats. To test this hypothesis, animals were subjected to stereotaxic surgery for infusion of 6-OHDA into their medial forebrain bundle (MFB) or their substantia nigra compacta (SN). These animals were divided in groups, one receiving bupropion (dopamine uptake blocker), fluoxetine (serotonin uptake blocker) or nortriptylin (noradrenalin uptake blocker), apart from a 6-OHDA with no blockers and a control group, which received 0,9% saline solution instead of 6-OHDA. At day 21 after surgery, behavioral testing started. Locomotor activity was evaluated by the open field test; depressive-like behavior by the forced swimming and the sucrose preference tests; and anxious behavior by the elevated plus maze test. The results were analyzed by one-way ANOVA, followed by post hoc Newman-Keuls post hoc test. The injury provoked by the infusion of the toxin in the SN was able to cause non-motor symptoms of PD, such as depression and anxiety, with no presentation of motor impairment by the animals, while injury in the FPM didn't cause the same symptoms. On the SN lesioned animals, the administration of nortriptyline and bupropion were able to prevent from the 6-OHDA effect on the time spent on the open arm of the elevated plus maze test. On the same animals, bupropion, nortriptyline and fluoxetine were capable of prevent the reduction of the number of entrances to the center and the open arms of the same maze, and the reduction of swimming time and increase of immobility time caused by 6-OHDA on the forced swimming test. These data indicate that the SN lesion causes more behavior alteration than the MFB lesion in rats, also demonstrating that these motor alterations depend on the effect of the toxin on dopaminergic, noradrenergic and serotonergic neurons. This contributes to the characterization of this model of behavioral alterations related to the nigrostriatal lesion.

Key-words: Parkinson's disease, monoamine neurotransmitter, behavior

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
6-OHDA	6-hidroxidopamina
α -syn	alfa-sinucleína
AADC	Aminoácido aromático descarboxilase
ADTs	Antidepressivo tricíclico
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
BHE	Barreira hematoencefálica
COMT	Catecol O-metiltransferase
DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina
DP	Doença de Parkinson
FPM	Feixe prosencefálico medial
G	Gauge
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GPe	Globo pálido externo
GPI	Globo pálido interno
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
i.p.	Intraperitoneal
ISRS	Inibidor seletivo da recaptação de serotonina
L-DOPA	Levodopa

MAO-B	Monoamina oxidase
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
NB	Núcleos da base
NA	Noradrenalina
NET	Transportador de norepinefrina
NST	Núcleo subtalâmico
PET	Tomografia computadorizada por emissão de pósitrons
SNC	Sistema nervosa central
SN	Substância negra
SNpc	Substância negra <i>pars compacta</i>
SNpr	Substância negra <i>pars reticulada</i>
SPECT	Tomografia computadorizada por emissão de fóton único
TGI	Trato gastrointestinal
TH	Tirosina hidroxilase
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
VTA	Área tegmental-ventral

LISTA DE ILUTRAÇÕES

FIGURA 1 – VIA DE SÍNTESE DA DOPAMINA.....	19
FIGURA 2 – MECANISMOS DE AÇÃO DA 6-OHDA.....	33
FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DA NORTRIPTILINA.....	34
FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DA FLUOXETINA.....	35
FIGURA 5 – ESTRUTURA QUÍMICA DA BUPROPIONA.....	36
FIGURA 6 – CRONOGRAMA EXPERIMENTAL DOS ANIMAIS LESADOS NO FPM E SN.....	39
FIGURA 7 – LOCALIZAÇÃO O BREGMA NO CRÂNIO DO RATO.....	40
FIGURA 8 – TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	42
FIGURA 9 – TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA.....	44
GRÁFICO 1 – AMBULAÇÃO NO TESTE DE CAMPO ABERTO NOS ANIMAIS LESADOS NO FPM (A) E NA SN (B).....	46
GRÁFICO 2 – REARING NO TESTE DE CAMPO ABERTO NOS ANIMAIS LESADOS NO FPM (A) E NA SN (B).....	47
GRÁFICO 3 – % DE TEMPO GASTO NO BRAÇO ABERTO NO TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ NOS ANIMAIS LESADOS NO FPM (A) E NA SN (B).....	48
GRÁFICO 4 – NÚMERO DE ENTRADAS NO BRAÇO ABERTO NO TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ NOS ANIMAIS LESADOS NO FPM (A) E NA SN (B).....	49
GRÁFICO 5 – % DE TEMPO GASTO NO BRAÇO FECHADO NO TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ NOS ANIMAIS LESADOS NO FPM (A) E NA SN (B).....	49
GRÁFICO 6 – NÚMERO DE ENTRADAS NO BRAÇO FECHADO NO TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ NOS ANIMAIS LESADOS NO FPM (A) E NA SN (B).....	50
GRÁFICO 7 – % DE TEMPO GASTO NO CENTRO NO TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ NOS ANIMAIS LESADOS NO FPM (A) E NA SN (B).....	50

GRÁFICO 8 – NÚMERO DE ENTRADAS NO CENTRO NO TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ NOS ANIMAIS LESADOS NO FPM (A) E NA SN (B).....	51
GRÁFICO 9 – CONSUMO DE SACAROSE NO TESTE DE PREFERÊNCIA À SACAROSE DOS ANIMAIS LESADOS NO FPM (A) E SN (B).....	52
GRÁFICO 10 – CONSUMO TOTAL DE LÍQUIDOS EM GRAMAS NO TESTE DE PREFERÊNCIA À SACAROSE DOS ANIMAIS LESADOSNO FPM (A) E NA SN (B).....	52
GRÁFICO 11 – TEMPO DE NATAÇÃO NO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA DOS ANIMAIS LESADOS NO FPM (A) E NA SN (B).....	53
GRÁFICO 12 – TEMPO DE IMOBILIDADE NO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA DOS ANIMAIS LESADOS NO FPM (A) E NA SN (B).....	54
GRÁFICO 13 – TEMPO DE ESCALADA NO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA DOS ANIMAIS LESADOS NO FPM (A) E NA SN (B).....	54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1 DOENÇA DE PARKINSON.....	18
3.2 EPIDEMIOLOGIA.....	20
3.3 FISIOPATOLOGIA.....	21
3.4 SINTOMATOLOGIA.....	22
3.4.1 Sintomas motores.....	22
3.4.2 Sintomas não-motores.....	23
3.4.2.1 Depressão.....	23
3.4.2.2 Ansiedade.....	26
3.5 DIAGNÓSTICO.....	27
3.6 TRATAMENTO.....	27
3.7 MODELOS ANIMAIS DE DOENÇA DE PARKINSON.....	30
3.7.1 6-Hidroxidopamina.....	31
3.8 INIBIDORES DA RECAPTAÇÃO DE NEUROTRANSMISORES MONOAMINÉRGICOS.....	33
3.8.1 Nortriptilina.....	34
3.8.2 Fluoxetina.....	35
3.8.3 Bupropiona.....	36
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 ANIMAIS.....	38
4.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....	38

4.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.....	40
4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	41
4.4.1 Teste de campo aberto.....	41
4.4.2 Teste de labirinto em cruz elevado.....	42
4.4.3 Teste de preferência à sacarose.....	43
4.4.4 Teste de natação forçada.....	43
4.5 DISSECÇÃO E ANÁLISE DO MESENCÉFALO.....	44
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
5 RESULTADOS.....	46
5.1 TESTE DO CAMPO ABERTO.....	46
5.2 TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	47
5.3 TESTE DE PREFERÊNCIA À SACAROSE.....	51
5.4 TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA.....	53
6 DISCUSSÃO.....	55
7 CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

James Parkinson descreveu pela primeira vez a (DP) em 1817, em sua monografia “Ensaio sobre a Paralisia agitante” onde relatou os sintomas motores da DP. A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente relacionada à idade, ficando atrás somente da Doença de Alzheimer. É caracterizada por degeneração de neurônios dopaminérgicos que possuem seus corpos celulares localizados na Substância Negra *pars compacta* (SNpc) e os axônios no estriado, formando a via nigroestriatal. A degeneração desses neurônios tem como consequência a redução da concentração do neurotransmissor dopamina (DA) no estriado. O déficit dopaminérgico é responsável pelo aparecimento dos sintomas motores característicos da DP tais como tremor de repouso, rigidez, instabilidade postural e bradicinesia.

Além dos sintomas motores, os pacientes podem apresentar sintomas não-motores como depressão e ansiedade. Esses sintomas afetam de maneira significativa a qualidade de vida desses pacientes, sendo mais prejudiciais que os sintomas motores, mesmo em fases mais avançadas da doença, quando estes já progrediram. O mecanismo que leva a depressão e ansiedade em pacientes com DP permanece incerto. Estudos em pacientes com DP indicam perda de neurônios não-dopaminérgicos, como noradrenérgicos e serotoninérgicos, em diversas estruturas que não compõe a via nigroestriatal. Sugere-se que estas perdas podem estar relacionadas aos sintomas não motores da DP.

Modelos animais de DP têm auxiliado na compreensão da etiologia e mecanismos moleculares envolvidos na doença. Dentre os diversos modelos disponíveis que utilizam neurotoxinas, destacam-se aqueles que provocam lesões irreversíveis como a 6-hidroxidopamina (6-OHDA), já que representam a doença de maneira mais fidedigna, não apresentando recuperação dos neurônios dopaminérgicos. A 6-OHDA apresenta estrutura semelhante à dopamina e causa degeneração dos neurônios dopaminérgicos através da inibição da cadeia de transporte de elétrons e estresse oxidativo. Apesar das limitações do modelo, como o fato de não causar alterações em estruturas olfativas, tronco cerebral ou *locus coeruleus*, ele tem contribuído significativamente para compreensão da DP.

Apesar do tratamento com levodopa, precursor da DA, ser muito útil nos sintomas motores, muitas vezes a utilização de inibidores da recaptação de monoaminas é necessária para o tratamento dos sintomas não-motores da DP. Em sistemas monoaminérgicos, a recaptação do neurotransmissor é o principal mecanismo pelo qual a neurotransmissão é finalizada. Deste modo, o uso de inibidores da recaptação de monoaminas pode aumentar a neurotransmissão pela diminuição da depuração do neurotransmissor da sinapse e prolongar o tempo de permanência do mesmo.

Este trabalho teve como objetivo testar se a injeção intraperitoneal (i.p.) dos bloqueadores da recaptação de neurotransmissores monoaminérgicos nortriptilina, fluoxetina ou bupropiona anterior a injeção de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial (FPM) ou na SNpc interfere nas alterações comportamentais produzidas pela neurotoxina.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Testar se os bloqueadores da recaptação de neurotransmissores monoaminérgicos noradrenalina (nortriptilina), serotonina (fluoxetina) ou dopamina (bupropiona) interferem nas alterações comportamentais provocadas pela a injeção da neurotoxina 6-OHDA no feixe prosencefálico medial ou na substância negra *pars compacta*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Lesar a via nigroestriatal com a infusão da neurotoxina 6-OHDA via cirurgia estereotáxica para obtenção de um modelo animal de Doença de Parkinson.
- Testar como a administração em dose única, anterior à neurotoxina, de inibidores seletivos de recaptação de monoaminas interfere nos efeitos comportamentais, motores e neurotóxicos da droga.
- Avaliar a influência da administração dos bloqueadores de recaptação de dopamina, noradrenalina ou serotonina sobre o desempenho de ratos lesados no feixe prosencefálico medial com 6-OHDA em testes de comportamento depressivo e ansioso.
- Avaliar a influência da administração dos bloqueadores de recaptação de dopamina, noradrenalina ou serotonina sobre o desempenho de ratos lesados na substância negra compacta com 6-OHDA em testes de comportamento depressivo e ansioso.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

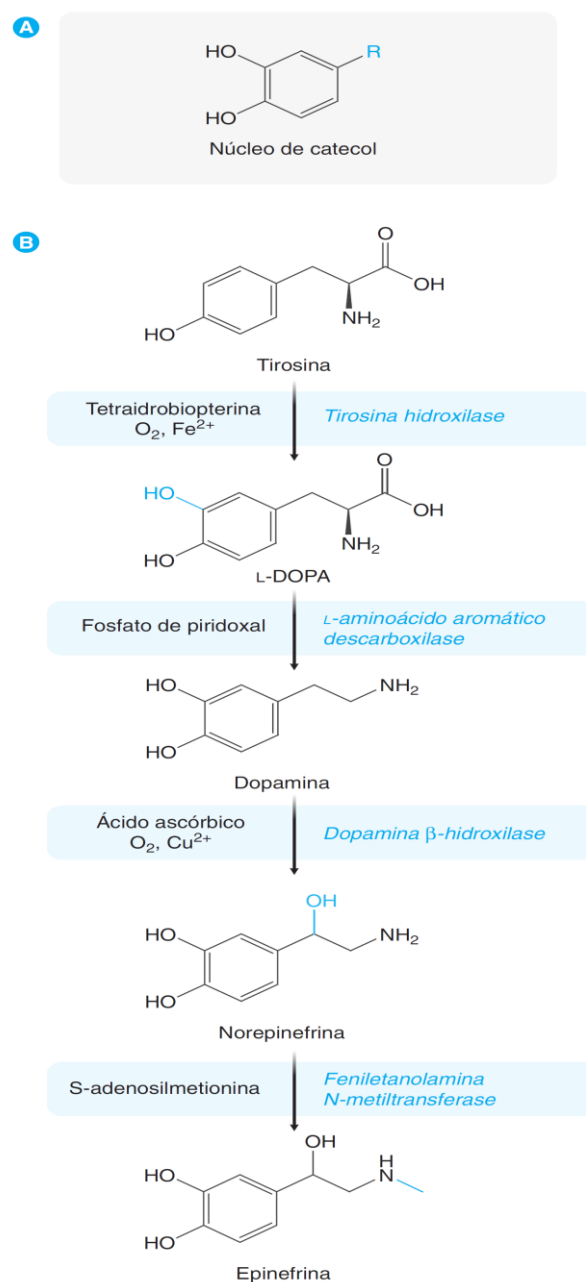
3.1 DOENÇA DE PARKINSON

James Parkinson descreveu pela primeira vez a DP em 1817, em sua monografia “Ensaio sobre a Paralisia agitante” onde relatou os sintomas motores da DP (PARKINSON, 1817). A DP é caracterizada pela degeneração massiva, progressiva e irreversível dos corpos celulares dopaminérgicos localizados na substância negra compacta do mesencéfalo, bem como de seus terminais de axônios no estriado, ocorrendo posteriormente acúmulo citoplasmático de inclusões fibrilares de proteínas, denominadas corpos de Lewy (HARDY et al, 2006; HERRERO; PAGONABARRAQA; LINAZASORO, 2011; LANSBURY JUNIOR; BRICE, 2002). Este fato faz com que ocorra a diminuição dos níveis da enzima tirosina hidroxilase (TH) na substância negra, a qual faz parte da via de síntese da DA, assim como a diminuição da concentração de dopamina no estriado (WIRDEFELDT et al, 2011).

A dopamina é um neurotransmissor que pertence à família das catecolaminas, da qual fazem parte também a noradrenalina (NA) e a adrenalina. Esses neurotransmissores têm como estrutura básica um núcleo catecol (3,4-diidroxibenzeno) ligado a um grupo amina através de uma ponte etil (figura 1A). A via de síntese da dopamina (figura 1B) inicia com o aminoácido tirosina que é obtido em maior parte da dieta e em pequena quantidade sintetizado no fígado a partir da fenilalanina. A DA é sintetizada através de uma série de reações enzimáticas que requerem co-fatores. A primeira etapa da síntese consiste na conversão do aminoácido tirosina em L-DOPA (L-3,4-diidroxifenilalanina ou levodopa) através da ação da enzima tirosina hidroxilase. Na segunda etapa, a L-DOPA é convertida em DA através da enzima aminoácido aromático descarboxilase (AADC) ou também conhecida como DOPA descarboxilase. Em neurônios dopaminérgicos, a via de síntese encerra nesse ponto e tem como produto final a DA, porém em neurônios noradrenérgicos e adrenérgicos a via de síntese segue convertendo DA em NE através da dopamina β -hidroxilase e NA em adrenalina através da feniletanolamina N-metiltransferase (ELWORTH; ROTH, 1997; BEST; NIJHOUT; REED, 2009).

Os neurônios dopaminérgicos originam-se em diferentes áreas do cérebro e estão presentes em 4 vias principais: a via nigroestriatal, a via túbero infundibular, a via mesolímbica e a via mesocortical. A principal via dopaminérgica é a via nigroestriatal que detém cerca de 80% da DA do cérebro. Os neurônios desta via projetam-se da SNpc para o estriado. Os neurônios dopaminérgicos desta via estão relacionados com os movimentos voluntários (BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011).

FIGURA 1 – VIA DE SÍNTESE DA DOPAMINA



Fonte: GOLAN et al (2009).

Os receptores de dopamina são receptores metabotrópicos, ou seja, receptores acoplados à proteína G. Os receptores de dopamina são divididos em duas classes de acordo com o seu efeito sobre a adenosina monofosfato cíclico (AMPc): D1 que contém os receptores D1 e D5 age pelo aumento de AMPc e D2 que contém os receptores D2, D3 e D4 age através da diminuição de AMPc. Os receptores de dopamina possuem diferentes distribuições no cérebro. Os receptores D1 e D2 são altamente expressos no estriado onde desempenham um papel fundamental no controle motor dos núcleos da base (MISSALE et al, 1998).

Embora a etiologia da DP ainda não tenha sido completamente elucidada, sabe-se que se trata de uma doença multifatorial. Apesar de ter sido realizada a identificação de genes associados ao desenvolvimento da doença, os fatores ambientais foram reconhecidos como responsáveis pela grande maioria dos casos de DP (esporádica ou idiopática) (THOMAS; BEAL, 2007; LICKER et al., 2009).

Os corpos de Lewy são compostos principalmente pela proteína alfa-sinucleína (α -syn) (SAVITT; DAWSON; DAWSON, 2006). Sua função fisiológica ainda não é conhecida, mas sugere-se que esteja ligada a regulação da neuroplasticidade (GEORGE et al, 1995, CLAYTON; GEORGE, 1999). Estudos demonstram que mutações no gene α -syn estão ligados a DP autossômica dominante, implicando assim seu papel na patogênese da DP (ZARRANZ et al., 2004).

3.2 EPIDEMIOLOGIA

A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais frequente relacionada à idade, sendo superada apenas pela Doença de Alzheimer (WILLIS et al., 2010; DE RIJK et al., 1997; ANDLIN-SOBOCKI et al, 2005), afetando cerca de 1% das pessoas idosas nos países ocidentais (WIRDEFELDT et al., 2011). A prevalência aumenta com a idade, cerca de 2% das pessoas com idade superior a 65 anos possuem DP (TAN, 2013).

Estima-se que cerca de 4,5 milhões de pessoas no mundo possuam DP (WIRDEFELDT et al., 2011). Acredita-se que em 2040, doenças neurodegenerativas como a DP superem o câncer e se tornem a segunda maior causa de morte entre idosos (LILIENFELD; PERL, 1993).

A DP afeta pessoas do mundo inteiro, de todas as etnias, sendo ligeiramente mais predominante em homens do que em mulheres. Indivíduos negros de diferentes partes do mundo apresentam diferentes incidências de DP, desta maneira, fatores ambientais parecem ter papel fundamental no desenvolvimento da patologia (LANG; LOZANO, 1998).

3.3 FISIOPATOLOGIA

Comprovou-se que uma série de mecanismos fisiopatológicos podem estar envolvidos na DP, estes mecanismos incluem estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, danos excitotóxicos, perturbação da homeostase de cálcio, inflamação, apoptose e agregação de proteínas (THOMAS; BEAL, 2007; LICKER et al., 2009; LOTHARIUS; BRUNDIN, 2002; CAMPELLO et al., 2013; COLLIER; SORTWELL, 1999) além de mutações em genes que codificam proteínas com um papel neuroprotetor, tal como a *parkin* (HARDY et al., 2006; THOMAS; BEAL, 2007).

Os núcleos da base (NB) fazem parte de uma complexa rede neuronal que integram as regiões cerebrais associativa, oculomotora, límbica e motora. Fazem parte dos NB: corpo estriado (formado pelo putâmen e o núcleo caudado), o globo pálido (interno (GPI) e externo (GPe)), o núcleo subtalâmico (NST) e a substância negra (*pars compacta* (SNpc) e *pars reticulada* (SNpr)). O circuito mais intimamente ligado à fisiopatologia do movimento é o “circuito motor” (SANTENS et al, 2003; ALEXANDER; DE LONG; STRICK, 1986).

No que diz respeito ao estresse oxidativo, sugere-se que os neurônios dopaminérgicos presentes na SNpc sejam particularmente suscetíveis à degeneração (BLUM et al, 2001). Neurônios dopaminérgicos apresentam níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (EROS). Sabe-se que a degradação da DA através da enzima monoamina oxidase (MAO) gera a formação de peróxido de

hidrogênio, além disso, a auto-oxidação da DA gera neuromelanina que, quando combinada com ferro, aumenta a formação de radicais hidroxila. Foi descoberto que a maioria dos neurônios da SNpc continham neuromelanina na DP, somado ao fato da diminuição da glutathione peroxidase ocasionando diminuição da capacidade de desintoxicação. Foram identificados dois principais responsáveis pelo aumento das EROS na degeneração da SNpc, o primeiro seria o aumento dos níveis de ferro e o segundo a diminuição da defesa antioxidante. Além da glutathione peroxidase, a proporção glutathione reduzida e oxidada (GSH/GSSG) apresenta-se reduzida no quadro de degeneração assim como a catalase (BLUM et al, 2001).

Além dos EROS, espécies reativas de nitrogênio parecem estar envolvidas também na fisiopatologia da DP. A ativação de células da glia do tecido em degeneração pode gerar citocinas (como fator de necrose tumoral- α (TNF- α)) e óxido nítrico que, por sua vez, geram o radical peroxinitrito. Além de geração de espécies reativas de nitrogênio e citocinas, as células da glia também podem ativar diretamente a via de morte celular (BLUM et al, 2001).

3.4 SINTOMATOLOGIA

3.4.1 Sintomas motores

Os primeiros sintomas motores da DP surgem quando aproximadamente 50% dos neurônios dopaminérgicos da SN se perderam e a DA no estriado foi reduzida em cerca de 80% (KIRIK; ROSENBLAD; BJORKLUND, 1998). Os pacientes acometidos pela DP apresentam como principais sintomas motores o tremor de repouso, rigidez, instabilidade postural e bradicinesia (lentidão de movimentos) (HARDY, 2006). Os pacientes com DP apresentam maior latência para iniciar movimentos e, quando o fazem, o tronco e os joelhos apresentam-se flexionados, os passos tornam-se mais curtos e o número de passos aumenta. O déficit de DA no estriado interfere diretamente no circuito motor ocasionando os sintomas acima enumerados (OBESO et al, 2002; BERARDELLI et al, 2001).

Estes sintomas podem vir acompanhados de sintomas não-motores que afetam de maneira significativa a qualidade de vida do paciente e diversas vezes não respondem aos tratamentos destinados aos sintomas motores (CHAUDHURI; SCHAPIRA, 2009). Os sintomas não-motores podem incluir déficits olfativos, prejuízo do sono e distúrbios neuropsiquiátricos (BRAAK et al, 2004; CHAUDHURI; HEALY; SCHAPIRA, 2006).

3.4.2 Sintomas não-motores

Sintomas como distúrbios olfatórios, de sono e autonômicos, fadiga, dor, depressão e ansiedade são ditos sintomas não-motores da DP e atingem a grande maioria dos pacientes antes mesmo do aparecimento dos primeiros sintomas motores (WOLTERS, 2008). Além dos já citados, pacientes com DP podem apresentar disfunção cognitiva, em casos mais graves podendo chegar à demência com extremo comprometimento da memória, pensamento e linguagem (CUMMINGS, 1992).

Sintomas depressivos ou de ansiedade também são comuns em pacientes acometidos pela DP e mostram-se frequentemente associados (KANO et al., 2011). Em um estudo de Menza e colaboradores (1993), foi relatada a ocorrência de transtorno depressivo em 92% dos pacientes com DP diagnosticados com transtorno de ansiedade e um transtorno de ansiedade em 67% do pacientes com DP deprimidos.

3.4.2.1 Depressão

A depressão é definida como um distúrbio em que estão presentes principalmente sintomas afetivos tais como tristeza, apatia, anedonia e desespero, mas também sintomas físicos que provocam perda de interesse por atividades diárias. De acordo com a DSM-V, para que se faça o diagnóstico do transtorno de depressão maior, é necessário que ao menos cinco dos sintomas a seguir sejam

satisfeitos no mesmo período de tempo de duas semanas. São eles: humor deprimido na maior parte do dia (percebido pelo próprio paciente ou por terceiros), perda significativa de peso ou aumento de peso, diminuição ou aumento do apetite quase todos os dias, insônia ou hipersonia quase todos os dias, agitação ou retardo psicomotor, fadiga, sentimentos de inutilidade ou culpa excessiva ou inapropriada, capacidade reduzida de pensar ou concentrar-se, pensamentos recorrentes de morte, sintomas que causam sofrimento clinicamente significativo ou prejuízo em áreas sociais, sintomas que não se devem aos efeitos fisiológicos diretos de uma substância (como uma droga de abuso ou medicamento), humor deprimido e perda de interesse ou prazer, sendo que pelo menos um dos dois últimos sintomas tem que estar necessariamente presente para que o diagnóstico de depressão maior seja feito (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION, 2013). Ainda, é preciso ressaltar a importância da diferenciação dos sintomas depressivos da depressão propriamente dita, já que sentimentos de tristeza são próprios da espécie humana (PARADELA, 2011).

Na literatura, muito se discute sobre o provável mecanismo que leva a depressão na DP e se esta está relacionada a outros sintomas psiquiátricos, incluindo a apatia e ansiedade. É discutido também se a depressão na DP está relacionada à disfunção dopaminérgica (ESKOW- JAUNARAJIS et al., 2011). Ainda não está claro se a depressão está realmente ligada à disfunção de sistemas neurotransmissores como os dopaminérgicos, noradrenérgicos e serotoninérgicos como muitos argumentam. Contudo, estudos de imagem demonstraram que os pacientes com DP que desenvolvem depressão apresentam alterações estruturais que refletem em disfunção dopaminérgica (WALTER; SKOLOUDÍK; BERG, 2010).

Várias teorias têm sido propostas para explicar a fisiopatologia da depressão (PRINS; OLIVER; KORTE, 2011). A principal teoria bioquímica da depressão é a das monoaminas, proposta por Schildkraut, em 1965. Esta teoria diz que a depressão pode ser causada por déficit de neurotransmissores monoaminérgicos em certos locais do cérebro (SCHILDKRAUT, 1965).

Ainda, a teoria é baseada principalmente na eficácia da primeira e segunda geração de antidepressivos, apontando um desequilíbrio principalmente na neurotransmissão serotoninérgica e noradrenérgica (SLATTERY; HUDSON; NUTT,

2004). Por exemplo, a nortriptilina é um antidepressivo tricíclico (ADTs) que age pelo bloqueio da recaptação pré-sináptica de noradrenalina; enquanto a fluoxetina é classificada como inibidor seletivo da recaptação de serotonina (ISRS) (MASSART; MONGEAU; LANFUMEY, 2012; HADDJERI et al, 2014;). Estas duas classes são tradicionalmente utilizadas na clínica como antidepressivos e podem ser também aplicadas no tratamento da depressão associada à DP (CHEN et al., 2007).

Diversos estudos histológicos em pacientes com DP relataram a perda de neurônios não-dopaminérgicos em diversas estruturas que não compõe a via nigroestriatal, tais como neurônios noradrenérgicos no *locus coeruleus* e núcleo vagal dorsal e neurônios serotoninérgicos da rafe (JELLINGER, 1987; JELLINGER, 1990). Estas perdas podem estar relacionadas a sintomas não-motores da DP como depressão e disfunção cognitiva (DEUMENS; BLOKLAND; PRICKAERTS, 2002).

Foi demonstrada através de tomografia computadorizada por emissão de pósitrons (PET) e tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) a perda da integridade de sistemas noradrenérgicos, serotoninérgicos e colinérgicos localizados no tronco cerebral de pacientes com DP (DODER et al, 2003). Ainda, foi possível correlacionar a gravidade do dano do sistema de neurotransmissor à expressão clínica da depressão (REMY et al, 2005; MURAI et al, 2001).

Os efeitos da depressão na qualidade de vida dos pacientes que possuem DP têm sido exaustivamente estudados, porém a mesma atenção não é dada a ansiedade (CAROD-ARTAL et al., 2008; QUELHAS; COSTA, 2009; HANNA; CRONIN-GOLOMB, 2009). Elas são indicadas como as maiores causas da má qualidade de vida dos pacientes com DP, sendo mais prejudiciais ao bem estar que os sintomas motores, mesmo nos estágios avançados da doença, quando estes já progrediram (CAROD-ARTAL et al., 2008; HELLY et al., 2005). Esses distúrbios chegam a afetar até 50% dos indivíduos com DP em alguma fase da doença (NÈGRE-PAGÈS et al, 2010).

Apesar deste fato, sabe-se que apenas 20% dos pacientes que possuem algum desses transtornos psicológicos recebem algum tipo de tratamento profissional (FRISINA, 2008). O tratamento de primeira linha para depressão e ansiedade em DP é realizado com psicofarmacoterapia. As duas classes mais

comumente utilizadas são inibidores da recaptação de serotonina e antidepressivos tricíclicos (CHEN et al., 2007).

3.4.2.2 Ansiedade

O transtorno de ansiedade generalizada é caracterizado por preocupação persistente e excessiva acompanhada de sintomas físicos como tensão muscular. De acordo com a DSM-V, para que o transtorno de ansiedade generalizada seja diagnosticado é necessário que paciente apresente ansiedade e preocupação excessiva, ocorrendo na maioria dos dias por pelo menos seis meses, que a preocupação seja difícil de controlar e esteja relacionada a pelo menos três dos seguintes sintomas: inquietação ou sensação de estar no limite, cansar-se facilmente, dificuldade de concentração, irritabilidade, tensão muscular e distúrbios do sono. Além disso, para o diagnóstico o paciente deve apresentar também sintomas físicos, ansiedade ou preocupação que causem sofrimento clinicamente significativo ou incapacidade em atividades sociais ou ocupacionais e por fim, o transtorno não pode estar atribuído a uma condição médica geral, uso de substâncias ou outro transtorno mental (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION, 2013).

Apesar das várias teorias propostas para explicar a ansiedade nos pacientes com DP, muito pouco se sabe sobre o assunto. Propõe-se que a ansiedade seja uma resposta reativa ao diagnóstico de DP. Entretanto, quando comparados grupos de pacientes com ansiedade com e sem DP, ela é significativamente mais grave em pacientes com DP (SCHIFFER et al., 1988). Aliado a este fato, foi observado que estes pacientes têm maior risco de desenvolver ansiedade, antes mesmo do diagnóstico de DP (WEISSKOPF et al., 2003; SHIBA et al., 2000).

Além do desconforto gerado pela própria ansiedade, esta também acarreta o agravamento dos sintomas motores. Segundo relato de pacientes, os episódios de ansiedade intensificam o tremor preexistente ou a discinesia (SIRI et al., 2010). Desta maneira, o tratamento da ansiedade destes pacientes pode consequentemente melhorar os sintomas motores (SCHIFFER et al., 1988).

3.5 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da DP é clínico, não havendo até o momento nenhum biomarcador ou teste que consiga diagnosticá-la com certeza (MASSANO, 2011; DELENCLOS et al, 2015). A combinação de alguns dos sintomas motores, presença de tremor de repouso e resposta à levodopa diferencia a DP de outros parkisonismos (GILADI et al, 1990). O tremor clássico de 4 a 6 Hz da DP pode ser útil para diferenciá-la de diversos outros parkisonismos, entretanto, o fator complicador é que este tremor está ausente em mais de um quarto dos casos de DP (GHIKA; BOGOUSSLAWSKY, 1997). De acordo com o UK Parkinson's disease Society Brain Bank Clinical Criteria (sensibilidade de 90,4% e especificidade 98,1%), para que se faça o diagnóstico de DP o mínimo necessário é identificar a presença de bradicinesia associada a mais um sintoma motor (rigidez, tremor de repouso com frequência de 4 a 6 Hz ou instabilidade postural). Por vezes os sinais da DP são evidentes já quando o paciente entra no consultório, outros necessitam de um exame mais detalhado (MASSANO, 2011).

3.6 TRATAMENTO

Existe um grande debate sobre qual seria o momento ideal para iniciar o tratamento medicamentoso da DP. Atualmente recomenda-se que o tratamento inicie apenas quando os sintomas motores forem considerados como limitantes para o paciente. O motivo pelo qual o tratamento farmacológico tem sido adiado é proteger o paciente dos efeitos adversos causados pela levodopa, além de possibilitar que o paciente responda por mais tempo à droga. Entretanto, não existem evidências que apoiem esta medida (STOCCHI; VACCA; RADICATI, 2015).

Terapias que visam interromper a perda progressiva de neurônios dopaminérgicos têm sido propostas, estas terapias são ditas neuroprotetoras e tem como objetivo retardar o curso da doença. Drogas neuroprotetoras necessitam ser inseridas o mais breve possível, já que se propõe que elas possam preservar os

neurônios restantes (EMBORG, 2004; STOCCHI; OLANOW, 2013). Embora inúmeras drogas neuroprotetoras testadas em laboratório se mostrem promissoras, o tratamento disponível para DP permanece sintomático, ou seja, tratam os sintomas mas não impedem a progressão da degeneração. Estes tratamentos mostram-se muito úteis, podendo melhorar significativamente a qualidade de vidas destes pacientes. Porém, algumas manifestações da DP não respondem bem as terapias farmacológicas atuais, tais como comprometimento cognitivo e demência as quais se fazem presentes nos estágios avançados da doença (STOCCHI; OLANOW, 2004; BRICHTA, GREENGARD, FLAJOLET, 2013; POEWE, MAHLKNECHT, JANKOVIC, 2012; LE, SAYANA, JANKOVIC, 2013).

Os tratamentos para DP propõem restaurar os níveis de DA no cérebro ou ativar diretamente os receptores dopaminérgicos e podem ser basicamente divididos em: precursores da DA, agonistas dopaminérgicos, inibidores da degradação de DA e anticolinérgicos (MATOS et al, 1998). A levodopa é considerada o padrão ouro para o tratamento de DP, nenhum tratamento farmacológico ou cirúrgico mostra-se mais efetivo que a levodopa (CLARKE; GUTTMAN, 2002; AHLISKOG; MUENTER, 2001). A levodopa (L-dopa) é um precursor da DA, que é convertido em DA através da ação da enzima AADC (KING et al, 2011). Este medicamento é administrado na forma de pró-fármaco pelo fato da DA não ser capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE). Uma vez no SNC, a levodopa atravessa a BHE através do transportador de aminoácidos neutros. A levodopa é administrada via oral e pode ser convertida a DA já no trato gastrointestinal (TGI) (LEE et al, 2008), desta maneira, a quantidade de levodopa que chega à BHE para atingir o sistema nervoso central (SNC) é muito pequena, cerca de 1 a 3%, por esse motivo ela é geralmente administrada em combinação com a carbidopa. A carbidopa é um inibidor da enzima AADC que impede que a levodopa seja convertida em DA na periferia. A carbidopa é incapaz de atravessar a BHE, assim, não interfere na conversão de levodopa em DA no SNC (FERREIRA et al, 2009).

O uso crônico da levodopa ocasiona tolerância e sensibilização, à medida que o uso de levodopa é continuado, é necessária uma maior dose do fármaco para haver melhora dos sintomas. A maioria dos pacientes após um longo período utilizando levodopa desenvolve flutuações motoras (STACY, 2005). A primeira

complicação motora a aparecer geralmente é o fenômeno *wearing-off*, onde o efeito antiparkinsoniano de uma dose do medicamento não se mantém até que a próxima dose seja administrada (CAILLAVA-SANTOS; MARGIS; RIEDER, 2015). Outra complicação são os fenômenos conhecidos como “on” e “off”, nos períodos “off” ocorre o reaparecimento dos sintomas motores devido ao efeito da levodopa desaparecer horas após sua administração, e nos períodos “on” a levodopa exerce seu efeito havendo melhora do desempenho motor dos pacientes (KEIJSERS; HORSTINK; GIELEN, 2003). Devido a estes efeitos discute-se o momento ideal de iniciar o uso da levodopa e as vantagens de se adiar este tratamento nos estágios iniciais da DP (TEIXEIRA JÚNIOR; CARDOSO, 2004). Por isso propõe-se utilizar outros fármacos como tratamento inicial, principalmente agonistas dopaminérgicos (DE SANT et al, 2008).

Os agonistas dopaminérgicos atuam diretamente nos receptores pós-sinápticos da DA. Pertencem a esta classe derivados da ergotamina como bromocriptina (agonista D2) e a pergolida (D1 e D2) e agonistas não derivados da ergotamina tais como pramipexole (D3 > D2) e ropinirol (D3 > D2) utilizados geralmente em associação com a levodopa (OLANOW, 2013). Esta classe apresenta diversas vantagens como não competir com a levodopa e outros aminoácidos neutros pelo seu transporte na BHE, não necessitam de conversão pela AADC e meias-vidas mais longas que a levodopa, necessitando de doses menos frequentes (RADAD; GILLE; RAUSCH, 2005).

A terceira classe utilizada para o tratamento de DP é a classe dos inibidores da degradação da DA. Pertencem a esta classe inibidores da MAO-B (isoforma da MAO que predomina no estriado) e inibidores da COMT. A MAO-B e a COMT são enzimas que participam do metabolismo da DA degradando-a (DE ANDRADE; FERRAZ, 1997). A selegilina foi o primeiro inibidor seletivo irreversível da MAO-B a ser utilizado em DP (LANGSTON; IRWIN, 1986). Uma desvantagem do uso da selegilina é que ela tem como metabólito a anfetamina, foi apontada uma maior mortalidade quando utilizada levodopa em associação com selegilina se comparado ao uso de levodopa isolada (HEINONEN; MYLLYLÄ, 1998). Além da selegilina, a rasagilina também é um inibidor da MAO-B, porém não apresenta metabólitos tóxicos. Ela mostrou-se eficiente como monoterapia no início da DP (PARKINSON

STUDY GROUP, 2002; STERN et al, 2004). A tolcapona e a entacapona são inibidores da COMT e ambos podem ser utilizados em associação com a levodopa por diminuírem seu metabolismo periférico (KAAKKOLA, 20010; WARD et al, 1984).

Os fármacos anticolinérgicos, como o biperideno e triexifenidil, são indicados como terapia inicial para pacientes mais novos (menos de 70 anos), sem disfunção cognitiva, pois apresentam diversos efeitos adversos, especialmente em indivíduos mais velhos. Dentre os efeitos adversos estão confusão, boca seca, retenção urinária e precipitação de crises de glaucoma. São utilizados quando o tremor é a manifestação predominante, não apresentando efeito clínico significativo sobre os demais sintomas motores da DP (MIYASAKI et al, 2002; MASSANO, 2011).

3.7 MODELOS ANIMAIS DE DOENÇA DE PARKINSON

Descobertas do ponto de vista da genética auxiliaram na compreensão de possíveis vias moleculares envolvidas na patogênese da DP. Entretanto, estas descobertas ainda não conseguiram responder a importantes questões que surgem quando falamos sobre esta patologia. Entre estas questões estão o envolvimento do envelhecimento com a DP, o papel da hereditariedade e por que há uma perda relativamente seletiva de neurônios dopaminérgicos. Estas e outras questões parecem ser abordadas de maneira mais eficiente por modelos animais (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

Apesar da neurobiologia da DP não ser bem conhecida, os modelos animais auxiliam na compreensão de sua etiologia, patologia e mecanismos moleculares (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Além disso, esses modelos tornaram-se muito úteis para a avaliação da eficácia de tratamentos potenciais na fase que antecede os ensaios clínicos em seres humanos (RIBEIRO et al., 2013).

Os modelos animais apresentam uma grande variedade de formas, mas basicamente podem ser divididos em dois grupos, os que utilizam neurotoxinas, ambientais ou sintéticas, e os genéticos, que utilizam a expressão *in vivo* de mutações relacionadas com a DP (BLESÁ et al, 2012). Dentre os modelos que

utilizam neurotoxinas, elas podem ser reversíveis como é o caso da reserpina ou irreversíveis como 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina (MPTP), hidroxodopamina (6-OHDA), paraquat e rotenona. Estudos mais recentes tem dado preferência às irreversíveis para produzir a patologia e sintomatologia relacionada à DP (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; CARLSSON; LINDQVIST; MAGNUSSON, 1957; CARLSSON, 1959; BETARBET; SHERER; GREENAMYRE, 2002).

Algumas características devem ser respeitadas pelo modelo animal quando testamos futuras terapias neuroprotetoras, entre estas destacamos o fato da lesão nigral realizada no modelo ser obrigatoriamente replicável e a perda de células dopaminérgicas ser estável e não haver recuperação instantânea. Estes requisitos são fundamentais para demonstrar a relevância clínica do estudo (EMBORG, 2004).

Os modelos que utilizam toxinas têm como característica comum o fato de produzir um estresse oxidativo e causar a morte celular em neurônios dopaminérgicos, assim como é visto na DP (BLESA et al., 2012).

A infusão de diferentes toxinas no mesmo local causam respostas diferentes. A infusão de MPTP causa morte de menor número de neurônios que a 6-OHDA injetada no mesmo local, indicando menor potência do MPTP em lesar o neurônio. Além da menor potência, sugere-se que as duas neurotoxinas ajam por mecanismos diferentes, indicando que há diferença entre a forma de captação das duas toxinas pelos neurônios dopaminérgicos e entre os mecanismos que levam à morte neuronal. O MPTP é capaz de causar lesão apenas quando o corpo celular é atingido pela infusão, causando uma lesão mais pontual, enquanto que a 6-OHDA parece ser captada, causando lesão retrógrada e atingindo também neurônios com o corpo celular em locais mais distantes do local de infusão (FERRO et al, 2005).

3.7.1 6-Hidroxidopamina

A 6-OHDA foi isolada em 1959 (SENOH; WITKOP, 1959) e utilizada pela primeira vez a quase 50 anos, sendo utilizada até hoje *in vitro* e *in vivo*

(UGERSTEDT, 1968). A 6-OHDA difere da dopamina pela presença de uma hidroxila adicional, este grupamento a torna tóxica para os neurônios dopaminérgicos (PERESE, 1989).

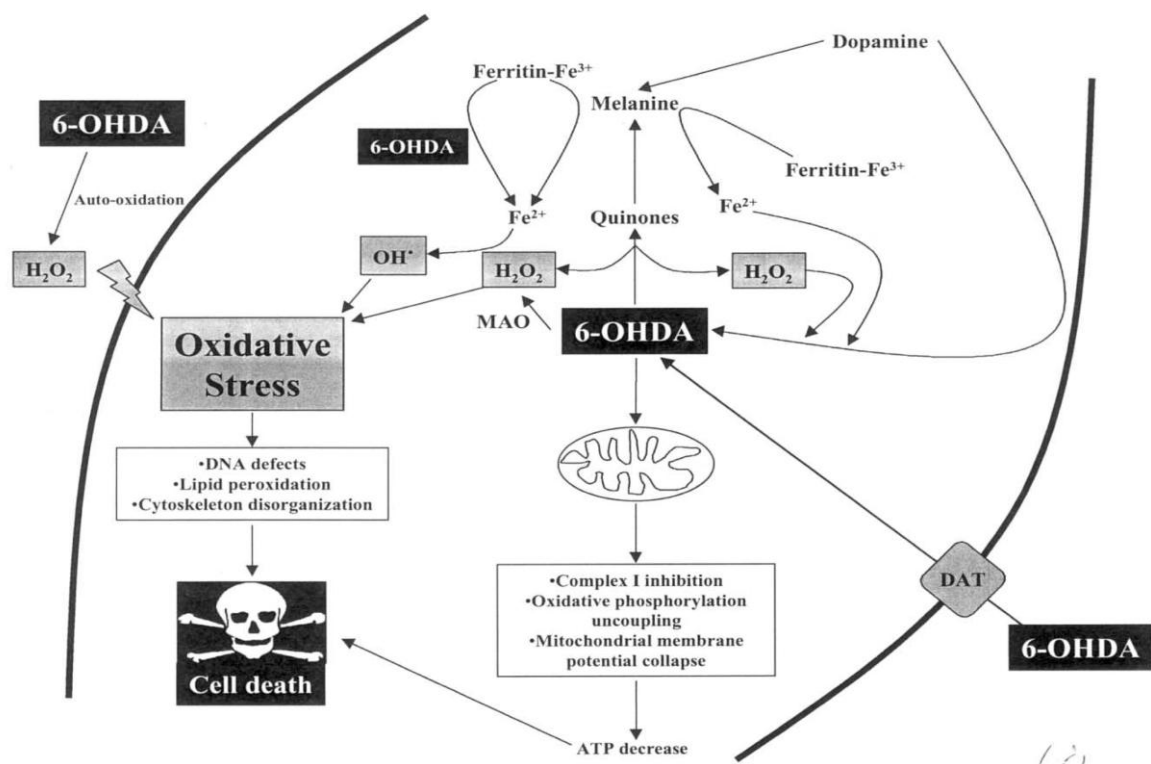
Esta neurotoxina apresenta elevada afinidade por transportadores catecolaminérgicos como o transportador de dopamina (DAT) e da norepinefrina (NET) (SACHS; JONSSON, 1975), por esse motivo, muitas vezes um inibidor de recaptação de noradrenalina, como a desipramina, é utilizado em conjugação com a 6-OHDA, com a finalidade de poupar os neurônios noradrenérgicos no modelo animal de DP (MARTIN; MYERS; NEWBERG, 1976). Além disso, um estudo realizado por Santiago e colaboradores (2014) demonstrou redução de 5-HT no hipocampo após lesão intranigral com 6-OHDA, indicando que a neurotoxina afeta também neurônios serotoninérgicos.

A 6-OHDA não atravessa a BHE, desta maneira, para gerar o modelo, é necessário que a toxina seja injetada diretamente no encéfalo com auxílio de uma cirurgia esterotáxica. Uma vez dentro dos neurônios dopaminérgicos, ela é oxidada em espécies reativas de oxigênio que levam à inibição cadeia de transporte de elétrons e estresse oxidativo (MAZZIO; REAMS; SOLIMAN, 2004). Sugere-se que a 6-OHDA cause degeneração da via nigroestriatal através da geração de peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, semelhante ao que ocorre na DP. Diversos estudos demonstram que a 6-OHDA produz estresse oxidativo tanto *in vitro* como *in vivo* e essa teoria é respaldada pelo fato de agentes antioxidantes reduzirem a toxicidade da neurotoxina. A 6-OHDA gera EROS através de dois mecanismos: 1) desaminação através da enzima MAO gerando peróxido de hidrogênio; 2) auto-oxidação não enzimática gerando diversas EROS tais como radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila. A formação de EROS pelos dois mecanismos parece ser amplificada pela presença de ferro. Após injeção de 6-OHDA os níveis de ferro são aumentados na SNpc e no estriado. O ferro catalisa a Reação de Fenton, aumentando o número de EROS e desta maneira, contribuindo para a toxicidade (BLUM et al, 2001).

A quantidade de 6-OHDA injetada, o local da injeção e espécies de animais utilizados determina a magnitude da lesão. Este modelo não é totalmente fiel às

características da DP. A 6-OHDA provoca perda de neurônios dopaminérgicos na região nigral, depleção de dopamina e déficits neurocomportamentais, entretanto, a neurotoxina parece não afetar outras regiões do cérebro tais como estruturas olfativas, áreas menores do tronco cerebral ou lócus coeruleus (BLESA et al, 2012). Os corpos de Lewy e déficits olfativos não são observados nos animais tratados com 6-OHDA (SPILLANTINI et al., 1997). Apesar das limitações este modelo tem contribuído significativamente para a compreensão da DP (BLESA et al., 2012).

FIGURA 2 – MECANISMOS DE AÇÃO DA 6-OHDA



Fonte: BLUM et al (2001).

3.8 INIBIDORES DA RECAPTAÇÃO DE NEUROTRANSMISORES MONOAMINÉRGICOS

O processo degenerativo da DP não limita-se aos neurônios dopaminérgicos, atingindo também sistemas noradrenérgicos e serotoninérgicos. Apesar do

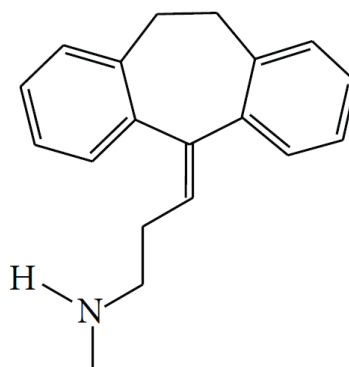
tratamento com levodopa associado à carbidopa ser considerado o padrão ouro para o tratamento de DP, esta associação auxilia apenas nos déficits de DA e NA não sendo útil na reversão da redução de 5-HT. Por esse motivo, inibidores da recaptação de monoaminas podem ser úteis por promoverem o aumento dos níveis de monoaminas em todo o cérebro (HUOT; FOX; BROTHIE, 2015).

Em sistemas monoaminérgicos, a recaptação do neurotransmissor é o principal mecanismo pelo qual a neurotransmissão é finalizada. Deste modo, a inibição da recaptação pode aumentar a neurotransmissão pela diminuição da depuração do neurotransmissor da sinapse e prolongar o tempo de permanência do neurotransmissor (HUOT; FOX; BROTHIE, 2015).

3.8.1 Nortriptilina

A nortriptilina faz parte da classe dos ADTs, que receberam este nome por possuírem em comum uma estrutura com dois anéis aromáticos ligados a um anel de ciclo-heptano. A imipramina foi o primeiro medicamento desta classe, que também engloba a amitriptilina, a desipramina e a clomipramida. Além do tratamento da depressão, os ADTs são úteis em doses mais baixas no tratamento de síndromes de dor, como enxaqueca, distúrbios de dor somática e na síndrome da fadiga crônica. Seus efeitos adversos são causados devido a sua ligação a vários canais de receptores além de seus alvos terapêuticos (GILLMAN, 2007).

FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DA NORTRIPTILINA



Fonte: HUOT; FOX; BROTHIE (2015).

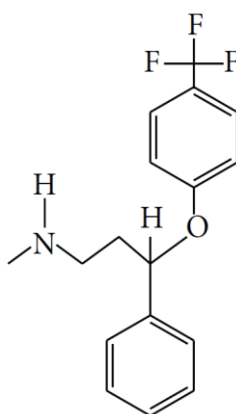
A nortriptilina age através da inibição da recaptação de NA da fenda sináptica pela ligação com o seu transportador. Como a NA permanece mais tempo na fenda, isso permite uma maior ativação dos receptores, consequentemente aumenta as respostas pós-sinápticas (GILLMAN, 2007).

3.8.2 Fluoxetina

A fluoxetina foi o primeiro medicamento da classe dos ISRS, que foi introduzida no mercado em 1987, revolucionando o tratamento da depressão, e é um dos ISRS mais prescritos até hoje. Os ISRS apresentam um mecanismo de ação semelhante aos ADTs, porém são mais seletivos para os receptores 5-HT. A fluoxetina age inibindo a recaptação de serotonina, que, por sua vez, tem seus níveis aumentados na fenda pré-sináptica, desta maneira, aumentando a ativação de seus receptores 5-HT e por consequência tendo o aumento das respostas pós-sinápticas a 5-HT (ROSSI; BARRACO; DONDA, 2004).

Além da fluoxetina, esta classe abrange também o citalopram, a fluvoxamina, a paroxetina, a sertralina e o escitalopram. Por apresentarem grande seletividade e poucos efeitos adversos, esta classe representa o tratamento de primeira linha para depressão, ansiedade e transtorno obsessivo-compulsivo, além de ser útil também no tratamento de síndrome do pânico e transtorno de estresse pós-traumático (ROSSI; BARRACO; DONDA, 2004).

FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DA FLUOTEXINA



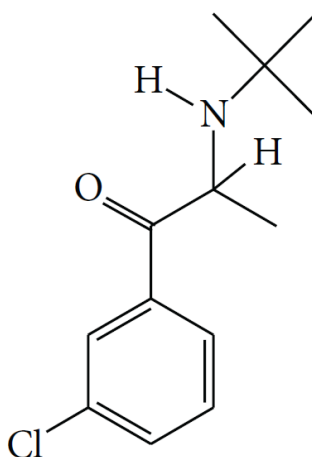
Fonte: HUOT; FOX; BROTHIE (2015)

3.8.3 Bupropiona

A bupropiona faz parte dos antidepressivos ditos atípicos e parece agir através de mecanismos múltiplos, apresentando uma neurofarmacologia menos definida. Além da bupropiona, fazem parte desta classe a mirtazapina, a nefazodona e a trazodona. Todas estas fazem parte da mesma classe pelo fato de não se enquadrarem em outras categorias de antidepressivos. Apresentam em sua maioria mecanismos diferentes, entretanto alguns deles são desconhecidos ou parcialmente conhecidos. Os antidepressivos atípicos apresentam poucos efeitos adversos e eficácia clínica semelhante (FAVA et al, 2005).

A bupropiona inibe tanto a recaptação dopaminérgica quanto a noradrenérgica e também pode ser empregada no tratamento de pacientes parkinsonianos depressivos. Além disso, seu mecanismo de ação pode ainda envolver a liberação pré-sináptica de noradrenalina e dopamina. Ela é o antidepressivo com menores efeitos adversos sexuais (FAVA et al, 2005).

FIGURA 5 – ESTRUTURA QUÍMICA DA BUPROPIONA



Fonte: HUOT; FOX; BROTHIE (2015).

Este trabalho teve como objetivo testar de que maneira os bloqueadores da recaptação de neurotransmissores monoaminérgicos interferem nas alterações

comportamentais provocadas pela a injeção da neurotoxina 6-OHDA no feixe prosencefálico medial ou na substância negra *pars compacta*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos Wistar com peso entre 280 e 320 g no início dos experimentos, fornecidos pelo biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Os animais foram agrupados em 5 por gaiola de polipropileno, forradas com aparas de madeira com livre acesso a água e comida. As gaiolas foram mantidas em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e em um ciclo claro-escuro de 12 horas, sendo as luzes acesas às 7 horas. Os experimentos tiveram início após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Processo CEUA 031/2014, Protocolo UEPG 6310/2014. Os experimentos foram realizados de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação animal (CONCEA) (CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL, 2013).

4.2 DESENHO EXPERIMENTAL

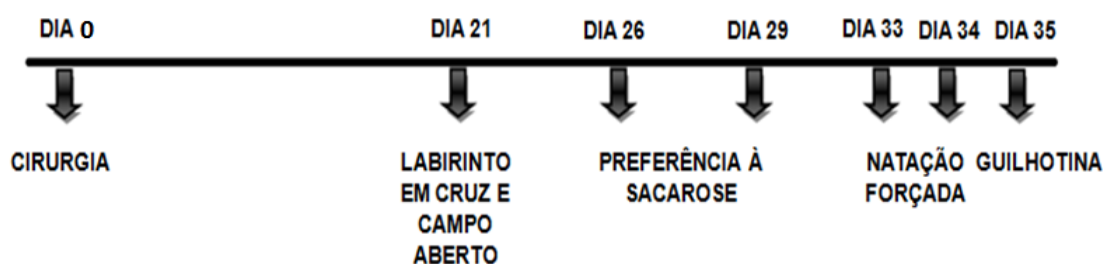
Os animais foram divididos em dois grandes grupos: um grupo lesado na substância negra (SN) e o outro no feixe prosencefálico medial (FPM). Cada um dos grupos (SN e FPM) foi subdividido em cinco grupos experimentais: falso operado (SHAM) ($n= 12$ para FPM e 10 para SN), animais lesados com 6-OHDA tratados com veículo (solução salina 0,9%) ($n= 12$ para FPM e 10 para SN) e animais lesados com 6-OHDA tratados com um bloqueador da recaptação de dopamina ($n= 10$ para FPM e 9 para SN), bloqueador da recaptação de noradrenalina ($n= 11$ para FPM e 9 para SN) ou bloqueador da recaptação de serotonina ($n= 12$ para FPM e 8 para SN). Os animais dos grupos SHAM foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos assim como os animais lesados, recebendo infusão de salina ao invés da neurotoxina 6-OHDA.

A neurotoxina 6-OHDA foi solubilizada em solução composta por ácido ascórbico 0,2% em cloreto de sódio 0,9% (salina) no dia da cirurgia. O ácido ascórbico foi utilizado para evitar que a neurotoxina se auto oxidasse precocemente. A 6-OHDA foi infundida bilateralmente, bem como a salina, na concentração de 6 µg em cada hemisfério, no volume de 1µl na SN (6 µg/µl) e 2 µl no FPM (3 µg/µl), do mesmo modo que foi realizado por Santiago e colaboradores na SN (2014).

Os bloqueadores da recaptação dos neurotransmissores dopamina, noradrenalina e serotonina utilizados neste trabalho foram a bupropiona na dose de 20 mg/Kg, nortriptilina 10 mg/Kg e fluoxetina 5 mg/Kg, respectivamente. As doses utilizadas foram estabelecidas de acordo com a literatura como capazes de inibir eficazmente a recaptação destes neurotransmissores em ratos (SANTAMARÍA; ARIAS, 2010; SCHAMNE et al, 2014). Tais drogas foram solubilizadas em solução salina 0,9% no dia do uso e administradas por via intraperitoneal (i.p.) uma única vez, 10 minutos antes da infusão de 6-OHDA.

Os testes de comportamento motor e não-motor foram realizados a partir do 21º dia após a lesão. Estes testes obedeceram a uma ordem crescente de acordo com o estresse que cada um deles gerava no animal, para que o estresse gerado por um teste não interferisse no teste seguinte. A ordem mantida foi: labirinto em cruz, campo aberto, preferência à sacarose e natação forçada (figura 6). Imediatamente após o término dos testes, os animais foram guilhotinados e seus cérebros foram dissecados para retirada do estriado e mesencéfalo para posterior avaliação neuroquímica por HPLC e avaliação histológica respectivamente.

FIGURA 6 – CRONOGRAMA EXPERIMENTAL DOS ANIMAIS LESADOS NO FPM E SN



Fonte: A Autora.

4.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

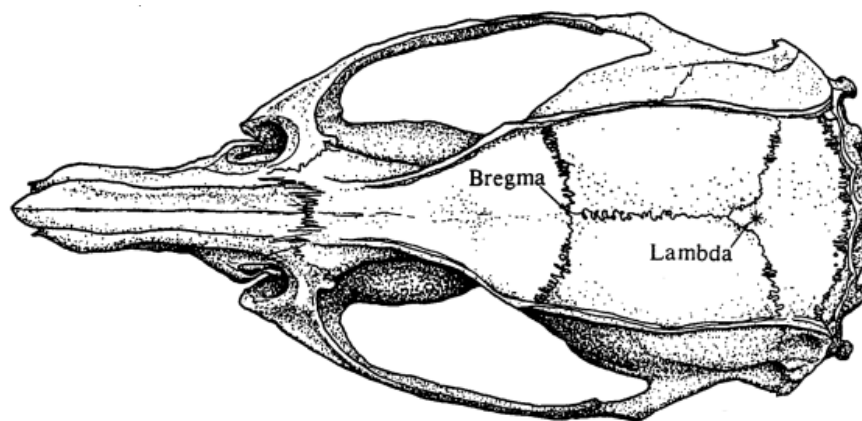
O procedimento cirúrgico teve início com a anestesia total com tiopental (50 mg/Kg) via i.p. A seguir, foi realizada a tricotomia da região craniana. As drogas bloqueadoras da recaptação de neurotransmissores foram administradas via i.p. 10 minutos antes da administração da 6-OHDA, a seguir, os animais foram fixados em aparelho estereotáxico para ratos. Antes da incisão, os animais receberam 0,2 ml de lidocaína 2% subcutânea no crânio.

Com o auxílio de uma lâmina de bisturi, realizou-se o afastamento da pele e do músculo epicrânio. O bregma foi localizado e utilizado como ponto de referência para o encontro das coordenadas do FPM e da SN. As coordenadas utilizadas foram:

- Feixe prosencefálico medial: Anteroposterior (AP) – 1,9 mm do bregma; Médio-lateral (ML) $\pm$ 1,9 mm da linha média; Dorsoventral (DV) – 7,9 mm do crânio; Barra nasal – 3,3 mm.
- Substância negra *pars compacta*: Anteroposterior (AP) – 5,0 mm do bregma; Médio-lateral (ML) $\pm$ 2,1 mm da linha média; Dorsoventral (DV) – 7,8 mm do crânio; Barra nasal – 3,3 mm.

O crânio foi perfurado com uma broca de baixa rotação em local baseado nas coordenadas estereotáxicas fornecidas pelo atlas de Paxinos e Watson (1997) para inserção da agulha e posterior injeção da neurotoxina. O procedimento realizado foi semelhante ao descrito por Da Cunha e colaboradores (2008).

FIGURA 7 – LOCALIZAÇÃO O BREGMA NO CRÂNIO DO RATO



Fonte: PAXINOS; WATSON (1997).

A cirurgia foi realizada com infusão de salina nos grupos SHAM, ou neurotoxina 6-OHDA nos demais grupos. A infusão da neurotoxina 6-OHDA ou solução salina foi realizada através de uma agulha calibre 30 G conectada a uma seringa Hamilton de 25 µl, através de um tubo de polietileno ligado a uma bomba infusora (0,25 µl/minuto). Após o término da infusão, a agulha foi mantida no local por 2 minutos para evitar o refluxo e só então retirada. Após a cirurgia estereotáxica os animais foram suturados e foi realizada a profilaxia de infecções através da administração de pentabiótico de uso veterinário de amplo espectro bacteriano na dose de 1ml/Kg. O pentabiótico é composto por benzilpenicilina benzatina 3000000 UI, benzilpenicilina procaína 1500000 UI, benzilpenicilina potássica 1500000 UI, diidroestreptomicina base (sulfato) 1250 mg e estreptomicina base (sulfato) 1250 mg.

4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

4.4.1 Teste do campo aberto

Os animais foram submetidos a este teste com o objetivo de avaliar sua capacidade motora. O campo aberto consiste em uma caixa quadrada (100 x 100 cm) com o piso dividido em 25 quadrados menores. Os ratos foram colocados no centro da caixa onde puderam explorar livremente durante 5 minutos. Este teste permite a avaliação de dois parâmetros: ambulação (frequência de locomoção avaliada pelo número de passagens de um quadrado para outro com as patas traseiras) e *rearing* (número de vezes que o animal se levanta apoiado em suas patas traseiras). A caixa foi higienizada com solução de etanol 5% em água para que o odor deixado pelo animal não interferisse no teste do animal seguinte. O procedimento realizado foi semelhante ao descrito por Santiago e colaboradores (2014).

4.4.2 Teste do labirinto em cruz elevado

Este teste permite avaliar um comportamento de ansiedade dos animais (PÊGO et al., 2008). O labirinto em cruz é formado por dois braços abertos e dois braços fechados formando uma plataforma comum, elevada a 50 cm do chão. Durante este teste, o animal foi colocado no ponto central da plataforma, virado para o braço aberto, permitindo que explorasse livremente o local durante 5 minutos. O teste permite avaliar os seguintes parâmetros: número de entradas nos braços abertos, nos fechados e no centro e a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos, nos fechados e na interseção deles. Depois de cada teste, a plataforma foi higienizada com solução de etanol 5% para que os odores deixados não influenciem nos testes posteriores. Os testes foram gravados para que posteriormente fossem analisados (WALL; MESSIER, 2001).

FIGURA 8 – TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO



Fonte: A Autora

4.4.3 Teste de preferência à sacarose

Este teste tem como objetivo medir a anedonia nos animais (PAPP; WILLNER; MUSCAT 1991; WANG et al., 2009). Durante o teste de preferência à sacarose, os animais foram transferidos para gaiolas-moradia individuais com livre acesso a comida. Em uma primeira fase, foram fornecidas duas garrafas com água, em lados opostos da gaiola para que se adaptassem a beber das duas garrafas durante 24 h. Após o treinamento, um dos frascos foi substituído por um contendo uma solução de sacarose 0,5% para os animais lesados no FPM ou 1% para os lesados na SN (SLATTERY; MARKOU; CRYAN, 2007). Após 24 h, as garrafas foram invertidas de lado, com o intuito de evitar a influência de uma possível perseverança do animal por um dos lados da gaiola. As garrafas foram pesadas antes e após serem oferecidas aos animais. O consumo de água e da solução de sacarose foi obtido pela diferença dos pesos iniciais e finais de cada garrafa.

4.4.4 Teste de natação forçada

Este teste permite avaliar o comportamento tipo depressivo dos animais, sendo que consiste em duas etapas: primeiro o treino e, após 24 h, o teste em si. Os ratos foram submetidos a natação forçada em um tanque cilíndrico opaco com espaço restrito (50 cm de altura e 20 cm de diâmetro) e impassível de fuga, contendo água a temperatura de $24 \pm 1^\circ \text{C}$ e uma profundidade de 30 cm (RÉNERIC, BOUVARD, STINUS, 2002), modificando a metodologia originalmente descrita por Porsolt et al. (1987). Durante a sessão treino, os animais foram colocados no recipiente durante 15 minutos para adaptação, 24h depois, foi realizado o teste propriamente dito, onde foram submetidos à natação forçada durante 5 minutos.

FIGURA 9 – TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA



Fonte: A Autora.

Este teste permite a avaliação de 3 parâmetros: tempo de imobilidade (falta de movimentos, exceto os necessários para manter a cabeça fora da água), escalada (movimentação vigorosa das patas dianteiras dirigidas contra a parede do tanque) e natação (movimentação vigorosa das patas dianteiras, deslocando o corpo em torno do cilindro). A água foi trocada entre os testes de um animal e outro para que os odores deixados e mudança de temperatura não influenciassem no teste seguinte. Os testes foram gravados para serem analisados posteriormente.

4.5 DISSECÇÃO E ANÁLISE DO MESENCÉFALO

Após a realização dos testes comportamentais, os animais foram sacrificados e foi realizada a dissecação para retirada do estriado e mesencéfalo para análises posteriores.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

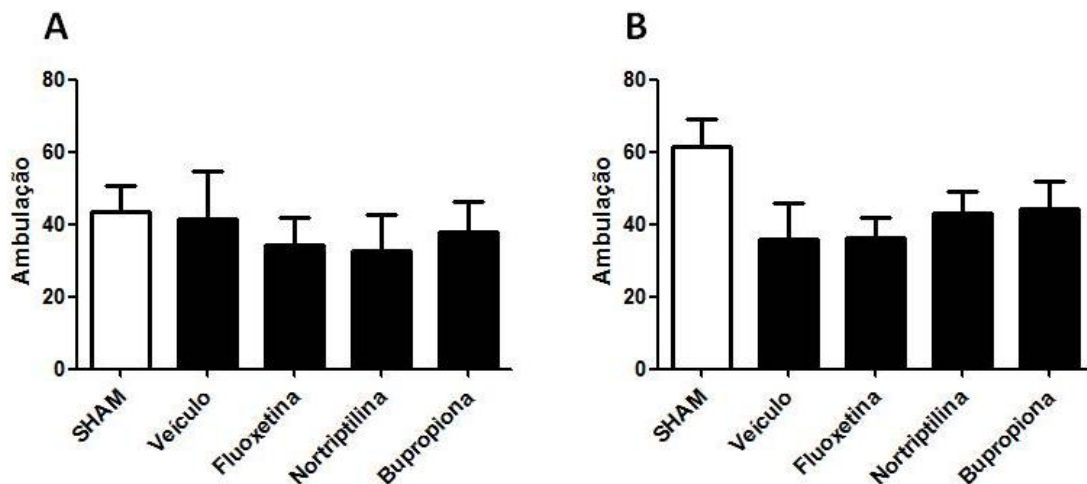
Foi realizado um cálculo amostral com base em trabalhos de lesão nigroestriatal e comportamento do nosso grupo (VECCHIA, 2013) e outros da literatura (SANTIAGO et al, 2014). O nível de significância adotado (alfa) foi 0,05. Os cálculos foram realizados com base no desvio padrão médio de 20%, estabelecendo um poder de teste de 90%, adotando um d Cohen de 1,5 como significativo. Os cálculos foram realizados utilizando o programa GPower 3.1 Germany (Faul et al., 2007). Este cálculo resultou em 11 animais por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via e as diferenças entre os grupos analisadas pelo teste de post-hoc de Newman-Keuls. Para execução dos cálculos, usou-se o programa Statsoft Statistica 7.

5 RESULTADOS

5.1 TESTE DO CAMPO ABERTO

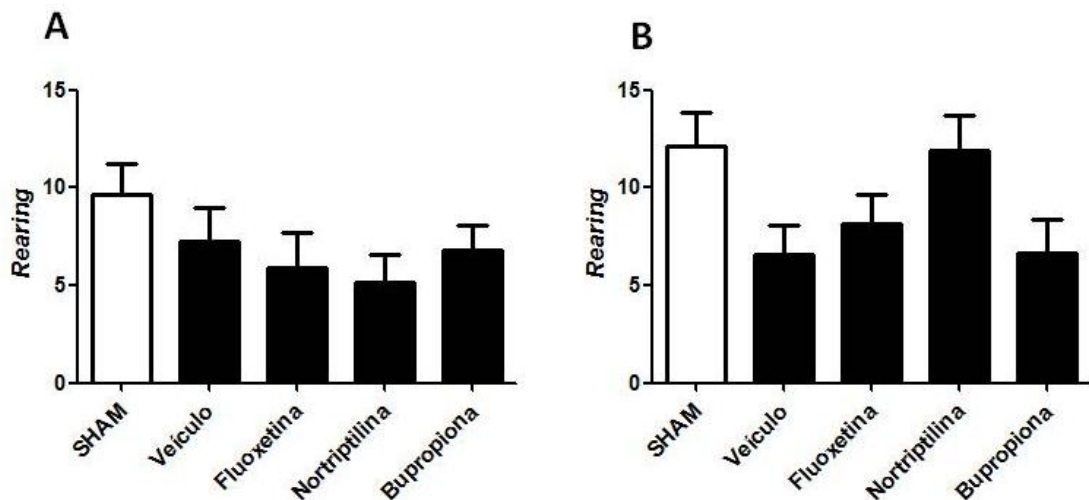
Conforme ilustrado nos gráficos 1A e 1B, nos animais lesados no FPM [$F(4,52)=0,25$, $p=0,91$] e na SN [$F(4,41)=1,96$, $p=0,12$] respectivamente, não houve diferença significativa entre os grupos no parâmetro ambulação. Com relação ao *rearing*, não houve diferença significativa entre os grupos com lesão no FPM [$F(4,52)=1,18$, $p=0,33$] (gráfico 2A). Já entre os animais lesados na SN [$F(4,41)=2,78$, $p<0,05$] (gráfico 2B), o teste ANOVA indica diferença no fator grupo, porém, não foi observada diferença entre os grupos no post hoc de Newman-Keuls.

GRÁFICO 1 – AMBULAÇÃO NO TESTE DE CAMPO ABERTO NOS ANIMAIS LESADOS NO FPM (A) E NA SN (B)



Barras brancas: SHAM; barras pretas: 6-OHDA. Os dados foram expressos como média $\pm$ SEM do número de linhas cruzadas pelos animais no piso do campo aberto 21 dias após a lesão (ANOVA de uma via).

GRÁFICO 2 – *REARING* NO TESTE DE CAMPO ABERTO NOS ANIMAIS LESADOS NO FPM (A) E NA SN (B)



Barras brancas: SHAM; barras pretas: 6-OHDA. Os dados foram expressos como média $\pm$ SEM do número de vezes que os animais se levantaram em duas patas no campo aberto 21 dias após a lesão (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc Newman-Keuls).

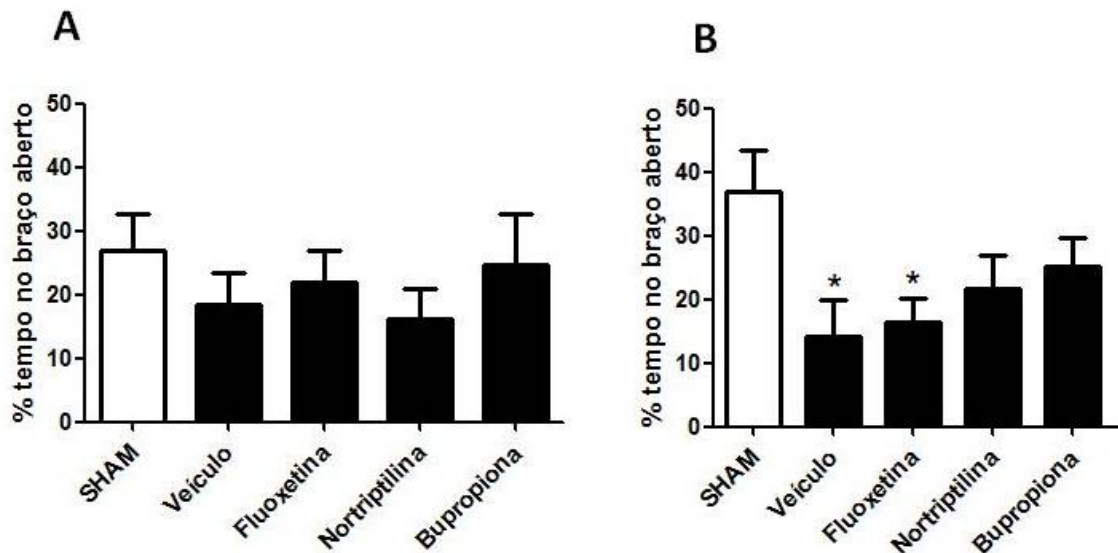
5.2 TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

No teste do labirinto em cruz elevado, a lesão no FPM não causou alteração em nenhum dos parâmetros analisados: porcentagem de tempo gasto no braço aberto [$F(4,52)=0,60$, $p=0,66$] (gráfico 3A), número de entradas no braço aberto [$F(4,52)=0,34$, $p=0,85$] (gráfico 4A), porcentagem de tempo gasto no braço fechado [$F(4,52)=0,86$, $p=0,49$] (gráfico 5A), número de entradas no braço fechado [$F(4,52)=1,22$, $p=0,31$] (gráfico 6A), porcentagem de tempo gasto no centro [$F(4,52)=0,24$, $p=0,91$] (gráfico 7A) e número de entradas no centro [$F(4,52)=0,88$, $p=0,48$] (gráfico 8A).

Com relação aos animais lesados na SN, no parâmetro tempo de permanência no braço aberto [$F(4,39)=2,92$, $p<0,05$] (gráfico 3B), houve redução da porcentagem de tempo gasto pelos animais do grupo 6-OHDA tratado com veículo e do grupo tratado com fluoxetina comparados ao grupo SHAM ($p<0,05$), e por fim, os grupos 6-OHDA tratados com nortriptilina e bupropiona não foram diferentes do grupo SHAM ou 6-OHDA tratados com veículo. O grupo 6-OHDA tratado com

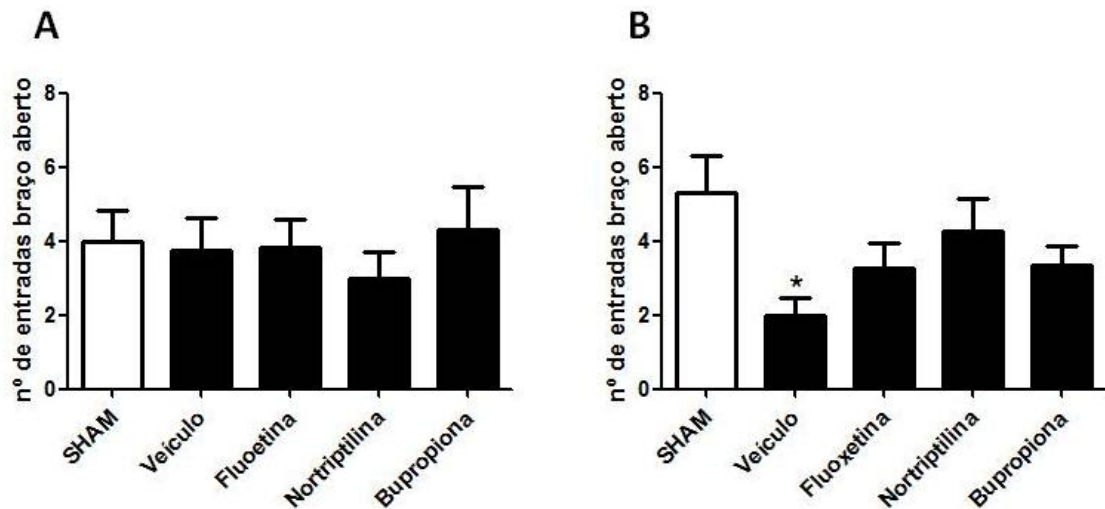
veículo apresentou menor número de entradas no braço aberto [$F(4,40)=2,99$, $p<0,05$] (gráfico 4B), bem como do número de passagens pelo centro do labirinto [$F(4,40)=3,37$, $p<0,05$] (gráfico 8B) comparado ao grupo SHAM ($p<0,05$). Os grupos não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros tempo de permanência nos braços fechados [$F(4,40)=1,41$, $p=0,25$] (gráfico 5B), tempo de permanência no centro [$F(4,40)=0,68$, $p=0,61$] (gráfico 7B) e número de entradas nos braços fechados [$F(4,40)=1,20$, $p=0,32$] (gráfico 6B).

GRÁFICO 3 – % DE TEMPO GASTO NO BRAÇO ABERTO NO TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ NOS ANIMAIS LESADOS NO FPM (A) E NA SN (B)



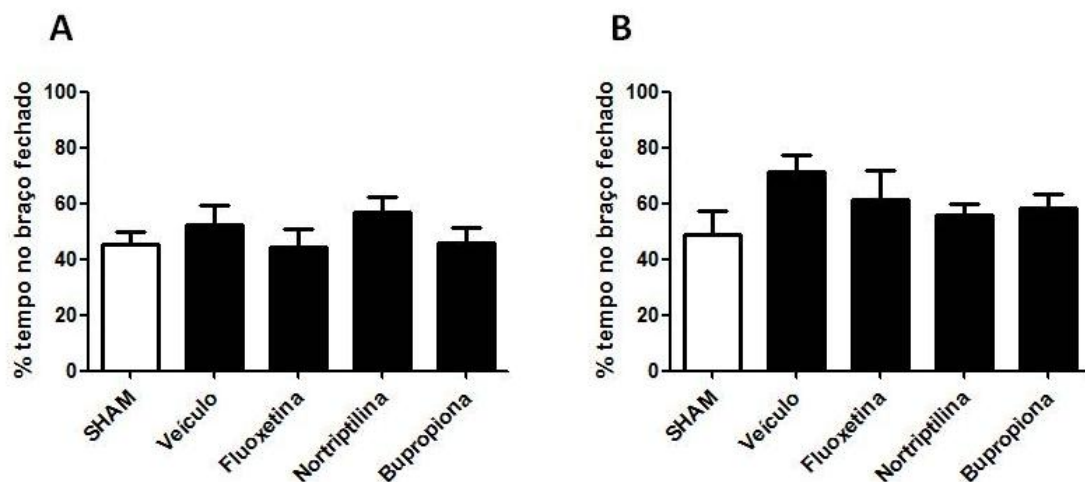
Barras brancas: SHAM; barras pretas: 6-OHDA. Os dados foram expressos como média $\pm$ SEM da porcentagem de tempo gasto pelos animais no braço aberto do labirinto em cruz 21 dias após a lesão * $p < 0,05$ comparado com o grupo SHAM (ANOVA de uma via, seguido de teste post hoc Newman-Keuls).

GRÁFICO 4 – NÚMERO DE ENTRADAS NO BRAÇO ABERTO NO TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ NOS ANIMAIS LESADOS NO FPM (A) E NA SN (B)



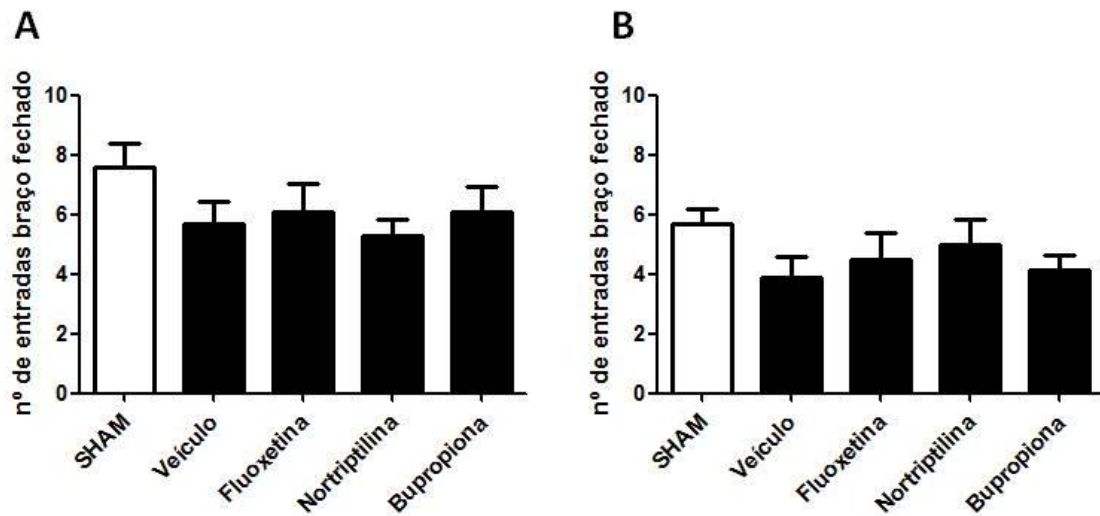
Barras brancas: SHAM; barras pretas: 6-OHDA. Os dados foram expressos como média $\pm$ SEM do número de vezes que os animais entraram no braço aberto do labirinto em cruz 21 dias após a lesão * $p < 0,05$ comparado com o grupo SHAM (ANOVA de uma via, seguido de teste post hoc Newman-Keuls).

GRÁFICO 5 – % DE TEMPO GASTO NO BRAÇO FECHADO NO TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ NOS ANIMAIS LESADOS NO FPM (A) E NA SN (B)



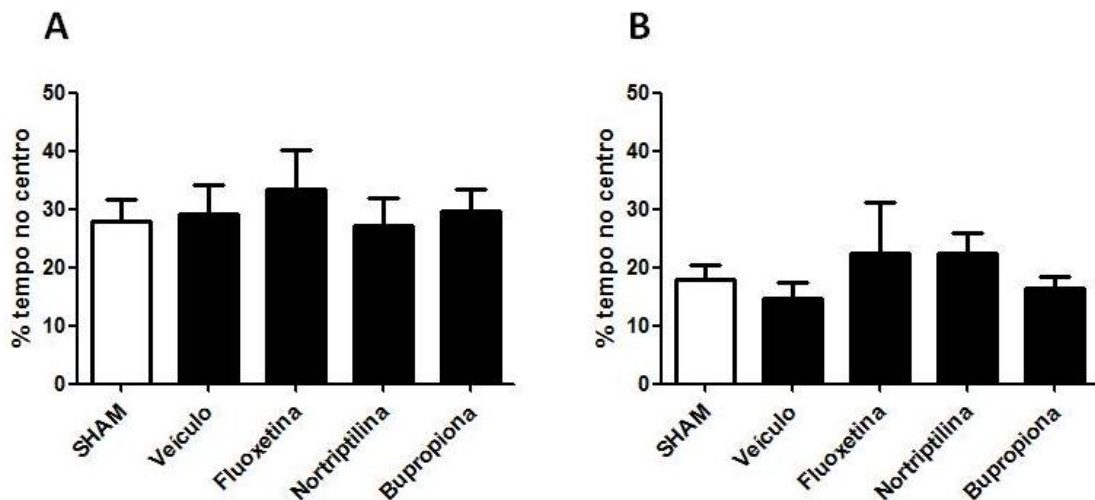
Barras brancas: SHAM; barras pretas: 6-OHDA. Os dados foram expressos como média $\pm$ SEM da porcentagem de tempo gasto pelos animais no braço fechado do labirinto em cruz 21 dias após a lesão (ANOVA de uma via).

GRÁFICO 6 – NÚMERO DE ENTRADAS NO BRAÇO FECHADO NO TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ NOS ANIMAIS LESADOS NO FPM (A) E NA SN (B)



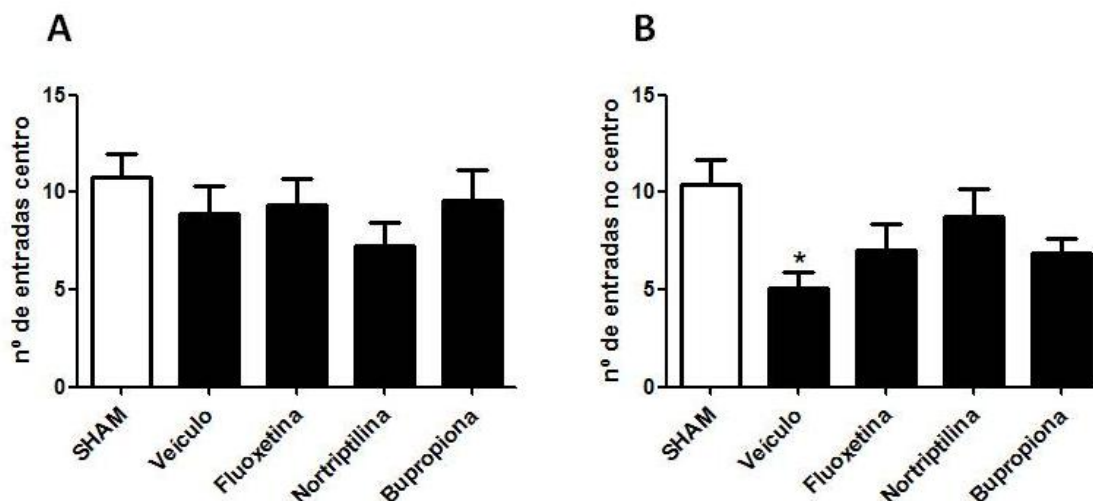
Barras brancas: SHAM; barras pretas: 6-OHDA. Os dados foram expressos como média $\pm$ SEM do número de vezes que os animais entraram no braço fechado do labirinto em cruz 21 dias após a lesão (ANOVA de uma via).

GRÁFICO 7 – % DE TEMPO GASTO NO CENTRO NO TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ NOS ANIMAIS LESADOS NO FPM (A) E NA SN (B)



Barras brancas: SHAM; barras pretas: 6-OHDA. Os dados foram expressos como média $\pm$ SEM da porcentagem de tempo gasto pelos animais no centro do labirinto em cruz 21 dias após a lesão (ANOVA de uma via).

GRÁFICO 8 – NÚMERO DE ENTRADAS NO CENTRO NO TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ NOS ANIMAIS LESADOS NO FPM (A) E NA SN (B)

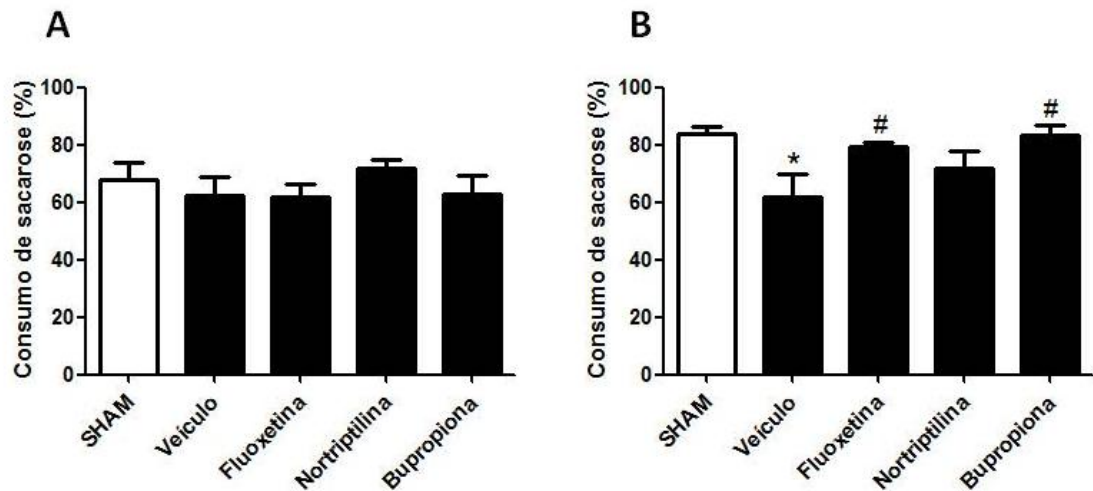


Barras brancas: SHAM; barras pretas: 6-OHDA. Os dados foram expressos como média $\pm$ SEM do número de vezes que os animais passaram pelo centro do labirinto em cruz 21 dias após a lesão. * $p < 0,05$ comparado com o grupo SHAM (ANOVA de uma via, seguido de teste post hoc Newman-Keuls).

5.3 TESTE DE PREFERÊNCIA À SACAROSE

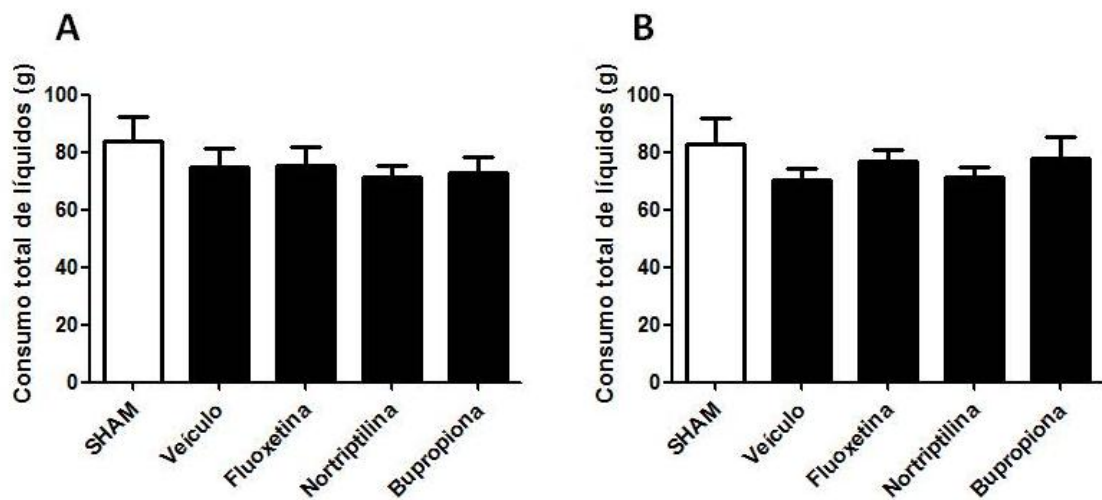
No teste de preferência à sacarose, não houve diferença na porcentagem do consumo de sacarose [$F(4,42)=1,06$, $p=0,39$] (gráfico 9A) ou no consumo total de líquidos [$F(4,52)=0,57$, $p=0,68$] (gráfico 10A), consumo de água somado ao consumo de solução de sacarose, entre os grupos dos animais lesados no FPM. Já entre os animais lesados na SN, houve menor consumo de sacarose [$F(4,38)=3,90$, $p<0,01$] (gráfico 9B) pelo grupo 6-OHDA tratado com veículo comparado ao grupo SHAM ($p<0,05$), o consumo de sacarose foi significativamente maior nos grupos 6-OHDA tratados com bupropiona e fluoxetina comparados ao grupo tratado com veículo ($p<0,05$) e o grupo 6-OHDA tratado com nortriptilina não foi diferente dos grupos 6-OHDA tratado com veículo ou SHAM. Já o consumo total de líquidos não foi diferente entre os grupos [$F(4,40)=0,68$, $p=0,61$] (gráfico 10B).

GRÁFICO 9 – CONSUMO DE SACAROSE NO TESTE DE PREFERÊNCIA À SACAROSE DOS ANIMAIS LESADOS NO FPM (A) E NA SN (B)



Barras brancas: SHAM; barras pretas: 6-OHDA. Os dados foram expressos como média $\pm$ SEM do consumo de sacarose pelos animais no teste de preferência à sacarose 26 dias após a lesão. * $p < 0,05$ comparado com o grupo SHAM, # $p < 0,05$ comparado com o grupo 6-OHDA+veículo (ANOVA de uma via, seguido de teste post hoc Newman-Keuls).

GRÁFICO 10 – CONSUMO TOTAL DE LÍQUIDOS EM GRAMAS NO TESTE DE PREFERÊNCIA À SACAROSE DOS ANIMAIS LESADOS NO FPM (A) E NA SN (B)

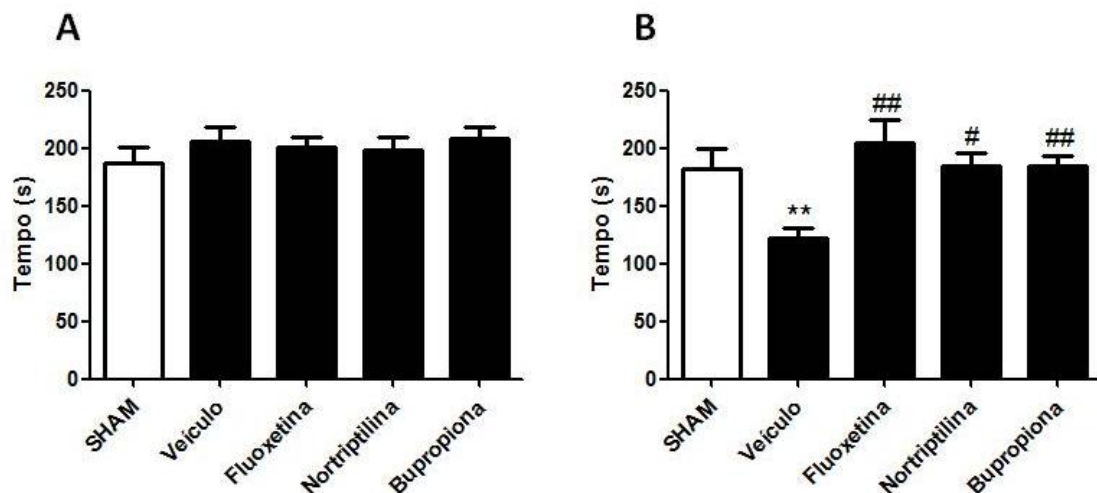


Barras brancas: SHAM; barras pretas: 6-OHDA. Os dados foram expressos como média $\pm$ SEM do consumo total de líquidos pelos animais no teste de preferência à sacarose 26 dias após a lesão (ANOVA de uma via).

5.4 TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA

No teste de natação forçada, os animais lesados no FPM não apresentaram diferença em nenhum dos parâmetros analisados: natação [$F(4,52)=0,52$, $p=0,72$] (gráfico 11A), imobilidade [$F(4,48)=1,87$, $p=0,13$] (gráfico 12A) e escalada [$F(4,52)=1,01$, $p=0,41$] (gráfico 13A).

GRÁFICO 11 – TEMPO DE NATAÇÃO NO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA DOS ANIMAIS LESADOS NO FPM (A) E NA SN (B)

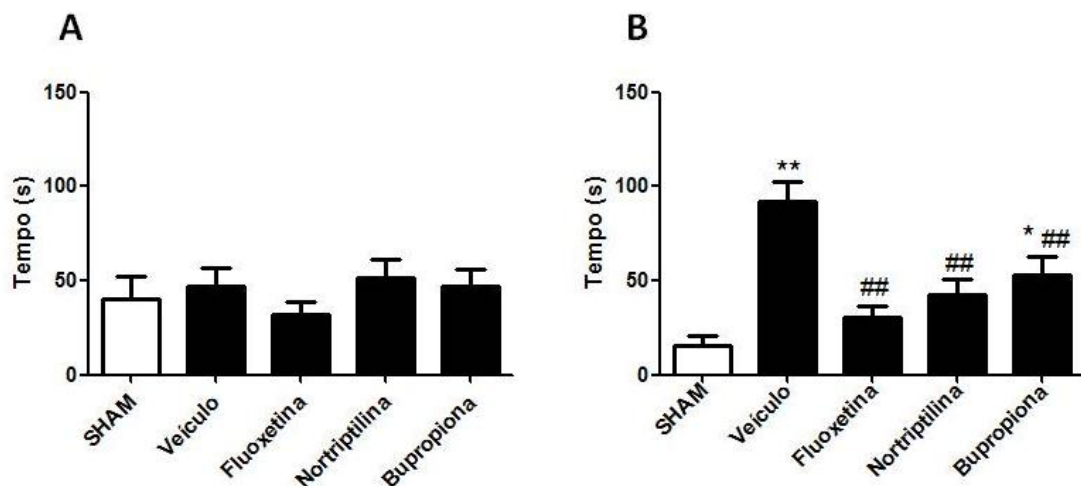


Barras brancas: SHAM; barras pretas: 6-OHDA. Os dados foram expressos como média $\pm$ SEM do tempo de natação dos animais no teste de natação forçada 33 dias após a lesão. ** $p < 0,01$ comparado com o grupo SHAM, # $p < 0,05$ comparado com o grupo 6-OHDA+veículo, ## $p < 0,01$ comparado com o grupo 6-OHDA+veículo (ANOVA de uma via, seguido de teste post hoc Newman-Keuls).

Os animais lesados na SN não apresentaram diferença no parâmetro escalada [$F(4,40)=1,26$, $p=0,30$] que pode ser visto no gráfico 13B. No parâmetro natação [$F(4,40)=5,10$, $p<0,01$] (gráfico 11B), o grupo 6-OHDA tratado com veículo apresentou menor tempo comparado aos demais grupos. Com relação a imobilidade [$F(4,40)=11,84$, $p<0,0001$] (gráfico 12B), o 6-OHDA tratado com veículo apresentou tempo de imobilidade significativamente maior que o grupo SHAM e, os grupos 6-OHDA tratados com fluoxetina e nortriptilina apresentaram menores tempos de

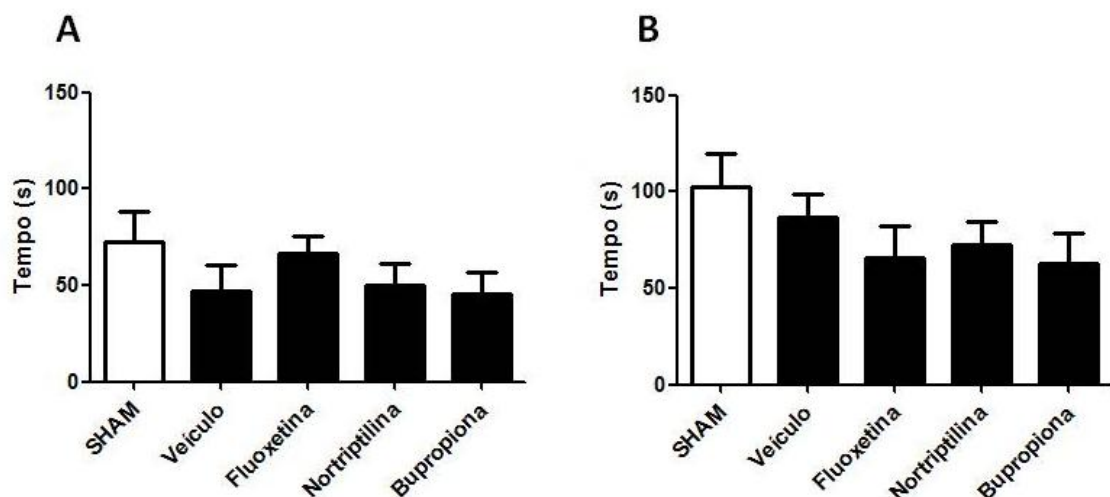
imobilidade comparados ao 6-OHDA tratado com veículo, por fim, o grupo bupropiona foi diferente dos grupos SHAM e 6-OHDA tratado com veículo.

GRÁFICO 12 – TEMPO DE IMOBILIDADE NO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA DOS ANIMAIS LESADOS NO FPM (A) E NA SN (B)



Barras brancas: SHAM; barras pretas: 6-OHDA. Os dados foram expressos como média $\pm$ SEM do tempo de imobilidade dos animais no teste de natação forçada 33 dias após a lesão. * $p < 0,05$ comparado com o grupo SHAM, ** $p < 0,01$ comparado com o grupo SHAM, ## $p < 0,01$ comparado com o grupo 6-OHDA+veículo (ANOVA de uma via, seguido de teste post hoc Newman-Keuls).

GRÁFICO 13 – TEMPO DE ESCALADA NO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA DOS ANIMAIS LESADOS NO FPM (A) E NA SN (B)



Barras brancas: SHAM; barras pretas: 6-OHDA. Os dados foram expressos como média $\pm$ SEM do tempo de escalada dos animais no teste de natação forçada 33 dias após a lesão (ANOVA de uma via).

6 DISCUSSÃO

Estudos prévios indicam que uma lesão bilateral com 6 µg de 6-OHDA na substância negra leva a um comportamento “tipo depressivo” (SANTIAGO et al 2010; SANTIAGO et al, 2014). Os testes comportamentais realizados neste trabalho iniciaram no 21º após a cirurgia com intuito de realizar uma comparação dos resultados com o desses trabalhos, já que após esse período o quadro depressivo parece já estar bem estabelecido, obtendo-se melhores respostas sobre a neuroproteção. Para que este comportamento pudesse ser avaliado neste estudo, foram utilizados os testes de preferência à sacarose e natação forçada.

O teste de preferência à sacarose é fundamental como modelo pré-clínico para avaliar o potencial de novas drogas, sendo frequentemente utilizado como medida de anedonia em roedores (WILLNER, 1997). A anedonia, ou perda de prazer por atividades anteriormente agradáveis, é um dos principais sintomas da depressão maior e um dos poucos que pode ser avaliado em animais, já que o diagnóstico de depressão muitas vezes baseia-se em relatos subjetivos dos sintomas através de questionários (SLATTERY; MARKOU; CRYAN, 2007; HALES et al, 2014). Desta maneira, a medida de anedonia em modelos animais torna-se útil para a compreensão dos circuitos neurais e vias moleculares ligados à patologia (SLATTERY; MARKOU; CRYAN, 2007).

O teste de preferência a sacarose permite avaliar dois parâmetros, o primeiro deles é a comparação do consumo de água e sacarose, onde medimos a anedonia através da redução da preferência natural do roedor pela sacarose e o segundo é o consumo total de líquidos, onde a redução do consumo total pode ser tomada como mais uma medida de prejuízo motor ou sensação de sede.

Através da comparação dos resultados obtidos no consumo de sacarose do grupo SHAM e do grupo 6-OHDA tratado com veículo, pode-se dizer que a lesão bilateral com 6-OHDA na substância negra causou um comportamento tipo depressivo, já que este grupo teve redução da preferência à sacarose quando comparado ao grupo não lesado, indicando anedonia. Já os grupos tratados com bupropiona e fluoxetina diferiram significativamente do grupo tratado com veículo,

protegendo os animais do comportamento tipo depressivo causado por esta lesão, o que pode indicar uma forte ligação dos déficits de DA e 5-HT com o estado de depressão. Com relação ao grupo tratado com nortriptilina, no parâmetro consumo de sacarose, não houve diferença com o grupo SHAM ou com o grupo lesado tratado com veículo. Ou seja, a nortriptilina não conseguiu prevenir completamente o aparecimento do comportamento tipo depressivo causado pela 6-OHDA. A partir destes dados, duas hipóteses podem ser levantadas: 1) a nortriptilina não foi capaz de proteger completamente os neurônios noradrenérgicos da lesão causada pela infusão da 6-OHDA; 2) os déficits de noradrenalina ocasionados pela degeneração dos neurônios noradrenérgicos não estão fortemente relacionados com a fisiopatologia da depressão na DP. Este impasse pode ser resolvido através de dosagens posteriores de noradrenalina em regiões cerebrais. Entretanto, o mesmo comportamento não foi observado nos animais lesados no FPM. O grupo 6-OHDA+veículo não foi significativamente diferente do grupo SHAM no consumo de solução de sacarose, indicando que a lesão bilateral (6 µg) no FPM não foi suficiente para causar um comportamento do tipo depressivo, desta maneira, impossibilitando a observação da possível neuroproteção pelas drogas utilizadas.

Com relação ao consumo total de líquidos, é importante ressaltar que não houve diferença significativa entre os grupos, tanto nos animais lesados no FPM como nos lesados na SN. Isso indica que a redução do consumo de sacarose pelos animais lesados na SN ocorreu devido a anedonia causada pela injeção da 6-OHDA e não como consequência de um possível déficit motor (SKALISZ et al, 2002).

Outro teste utilizado para avaliar o comportamento tipo depressivo dos animais foi o teste de natação forçada que é conhecido como um “teste de desespero comportamental”. Ele foi desenvolvido por Porsolt para avaliar a eficácia clínica de drogas antidepressivas (PORSOLT et al, 1978). O pré-teste é tido como um estressor o qual leva ao estado de desespero comportamental, já que o animal é colocado em uma situação da qual não consegue escapar (PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1978). Ao longo do teste, os animais adotam uma postura de imobilidade em que fazem apenas os movimentos necessários para manter a cabeça fora da água, drogas antidepressivas são capazes de reduzir esse período (CASTAGNÉ; PORSOLT; MOSER, 2009; CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005).

O comportamento tipo depressivo observado no teste de preferência à sacarose nos animais lesados na SN foi confirmado através da medida do tempo de imobilidade no teste de natação forçada. O grupo lesado tratado com veículo apresentou tempo de imobilidade significativamente maior que o grupo SHAM. Os grupos 6-OHDA tratados com fluoxetina, nortriptilina e bupropiona tiveram tempo de imobilidade significativamente menor que o grupo tratado com veículo, podendo indicar que as três drogas protegeram os animais do comportamento tipo depressivo. Curiosamente, o grupo 6-OHDA+bupropiona também apresentou diferença significativa com o grupo SHAM, podendo sugerir que a bupropiona não foi capaz de proteger completamente de um comportamento de depressão ocasionado pela neurotoxina, o que não condiz com o observado no teste de preferência à sacarose, em que seus resultados indicam que a bupropiona previne o comportamento de depressão. Esses dados indicam a necessidade de dar continuidade ao estudo, já que existe a possibilidade de um n maior traçar um melhor perfil de neuroproteção da bupropiona.

Além da imobilidade, também são avaliados no teste de natação forçada os comportamentos de natação e escalada. O grupo 6-OHDA tratado com veículo teve um período de natação significativamente menor que o grupo SHAM. Essa diferença manteve-se presente também quando o grupo 6-OHDA+veículo foi comparado com os grupos tratados com fluoxetina, bupropiona e nortriptilina. Esse fato é somado ao comportamento de imobilidade, demonstrando que o grupo não lesado (SHAM) ou lesado tratado com alguma das drogas (fluoxetina, bupropiona ou nortriptilina), apresenta-se mais ativo diante de uma situação sem possibilidade de fuga.

O teste de natação forçada permite ainda diferenciar drogas com mecanismo de ação noradrenérgico de serotoninérgico, a primeira aumenta o tempo de escalada, enquanto que a segunda aumenta o tempo de natação (BOGDANOVA et al, 2013). Entretanto, no presente estudo não foi possível demonstrar diferença entre os comportamentos de escalada e natação entre as drogas noradrenérgica (noradrenalina) e serotoninérgica (fluoxetina) testadas.

Novamente, não houve diferença significativa entre os grupos SHAM e 6-OHDA+veículo injetada no FPM nos parâmetros imobilidade, natação e escalada, confirmando que a lesão nessa região foi insuficiente para causar o comportamento

tipo depressivo nos animais, impossibilitando a relação dos inibidores da recaptação de neurotransmissores monoaminérgicos com o comportamento de depressão.

Estes dados corroboram com estudos realizados por Santiago e colaboradores (2010, 2014, 2015), em que a lesão bilateral na SN causa aumento significativo do tempo de imobilidade no teste de natação forçada e diminuição significativa do consumo de sacarose sem que ocorra diminuição do consumo total de líquidos comparado ao grupo SHAM, do mesmo modo que foi demonstrado por Beppe e colaboradores (2015) utilizando lesão unilateral. Além disso, observaram também redução de 5-HT no hipocampo, reforçando a ligação de déficits de 5-HT com a fisiopatologia da depressão e redução de DA no estriado, concordando com Tadaiesky et al (2008), que além deste, ainda demonstrou redução de 5-HT no estriado. Este fato concorda mais uma vez com o presente estudo, em que o tratamento com fluoxetina (inibidor da recaptação de serotonina) leva a um tempo de imobilidade significativamente menor e consumo de sacarose maior que os animais lesados tratados apenas com veículo.

Curiosamente, um estudo realizado por Bonito-Oliva e colaboradores (2014) demonstrou que o pré-tratamento com desipramina (inibidor da recaptação de noradrenalina) i.p. minutos antes da injeção de 6-OHDA, assim como o que foi realizado com nortriptilina neste estudo, não protege os animais de comportamentos tipo depressivo ou de ansiedade. Em contrapartida, a reboxetina, também inibidor da recaptação de NA, quando administrada i.p. é capaz de reverter quadros de depressão e ansiedade já estabelecidos. Estes dados são contrários ao que foi demonstrado no teste de natação, em que a nortriptilina apresentou tempo de imobilidade reduzido comparado aos animais tratados com veículo. Entretanto, concordam com o que foi demonstrado no teste de preferência à sacarose. Um estudo realizado através da comparação de pacientes deprimidos e não-deprimidos com a metodologia PET, utilizando um ligante com afinidade por transportadores de noradrenalina e dopamina demonstrou menor ligação no *locus coeruleus* e várias regiões do sistema límbico (tálamo, amígdala e estriado ventral) de pacientes deprimidos (REMY et al, 2005). Este e outros estudos demonstram uma ligação dos déficits de neurotransmissores monoaminérgicos com a depressão.

Além da participação da NA e da 5-HT, a hipótese do déficit de DA estarem envolvidos na fisiopatologia da depressão é suportada pelo uso de agonistas dopaminérgicos, como o pramipexol auxiliarem na melhora da depressão na DP (BARONE et al, 2010).

O teste do labirinto em cruz elevado foi utilizado para avaliar se a lesão com 6-OHDA causou comportamento de ansiedade e quais as drogas preveniram este comportamento. O teste do labirinto em cruz permite avaliar um tipo de comportamento chamado de conflito de aproximação-esquiva (*approach-avoid conflict*), onde o animal é deixado durante 5 minutos em um ambiente desconhecido, ocorrendo um conflito entre explorar o ambiente e a tendência de fuga de regiões abertas. Este teste foi validado através da mudança de comportamento diante de drogas ansiolíticas e ansiogênicas (LISTER, 1987).

Neste teste, as entradas e tempo gasto nos braços abertos ou fechadas são medidas da ansiedade, quanto mais ansioso o animal estiver, menor será o número de entradas e tempo que ele permanecerá nos braços abertos (HANDLEY; MITHANI, 1984; PELLOW; FILE, 1986).

Os animais lesados na SN tratados com veículo obtiveram uma porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do labirinto, número de entradas nos braços abertos e no centro significativamente menores que os obtidos pelos animais SHAM, indicando que a lesão bilateral com 6 µg da toxina foi capaz de induzir um estado de ansiedade nos animais. Os animais tratados com fluoxetina gastaram significativamente menos tempo nos braços abertos que os animais SHAM, sugerindo que o tratamento com fluoxetina não foi capaz de evitar que os animais tivessem comportamento de ansiedade. Já os animais tratados com bupropiona ou nortriptilina não foram diferentes do grupo SHAM ou do grupo tratado com veículo. Isto indica que não conseguiram evitar que o estado de ansiedade se instalasse por completo.

Os dados estão de acordo com outros, demonstrado que a injeção intranigral da toxina é capaz de produzir comportamentos de ansiedade nos animais. De acordo com Taidaesky et al (2008) uma lesão intraestriatal é capaz de produzir comportamento de ansiedade 3 semanas após a infusão, assim como verificamos

nesse estudo. Esse comportamento foi observado através da redução significativa do número de entradas nos braços abertos dos animais lesados quando comparado ao SHAM, estando de acordo com Beppe et al (2015) que obteve ainda redução da porcentagem de tempo gasto no braço aberto.

Com relação aos comportamentos observados nos animais lesados no FPM, podemos inferir que a injeção bilateral de 6-OHDA não foi capaz de causar comportamento tipo depressivo ou de ansiedade nos animais testados, contrapondo-se a um estudo recente (CARVALHO et al, 2013), assim como dados anteriores, ainda não publicados, do nosso grupo de pesquisa, em que a lesão bilateral no FPM foi capaz de causar um comportamento tipo depressivo nos animais (VECCHIA, 2013; SCHAMNE, 2014). Carvalho e colaboradores (2013) obtiveram comportamento tipo depressivo, avaliado pela preferência à sacarose, através de uma lesão com uma dose maior (12 µg) unilateral, mas não comportamento de ansiedade (não houve diferenças significativas entre os grupos lesados e SHAM no teste de labirinto em cruz elevado). Entretanto, a concentração de sacarose de 3% utilizada por Carvalho foi muito superior à utilizada neste estudo (0,5%), questionando se a concentração de sacarose menor foi suficiente para diferenciar os animais com comportamento de depressão. Por essa razão, foi utilizada uma maior concentração de sacarose (1%) no teste realizado com os animais lesados na SN. Ainda, observaram que o tratamento com bupropiona ou paroxetina (inibidor da recaptação de 5-HT) não foi capaz de reverter o quadro depressivo induzido pela 6-OHDA injetada no FPM.

Para avaliar o comprometimento motor dos animais, foi utilizado o teste de campo aberto, o qual consiste em uma arena quadrada dividida em quadrados menores. Neste teste foi possível observar o número de passagens através dos quadrados com as patas traseiras (ambulação) e a exploração do ambiente através da contagem do número de vezes que o animal ficava apoiado apenas nas patas traseiras (*rearing*). O teste foi realizado para garantir que os comportamentos dos animais lesados, como maior tempo de imobilidade no teste de natação, redução do consumo de sacarose e menor porcentagem de tempo gasto nos braços abertos, ocorressem devido aos comportamentos de depressão e ansiedade provenientes da lesão e não ocasionados por comprometimento motor.

Como esperado, não houve diferença significativa entre os grupos lesados no FPM e SN no parâmetro ambulação, bem como no parâmetro *rearing* nos animais lesado no FPM. Entretanto, houve uma pequena diferença, porém significativa, no *rearing* quando a ANOVA de uma via foi realizada. Curiosamente, quando esse parâmetro foi analisado através do teste *post hoc* de escolha, o Newman Keuls, não foi possível identificar entre quais grupos ocorria essa diferença. Apesar deste fato, acredita-se que o comprometimento motor não tenha ocorrido, baseado na ausência de diferença na ambulação, no consumo total de líquidos semelhante entre os grupos e do número de entradas nos braços fechados do labirinto em cruz.

Segundo Hanrott et al (2006), a neurotoxicidade da 6-OHDA é causada através de sua auto oxidação no meio extracelular e estresse oxidativo através de seus produtos gerados. O estudo foi realizado utilizando uma linhagem de células catecolaminérgicas PC12 e o mecanismo de estresse oxidativo confirmado através da pré-incubação com catalase que impediu a toxicidade, sugerindo uma forte ligação do peróxido de hidrogênio com a degeneração dos neurônios. O estudo aponta que a toxicidade não ocorre através da entrada da toxina por transportadores de DA e NA, uma vez que foram utilizados GBR -12909 (inibidor do transportador de DA) e nisoxetina (inibidor do transportador de NA) sem que reduzissem a toxicidade da 6-OHDA. O mesmo não foi observado no presente estudo já que o uso de bupropiona e nortriptilina impediu ao menos em parte a observação de sintoma tipo depressivo nos testes comportamentais, sugerindo que essas drogas podem preservar neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos através do bloqueio de transportadores. Esses podem indicar que além dos mecanismos apontados por Hanrott, o mecanismo de toxicidade da 6-OHDA pode ainda abranger sua entrada através desses transportadores. Os resultados obtidos podem ainda justificar o uso de nortriptilina ou desipramina em diversos estudos para que os neurônios noradrenérgicos sejam preservados, sendo possível estudar apenas o efeito da degeneração dos neurônios dopaminérgicos.

A explicação para que lesões com a mesma toxina, ambas na mesma quantidade (6 µg), causarem comportamentos diferentes pode estar no fato de alvos diferentes de lesões (FPM ou SN neste caso) atinjam áreas vizinhas com menor ou maior intensidade. É conhecido que na DP a degeneração de neurônios

dopaminérgicos ocorre não só na via nigroestriatal, como também na área tegmental ventral que projeta-se para o estriado ventral (núcleo accumbens) e na área retrorubral que envia seu axônios para o putâmen ventrocaudal (JELLINGER, 1987).

Foi demonstrado que lesões unilaterais através da injeção de 6-OHDA no FPM promovem destruição da via nigroestriatal bem como da área tegmental ventral (PERESE et al, 1989), o que também é observado em lesões bilaterais as quais ocasionam prejuízos motores e de cognição (WHISHAW; DUNNETT, 1985). Já lesões provocadas na SN são conhecidas por serem mais seletivas com depleção moderada de DA, afetando mais a via nigroestriatal e em menor grau a área tegmental ventral (CARMAN; GAGE; SHULTS, 1991; VAN OOSTEN; COOLS, 1999). Um estudo realizado por Drui e colaboradores (2013) comparou lesões bilaterais na SN e na VTA com o objetivo de correlacioná-las com os sintomas não motores da DP. Através de testes comportamentais, como natação forçada e labirinto em cruz, os mesmos executados no presente estudo, concluíram que lesões na SN levam a comportamentos de depressão e ansiedade, porém os mesmo comportamentos não são vistos em animais lesados na VTA. Estes dados concordam com nosso estudo, onde animais lesados na SN apresentaram comportamentos de depressão e ansiedade, enquanto que os animais lesados no FPM, lesão que atinge a VTA de maneira mais agressiva que a lesão na SN, não foi capaz de provocar estes comportamentos.

Além disso, estudos mostram que a lesão bilateral do FPM provoca sintomatologia motora grave com acinesia semelhante ao que ocorre em estágios mais avançados da DP (UNGERSTEDT, 1971), enquanto que a injeção na SN causa uma lesão mais branda, simulando estágios precoces da doença onde são observados os sintomas não-motores (DEUMENS; BLOKLAND; PRICKAERTS, 2002). Através desses dados, podemos sugerir que a lesão no FPM está mais ligada ao prejuízo motor do que aos sintomas não motores e que a concentração de toxina utilizada nesse estudo (6 µg) foi insuficiente para causar este prejuízo, uma vez que os primeiros sintomas motores ocorrem apenas quando cerca de 50% dos neurônios dopaminérgicos da via são destruídos e ocorre 80% de depleção de DA (KIRIK; ROSENBLAD; BJORKLUND, 1998).

Por fim, é esperado que a continuidade do estudo através do aumento do número de animais lesados na SN possa sanar algumas das dúvidas que persistem sobre a participação dos neurotransmissores monoaminérgicos nos sintomas não motores da DP induzida por 6-OHDA.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, a lesão bilateral pela infusão da toxina 6-OHDA na SN foi capaz de causar sintomas não motores da DP, como depressão e ansiedade, sem que houvesse prejuízo motor em um modelo animal, enquanto que a lesão no FPM não causou os mesmos sintomas. A administração em dose única de inibidores da recaptação de neurotransmissores monoaminérgicos foi capaz de preservar neurônios evitando que comportamentos de depressão e ansiedade ocorressem após a lesão com 6-OHDA na SN, de acordo com o que foi observado nos testes comportamentais. Entretanto, não foi possível traçar o perfil de neuroproteção das drogas quando a lesão foi realizada no FPM, já que os sintomas não motores não foram obtidos neste caso. Através da comparação de animais lesados na SN tratados com veículo com os tratados com as drogas, sugere-se que ao menos um dos mecanismos de entrada da 6-OHDA em neurônios monoaminérgicos seja por meio dos transportadores desses neurotransmissores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHLSSKOG, J. E.; MUENTER, M. D. Frequency of levodopa dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. **Movement disorders**, v. 16, p. 448-458, 2001.

ALEXANDER, G. E.; CRUTCHER, M. D. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. **Trends Neuroscience**, v. 13, p. 266-271, 1990.

ALEXANDER, G. E.; DE LONG, M. R.; STRICK, P. L. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. **Annual review of Neuroscience**, v. 9, p. 357-381, 1986.

AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders - DSM-5**. 5^a ed. Washington: American Psychiatric Association, 2013.

ANDLIN-SOBOCKI, P. et al. Cost of disorders on the brain in Europe. **European Journal of Neurology**, v.12, p. 1-27, 2005.

BARONE, P. et al. Pramipexole for the treatment of depressive symptoms in patients with Parkinson's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **The Lancet Neurology**, v. 9., n.6, p. 573-580, 2010.

BEAULIEU, J. M.; GAINETDINOV, R. R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 1, p. 183-216, 2011.

BEPPE, G. J. et al. The aqueous extract of *Albizia adianthifolia* leaves attenuates 6-hydroxydopamine-induced anxiety, depression and oxidative stress in rat amygdala. **Complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 1-13, 2015.

BERARDELLI, A. et al. Pathophysiology of bradykinesia in Parkinson's disease. **Brain**, v. 124, p. 2131-2146, 2001.

BEST, J. A.; NIJHOUT, H. F.; REED, M. C. Homeostatic mechanisms in dopamine synthesis and release: a mathematical model. **Theoretical biology and medical modeling**, v. 6, n. 1, p. 1-20, 2009.

BETARBET, R.; SHERER T. B.; GREENAMYRE, J. T. Animal models of Parkinson's disease. **Bioessays**, v. 24, n. 4, p. 308-318, abr. 2002.

BLESA, J. et al. Classic and new animal models of Parkinson's disease. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, n. 845-618, mar. 2012.

BLUM, D. et al. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 65, n. 2, p. 135-172, 2001.

BOGDANOVA, O. V. et al. Factors influencing behavior in the forced swim test. **Psychology & Behavior**, v. 118, p. 227-239, 2013.

BONITO-OLIVA, A.; MASINI, D.; FISONE, G. A mouse modelo of non-motor symptoms in Parkinson's disease: focus on pharmacological interventions targeting affective dysfunctions. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 8, n. 290, p. 1-12, 2014.

BRAAK, H. et al. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. **Cell Tissue Research**, v. 318, n. 1, p. 121-134, out. 2004.

BRICHTA, L.; GREENGARD, P.; FLAJOLET, M. Advances in the pharmacological treatment of Parkinson's disease: targeting neurotransmitter systems. *Trends neuroscience*, v. 36, n. 9, p. 543-554, 2013.

CAILLAVA-SANTOS, F.; MARGIS, R.; RIEDER, C. R. M. Wearing-off in Parkinson's disease: neuropsychological differences between on and off periods. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 11, p. 1175-1180, 2015.

CAMPELLO, L. et al. The ubiquitin-proteasome system in retinal health and disease. **Molecular Neurobiology**, v. 47, n. 2, p. 790-810, 2013.

CARLSSON, A; LINDQVIST, M.; MAGNUSSON, T. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. **Nature**, v. 180, n. 4596, p. 1200, 1957.

CARLSSON, A. The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. **Pharmacological Reviews**, v. 11, n. 2 (parte 2), p. 490-493, jun 1959.

CARMAN, L. S.; GAGE, F. H.; SHULTS, C. W. Partial lesion of the substantia nigra: Relation between extent of lesion and rotational behavior. **Brain research**, v. 553, n. 2, p. 275-283, 1991.

CAROD-ARTAL, F. J. et al. Anxiety and depression: main determinants of healthrelated quality of life in Brazilian patients with Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 14, n. 2, p. 102-108, 2008.

CARVALHO, M. M. et al. Behavioral characterization of the 6-hydroxidopamine model of Parkinson's disease and pharmacological rescuing of non-motor deficits. **Molecular degeneration**, v. 8, n. 14, p. 1-11, 2013.

CASTAGNÉ, V.; PORSOLT, R. D.; MOSER, P. Use of latency to immobility improves detection of antidepressant-like activity in the behavioral despair test in the mouse. **European Journal of pharmacology**, v. 616, n. 13, p. 128-133, 2009.

CHAUDHURI, K. R.; HEALY, D. G.; SCHAPIRA, A. H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. **Lancet Neurology**, v. 5, n. 3, p. 235-245, 2006.

CHAUDHURI, K. R.; SCHAPIRA A. H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. **Lancet Neurology**, v. 8, n. 5, p. 464-474, 2009.

CHEN, P. et al. Antidepressant treatment of veterans with Parkinson's disease and depression: analysis of a national sample. **Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology**, v. 20, n. 3, p. 161-165, 2007.

CLAYTON, D. F.; GEORGE, J. M. Synucleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. **Journal Neuroscience Research**, v. 58, n. 1, p. 120-129, 1999.

CLARKE, C. E.; GUTTMAN, M. Dopamine agonist monotherapy in Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 360, n. 9347, p. 1767-1769, 2002.

COLLIER, T. J.; SOTWELL, C. E. Therapeutic potential of nerve growth factors in Parkinson's disease. **Drugs aging**, v. 14, n.4, p. 261-287, 1999.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA). **Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA**. Brasília, 2013.

CRYAN, J. F.; VALENTINO, R. J. ; LUCKI, I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 2, n. 4 5, p. 547-569, 2005.

CUMMINGS, J. L. Depression and Parkinson's disease: A review. **The American journal of Psychiatry**, v. 149, n. 4, 443-454.

DA CUNHA, C. et al. Hemiparkinsonian rats rotate toward the side with the weaker dopaminergic neurotransmission. **Behavioural Brain Research**, v. 189, n. 2, p. 364-372, jun. 2008.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, v. 39, n. 6, p. 889-909, set. 2003.

DE ANDRADE, L. A. F.; FERRAZ, H. B. Inibição enzimática, neuroproteção e tratamento da Doença de Parkinson. **Revista de Neurociências**, v. 5, n. 1, p. 27-33, 1997.

DELENCLOS, M. et al. Biomarkers in Parkinson's disease: Advances and strategies. **Parkinsonism & related disorders**, 2015.

DE RIJK, M. C. et al. Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe: the EUROPARKINSON collaborative study. European Community Concerted Action on the Epidemiology of Parkinson's disease. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 62, n. 1, p. 10-15, 1997.

DE SANT, C. R. et al. Abordagem fisioterapêutica na doença de parkinson. **Revista Brasileira de Ciências do Envelhecimento Humano**, v. 5, n. 1, p. 80-89, 2008.

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

DODER, M. et al. Tremor in Parkinson's disease and serotonergic dysfunction: an 11C-WAY 100635 PET study. **Neurology**, v. 60, n. 4, p. 601-605, 2003.

DRUI, G. et al. Loss of dopaminergic nigrostriatal neurons accounts for the motivational and affective deficits in Parkinson's disease. **Molecular psychiatry**, v. 19, n. 3, 358-367, 2013.

EMBORG, M. E. Evaluation of animals models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. **Journal of neuroscience methods**, v. 139, n. 2, p. 121-143, out. 2004.

ESKOW- JAUNARAJ, K. L. et al. Potential mechanisms underlying anxiety and depression in Parkinson's disease: consequences of L-DOPA treatment. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 3, p. 556-564, 2011.

FAUL, F., et al. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. **Behavior Research Methods**, v. 39, 175-191, 2007.

FAVA, M. et al. 15 years of clinical experience with Bupropion HCl: from Bupropion to Bupropion SR to Bupropion XL. **Primary care Companion to the Journal of clinical psychiatry**, v. 7, n. 3, p. 106-113, 2005.

FERREIRA, F. D. et al. Doença de Parkinson: Aspectos fisiopatológicos e terapêuticos. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 3, n.2, p. 221-228, 2010.

FERRO, M. M. et al. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: Histological, neurochemical, motor and memory alterations. **Journal of neuroscience methods**, n.148, p. 78-87, 2005.

FRISINA, P. G. Depression in parkinson's disease: health risks, etiology and treatment options. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 4, n. 1, p. 81-91, 2008.

GEORGE, J. M. et al. Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. **Neuron**, v. 15, n. 2, p. 361-372, 1995.

GHIKA, J.; BOGOUSSLAWSKY, J. Presymptomatic hypertension is a major feature in the diagnosis of progressive supranuclear palsy. **Archives of neurology**, v. 54, n. 9, p. 1104-1108, 1997.

GILADI, N. et al. Hemiparkinsonism-hemiatrophy syndrome: clinical and neuroradiologic features. **Neurology**, v. 40, p. 1731-1734, 1990.

GILLMAN, P. K. Tricyclic antidepressant pharmacology and therapeutic drug interactions updated. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, n. 6, p. 737-748, 2007.

GOLAN, D. E. et al. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

HADDJERI, N. et al. Neuroadaptations of the 5-HT system induced by antidepressant treatments: Old and new strategies. **Journal of allergy disorders and therapy**, v. 1, n. 001, p. 1-11, 2014.

HALES, C. A. et al. Modelling cognitive affective biases in major depressive disorder using rodents. **British journal of Pharmacology**, v. 171, p. 4524-4538, 2014.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'- motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 327, n. 1, p. 1-5, 1984.

HANNA, K. K.; CRONIN-GOLOMB, A. Impact of anxiety on quality of life in Parkinson's disease. **Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 21, n. 4, p. 413-419, 2009.

HANROTT, K. 6-Hydroxydopamine-induced apoptosis is mediated via extracellular auto-oxidation and caspase 3-dependent activation of protein kinase C δ *. **The journal of biological chemistry**, v. 281, n. 9, p. 5373-5382, 2006.

HARDY, J. et al. Genetics of Parkinson's disease and parkinsonism. **Annals of Neurology**, v. 60, n. 4, p. 389-398, out. 2006.

HEINONEN, E. H.; MYLLYLÄ, V. Safety of selegiline (Deprenyl) in the treatment of Parkinson's disease. **Drug safety**, v. 19, n. 1, p. 11-22, 1998.

HELLY, M. A. et al. Sydney multicentre study of parkinson's disease: non-L-dopa-responsive problems dominate at 15 years. **Movement disorders Journal**, v. 20, n. 2, p. 190-199, 2005.

HERRERO, M. T.; PAGONABARRAQA, J.; LINAZASORO, G. Neuroprotective role of dopamine agonists: evidence from animal models and clinical studies. **Neurologist**, v. 17, n. 6, p. 54-66, 2011.

HUOT, P.; FOX, S. H.; BROTHIE, J. M. Monoamine reuptake inhibitors in Parkinson's disease. **Parkinson's disease**, v. 2015, p 1 71, 2015.

JELLINGER, K. The pathology of parkinsonism. **In Movement Disorders**, v. 2, p. 124-165, 1987.

JELLINGER, K. New developments in the pathology of Parkinson's disease. **Advances in Neurology**, v. 53, p. 1-16, 1990.

KAAKKOLA, S. Problems with the present inhibitors and a relevance of new and improved COMT inhibitors in Parkinson's disease. **International review of neurobiology**, v. 95, p. 207-225, 2010.

KANO, O. et al. Neurobiology of depression and anxiety in Parkinson's disease. **Parkinson's Disease**, v. 2011, n. 143-147, 2011.

KEIJERS, N. L.; HORSTINK, M. W.; GIELEN, S. C. Online monitoring of dyskinesia in patients with Parkinson's disease. **IEEE engineering in medicine and biology magazine**, v. 22, n. 3, p. 96-103, 2003.

KING, J. M. et al. L-Dihydroxyphenylalanine modulates the steady-state expression of mouse striatal tyrosine hydroxylase, aromatic L-amino acid decarboxylase, dopamine and its metabolites in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Life Sciences**, v.89, p. 638-643, 2011.

KIRIK, D.; ROSENBLAD, C.; BJÖRKLUND, A. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastratial 6 hydroxydopamine in rat. **Experimental neurology**, v. 152, n. 2, 259-277, 1998.

LANG, A. E.; LOZANO, A. M. Parkinson's disease. First of two parts. **New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 15, p. 1044-1053, 1998.

LANGSTON, J. W.; IRWIN, I. MPTP: current concepts and controversies. **Clinical neuropharmacology**, v. 9, p. 485-507, 1986.

LANSBURY JUNIOR, P. T.; BRICE, A. Genetics of Parkinson's disease and biochemical studies of implicated gene products. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 12, n. 3, p. 299-306, jun. 2002.

LE, W.; SAYANA, P.; JANKOVIC, J. Animal models of Parkinson's disease: A gateway to therapeutics? **Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental Neuro Therapeutics**, v. 11, n. 1, p. 92-110, 2014.

LEE, E. S. et al. The role of 3-O-methyldopamine the side effects of L-DOPA. **Neurochemical Research**, v. 33, n. 3, p. 401-411, 2007.

LICKER, V. et al. Proteomics in human Parkinson's disease research. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 1, p. 10-29, 2009.

LILIENFELD, D. E.; PERL, D. P. Projected neurodegenerative disease mortality in the United States, 1990-2040. **Neuroepidemiology**, v. 12, n. 4, p. 219-228, 1993.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, p. 180-185, 1987.

LOTHARIUS, J.; BRUNDIN, P. Impaired dopamine storage resulting from α -synuclein mutations may contribute to the pathogenesis of Parkinson's disease. **Human Molecular Genetics**, v. 11, n. 20, p. 2395-2407, 2002.

MARTIN, G. E.; MYERS, R. D.; NEWBERG, D. C. Catecholamine release by intracerebral perfusion of 6 hydroxydopamine and desipramine. **European Journal of Pharmacology**, v. 36, n. 2, p. 299-311, 1976.

MASSANO, J. Doença de Parkinson: Atualização Clínica. **Acta Médica Portuguesa**, v. 24, s. 4, p. 827-834, 2011.

MASSART, R.; MONGEAU, R.; LANFUMEY, L. Beyond the monoaminergic hypothesis: neuroplasticity and epigenetic changes in a transgenic mouse model of

depression. **Philosophical transactions of the royal society B: Biological Sciences**, v. 367, n. 1601, p. 2485-2494, 2012.

MATOS, A. F. S. et al. Processos neurodegenerativos – Parte II L-DOPA na Doença de Parkinson: riscos e benefícios. **Revista Brasileira de Neurologia Psiquiátrica**, v. 2, n. 3, p. 85-88, 1998.

MAZZIO, E. A.; REAMS, R. R.; SOLIMAN, K. F. The role of oxidative stress, impaired glycolysis and mitochondrial respiratory redox failure in the cytotoxic. **Brain Research**, v. 1004, n. 1-2, p. 29-44, abr. 2004.

MENZA, M. A.; ROBERTSON-HOFFMAN, D. E.; BONAPACE, A. S. Parkinson's disease and anxiety: comorbidity with depression. **Biological Psychiatry**, v. 34, n. 7, p. 465-470, out. 1993.

MISSALE, C. et al. Dopamine receptors: From structure to function. **Physiological Reviews**, v. 78, n. 1, p. 189-225, 1998.

MIYASAKI, J. M. et al. Practice parameter: Initiation of treatment for Parkinson's disease: an evidence-based review: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. **Neurology**, v. 58, n. 1, p. 11-17, 2002.

MURAI, T. et al. In vivo evidence for differential association of striatal dopamine and midbrain serotonin systems with neuropsychiatric symptoms in Parkinson's disease. **The Journal of Neuropsychiatry & Clinical Neurosciences**, v. 13, n. 2, p. 222-228, 2001.

NÈGRE-PÈGES, L. et al. Anxious and depressive symptoms in Parkinson's disease: the French cross-sectional DoPAMiP study. **Movement disorders**, v. 25, n. 2, p. 157-166, 2010.

OBESO, J. A. et al. The basal ganglia and disorders of movement: Pathophysiological mechanisms. **News in physiological sciences**, v. 17, p. 51-55, 2002.

OLANOW, C. W. et al. Factors predictive of the development of levodopa-induced dyskinesia and wearing-off in Parkinson's disease. **Movement disorders**, v. 28, n. 8, p. 1064-1071, 2013.

PAPP, M.; WILLNER, P.; MUSCAT, R. An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. **Psychopharmacology**, v. 103, n. 2, p. 255-259, 1991.

PARADELA, E. M. P. Depressão em idosos. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 10, n. 2, p. 31-40, 2011.

PARKINSON, J. An essay on the shaking palsy. **Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences**, v. 14, n. 2, p. 223-236, 1817

PARKINSON STUDY GROUP. A controlled trial of rasagiline in early Parkinson disease: The TEMPO study. **Archives of neurology**, v. 59, p. 1937-1943, 2002.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 3 ed. Orlando: Academic Press, 1997.

PÊGO, J. M. et al. Dissociation of the morphological correlates of stress-induced anxiety and fear. **The European journal of neuroscience**, v. 27, n. 6, p. 1503-16, 2008.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology, biochemistry and behavior**, v. 24, n. 3, p. 525-529, 1986.

PERESE, D. A. et al. A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model. **Brain Research**, v. 494, n. 2, p. 285-293, ago. 1989.

POEWE, W.; MAHLKNECHT, P.; JANKOVIC, J. Emerging therapies for Parkinson's disease. **Current opinion in neurology**, v. 24, n. 4, p. 448-459, 2012.

PORSOLT, R. D. et al. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 379-391, fev. 1978.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. "Behavioural despair" in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. **European Journal of Pharmacology**, v. 51, n. 3, p. 291-294, 1978.

PRINS, J.; OLIVER, B.; KORTE, S. M. Triple reuptake inhibitors for treating subtypes of major depressive disorder: the monoamine hypothesis revisited. **Expert Opinion Investigational Drugs**, v. 20, n. 8, p. 1107-1030, ago. 2011.

QUELHAS, R; COSTA, M. Anxiety, depression and quality of life in Parkinson's disease. **Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 21, n. 4, p. 413-419, 2009.

RADAD, K.; GILLE, G.; RAUSCH, W. D. Short review on dopamine agonists: insight into clinical and research studies relevant to Parkinson's disease. **Pharmacological Reports**, v. 57, p. 701-712, 2005.

RÉNÉRIC, J. F.; BOUVARD, M; STINUS, L. In the rat forced swimming test, chronic but not subacute administration of dual 5-HT/NA antidepressant treatments may produce greater effects than selective drugs. **Behavioural Brain Research**, v. 136, p. 521-532, jul. 2002.

REMY, P. et al. Depression in Parkinson's disease: loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system. **Brain**, v. 128, p. 1314-1322, 2005.

RIBEIRO, F. M. et al. Animal models of neurodegenerative diseases. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, n. 2, p. 82-91, 2013.

ROSSI, A.; BARRACO, A.; DONDA, P. Fluoxetine: A review on evidence based medicine. **Annals of General Hospital Psychiatry**, v. 3, p. 1-8, 2004.

SACHS, C.; JONSSON, G. Mechanisms of action of 6-hydroxydopamine. **Biochemical Pharmacology**, v. 24, n. 1, p. 1-8, 1975.

SANTAMARÍA, A.; ARIAS, H. R. Neurochemical and behavioral effects elicited by bupropion and diethylpropion in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 211, p. 132-139, 2010.

SANTENS, P. et al. The pathophysiology of motor symptoms in Parkinson's disease. **Acta neurologica Belgica**, v. 103, n. 3, p. 129-134, 2003.

SANTIAGO, R. M. et al. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, n. 34, p. 1104-1114, 2010.

SANTIAGO, R. M. et al. Induction of depressive-like behavior by intranigral 6-OHDA is directly correlated with deficits in striatal dopamine and hippocampal serotonin. **Behavioural Brain Research**, v. 259, p. 70-77, 2014.

SANTIAGO, R. M. et al. The nonsteroidal antiinflammatory drug piroxicam reverses the onset of depressive-like behavior in 6-OHDA animal model of Parkinson's Disease. **Neuroscience**, v. 300, p. 246-253, 2015.

SAVITT, J. M.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 7, p. 1744-1754, jul. 2006.

SCHAMNE, M. G. Efeito comportamental das estatinas em um modelo animal de Doença de Parkinson. Dissertação de mestrado – Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Ponta Grossa, 2014.

SCHAMNE, M. G. et al. Efeito da sinvastatina no teste de comportamento rotatório após desafio com apomorfina em um modelo animal da Doença de Parkinson. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 9, n. 3, p. 62-68, 2014.

SCHIFFER, R. B. et al. Evidence for atypical depression in Parkinson's disease. **The American Journal of Psychiatry**, v. 145, n. 8, p. 1020-1022, 1988.

SCHILDKRAUT, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **The journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences**, v. 7, n. 4, p. 524-533, 1965.

SENOH, S.; WITKOP, B. Non-enzymatic conversions of dopamine to norepinephrine and trihydroxyphenethylamines. **Journal of the American Chemical Society**, v. 81, n. 23, p. 6222-6231, 1959.

SHIBA, M. et al. Anxiety disorders and depressive disorders preceding Parkinson's disease: a case-control study. **Movement Disorder Society**, v. 15, n. 4, p. 669-677, jul. 2000.

SIRI, C. et al. Psychiatric symptoms in Parkinson's disease assessed with the SCL-90R self-reported questionnaire. **Journal of Neurological Sciences**, v. 31, n. 1, p. 35-40, 2010.

SKALISZ, L. L. et al. Evaluation of the face validity of reserpine administration as an animal model of depression--Parkinson's disease association. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 26, p. 879-883, 2002.

SLATTERY, D. A.; HUDSON, A. L.; NUTT, D. J. Invited review: the evolution of antidepressant mechanisms. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 18, n. 1, p. 1-21, fev. 2004.

SLATTERY, D. A.; MARKOU, A.; CRYAN, J. F. Evaluation of reward processes in an animal model of depression. **Psychopharmacology**, v. 190, n. 4, p. 555-568, mar. 2007.

SPILLANTINI, M. G. et al. Alpha-synuclein in Lewy bodies. **Nature**, v. 388, n. 6645, p. 839-840, ago. 1997.

STACY, M. et al. Identification of motor and nonmotor wearing-off in Parkinson's disease: comparison of a patient questionnaire versus a clinician assessment. **Movement disorders**, v. 20, n. 5, p. 726-733, 2005.

STERN, M. B. et al. Double blind, randomized, controlled trial of rasagiline as monotherapy in early Parkinson's disease patients. **Movement disorders**, v. 19, p. 916-923, 2004.

STOCCHI, F.; OLANOW, C. W. Obstacles to the development of a neuroprotective therapy for Parkinson's disease. **Movement disorders**, v.28, n. 1, p. 3-7, 2013.

STOCCHI, F.; VACCA, L.; RADICATI, F. G. How optimize the treatment of early stage Parkinson's disease. **Translational neurodegeneration**, v. 4, p. 1-7, 2015.

TADAIESKY, M. T. et al. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's Disease. **Neuroscience**, v. 156, n. 4, p. 830 - 840, 2008.

TAN, L. C. S. Epidemiology of Parkinson's disease. **Neurology Asia**, v. 13, n. 2, p. 231-238, 2013.

TEIXEIRA JR, A. L.; CARDOSO, F. Tratamento inicial da Doença de Parkinson. **Revista de Neurociências**, v. 12, n. 3, 2004.

THOMAS, B.; BEAL, M. F. Parkinson's disease. **Human Molecular Genetics**, v. 16, p. 183-194, out. 2007.

UGERSTEDT, U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. **European Journal of Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 107-110, dez. 1968.

UNGERSTEDT, U. Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. **Acta Physiologica Scandinavica Supplementum**, v. 367, p. 95-122, 1971.

VAN OOSTEN, R. V.; COOLS, A. R.. Functional updating of the bilateral 6-OHDA rat model for Parkinson's disease. **Society neuroscience**, v 25, p. 1599, 1999.

VECCHIA, D. D. Efeito neuroprotetor e comportamental do *Hypericum perforatum*. Dissertação de mestrado – Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Ponta Grossa, 2013.

WALL, P. M.; MESSIER, C. Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-

like behavior. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 3, p. 275-286, mai. 2001.

WALTER, U.; SKOLOUDÍK, D.; BERG, D. Transcranial sonography findings related to non-motor features of Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 289, n. 1-2, p. 123-127, fev. 2010.

WANG, S. H. et al. Anhedonia and activity deficits in rats: impact of post-stroke depression. **Journal of Psychopharmacology**, v. 23, n. 3, p. 295-304, mai. 2009.

WARD, C. D. et al. L-dopa decarboxylation in chronically treated patients. **Neurology**, v. 34, p. 198-201, 1984.

WEISSKOPF, M. G. et al. Prospective study of phobic anxiety and risk of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 18, n. 6, p. 646-651, jun. 2003.

WHISHAW, I. Q.; DUNNETT, S. B. Dopamine depletion, stimulation or blockade in the rat disrupts spatial navigation and locomotion dependent upon beacon or distal cues. **Behavioural brain research**, v. 18, n. 1, 11-29, 1985.

WILLIS, A. W. et al. Geographic and ethnic variation in Parkinson disease: a population-based study of US medicare beneficiaries. **Neuroepidemiology**, v. 34, n. 3, p. 143-151, 2010.

WILLNER, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of a depression: a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology**, v. 134, n. 4, p. 319-329, 1997.

WIRDEFELDT, K. et al. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. **European Journal of Epidemiology**, 2011.

WOLTERS, E. C. Variability in the clinical expression of Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 266, p. 197-203, 2008.

ZARRANZ, J. J. et al. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. **Annals of Neurology**, v. 55, n. 2, p. 164-173, 2004.