

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Neurociências**

**CAMILLA LAZZARETTI**

**FATORES INTERFERENTES NA INDUÇÃO DA ATIVIDADE ROTACIONAL  
INDUZIDA PELO TESTE DE MOTRICIDADE SOBRE GRADE EM MODELO  
ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON**

**Porto Alegre  
2011**

**CAMILLA LAZZARETTI**

**FATORES INTERFERENTES NA INDUÇÃO DA ATIVIDADE ROTACIONAL  
INDUZIDA PELO TESTE DE MOTRICIDADE SOBRE GRADE EM MODELO  
ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON**

Dissertação a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Tadeu Mello e Souza

**Porto Alegre  
2011**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador Tadeu pelos ensinamentos a mim destinados, por toda sua paciência e calma diante de minha ansiedade, por estar sempre presente na discussão de experimentos, e definições do laboratório. Agradeço por acreditar em mim, no meu trabalho e permitir que eu pudesse crescer e aprender muito durante esses dois anos de mestrado. Também muito das tuas qualidades levo comigo e servem de exemplo para minha vida profissional.

Agradeço aos colegas de laboratório, que mesmo distantes do lab 22, SEMPRE estiveram dispostas mostrando sua ajuda, amizade, mesmo quando os experimentos duravam até altas horas da noite. Cris e Mile, vocês são mais que colegas, e sim amigas. Muito obrigada pela força, ajuda, apoio, e principalmente por transformar os momentos de seriedade e trabalho em horas mais leves e felizes de descontração. Beta, obrigada por tua ajuda, por me apresentar o TMG junto com o Tadeu e o Lucas, e além de tudo me apresentar ao lab que me recebeu de braços abertos. Agradeço também ao Lucas que foi uma pessoa muito importante para o andamento do meu mestrado, e por me ajudar em dúvidas que sempre foram persistentes. Agradeço ao pessoal do extinto laboratório 35, o grupo de pesquisa do Dioguinho, que sempre foram solícitos emprestando materiais, e principalmente por sua amizade, e companhia nos congressos. Também ao grupo da Prof<sup>a</sup>. Ana Battastini que nos acolheu e fizemos uma grande amizade.

Agradeço à professora Iraci Torres e sua aluna Joana pelo empréstimo de materiais e por serem pessoas muito solícitas e dispostas a ajudar, assim como ao Prof. Fábio Klamt quanto à colaboração em um dos experimentos.

Agradeço à Beta Palazzo que junto com a Mile foram e são grandes amigas e colegas de apartamento, sempre alegrando os momentos e sendo minha família em Porto Alegre.

Agradeço especialmente a minha família, pai, mãe e minha irmã Sílvia, que sempre incentivaram meus sonhos, sendo um porto seguro nos momentos difíceis, e minha leveza nos momentos de alegria. Admiro tua força pai e mãe, diante de todas as dificuldades que o ano de 2010.

Agradeço o PPG Neurociências, o departamento de Bioquímica da UFRGS por possibilitarem o andamento do trabalho, assim como a CAPES pela bolsa de

estudo e a UFRGS por ser uma universidade de grande renome e fornecer um ensino de qualidade.

## RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa progressiva que atinge 1% da população mundial acima dos 55 anos. Em trabalho anterior, verificou-se que a atividade rotacional ipsilateral induzida pelo teste de motricidade sobre grade (TMG) é um parâmetro útil para a triagem de animais extensamente lesionados após infusão de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) no feixe prosencefálico medial (FPM), um modelo animal muito utilizado para o estudo da doença. Entretanto, não se sabe como diferentes variáveis do aparato (altura e natureza da grade, presença ou não de paredes) e do modelo (diferentes sítios de infusão ou de variações no protocolo comportamental, com sessões de reteste ou aplicação de diazepam, interferem nessa atividade. Ratos Wistar machos de 110 dias de idade receberam infusões de 6-OHDA no corpo estriado (3,3 µg/µL, 6 µL), no FPM (3 µg/µL, 5,5 µL) ou na substância *nigra* (0, 3, 6 e 12µg/µL, 4 µL), sendo submetidos ao TMG 22 dias depois. No caso dos animais com infusão no FPM, o TMG teve variações de altura (8 ou 76,5 cm), de superfície (presença ou não de vidro transparente sobre a grade), ou de borda (presença ou não de parede a 30 ou 60 cm). Uma leva desses animais foi submetida a uma sessão prévia do TMG 7 dias antes da cirurgia, e outra recebeu diazepam (2 mg/kg, i.p.) ou apenas salina 30 minutos antes do teste. Verificou-se que a colocação de uma parede ao redor do aparato elimina a atividade rotacional (teste exato de Fisher,  $p=0,016$ ), embora não tenha sido possível observar esse efeito ao se discriminar a distância em 30 ou 60 cm (teste exato de Fisher,  $p=0,066$  e  $p=0,070$ , respectivamente). Não houve diferença significativa na atividade rotacional ao se variar a altura da grade ou sua superfície (teste exato de Fisher,  $p=0,424$  e  $p=1,000$ ), nem com a administração prévia de diazepam (teste exato de Fisher,  $p=0,648$ ). Verificou-se que infusões realizadas no estriado podem produzir atividade rotacional no TMG (teste exato de Fisher,  $p=0,016$ ) e que infusões na substância nigra o fazem quanto maior for a dose (teste de correlação de Spearman,  $r=0,53$ ,  $p=0,003$ ). Os resultados sugerem que variações na altura da grade e na superfície de locomoção não interferem na indução da atividade rotacional no TMG, e que a mesma pode ocorrer em animais infundidos em quaisquer dos sítios de infusão utilizados neste trabalho. Entretanto, a possibilidade de tigmotaxia pela presença de paredes ao redor do aparato inibe essa

atividade, embora a administração de diazepam não tenha surtido efeito, o que exige maiores estudos para se verificar o papel da ansiedade no processo. A exposição prévia à cirurgia, ao TMG não interferiu na atividade rotacional indicando que o fator novidade do teste parece não ser relevante para a atividade rotacional. Desse modo, destaca-se a tigmotaxia como principal fator interferente da atividade rotacional induzida pelo TMG e para o esclarecimento dos seus mecanismos e continuidade de estudos futuros utilizando o aparato.

## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disorder that affects 1% of the population above 55 years. In a previous work, it was shown that the footfault test is a tool for screening highly lesioned rats in modeling for PD using the toxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA), which is widely used, by observing whether animals present or not context-induced ipsilateral rotational activity (CIIRA). However, it is not known whether CIIRA may change because of variations in the apparatus – such as in height or in surface texture, or in placing a surrounding wall - or of other differences, such as varying the 6-OHDA infusion site or the behavioral protocols, by including other testing sessions or applying a drug before testing. Male Wistar rats (110 days old) received 6-OHDA infusions into either the striatum (3.3 µg/µL, 6 µL), the MFB (3 µg/µL, 5,5 µL) or the substantia *nigra* (0, 3, 6, 12µg/µL, 4 µL), and were submitted to the footfault test 22 days later. In the case of animals that received infusions into the MFB, the footfault test varied in height (8 or 76.5 cm), surface (presence or not of a transparent glass on the grid), edge (presence or not of a surrounding wall 30 or 60 cm from the center). One cohort of these animals had a previous testing session 7 days before surgery and another received either diazepam (2 mg/kg, i.p.) or saline 30 min before testing. Our results show that a surrounding wall eliminates CIIRA (Fisher's exact test,  $p = 0.016$ ), even though it was not possible to specify this effect concerning the wall distance from the center (30 or 60 cm; Fisher's exact test,  $p = 0.066$  and  $0.070$ , respectively). There was no difference by varying the height or the surface of the apparatus (Fisher's exact test,  $p = 0.424$  and  $1.000$ , respectively) or by administering diazepam before testing (Fisher's exact test,  $p = 0, 648$ ). It was observed that animals who received infusions into either the striatum (Fisher's exact test,  $p = 0.016$ ) or the substantia nigra (Spearman correlation,  $r = 0,53$ ,  $p = 0,003$ ) presented CIIRA in the footfault test. Our results suggest that CIIRA in the footfault is a robust effect in PD animal models considering the 6-OHDA infusion site and height of TMG, or if a transparent glass is placed on the grid. The presence of a surrounding wall eliminates the rotational activity, indicating that the possibility of presenting a tigmotaxic behavior interfere in this process. However, diazepam was not effective, indicating that the role of anxiety in this process requires further studies. Thus, we show the importance of tigmotaxic behavior as a main factor of rotational activity induced by the footfault test, and

probably for understanding the underlying mechanisms and for the continuity of the studies using the apparatus.



## LISTA DE ABREVIATURAS

PD- Doença de Parkinson  
6-OHDA - 6-hidroxidopamina  
DA - Dopamina  
NE - Noradrenalina  
DAT- Transportador de dopamina  
NAT - Transportador de noradrenalina  
FPM- Feixe prosencefálico medial  
VTA- Área tegmentar ventral  
TMG- Teste de Motricidade Sobre Grade  
SNpc- Parte compacta da substância nigra  
SN - Substância *nigra*  
GPI - Globo pálido interno  
SNpr- Parte reticular da substância nigra  
MAO- Monoaminoxidase  
EROs- Espécies reativas de oxigênio  
MPTP- 1-metil- 4-fenil-1,2,3,6- tetrahidropiridina  
MPP<sup>+</sup> - 1-metil-4-fenilpiridina  
APO- Apomorfina  
GABA- Ácido gama-aminobutírico  
BZ- Benzodiazepínicos

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>III</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>IX</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 Doença de Parkinson.....	1
1.2 Modelos Animais da Doença de Parkinson.....	3
1.2.1 O Modelo Animal da Doença de Parkinson induzido por 6-OHDA.....	4
1.3 Testes de Avaliação Rotacional em Modelos Animais de Parkinson.....	5
1.3.1 Atividade rotacional induzida por drogas dopaminomiméticas.....	6
1.3.2 Teste de Motricidade Sobre Grade.....	6
1.4 Infusão de 6-OHDA no corpo estriado.....	7
1.5 Infusão de 6-OHDA na substância <i>nigra</i> .....	8
1.6 Comportamento motor e características de aparatos comportamentais.....	9
1.7 Interação entre atividade gabaérgica e dopaminérgica.....	9
<b>2. OBJETIVO</b> .....	<b>11</b>
2.1 Objetivos específicos.....	11
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>12</b>
3.1 Animais.....	12
3.2 Infusões de 6-OHDA.....	12
3.3 Testes Comportamentais.....	13
3.3.1 Triagem Locomotora.....	13
3.3.2 Teste de Motricidade Sobre Grade (TMG).....	14
3.3.2.1 Administração de diazepam pré-teste.....	15
3.3.2.2 Exposição dos animais ao TMG prévia a cirurgia.....	15
<b>4. ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	<b>15</b>
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>16</b>
5.1 Modificações na estrutura do TMG.....	16
5.1.1 Da altura da grade.....	16
5.1.2 Da Superfície de Locomoção.....	16
5.1.3 Das Bordas.....	17
5.2 Modulação Gabaérgica.....	17
5.2.1 Administração de diazepam pré-teste.....	17
5.3 Exposição prévia ao TMG.....	18
5.4 Quanto ao Sítio de Infusão.....	18

5.4.1 Corpo Estriado.....	18
5.4.2 Substância Nigra.....	19
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>25</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>26</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (DP) é uma desordem progressiva, sendo a segunda doença neurodegenerativa mais comum, pois atinge 1% da população mundial acima de 55 anos e possui incidência aumentada com o avanço da idade (Lees, Hardy et al. 2009; Hayes, Fung et al. 2010). Os principais sintomas clínicos são motores, podendo-se citar tremor, rigidez muscular, acinesia, bradicinesia, micrografia, hipofonia, alterações posturais e de marcha. No entanto, existem também alguns sintomas não-motores, que podem incluir fadiga, depressão, distúrbios do sono, constipação e distúrbios cognitivos. O quadro clínico apresenta-se em decorrência da morte de neurônios dopaminérgicos da parte compacta da substância *nigra* (SNpc), resultando em uma depleção de dopamina (DA) no corpo estriado e disfunção da circuitaria que envolve os núcleos da base. No princípio do aparecimento dos sintomas clínicos, em torno de 80% de neurônios da SNpc podem estar degenerados e 60% da dopamina no corpo estriado pode estar depletada. Acompanhando a perda neuronal, há a presença de inclusões protéicas intracitoplasmáticas neuronais, denominadas corpos de Lewy, e o aumento de células gliais na substância *nigra* (SN) (Blaszczyk 1998; Dauer and Przedborski 2003; Fahn and Sulzer 2004; Wu, Le et al. 2010).

Os núcleos da base são responsáveis pelo controle, iniciação de movimentos voluntários e inibição de movimentos não-requeridos (Marsden and Obeso 1994). Na PD, sua disfunção é caracterizada pela atividade aumentada do globo pálido interno (GPi) e da parte reticular da substância nigra, o que acredita-se gerar uma ausência de desinibição de algumas regiões do tálamo e do neocórtex (Obeso, Marin et al. 2008) conforme esquematizado na figura 1.

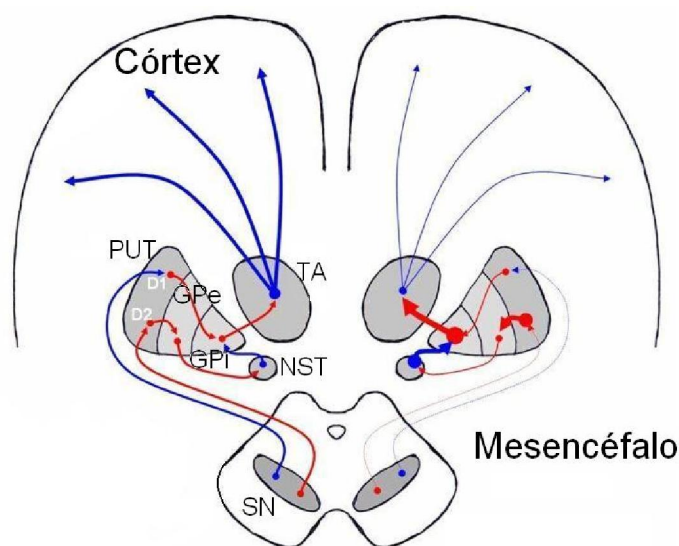


Figura 1. Esquema simplificado da circuitaria envolvida na DP. À esquerda, circuito neuronal normal. À direita, circuito alterado na DP. A comunicação nigroestriatal é interrompida devido à morte de neurônios na SNpc, ocasionando maior atividade do GPi que, por sua vez, causa maior inibição do sistema motor tálamo-cortical. GPe, globo pálido externo; GPi, globo pálido interno; PUT, putâmen; SN, substância negra; TA, tálamo. Linhas azuis representam vias excitatórias e linhas vermelhas representam vias inibitórias.

A etiologia da DP não é bem elucidada. Entretanto, a neurodegeneração parece ser resultante da interação de diversos fatores tais como neuroinflamação (Betchen and Kaplitt 2003; Barnum and Tansey 2010; Chung, Ko et al. 2010), disfunção mitocondrial (Surendran and Rajasankar 2010), mau enovelamento protéico (Dauer and Przedborski 2003) e excitotoxicidade pelo glutamato (Greenamyre 2001).

O tratamento da PD ainda é apenas sintomático e os fármacos utilizados são somente atenuantes da sintomatologia motora e não-motora. Dentre os principais fármacos utilizados, estão a levodopa acrescentada de inibidores da descarboxilase periférica (*e.g.*, carbidopa), agonistas dopaminérgicos (*e.g.*, pramipexol, ropinirol e bromocriptina), inibidores da monoaminoxidase B (*e.g.*, selegilina), inibidores da catecol-o-metil-transferase (*e.g.*, entacapona, tolcapona) e anticolinérgicos (*e.g.*, triexifenidil, benzotropina). Esses fármacos não retardam ou inibem a neurodegeneração progressiva, e alguns medicamentos podem ocasionar efeitos

colaterais, como com a utilização da levodopa, que gera discinesias e flutuações motoras (Silver 2008; Salawu, Olokoba et al. 2010). Em estágios mais avançados da doença, há a necessidade de intervenções cirúrgicas para inserção de eletrodos em estruturas dos núcleos da base (Morley and Hurtig 2010) ou técnicas mais antigas de ablação de regiões (Betchen and Kaplitt 2003).

## 1.2 Modelos Animais da Doença de Parkinson

Existem modelos animais que mimetizam a DP com distintas metodologias no desenvolvimento da doença, podendo ser genéticos (Harvey, Wang et al. 2008) ou baseados em neurotoxinas (Meredith, Sonsalla et al. 2008). Dentre as neurotoxinas empregadas estão o MPTP, paraquat, rotenona e a 6-hidroxidopamina (6-OHDA).

O modelo animal que utiliza o MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) foi identificado na década de 80 como indutor de PD em usuários de heroína contaminada com a toxina, sendo utilizado como modelo experimental bem sucedido por causar morte neuronal na SNpc através de seu metabólito tóxico MPP<sup>+</sup> (1-metil-4-fenilpiridina). O MPP<sup>+</sup> é um potente inibidor do complexo I da cadeia transportadora de elétrons nos neurônios produtores de DA (Langston, Forno et al. 1984).

O emprego da rotenona e do paraquat como pesticida e herbicida, respectivamente, são relacionados ao desenvolvimento de PD e, dessa maneira, introduzidos como modelos experimentais. Entretanto, suas toxicidades diferem: enquanto a rotenona inibe o complexo I da cadeia transportadora de elétrons, o paraquat age na mitocôndria, sendo reduzido pelo complexo I e resultando em um radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) com posterior indução de danos oxidativos mitocondriais (Caboni, Sherer et al. 2004; Cocheme and Murphy 2008). Tanto o MPTP quanto a rotenona e o paraquat são lipofílicos e atravessam a barreira hematoencefálica (BHE) (Meredith, Sonsalla et al. 2008).

O modelo animal de DP induzido por 6-OHDA é amplamente empregado e possui mecanismos de ação semelhantes aos já descritos. A neurotoxina 6-OHDA possui grande semelhança estrutural com catecolaminas, sendo dessa maneira tóxica aos neurônios catecolaminérgicos (Breese and Traylor 1971). A 6-OHDA é largamente utilizada em modelos de PD e mostra-se bastante útil e de grande valia

para o estudo dos mecanismos e possíveis terapias farmacológicas da doença, o qual será abordado com mais detalhes a seguir.

### 1.2.1 O Modelo Animal da Doença de Parkinson induzido por 6-OHDA

O modelo animal da doença de Parkinson através da lesão por infusão da toxina 6-OHDA foi inicialmente introduzido no final da década de 1960, onde eram realizadas infusões bilaterais da neurotoxina na SN de ratos (Ungerstedt 1968). Mais tarde, a infusão unilateral foi apontada como mais proveitosa para induzir a DP em ratos, visto que as infusões bilaterais podem causar adipsia e afagia nos animais (Ungerstedt 1971). Do mesmo modo, outra importância relevante do procedimento unilateral é a disposição de um hemisfério lesionado e outro intacto para a realização de comparações entre ambos e de testes comportamentais que visualizem essa assimetria (Ungerstedt and Arbuthnott 1970; Ungerstedt 1971; Ungerstedt 1971).

A 6-OHDA é uma neurotoxina estruturalmente análoga às catecolaminas DA e noradrenalina (NE), exercendo efeitos neurotóxicos seguindo dois passos: (1) acúmulo em neurônios catecolaminérgicos seguido de alteração na homeostase, e (2) dano neuronal. Ela é levada ao meio intracelular pelos transportadores de DA e NE (DAT e NAT, respectivamente), que reconhecem e captam a 6-OHDA. Os principais danos neuronais são causados pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) no interior do neurônio, originados através da oxidação da 6-OHDA pela enzima MAO, e de eventos de auto-oxidação, nos quais os produtos gerados são  $H_2O_2$  e quinonas, respectivamente, resultando assim em morte neuronal. Também a 6-OHDA pode induzir neurotoxicidade por alterar a função mitocondrial, agindo no complexo I da cadeia transportadora de elétrons (Simola, Morelli et al. 2007), conforme mostrado na figura 2.

Por não atravessar a barreira hematoencefálica, a 6-OHDA deve ser infundida através de cirurgia estereotáxica nas mesmas estruturas afetadas na DP: a própria SN, onde estão corpos dos neurônios; o feixe prosencefálico medial (FPM), onde estão os axônios desses neurônios; ou o corpo estriado, onde estão as terminações nervosas (Kirik, Rosenblad et al. 1998; Deumens, Blokland et al. 2002).

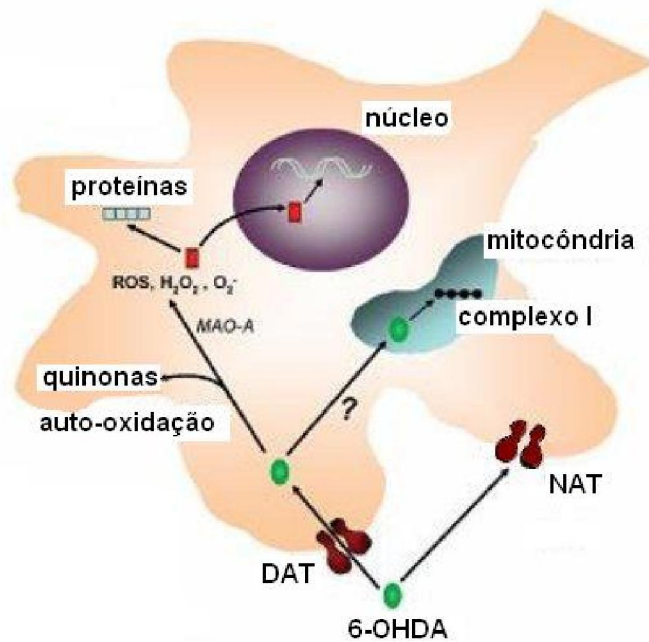


Figura 2: Mecanismos de neurotoxicidade induzida por 6-OHDA. Após sua captação por transportadores DAT ou NAT, a 6-OHDA entra nos neurônios catecolaminérgicos e é degradada enzimaticamente pela MAO ou auto-oxidada, gerando espécies citotóxicas que danificam proteínas e ácidos nucléicos, induzindo ao dano neuronal. Além disso, a 6-OHDA pode levar à neurotoxicidade através da disfunção do complexo mitocondrial I. Adaptado de Simola *et al.*, 2007.

### 1.3 Testes de Avaliação Rotacional em Modelos Animais de Parkinson

O modelo animal da doença de Parkinson através da infusão unilateral de 6-OHDA no FPM provoca a morte dos neurônios produtores de DA na SNpc, com posterior depleção ipsilateral à lesão desse neurotransmissor no corpo estriado, no núcleo *accumbens*, bem como em outras áreas, como os tubérculos olfatórios, o septo e o córtex pré-frontal. Essa depleção gera uma assimetria tanto nos níveis de DA quanto na sensibilidade a ela, que pode gerar comportamento rotacional induzido pela administração intraperitoneal (i.p.) de uma droga dopaminomimética como anfetamina, apomorfina (APO), metilfenidato (MF) (Schwartzing e Huston 1996; Schwartzing e Huston 1996) ou pela simples submissão do animal ao teste de



motricidade sobre grade (TMG), onde não é administrado nenhum fármaco para a indução da atividade rotacional (Silvestrin, de Oliveira et al. 2009).

### 1.3.1 Atividade rotacional induzida por drogas dopaminomiméticas

A administração de drogas dopaminomiméticas gera uma alteração na transmissão dopaminérgica entre os hemisférios. A anfetamina é um agonista indireto da DA que aumenta sua liberação e inibe sua recaptção, resultando em um aumento da DA em receptores pós-sinápticos. Sendo assim, o animal apresenta atividade rotacional ipsilateral à lesão, pois são as fibras existentes que promoverão a liberação de DA no estriado e estas estão em maior número no hemisfério não-lesionado. Vale destacar que estriado direito possui um controle sobre os membros do lado esquerdo, e vice-versa (Torres and Dunnett 2007). O MF é um agente que facilita a liberação de DA e inibe sua recaptção, evocando rotações ipsilaterais após sua administração, gerando um perfil de comportamento motor e mecanismo de ação semelhantes à anfetamina (Kuczenski and Segal 1997; Chopin, Colpaert et al. 1999).

Com a administração de APO, um agonista direto de receptores D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> de DA, os animais exibem rotações contralaterais à lesão, pois sua ação diferentemente do MF e da anfetamina, ocorre nos receptores sensibilizados do lado lesionado (Ungerstedt 1971; Hudson, van Horne et al. 1993). Para haver atividade rotacional induzida pela administração de APO, há a necessidade de uma grande extensão de lesão superior a 90% de morte dos neurônios dopaminérgicos na SNpc (Hefti, Melamed et al. 1980).

### 1.3.2 Teste de Motricidade Sobre Grade

O teste de motricidade sobre grade (TMG) ou, em inglês, *footfault test* (fig. 3.), avalia a capacidade locomotora de um animal sobre uma grade elevada. O teste foi inicialmente utilizado em modelos animais de isquemia (Lubics, Reglodi et al. 2005), lesão medular (Himes, Neuhuber et al. 2006) e piramidotomia (Starkey, Barritt et al. 2005) para analisar o padrão de erros de colocação de patas (*footfaults*) durante a exploração do aparato: animais com lesões unilaterais apresentam um

padrão assimétrico, ao contrário de animais não lesionados. Entretanto, foi evidenciada a utilidade do TMG como um teste de triagem de animais lesionados unilateralmente por 6-OHDA no FPM pela observação de giros ipsilaterais à lesão induzidos pelo teste (Silvestrin, de Oliveira et al. 2009).



Figura 3. Aparato do TMG

O TMG é um teste rápido, com duração de 3 minutos, e não há a necessidade da administração de drogas antes de sua realização, provavelmente pouco alterando parâmetros neuroquímicos no animal. O TMG tem altíssima especificidade, sendo mais sensível que a APO na dose de 1mg/Kg e menos sensível que MF na dose de 40mg/Kg, que é equivalente a 5mg/Kg de anfetamina (Silvestrin, de Oliveira et al. 2009).

#### 1.4 Infusão de 6-OHDA no corpo estriado

A infusão de 6-OHDA no corpo estriado atinge os terminais axonais dopaminérgicos e gera uma perda gradual de neurônios na SN ipsilateral que consiste em dois passos: uma fase rápida, que é completada em três a quatro semanas, seguida de uma fase prolongada de perda neuronal, que perdura por meses. A infusão no corpo estriado não é considerada de magnitude abrupta em questões de morte neuronal como as lesões realizadas na SN e no FPM.

Adicionalmente, apesar da similaridade da assimetria motora em tarefas comportamentais, a resposta rotacional induzida por drogas dopaminomiméticas é maior em animais com lesão induzida por infusão intraestriatal (Dowd and Dunnett 2004).

Dentre as vantagens de utilizar o corpo estriado como sítio de infusão, temos: (1) infusões no FPM a lesão podem acarretar danos neuronais na região do núcleo *accumbens*, que é de grande importância para a amplitude da resposta e a iniciação do movimento (Przedborski, Levivier et al. 1995); (2) modelos que envolvem lesões menos intensas e com isso simulam estágios iniciais da DP podem ser facilmente alcançados com infusões no corpo estriado (McGeer, Itagaki et al. 1988; Kirik, Rosenblad et al. 1998). Portanto, verificar se a atividade rotacional induzida pelo TMG pode ocorrer quando o corpo estriado é utilizado como sítio de infusão poderia vir a se tornar uma ferramenta útil para modelos animais da DP em seus estágios iniciais.

### 1.5 Infusão de 6-OHDA na substância *nigra*

A infusão de 6-OHDA na SN é considerada pioneira, pois foi realizada inicialmente no desenvolvimento do modelo de PD com o uso da neurotoxina (Ungerstedt and Arbuthnott 1970). Quando infundida na SN, sua ação tóxica se dá primariamente nos corpos celulares dos neurônios dopaminérgicos, causando a morte dessas células, que possuem suas terminações no corpo estriado.

As infusões realizadas caudalmente na SN não produzem atividade rotacional, diferentemente de infusões realizadas anteriormente ou na região medial, que geram atividade rotacional induzida por drogas dopaminomiméticas (Schwartz and Huston 1996).

Animais que possuem atividade rotacional espontânea através de lesão realizada na SN possuem um padrão de rotação ipsilateral, e para tal há a necessidade de uma depleção de DA no estriado em torno de 95%, e lesões em torno de 80% de morte neuronal. Lesões menores podem provocar mecanismos compensatórios, não gerando atividade rotacional (Schwartz and Huston 1996). Em outro trabalho com animais lesionados na SN, foi descrita atividade rotacional através da indução por APO e L-DOPA, que necessita extensão de lesão aproximadamente 90%), ou por anfetamina, com limiar de lesão de 50% de morte

neuronal para haver o comportamento rotacional (Hefti, Melamed et al. 1980). Portanto, com esses dados a verificação do potencial do TMG pode vir a ser útil para trabalhos que utilizem a infusão na SN.

### **1.6 Comportamento motor e características de aparatos comportamentais**

Diferentes tarefas comportamentais são realizadas em condições específicas relacionadas ao aparato utilizado. No TMG, existem diversas variáveis como a altura do aparato, a natureza da superfície em que o animal se locomove (tamanho das aberturas da grade ou mesmo a ausência dessas aberturas), e a presença ou não de paredes laterais que permitiriam a tigmotaxia do animal durante o teste. Por sinal, animais lesionados pela infusão de 6-OHDA no estriado ou na SNpc apresentam assimetria no comportamento de tigmotaxia devido às diferenças entre os hemisférios intacto e lesionado (Sullivan, Fraser et al. 1994). Contudo, não se sabe se esses fatores estruturais no TMG como a superfície de locomoção composta por grade, a altura elevada, ou a ausência de bordas podem ser interferentes importantes no teste.

Na tarefa do labirinto em cruz elevado, essas variáveis têm sido bem estudadas (Treit, Menard et al. 1993; Carobrez and Bertoglio 2005). Nessa tarefa, observam-se respostas emocionais relacionadas à ansiedade, que podem ser eliminadas por fármacos ansiolíticos administrados antes dos testes, uma vez que o animal apresenta um conflito entre explorar o novo ambiente, que inclui os braços abertos, e permanecer um tempo maior do teste no abrigo dos braços fechados (Pellow, Chopin et al. 1985; Treit, Menard et al. 1993; Hogg 1996). Dessa maneira, as questões comportamentais do labirinto em cruz elevado podem auxiliar algumas indagações ainda não entendidas relacionadas ao TMG.

### **1.7 Interação entre atividade gabaérgica e dopaminérgica**

O ácido gama-aminobutírico (GABA) medeia a maioria dos eventos de transmissão inibitória no encéfalo dos vertebrados. Existem três classes de receptores GABA pós-sinápticos: os GABA<sub>A</sub> e os GABA<sub>C</sub>, que são receptores ionotrópicos, e os GABA<sub>B</sub>, metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos são acoplados a um canal permeável ao cloreto (Cl<sup>-</sup>) e o aumento da condutância desse íon

impulsiona o potencial de membrana para o potencial do Cl<sup>-</sup> que é em torno de -65 mV inibindo o disparo de novos potenciais de ação. Esses receptores são pentâmeros constituídos por cinco tipos de subunidades (  $\alpha$  ,  $\beta$  ,  $\gamma$  ,  $\delta$  , e  $\epsilon$  ). Os receptores metabotrópicos GABA<sub>B</sub>, são inibitórios devido à abertura de canais de potássio (K<sup>+</sup>), ou através do bloqueio de canais Ca<sup>+</sup>, tendendo a hiperpolarizar as células pós-sinápticas (Kuffler and Edwards 1958).

Substâncias que agem como agonistas ou moduladores de receptores pós-sinápticos GABA<sub>A</sub>, como os benzodiazepínicos (BZ), possuem grande relevância pela longa utilização histórica de aplicação terapêutica como terapia ansiolítica, sedativa, hipnótica, amnésica e relaxante muscular (Barnard, Skolnick et al. 1998; Hoffman and Mathew 2008).

A modulação de receptores GABA<sub>A</sub> através da administração de fármacos benzodiazepínicos, como seu agonista diazepam, é realizada pela ligação do fármaco em um sítio específico de alta afinidade para benzodiazepínicos que se localiza dentro do canal de Cl<sup>-</sup>. Esses receptores estão localizados ubiquamente no sistema nervoso central, como o córtex, núcleos da base, SN e cerebelo, na forma de neurônios de projeção e interneurônios (Foster and Kemp 2006).

Os BZ possuem um efeito anti-dopaminérgico, pois inibem a liberação de DA no estriado e núcleo *accumbens*. Em animais unilateralmente lesionados com infusão de 6-OHDA na via nigroestriatal, são observados um aumento da liberação de GABA e da expressão de seus receptores no estriado ipsilateral à lesão. Esse evento se dá pela diminuição de DA que medeia a inibição GABA. Também os BZ, como o clonazepam, inibem a atividade rotacional induzida por APO, o que mostra esse poder antagônico entre o sistema dopaminérgico e gabaérgico (Tenn and Niles 1995).

Desse modo, torna-se interessante investigar a influência da interação entre as atividades dopaminérgica e gabaérgica sobre a atividade rotacional realizada no TMG, assim como avaliar como modificações estruturais do aparato (altura superfície e bordas) podem influenciar nesse comportamento. Da mesma forma, como anteriormente abordado, avaliar a utilização de outros sítios de infusão de 6-OHDA, como o estriado e a SN, também pode ser útil para estudos posteriores. Dessa forma, o presente trabalho buscará responder a essas questões.

## 2. OBJETIVO

Investigar os fatores que podem interferir na indução da atividade rotacional presente no Teste de Motricidade sobre Grade (TMG) em ratos lesionados pela infusão unilateral de 6-hidroxidopamina em modelo animal de Parkinson.

### 2.1 Objetivos específicos

1. Verificar se a atividade rotacional no TMG em animais lesionados pela infusão unilateral de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial pode ser afetada pela modificação da altura da grade;

2. Verificar se a atividade rotacional no TMG em animais lesionados pela infusão unilateral de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial pode ser alterada através modificação da superfície de locomoção pela colocação de um vidro liso e transparente;

3. Verificar se a atividade rotacional no TMG em animais lesionados pela infusão unilateral de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial pode ser alterada pela colocação de paredes circulares de 30 e 60 cm ao redor o centro do aparato;

4. Verificar se a atividade rotacional no TMG em animais lesionados pela infusão unilateral de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial pode ser alterada após a administração pré-teste de diazepam;

5. Verificar se a exposição prévia ao TMG pode prevenir a atividade rotacional em uma segunda sessão 22 dias após a cirurgia de infusão de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial.

6. Verificar se a infusão unilateral de 6-OHDA no corpo estriado induz atividade rotacional no TMG;

7. Verificar se a infusão unilateral de diferentes doses de 6-OHDA na substância *nigra* induz atividade rotacional no TMG.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Ratos Wistar machos adultos de 110 dias de idade foram utilizados, provenientes do Centro de Produção e Experimentação Animal (CEPEA) do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos em gaiolas/caixas (cinco animais por caixa) em um ciclo claro/escuro de 12 horas (7h-19h) em ambiente com temperatura controlada (22°C), e acesso livre à água e ração padrão *ad libitum*.

Para a realização dos testes comportamentais, os animais eram acomodados na sala de comportamento 30 minutos antes para ambientação, permanecendo em suas caixas-moradia. Dessa forma, os experimentos de comportamento foram realizados na mesma sala para todos os grupos de estudo, e em iguais horários. Durante todos os testes, o comportamento foi filmado e analisado com o programa *Any Maze* em iluminação de 20 lux.

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de Ética em pesquisa desta Universidade com o parecer número 17860.

#### 3.2 Infusões de 6-OHDA

Os animais foram anestesiados com equitesina (3,3 mg/Kg, i.p.) e acomodados em aparelho estereotáxico para receber infusões de 6-hidroxidopamina (veículo: ácido ascórbico 0,20% em salina), em diferentes sítios de infusão, como descrito a seguir, com suas coordenadas baseadas no atlas (Paxinos 1998) relacionadas ao bregma:

- § *Estriado*- 1ª infusão: 0,5 µL/min, 2,0µL, AP 0,0mm, LL -2,8mm, DV -6,0mm a partir do bregma; 2ª infusão: 2,0 µL, AP -0,5 mm, LL -3,9 mm, DV. -6,0; 3ª infusão: 1µL, AP -1,2 mm, LL -4,1 mm, DV -6,0 mm. Bucal 0,0 mm. A concentração utilizada de foi 3,3 µg/µL. Adaptado de (Kirik, Rosenblad et al. 1998).
- § *Feixe prosencefálico medial*- 1ª infusão: 0,5 µL/min, 2,5µL, AP -4,4 mm, LL -1,8 mm, -8,8 mm a partir do bregma; 2ª infusão: 3,0 µL, AP -4,0 mm, LL

-1,6 mm, DV. -9,0 mm. Bucal -3,3mm. A concentração utilizada foi 3 µg/µL. Como descrito em nosso trabalho anterior, (Silvestrin, de Oliveira et al. 2009).

§ *Substância Negra* – Infusão: 1µL /min, 4µL, AP -4,8mm, LL 2,0mm, DV 7,8mm a partir do bregma. Bucal -3,3mm. A concentração utilizada foi 4µg/µL (Hefti, Melamed et al. 1980).

Para a realização das infusões, foi utilizada uma agulha conectada a uma microseringa de 10 µl (Hamilton, 701 N) e uma bomba de infusão (Insight, Brasil). Após a conclusão de cada infusão, a agulha foi mantida no encéfalo por quatro ou cinco minutos para permitir a difusão da droga. Posteriormente à cirurgia, os tecidos foram unidos com adesivo cianocrilato. Os animais ficaram sob observação e aquecidos até recobrem os sentidos e foram, então, acomodados em suas caixas-moradia em sala específica de pós-operatório.

### 3.3 Testes Comportamentais

#### 3.3.1 Triagem Locomotora

No 20º dia após a cirurgia, os animais que realizaram o TMG somente após a cirurgia (exceto aqueles com lesão na SN), eram colocados durante 4 minutos em uma arena circular de 60 cm de diâmetro para se avaliar a distância percorrida pelos animais através da filmagem e análise do comportamento pelo programa *Any Maze*. Assim, podem-se homogeneizar os grupos quanto à atividade locomotora (Figura 4).

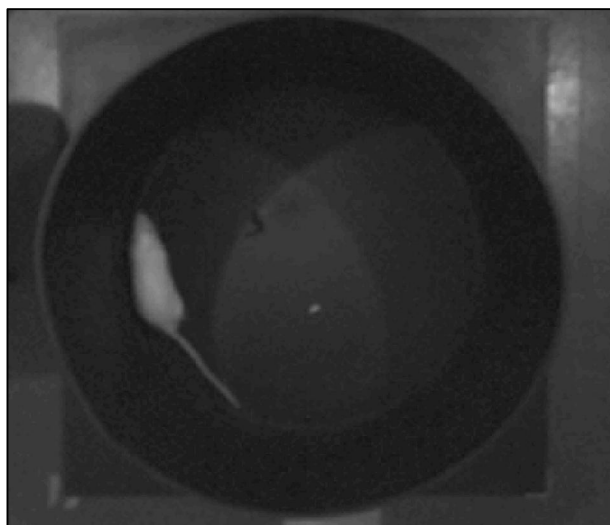


Figura 4. Avaliação locomotora em arena circular



### 3.3.2 Teste de Motricidade Sobre Grade (TMG)

No 22º dia após a cirurgia, foi avaliada a atividade rotacional no TMG, que consiste de uma grade elevada (80 cm x 60 cm) com aberturas de 3 cm x 3 cm, e 76 cm de altura (Figura 5). Durante o teste, os animais foram colocados no centro da grade, um de cada vez, e deixados livres para exploração durante três minutos. Avaliou-se apenas a presença ou ausência desse giro, não sua intensidade (número de giros ou velocidade), por ser um parâmetro de avaliação suficiente para treinar animais com alto grau de lesão (Silvestrin, de Oliveira et al. 2009).

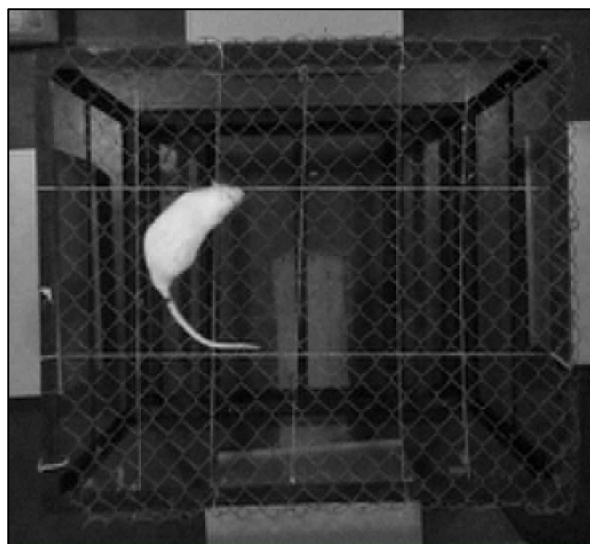


Figura 5. Vista superior do animal sobre a grade

Em paralelo ao TMG tradicional, foram conduzidos testes com uma das seguintes alterações no aparato:

- altura da grade, diminuída para 10 cm através da colocação de um fundo falso abaixo da grade, de fácil visualização pelo animal;
- superfície de locomoção, ao se colocar um vidro liso e transparente sobre a grade, evitando-se a sensibilidade da mesma durante a exploração, mas preservando a visão da altura do aparato pelo animal;
- bordas, ao serem colocadas paredes circulares ao redor do centro do aparato a 30 ou 60 cm do centro do aparato.

Com essas alterações, verificaram-se, então, como os referidos fatores podem interferir na indução da atividade rotacional.

### **3.3.2.1 Administração de diazepam pré-teste**

Para a avaliação se a modulação gabaérgica pode influenciar a atividade rotacional no TMG, foi administrado Diazepam 2mg/Kg (União Química Nacional S/A), i.p., ou apenas seu veículo (solução salina 0,9%) 30 minutos antes do TMG. A dose foi escolhida de acordo com estudos que utilizam diazepam como controle positivo ansiolítico no labirinto em cruz elevado (Engin, Treit et al. 2009).

### **3.3.2.2 Exposição dos animais ao TMG prévia a cirurgia**

Sete dias antes da cirurgia os animais foram expostos previamente ao aparato do TMG por 3 minutos. Passados 29 dias, os animais foram re-expostos ao TMG.

## **4. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A análise estatística foi feita através do programa SPSS 10.0 para Windows. Para se verificar a diferença entre os grupos quanto ao número de animais que tiveram atividade rotacional, os dados referentes foram analisados com a utilização do teste exato de Fisher.

O número de animais que apresentou atividade rotacional no TMG para cada dose de 6-OHDA infundida na SN foi analisado pelo teste de correlação de Spearman e por regressão logística binária.

O número de animais que apresentou atividade rotacional no TMG e na arena circular foi comparado pelo teste do sinal. No caso dos animais submetidos a uma sessão do TMG antes da cirurgia, os dados foram comparados pelo teste do - quadrado.

Para todos os resultados, o valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado como diferença significativa entre os grupos.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Modificações na estrutura do TMG

#### 5.1.1 Da altura da grade

Não houve diferença no número de animais que mostraram atividade rotacional ipsilateral no TMG com duas diferentes alturas da grade: 8 e 76,5 cm (teste exato de Fisher,  $p= 0,424$ ) (Tabela 1).

Tabela 1. Atividade rotacional no TMG em diferentes alturas da grade

<i>Atividade Rotacional</i>	<i>Altura de 8 cm</i>	<i>Altura de 76,5 cm</i>	<i>Total</i>
<i>Não</i>	15	18	33
<i>Sim</i>	14	10	24
<i>Total</i>	29	28	57

Número de animais que apresentaram ou não atividade rotacional induzida pelo TMG,  $n=57$

Teste exato de Fisher,  $p = 0, 424$

#### 5.1.2 Da Superfície de Locomoção

Como indicado na tabela 2, a colocação de um vidro liso e transparente sobre a grade não alterou o número de animais que apresentaram atividade rotacional ipsilateral à lesão no teste de motricidade (teste exato de Fisher,  $p= 1,000$ ) (Tabela 3).

Tabela 2. Atividade rotacional no TMG normal ou com vidro liso e transparente sobre a grade

<i>Atividade Rotacional</i>	<i>Grade</i>	<i>Vidro</i>	<i>Total</i>
<i>Não</i>	12	11	23
<i>Sim</i>	6	7	13
<i>Total</i>	18	18	36

Número de animais que apresentaram ou não atividade rotacional induzida pelo TMG,  $n=36$

normal ou com vidro sobre a grade (teste exato de Fisher,  $p=1,000$ )

### 5.1.3 Das Bordas

Os resultados observados na tabela 3 mostram que a presença de uma parede rodeando o centro do aparato diminuiu o número de animais que apresentaram atividade rotacional no TMG (teste exato de Fischer,  $p=0,016$ ). Entretanto, ao se discriminar a distância dessa parede ao centro do aparato (30 ou 60 cm), houve em ambas as distâncias apenas uma tendência para a diminuição do número de animais que apresentam atividade rotacional no TMG (tabelas 5 e 6) (teste exato de Fisher,  $p=0,066$  e  $p=0,070$ , respectivamente).

Tabela 3. Atividade rotacional induzida pelo TMG com ou sem paredes circulares ao redor do centro do aparato

<i>Atividade Rotacional</i>	<i>Sem parede</i>	<i>Com parede<sup>a</sup></i>	<i>Parede a 30 cm do centro do aparato<sup>b</sup></i>	<i>Parede a 60 cm do centro do aparato<sup>c</sup></i>	<i>Total</i>
<i>Não</i>	10	35	18	17	80
<i>Sim</i>	5	2	1	1	9
<i>Total</i>	15	37	19	18	89

Número de animais que apresentaram ou não atividade rotacional induzida pelo TMG,  $n=89$

Com ou sem paredes circulares ao redor do centro do aparato; a, b e c indicam  $p=0,016$ ,  $0,066$  e  $p=0,070$ , respectivamente, quando comparados ao valores “sem parede” (teste exato de Fisher).

## 5.2 Modulação Gabaérgica

### 5.2.1 Administração de diazepam pré-teste

Na tabela 4 observam-se os resultados preliminares referentes à administração de diazepam 2mg/Kg ou salina (i.p.) 20 minutos antes do TMG. O diazepam não alterou significativamente o número de animais que apresentaram atividade rotacional (teste exato de Fisher  $p=0,648$ ).

Tabela 4. Atividade rotacional induzida pelo TMG com a administração de diazepam 2mg/Kg ou salina

<i>Atividade Rotacional</i>	<i>TMG + salina</i>	<i>TMG + diazepam</i>	<i>Total</i>
<i>Não</i>	10	11	21
<i>Sim</i>	4	2	6
<i>Total</i>	14	13	27

Número de animais que apresentaram ou não atividade rotacional induzida pelo TMG, n=27

Teste exato de Fisher, p=0,648

### 5.3 Exposição prévia ao TMG

A tabela 5 apresenta os resultados da exposição prévia ao TMG (7 dias antes) da cirurgia de infusão de 6-OHDA. Desse modo a realização do teste antes da cirurgia não alterou o número de animais que apresentaram atividade rotacional posterior a cirurgia, quando comparados àqueles que não sofreram uma exposição anterior.

Tabela 5. Atividade rotacional no TMG com exposição prévia ao aparato antes da cirurgia

	<i>Número de animais com atividade rotacional</i>	<i>Total</i>
<i>Sem novidade</i>	5	16
<i>Com novidade</i>	4	15

Número de animais que apresentaram ou não atividade rotacional induzida pelo TMG. P = 0,7787 (teste do  $\chi^2$ ).

### 5.4 Quanto ao Sítio de Infusão

#### 5.4.1 Corpo Estriado

Conforme se pode observar na tabela 6, os animais que receberam a infusão de 6-OHDA no corpo estriado apresentaram atividade rotacional ipsilateral

induzida pelo TMG. Em acréscimo, o TMG induz essa atividade em mais animais do que a exposição à arena circular (teste do sinal,  $p=0,016$ ).

Tabela 6. Atividade rotacional no TMG e em Arena circular

<i>Atividade Rotacional</i>	<i>TMG<sup>a</sup></i>			
		<i>Não</i>	<i>Sim</i>	<i>Total</i>
<i>Arena circular</i>	<i>Não</i>	5	7	12
	<i>Sim</i>	0	1	1
	<i>Total</i>	5	8	13

Número de animais que apresentaram ou não atividade rotacional induzida pelo TMG,  $n=13$  (<sup>a</sup> teste do sinal,  $p=0,016$ ).

#### 5.4.2 Substância *Nigra*

Conforme se pode observar no gráfico 1, os animais que receberam a infusão de 6-OHDA na substância *nigra* apresentaram atividade rotacional ipsilateral induzida pelo TMG. Em acréscimo, houve uma correlação positiva entre o a porcentagem de animais que apresentaram atividade rotacional no TMG com a dose de 6-OHDA infundida na substância negra (correlação de Spearman,  $r=0,53$ ,  $p=0,003$ ).

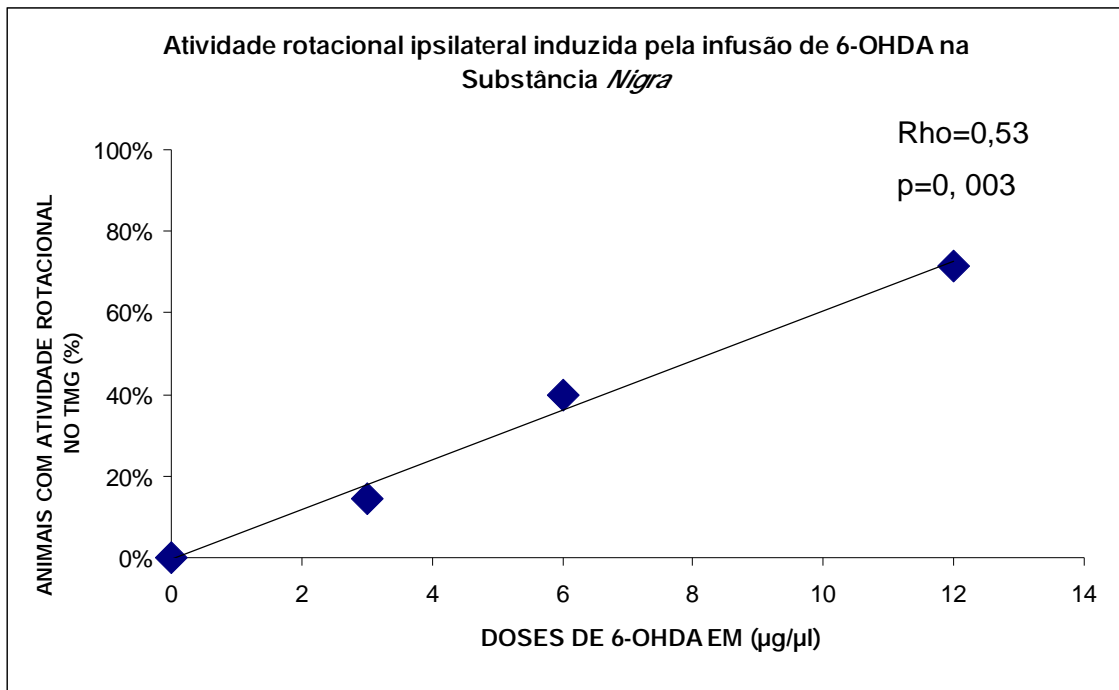


Figura 1. Ordenadas indicam a porcentagem dos animais que apresentaram atividade rotacional induzida pelo TMG. N=5, 7, 10 e 7 para as doses de 6-OHDA de 0, 3,6 e 12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , respectivamente, que são indicadas nas abscissas, e que foram infundidas diretamente na substância negra. Teste de correlação de Spearman,  $\rho = 0,53$ ,  $p=0,003$ . Regressão logística binária: teste de Hosmer e Lemeshow,  $\chi^2 = 0,730$ . G.L.= 2,  $p = 0,694$ ; parâmetros estimados dos animais que apresentaram rotações,  $B = 1,285 \pm 0,506$  (S.E;  $\rho < 0,011$ ),  $\exp B = 3,613$  (95% CI, de 1,339 a 9,749) e  $C = -2,666 \pm 0,959$  ( $\rho = 0,005$ ).

## 6. DISCUSSÃO

Nesse trabalho buscou-se investigar os fatores que interferem na atividade rotacional no TMG e seus mecanismos subjacentes em ratos que receberam infusão unilateral de 6-OHDA na via nigroestriatal ou no corpo estriado. Avaliou-se da mesma maneira se a lesão no corpo estriado e na SNpc produz atividade rotacional no TMG. Na análise dos animais lesionados no FPM, verificaram-se os fatores interferentes no TMG como altura da grade e superfície de locomoção do animal, paredes ao circulares ao redor do aparato, a administração de diazepam pré-teste e a exposição prévia à cirurgia dos animais ao TMG.

Nossos resultados mostram que a colocação de uma parede circular ao redor do aparato inibe a atividade rotacional. Infelizmente, não conseguimos mostrar que, individualmente, cada distância da parede ao centro, 30 ou 60 cm, seria capaz de inibir o comportamento rotacional, já que tal demonstração exige um maior número amostral, não alcançado por nosso experimento. Sabe-se que ratos unilateralmente lesionados com 6-OHDA preferem fazer tigmotaxia do lado ipsilateral à lesão (Steiner, Bonatz et al. 1988; Fornaguera, Carey et al. 1994; Sullivan, Fraser et al. 1994), juntamente com o giro dos mesmos no centro do TMG na mesma direção (Fornaguera, Schwarting et al. 1993). Portanto, um possível motivo para a ausência de atividade rotacional pela colocação de uma parede no aparato seria que ambos os comportamentos rotacionais, o giro no centro e a possibilidade de tigmotaxia nas paredes, possuem mecanismos dopaminérgicos (Sullivan, Fraser et al. 1994). Então, a “atração” do animal para a parede por si só poderia afetar a atividade rotacional pelo fato de ambas recrutarem mecanismos modulatórios similares ou mesmo iguais.

Outra possibilidade não necessariamente excludente à primeira seria que fatores ansiogênicos estimulem a indução do comportamento rotacional e a presença de uma parede, que permite o comportamento tigmotáxico do animal, teria um efeito ansiolítico. Sabe-se que animais colocados no labirinto em cruz elevado procuram evitar os braços abertos do aparato, uma vez que o mesmo possui diversos fatores aversivos, tais como a altura e a aversão do animal a ambientes abertos: o comportamento de tigmotaxia e a permanência em um ambiente de paredes verticais seria parte de seu repertório natural de defesa (Carobrez and Bertoglio 2005). Um dos grandes fatores motivadores que contribuem para essa



aversão aos braços abertos é a ansiedade, que vem notavelmente sendo estudada há mais de 20 anos através do teste, pois fármacos ansiolíticos (*e.g.*, diazepam, clonazepam) revertem essa ausência de permanência no local (Pellow, Chopin et al. 1985). Com esses dados, poderíamos, em princípio, sobrepor o conhecimento do labirinto em cruz para o TMG, sendo que o último também poderia ser considerado extremamente ansiogênico quando da ausência de paredes.

Para testar a hipótese da ansiedade como mecanismo estimulador ou mesmo indutor de atividade rotacional no TMG, foi realizado o experimento de administração do fármaco diazepam na dose ansiolítica de 2mg/Kg 30 minutos antes do TMG. Entretanto, os resultados preliminares indicam que o diazepam não elimina a atividade rotacional, o que merece uma confirmação com um experimento adicional. Por sinal, resultados também preliminares (dados não mostrados) poderiam apontar para a possibilidade de maiores níveis de rotação em maiores níveis de iluminação da sala. Caso esse resultado se confirme, seria interessante tentar obter a reversão do efeito pelo diazepam nessas condições mais ansiogênicas. Vale ressaltar que já se sabe da atividade antagônica que benzodiazepínicos causam no sistema dopaminérgico, causando uma diminuição da DA e assim, possivelmente, da atividade rotacional (Tenn and Niles 1995).

Nossos resultados indicam que as alterações no TMG de altura ou colocação de um vidro transparente sobre a grade não alteram a atividade rotacional. Como mostrado em resultados com o labirinto em cruz elevado, a altura talvez não seja tão crítica ou mesmo aversiva aos animais quanto a ausência de locais para sua proteção, como paredes ou braços fechados (Carobrez and Bertoglio 2005). Vale destacar que o vidro colocado sobre a grade altera a estimulação táctil e proprioceptiva do animal em relação ao TMG convencional, mas preserva a noção de altura do aparato.

Em trabalho anterior, mostramos que uma segunda sessão do TMG não era capaz de reinduzir o comportamento rotacional. A hipótese inicial era de que a novidade poderia ser fator primordial para explicar referido resultado. Um experimento foi conduzido para testar essa hipótese. Nele, verificou-se que a pré-exposição dos animais ao TMG sete dias antes da infusão de 6-OHDA não alterou a atividade rotacional no TMG conduzido 22 dias após a cirurgia, indicando que o fato dos animais serem reapresentados ao aparato pode ou não influenciar no processo de indução da atividade rotacional pelo TMG: parece ser crítico o fato de haver ou

não grande assimetria de atividade dopaminérgica entre os hemisférios na primeira sessão para que se iniba o comportamento rotacional em uma segunda sessão. Maiores estudos são necessários para se entender melhor referida questão.

Nossos resultados mostraram haver uma correlação positiva entre a porcentagem de animais que apresentaram atividade rotacional no TMG e as doses de 6-OHDA infundida na SN, sendo assim um efeito dependente de dose. No estudo de Przedborski em 1995, também se verificou um aumento do número de rotações induzidas por APO e anfetamina com o aumento da dose de 6-OHDA, que nesse trabalho foi infundida no estriado. Nesse trabalho, também se mostrou correlações negativas da dose de 6-OHDA com a ligação de manzidol ( $H^3$ ) e no número de células através da coloração de Nissl, na SNpc, estriado e VTA ipsilaterais a lesão. Esse estudo mostra as diminuições dos sítios de captação de DA e de maior degeneração celular com o aumento da dose da neurotoxina. Relacionando nosso trabalho com o de Przedborski, sabe-se que o TMG é mais sensível que a APO na triagem de animais lesionados (Silvestrin, de Oliveira et al. 2009); logo, pode-se hipotetizar que, em nosso trabalho, obtivemos crescente perdas de neurônios dopaminérgicos na SNpc com o aumento da dose de 6-OHDA. Portanto, o objetivo de verificar se era possível usar o TMG no modelo com infusões diretamente na SN foi alcançado. Nossos resultados indicam que animais com lesão obtida através da infusão de 6-OHDA no estriado apresentam atividade rotacional no TMG. Esse resultado é muito positivo, pois indica que o TMG pode ser empregado em experimentos que usam o corpo estriado como sítio de infusão, que, conforme abordado anteriormente é uma metodologia com várias vantagens, entre as quais, o fato de poder modelar estágios precoces da doença (McGeer, Itagaki et al. 1988; Kirik, Rosenblad et al. 1998). Vale destacar que as infusões realizadas no corpo estriado através do protocolo utilizado no presente trabalho mostrou reduzir em 80 a 95% o número de neurônios positivos para tirosina hidroxilase (Kirik, Rosenblad et al. 1998). Mostramos ainda que há maior atividade rotacional no TMG do que em arena circular, indicando que a natureza do aparato é relevante para a ocorrência da atividade rotacional, o que reproduziu resultado anterior (Silvestrin, de Oliveira et al. 2009). Nossos resultados também mostram que há maior frequência de animais que possuem atividade rotacional no TMG pela infusão de 6-OHDA no corpo estriado do que no FPM, possivelmente devido ao fato de que a infusão no corpo estriado, diferentemente de em outros sítios, não provoca a morte de neurônios no núcleo

*accumbens*, estrutura de importância para a amplitude da resposta, conforme abordado na literatura (Przedborski, Levivier et al. 1995). Portanto, pode haver atividade rotacional induzida pelo TMG tanto em animais com infusão no corpo estriado, conforme feito neste trabalho, ou no FPM, conforme trabalho anterior.

Em resumo, na elucidação de fatores que interferem na atividade rotacional no teste, nosso trabalho apontou que a presença de paredes inibe o comportamento rotacional, mas que grandes diferenças de altura e de natureza de superfície não promovem o mesmo efeito. Diazepam, entretanto, não foi capaz de alterar o comportamento rotacional em nossos resultados. Entretanto, ainda não se pode descartar um possível papel da ansiedade na indução do comportamento rotacional induzido pelo TMG. Além disso, pode-se observar que a infusão intraestriatal e intranigral de 6-OHDA produz uma assimetria motora suficiente para permitir o comportamento rotacional no TMG, indicando que variações quanto ao sítio de infusão não se mostram relevantes para a utilização geral do TMG.

## PERSPECTIVAS

Pretendemos dar continuidade aos estudos realizados através do seguimento dos seguintes experimentos:

- § Complementar os resultados utilizando agonistas benzodiazepínicos, tanto GABA<sub>A</sub> quanto GABA<sub>B</sub>;
- § Complementar os resultados do experimento utilizando morfina, com lesões no FPM, e complementando-os com o antagonista naloxona;
- § Alterar as condições de iluminação do TMG e verificar se esse parâmetro altera a atividade rotacional induzida pelo TMG. Com esse resultado, submeteremos um artigo em revista internacional da área juntamente com os outros resultados referentes a variações de altura, superfície e presença ou não de paredes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barnard, E. A., P. Skolnick, et al. (1998). "International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function." Pharmacol Rev 50(2): 291-313.
- Barnum, C. J. and M. G. Tansey (2010). "Modeling neuroinflammatory pathogenesis of Parkinson's disease." Prog Brain Res 184: 113-32.
- Betchen, S. A. and M. Kaplitt (2003). "Future and current surgical therapies in Parkinson's disease." Curr Opin Neurol 16(4): 487-93.
- Blaszczyk, J. W. (1998). "Motor deficiency in Parkinson's disease." Acta Neurobiol Exp (Wars) 58(1): 79-93.
- Breese, G. R. and T. D. Traylor (1971). "Depletion of brain noradrenaline and dopamine by 6-hydroxydopamine." Br J Pharmacol 42(1): 88-99.
- Caboni, P., T. B. Sherer, et al. (2004). "Rotenone, deguelin, their metabolites, and the rat model of Parkinson's disease." Chem Res Toxicol 17(11): 1540-8.
- Carobrez, A. P. and L. J. Bertoglio (2005). "Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on." Neurosci Biobehav Rev 29(8): 1193-205.
- Chopin, P., F. C. Colpaert, et al. (1999). "Effects of alpha-2 adrenoceptor agonists and antagonists on circling behavior in rats with unilateral 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal pathway." J Pharmacol Exp Ther 288(2): 798-804.
- Chung, Y. C., H. W. Ko, et al. (2010). "The role of neuroinflammation on the pathogenesis of Parkinson's disease." BMB Rep 43(4): 225-32.
- Cocheme, H. M. and M. P. Murphy (2008). "Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat." J Biol Chem 283(4): 1786-98.
- Dauer, W. and S. Przedborski (2003). "Parkinson's disease: mechanisms and models." Neuron 39(6): 889-909.
- Deumens, R., A. Blokland, et al. (2002). "Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway." Exp Neurol 175(2): 303-17.
- Dowd, E. and S. B. Dunnett (2004). "Deficits in a lateralized associative learning task in dopamine-depleted rats with functional recovery by dopamine-rich transplants." Eur J Neurosci 20(7): 1953-9.
- Engin, E., D. Treit, et al. (2009). "Anxiolytic- and antidepressant-like properties of ketamine in behavioral and neurophysiological animal models." Neuroscience 161(2): 359-69.
- Fahn, S. and D. Sulzer (2004). "Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease." NeuroRx 1(1): 139-54.
- Fornaguera, J., R. J. Carey, et al. (1994). "Behavioral asymmetries and recovery in rats with different degrees of unilateral striatal dopamine depletion." Brain Res 664(1-2): 178-88.
- Fornaguera, J., R. K. Schwarting, et al. (1993). "Behavioral indices of moderate nigro-striatal 6-hydroxydopamine lesion: a preclinical Parkinson's model." Synapse 13(2): 179-85.
- Foster, A. C. and J. A. Kemp (2006). "Glutamate- and GABA-based CNS therapeutics." Curr Opin Pharmacol 6(1): 7-17.

- Greenamyre, J. T. (2001). "Glutamatergic influences on the basal ganglia." Clin Neuropharmacol 24(2): 65-70.
- Harvey, B. K., Y. Wang, et al. (2008). "Transgenic rodent models of Parkinson's disease." Acta Neurochir Suppl 101: 89-92.
- Hayes, M. W., V. S. Fung, et al. (2010). "Current concepts in the management of Parkinson disease." Med J Aust 192(3): 144-9.
- Hefti, F., E. Melamed, et al. (1980). "Circling behavior in rats with partial, unilateral nigro-striatal lesions: effect of amphetamine, apomorphine, and DOPA." Pharmacol Biochem Behav 12(2): 185-8.
- Hefti, F., E. Melamed, et al. (1980). "Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: biochemical characterization." Brain Res 195(1): 123-37.
- Himes, B. T., B. Neuhuber, et al. (2006). "Recovery of function following grafting of human bone marrow-derived stromal cells into the injured spinal cord." Neurorehabil Neural Repair 20(2): 278-96.
- Hoffman, E. J. and S. J. Mathew (2008). "Anxiety disorders: a comprehensive review of pharmacotherapies." Mt Sinai J Med 75(3): 248-62.
- Hogg, S. (1996). "A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety." Pharmacol Biochem Behav 54(1): 21-30.
- Hudson, J. L., C. G. van Horne, et al. (1993). "Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats." Brain Res 626(1-2): 167-74.
- Kirik, D., C. Rosenblad, et al. (1998). "Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat." Exp Neurol 152(2): 259-77.
- Kuczenski, R. and D. S. Segal (1997). "Effects of methylphenidate on extracellular dopamine, serotonin, and norepinephrine: comparison with amphetamine." J Neurochem 68(5): 2032-7.
- Kuffler, S. W. and C. Edwards (1958). "Mechanism of gamma aminobutyric acid (GABA) action and its relation to synaptic inhibition." J Neurophysiol 21(6): 589-610.
- Langston, J. W., L. S. Forno, et al. (1984). "Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey." Brain Res 292(2): 390-4.
- Lees, A. J., J. Hardy, et al. (2009). "Parkinson's disease." Lancet 373(9680): 2055-66.
- Lubics, A., D. Reglodi, et al. (2005). "Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury." Behav Brain Res 157(1): 157-65.
- Marsden, C. D. and J. A. Obeso (1994). "The functions of the basal ganglia and the paradox of stereotaxic surgery in Parkinson's disease." Brain 117 ( Pt 4): 877-97.
- McGeer, P. L., S. Itagaki, et al. (1988). "Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process." Ann Neurol 24(4): 574-6.
- Meredith, G. E., P. K. Sonsalla, et al. (2008). "Animal models of Parkinson's disease progression." Acta Neuropathol 115(4): 385-98.
- Morley, J. F. and H. I. Hurtig (2010). "Current understanding and management of Parkinson disease: five new things." Neurology 75(18 Suppl 1): S9-15.

- Obeso, J. A., C. Marin, et al. (2008). "The basal ganglia in Parkinson's disease: current concepts and unexplained observations." Ann Neurol **64** Suppl 2: S30-46.
- Paxinos, G. (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates.
- Pellow, S., P. Chopin, et al. (1985). "Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat." J Neurosci Methods **14**(3): 149-67.
- Przedborski, S., M. Levivier, et al. (1995). "Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine." Neuroscience **67**(3): 631-47.
- Salawu, F., A. Olokoba, et al. (2010). "Current management of Parkinson's disease." Ann Afr Med **9**(2): 55-61.
- Schwartz, R. K. and J. P. Huston (1996). "The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments." Prog Neurobiol **50**(2-3): 275-331.
- Silver, D. E. (2008). "Early, nondisabling Parkinson's disease: weighing the options for initial therapy." Neurol Clin **26**(3 Suppl): S1-13, v.
- Silvestrin, R. B., L. F. de Oliveira, et al. (2009). "The footfault test as a screening tool in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease." J Neurosci Methods **177**(2): 317-21.
- Simola, N., M. Morelli, et al. (2007). "The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease." Neurotox Res **11**(3-4): 151-67.
- Starkey, M. L., A. W. Barritt, et al. (2005). "Assessing behavioural function following a pyramidotomy lesion of the corticospinal tract in adult mice." Exp Neurol **195**(2): 524-39.
- Steiner, H., A. E. Bonatz, et al. (1988). "Lateralized wall-facing versus turning as measures of behavioral asymmetries and recovery of function after injection of 6-hydroxydopamine into the substantia nigra." Exp Neurol **99**(3): 556-66.
- Sullivan, R. M., A. Fraser, et al. (1994). "Asymmetrical orientation to edges of an openfield: modulation by striatal dopamine and relationship to motor asymmetries in the rat." Brain Res **637**(1-2): 114-8.
- Surendran, S. and S. Rajasankar (2010). "Parkinson's disease: oxidative stress and therapeutic approaches." Neurol Sci **31**(5): 531-40.
- Tenn, C. C. and L. P. Niles (1995). "Central-type benzodiazepine receptors mediate the antidopaminergic effect of clonazepam and melatonin in 6-hydroxydopamine lesioned rats: involvement of a GABAergic mechanism." J Pharmacol Exp Ther **274**(1): 84-9.
- Torres, E. M. and S. B. Dunnett (2007). "Amphetamine induced rotation in the assessment of lesions and grafts in the unilateral rat model of Parkinson's disease." Eur Neuropsychopharmacol **17**(3): 206-14.
- Treit, D., J. Menard, et al. (1993). "Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze." Pharmacol Biochem Behav **44**(2): 463-9.
- Ungerstedt, U. (1968). "6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons." Eur J Pharmacol **5**(1): 107-10.
- Ungerstedt, U. (1971). "Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system." Acta Physiol Scand Suppl **367**: 95-122.
- Ungerstedt, U. (1971). "Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system." Acta Physiol Scand Suppl **367**: 69-93.

- Ungerstedt, U. (1971). "Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed by rotational behaviour." Acta Physiol Scand Suppl 367: 49-68.
- Ungerstedt, U. and G. W. Arbuthnott (1970). "Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system." *Brain Res* 24(3): 485-93.
- Wu, Y., W. Le, et al. (2010). "Preclinical biomarkers of Parkinson disease." *Arch Neurol* 68(1): 22-30.