

AS ALTERAÇÕES GASTROINTESTINAIS E OLFATÓRIAS
PRECEDEM OS SINAIS MOTORES NO MODELO
EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO
PELA ROTENONA

LÍVIA HECKE MORAIS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-
graduação em Farmacologia do Centro de
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Santa Catarina como requisito
parcial para a obtenção do título de Mestre
em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi.

Coorientador: Prof. Dr. Anicleto Poli

Florianópolis - SC

2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Morais, Livia Hecke

AS alterações gastrointestinais e olfatórias precedem os sinais motores no modelo experimental da Doença de Parkinson induzido pela rotenona / Livia Hecke Moraes ; orientador, Reinaldo Naoto Takahashi ; co-orientador, Anicleto Poli. - Florianópolis, SC, 2013.

83 p.

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

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Doença de Parkinson. 3. Modelos animais. 4. Rotenona. I. Takahashi, Reinaldo Naoto . II. Poli, Anicleto. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

AGRADECIMENTOS

- ✓ Ao professor Reinaldo N. Takahashi, por ter aceitado me orientar e que, dessa maneira, me concedeu o privilégio de compartilhar da sua visão de ciência que certamente influenciará minha conduta científica nas próximas etapas. Sou muito grata pela grande dedicação durante minha orientação acadêmica, pela amizade e respeito.
- ✓ Ao professor Anicleto Poli, por toda a sua dedicação na minha co-orientação e durante os experimentos de HPLC. Também sou grata pelos ensinamentos que vão além da vivência acadêmica e ficarão para a vida. Agradeço também pelos momentos de amizade e apoio.
- ✓ À professora Daniela B. Hara, por ter acreditado neste trabalho desde o início, auxiliado no desenho experimental e por ter ajudado sempre que foi preciso durante o desenvolvimento. À colega Maíra Bicca pelo seu otimismo e pela ajuda no desenvolvimento dos experimentos de imunistoquímica, em andamento.
- ✓ Aos professores Roberto Andreatini e Giles A. Rae pela grande contribuição com suas correções e sugestões para a versão final desta dissertação, bem como, pelas discussões levantadas durante a defesa.
- ✓ Aos colegas de laboratório Tatiane, Marília, Cristiane, Jéssica, Rafael, Assini, Thiago pelo excelente ambiente de trabalho, pelas conversas científicas e não-científicas.
- ✓ Ao professor Giles A. Rae e às suas alunas (Alessandra, Stefânia, Lenyta, Samilla e Gisele), ao professor Fernando Spiller e ao professor André Báfica juntamente às suas alunas (Fernanda e Cristina) por sempre ajudarem, abrindo as portas dos seus laboratórios e auxiliando sempre que foi preciso, inclusive, na discussão de resultados, durante os experimentos.

Aos professores João B. Calixto, Rui D. Prediger, e Alexandra Latini por terem gentilmente disponibilizado a estrutura de seus laboratórios.

- ✓ Aos amigos e colegas da pós, Lara, Manuel, Ana Kelly, Vagner, Tatiane, Marília, Amanda, Flora, Renata, Leonardo, Karina, Patricia, Fernanda, Sandro por terem feito desses dois anos mais divertidos. À grande amiga Lenyta, por ter sempre me apoiado, desde a preparação para a prova de seleção até a conclusão desta etapa.
- ✓
- ✓ A minha mãe, Mildred, grande companheira, por me compreender tão bem, por me apoiar e me amar incondicionalmente.
- ✓ Aos Amigos externos Leandro Antero e Lívia Tiemi pela cumplicidade .
- ✓ Aos funcionários Pedro e Murilo, pelo cuidado dos animais.
- ✓ Ao CNPq, CAPES e FAPESC pelo apoio financeiro.

“Never ignore a gut feeling, but never believe that it's enough.”
Robert Heller

"The systems view looks at the world in terms of relationships and integration. Systems are integrated wholes whose properties cannot be reduced to those of smaller units. Instead of concentrating on basic building blocks or basic substances, the systems approach emphasizes basic principles of organization. Every organism- from the smallest bacterium through the wide range of plants and animals to humans is an integrated whole and thus a living system...All these natural systems are wholes whose specific structures arise from the interactions and interdependence of their parts. The activity of systems involves a process known as transaction- the simultaneous and mutually interdependent interaction between multiple components."

- Fritjof Capra
The Turning Point

RESUMO

Existem hipóteses que o processo patológico da Doença de Parkinson inicia-se no Sistema Nervoso Entérico e no bulbo olfatório. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar se a administração oral de um pesticida, rotenona, seria capaz de mimetizar a progressão temporal do parkinsonismo em camundongos, considerando os efeitos locais no trato gastrointestinal, efeitos comportamentais e neuroquímicos. Neste estudo, camundongos machos receberam administrações orais diárias de rotenona ou o veículo (carboximetilcelulose à 0,5%) por até 28 dias. Nossos resultados demonstram que o tratamento com a rotenona diminuiu a motilidade gastrointestinal associada à infiltração de leucócitos no cólon. Além disso, a rotenona prejudicou a discriminação e o reconhecimento olfativo, ao mesmo tempo em que induziu aumento taxa de renovação da serotonina no bulbo olfatório, sugerindo que as alterações neuroquímicas encontradas possam estar relacionadas ao prejuízo do processamento olfatório. No presente estudo, o comprometimento intestinal e olfatório precedem os danos motores, de maneira semelhante ao observado na Doença de Parkinson. Apesar disso, não houve diferença na concentração de monoaminas estriatais. O presente estudo demonstrou a importância do modelo experimental induzido pela administração oral de rotenona para compreensão dos mecanismos envolvidos nas alterações pré-motoras da Doença de Parkinson. Além disso, nossos resultados reforçam a importância da exposição a toxinas ambientais como fator de predisposição para a Doença de Parkinson. Ainda, esses resultados ressaltam a importância da via oral como porta de entrada para toxinas ambientais e o epitélio gastrointestinal como a primeira barreira de contato entre pesticidas e o organismo.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, rotenona, Sistema Nervoso Entérico, bulbo olfatório.

ABSTRACT

Accumulating evidence suggested that the pathological process of Parkinson's disease starts in the enteric nervous system and in the olfactory bulb. However this hypothesis has not yet been fully investigated. Therefore, the aim of this study was to investigate the role of enteric nervous system and olfactory bulb in the onset of Parkinson's disease induced by rotenone administration in mice. Male Swiss mice received daily oral administrations of rotenone 30 mg/kg or vehicle (0.5% carboxymethylcellulose) up to 28 days. Our results showed that rotenone was able to reduce the gastrointestinal motility, which was associated to leukocyte infiltration in the colon. Regarding the olfactory function, rotenone disrupted the discrimination and recognition abilities. At the same time, this treatment increased the serotonin turnover in the olfactory bulb, which suggests that these neurochemical alterations may be linked with the abnormal processing of odor stimulus. These alterations preceded the appearance of motor disability in our model, such as in Parkinson's Disease clinical condition. Despite of it, no difference was found in monoaminergic concentrations in striatum. The current result indicated that rotenone model can be an important tool for studying premotor phase of parkinsonism in rodents. Moreover, our results reinforce the importance of environmental exposure to toxins and the key role of intestinal epithelium as the first point of contact with pesticides and chemical agents.

Keywords: Parkinson's disease, rotenone, Enteric nervous system and olfactory bulb.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismos de neurotoxicidade da rotenona.	13
Figura 2- Efeito da administração da rotenona (7 dias) em diferentes doses na atividade motora espontânea no campo aberto..	29
Figura 3- Efeito da administração da rotenona (7 dias) em diferentes doses na na coordenação motora dos animais no rotarod.....	30
Figura 4- Efeito da administração diária de rotenona (30 mg/kg) por 28 dias na atividade motora espontânea no campo aberto.....	31
Figura 5- Efeito da administração diária por 28 dias de rotenona (30 mg/kg) na coordenação motora no teste do rotarod	32
Figura 6 - Efeito da administração da rotenona em diferentes doses na motilidade gastrointestinal após 7 dias de administração.....	37
Figura 7- Efeito da administração aguda da rotenona (30 mg/kg) na motilidade gastrointestinal	39
Figura 8- Efeito da administração diária por 28 dias de rotenona (30 mg/kg) na motilidade gastrointestinal.	41
Figura 9 - Efeito da administração aguda da rotenona (30 mg/kg) na ativação da enzima MPO.....	42
Figura 10- Efeito da administração da rotenona 30 mg/kg na ativação da enzima MPO, após 7 dias de tratamento	43
Figura 11- Efeito da administração da rotenona 30 mg/kg na ativação da enzima MPO, após 28 dias de tratamento.	44
Figura 12- Escores atribuídos à análise do dano microscópico histológico do cólon induzido pela rotenona.....	45
Figura 13- Modificações histológicas induzidas pela rotenona após 12 h.	46
Figura 14- Escores atribuídos à análise do dano microscópico histológico do cólon induzido pela rotenona após 7 dias de tratamento	47
Figura 15-Modificações histológicas induzidas pela rotenona após 7 dias de tratamento.	48

Figura 16- Escores atribuídos à análise do dano microscópico histológico do cólon induzido pela rotenona após 28 dias de tratamento	49
Figura 17- Modificações histológicas induzidas pela rotenona (30 mg/kg) após 28 dias de tratamento.	50
Figura 18- Efeito da administração da rotenona na discriminação olfatória e no reconhecimento social.....	52
Figura 19- Efeito da administração prolongada de rotenona (7 dias) nas concentrações de monoaminas no bulbo olfatório.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise histológica e avaliação do dano microscópico do cólon de acordo com os escores propostos por Neurath et al. (1995) ...	24
Tabela 2 - Concentrações de DA, 5-HT e respectivos metabólitos no estriado após a administração de rotenona 10, 30 e 60 mg/kg (HPLC)	33
Tabela 3 - Concentrações de DA, 5-HT e metabólitos no estriado após a administração de rotenona 30 mg/kg por 28 dias (HPLC)	35
Tabela 4 - Resumo dos principais efeitos motores, olfatórios, gastrointestinais induzidos pela administração aguda e prolongada de rotenona (30 mg/kg)	55

LISTA DE ABREVIACOES

α -sin	α -sinucleína
ANOVA	Análise de variância
BHE	Barreira hematoencefálica
BO	Bulbo olfatório
CMC	Carboximetil-celulose
5-HT	5-hidroxitriptamina
5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindolacético
DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina
DOPAC	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
DP	Doença de Parkinson
E.P.M.	Erro padrão da média
EROS	Espécies reativas de oxigênio
IMAO-B	Inibidores da enzima monoamina oxidase B
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
i.g.	Intragástrica
i.n.	Intranasal
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon- γ
L-DOPA	Levodopa
MPO	Mieloperoxidase
MPP+	1-metil-4-fenilpiperidum
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MPO	Mieloperoxidase
MPP+	1-metil-4-fenilpiperidum
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NA	Noradrenalina
NDMV	Núcleo dorsal motor do nervo vago
NIML	Núcleo intermedio-lateral da medula espinhal
RPM	Rotações por minuto
6-OHDA	6-hidroxidopamina
SNC	Sistema Nervoso Central
SNE	Sistema Nervoso Entérico
SNpc	Substância negra parte compacta
PM	Plexo mioentérico
PS	Plexo submucoso
TH	Tirosina-hidroxilase
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

v.o.

Via oral

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIACÕES	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. INTRODUÇÃO À DOENÇA DE PARKINSON	1
1.2. ALTERAÇÕES NEUROPATOLÓGICAS NA DOENÇA DE PARKINSON	3
1.3. DO INTESTINO AO CÉREBRO: IMPLICAÇÕES PARA A DOENÇA DE PARKINSON	5
1.4. EXPOSIÇÃO A TOXINAS AMBIENTAIS E A INCIDÊNCIA DA DOENÇA DE PARKINSON	8
1.5. MODELOS ANIMAIS DE PARKINSONISMO BASEADOS EM NEUROTOXINAS	10
1.5.1. A rotenona como modelo animal de parkinsonismo	12
2. JUSTIFICATIVA	16
3. OBJETIVOS	17
3.1. OBJETIVO GERAL	17
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	18
4.3. DROGAS E REAGENTES	18
4.4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	19
4.4.1. Testes comportamentais	19
4.4.1.1. Avaliação da função motora	19

4.4.1.1.1. Atividade motora espontânea na arena do campo aberto _____	19
4.4.1.1.2. Avaliação da coordenação motora no teste do Rotarod _____	20
4.4.1.2. Testes comportamentais para verificação da função olfatória _____	20
4.4.1.2.1. Discriminação olfatória _____	20
4.4.1.2.2. Reconhecimento social _____	21
4.4.2. Avaliação da motilidade gastrointestinal _____	22
4.4.2.1. Contagem do número de bolos fecais em 1 hora de coleta _____	22
4.4.2.2. Trânsito gastrointestinal _____	22
4.4.3. Avaliação da migração de células inflamatórias para o cólon _____	22
<p>A avaliação da migração de células inflamatórias para o cólon foi realizada por meio de dois procedimentos: 1) Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO); 2) Análise histológica do cólon. Essa sequência experimental foi realizada em 3 intervalos de tempo: agudamente (12 h) e após 7 dias e 28 dias de tratamento com rotenona 30 mg/kg ou o veículo. _____</p>	
4.4.3.1. Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) _____	23
4.4.3.2. Análise histológica do cólon _____	23
4.4. Análise das concentrações de monoaminas cerebrais por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) _____	25
4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA _____	27
5. RESULTADOS _____	28
5.1. Efeitos da administração (v.o.) da rotenona na função motora _____	28
5.1.1. Efeitos da administração da rotenona (10 mg/kg, 30 mg/kg, 60 mg/kg) por sete dias, na função motora. _____	28
5.1.2. Alterações motoras induzidas pela administração da rotenona (30 mg/kg) por 28 dias _____	30

5.2. Efeitos da administração (v.o.) de rotenona nas concentrações de monoaminas estriatais	32
5.2.1. Efeitos da administração da rotenona (10, 30 e 60 mg/kg) por sete dias, na concentração de monoaminas estriatais	32
5.2.2. Efeitos da administração da rotenona (30 mg/kg) por 28 dias na concentração de monoaminas no estriado (HPLC).	34
5.3. Efeitos da rotenona na motilidade gastrointestinal	36
5.3.1 Efeitos da administração da rotenona (10, 30, 60 mg/kg) por 7 dias, na motilidade gastrointestinal	36
5.3.2. Efeitos da administração aguda de rotenona (30 mg/kg) no trânsito gastrointestinal	38
5.3.3. Efeitos da administração da rotenona (30 mg/kg) por 28 dias na motilidade gastrointestinal	40
5.4. Efeitos da rotenona (30 mg/kg) na migração de células inflamatórias para o cólon	42
5.4.1. Efeito agudo da administração da rotenona (30 mg/kg) na atividade da MPO no cólon	42
5.4.2. Efeitos da administração da rotenona (30 mg/kg) por 7 dias na atividade da MPO no cólon	43
5.4.3. Efeitos da administração da rotenona (30 mg/kg) por 28 dias na atividade da MPO no cólon	44
5.4.4. Modificações histológicas no cólon de animais após administração aguda de rotenona (30 mg/kg)	45
5.4.5. Modificações histológicas no cólon de animais que receberam administrações de rotenona (30 mg/kg) por 7 dias	47
5.4.6. Modificações histológicas no cólon de animais que receberam administrações de rotenona (30 mg/kg) por 28 dias	49
5.5 Alterações na função olfatória induzidas pela administração da rotenona (30 mg/kg) por 7 dias	51
5.6. Alterações nas concentrações de monoaminas no bulbo olfatório induzidas pela administração da rotenona (30 mg/kg) por 7 dias (HPLC)	53

<i>5.7. Principais efeitos induzidos pela administração aguda e prolongada de rotenona (30 mg/kg)</i>	55
6. DISCUSSÃO	56
7. CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXO A	84

1. INTRODUÇÃO

1.1. INTRODUÇÃO À DOENÇA DE PARKINSON

A Doença de Parkinson (DP) é parcialmente caracterizada pela neurodegeneração dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal resultando em complexos sinais motores incluindo tremor em repouso, rigidez e bradicinesia. A primeira descrição médica da DP foi feita por James Parkinson em sua monografia publicada em 1817, denominada “An essay on the Shaking Palsy”. James Parkinson descreveu precisamente os sinais motores apresentados por seis pacientes como paralisia agitante. Além desses sinais ele também observou alguns sinais não motores (CHAUDHURI et al., 2006). Mesmo antes de James Parkinson, Sylvius de La Boe (séc XIII) já havia diferenciado o tremor em repouso de outros tipos de tremores. Em 1880, Charcot distinguiu duas patologias que eram até então muito confundidas: a esclerose múltipla e a paralisia agitante, denominando a última de Doença de Parkinson (DP). Subsequentemente, Charcot descreveu parte dos sinais motores da DP que são conhecidos até hoje: rigidez muscular, micrografia e postura arqueada. Charcot descreveu a natureza progressiva da doença em três estágios que deveriam se manifestar no decurso de 30 anos: fase inicial da doença, fase intermediária e fase de manifestação completa da sintomatologia (DUVOISIN, 1987; GOEDERT et al., 2012).

Em 1958, Arvid Carlsson descobriu o sistema dopaminérgico no cérebro de mamíferos e descreveu os neurônios dopaminérgicos da substância negra parte compacta (SNpc) como componentes da via dopaminérgica nigroestriatal. Essas descobertas implicaram em outras duas: primeira, a neurodegeneração dos neurônios dopaminérgicos da SNpc diminui a liberação de dopamina (DA) no estriado e é responsável pela maioria dos sinais motores do parkinsonismo induzido em roedores; segunda, a administração do precursor de dopamina levodopa (L-DOPA) alivia a maioria desses sinais (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

A DP atinge 1,5% da população mundial acima de 65 anos (MEISSNER et al., 2011). Estima-se que em 2005 eram 4,1 milhões de portadores da DP e projeta-se para 2030 que sejam 8,7 milhões (MARTINEZ; GREENAMYRE, 2012). Não existem dados atualizados, disponíveis na literatura, sobre a prevalência da DP no Brasil. No

entanto, o CENSO realizado no ano 2000 estimou 200.000 brasileiros portadores da DP. Trata-se da segunda doença neurodegenerativa mais frequente e é uma das condições neurológicas menos compreendidas em termos de fatores causais.

Certamente o processo do envelhecimento é o fator causal mais predominante, já que são relativamente poucos os diagnósticos feitos em pessoas com menos de 40 anos. A doença também é mais prevalente em homens devido a um possível papel protetor do estrogênio. A maioria dos casos de parkinsonismo é considerada idiopática, de causa desconhecida; e, apenas 10% têm causa genética (SCHNABEL, 2010). Apesar disso, acredita-se que a maioria desses casos resultem de uma complexa interação entre genes, fatores ambientais somados ao envelhecimento. Outros fatores causais associados à etiologia da DP incluem: disfunções mitocondriais, estresse oxidativo, formação de agregados protéicos, vulnerabilidade dos neurônios dopaminérgicos, inflamação, excitotoxicidade glutamatérgica (MARTINEZ; GREENAMYRE, 2012).

A DP é uma doença de manifestação clínica heterogênea. Os dois subtipos mais frequentes que existem são: aquele em que o tremor em repouso é predominante, que frequentemente ocorre em pessoas mais jovens. O segundo subtipo melhor caracterizado pela instabilidade postural, desequilíbrio, rigidez, bradicinesia e acinesia, sendo mais comum em idosos (OBESO et al., 2010). Além dos sintomas motores, a DP também é caracterizada por sintomas não-motores que afetam diretamente a qualidade de vida dos portadores da DP, principalmente pelo fato de boa parte deles não responder bem à medicação atual.

Existe um amplo espectro de sintomatologia não-motora na DP, incluindo: distúrbios neuropsiquiátricos (depressão, ansiedade, déficit de atenção, alucinações, demência, comportamentos obsessivos, confusão mental, delírio e ataques de pânico); distúrbios de sono (síndrome das pernas inquietas, distúrbios do sono paradoxal, sonolência diurna e insônia); sintomas autonômicos (distúrbios urinários, sudorese, hipotensão ortostática e disfunções sexuais); distúrbios gastrointestinais (dysfagia, refluxo, náusea, constipação e incontinência); problemas sensoriais (parestesias, dores e distúrbios olfatórios) e outros sintomas (fadiga, seborréia, perda de peso). Os distúrbios gastrointestinais, olfativos, distúrbios de sono e psiquiátricos da DP precedem o surgimento da sintomatologia motora (CHAUDHURI et al., 2006; WOLTERS, 2009). Apesar disso, apenas os sintomas motores são considerados para diagnóstico clínico da doença e quando esses se

manifestam, a dopamina estriatal já se encontra diminuída em 80% e já houve neurodegeneração de 60% dos neurônios dopaminérgicos da SNpc (VIVES-BAUZA et al., 2009).

Os sintomas motores exibem grande melhora com a terapia medicamentosa disponível atualmente, pois o alvo desses medicamentos é basicamente o sistema dopaminérgico: L-DOPA, o precursor da dopamina; agonistas dopaminérgicos, inibidores da enzima monoamina oxidase B (IMAO-B), inibidores da enzima catecol-O-metiltransferase. A L-DOPA continua sendo o principal medicamento de escolha e o mais eficaz para os sintomas motores. No entanto, com a progressão da doença surgem efeitos indesejados como flutuações motoras e discinesias, que se alternam entre períodos de mobilidade reduzida e movimentos involuntários. A L-DOPA tem pouco impacto nos sintomas não motores, sendo esse um grande desafio para as novas abordagens terapêuticas (VOON et al., 2009). Além do tratamento sintomático da DP, ainda não foram descobertas novas estratégias neuroprotetoras ou neurorestauradoras que sejam realmente eficazes na clínica. O avanço no campo da descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos dependerá de múltiplos avanços convergentes que incluem: descobertas transformadoras sobre a neuropatologia da doença, diagnósticos precoces e modelos animais de maior qualidade que permitam uma melhor tradução de pesquisa pré-clínica do laboratório para a clínica (MEISSNER et al., 2011).

1.2. ALTERAÇÕES NEUROPATOLÓGICAS NA DOENÇA DE PARKINSON

Por muitas décadas acreditou-se que a DP envolveria um processo neuropatológico simples, incluindo especificamente neurônios dopaminérgicos da SNpc e resultando na diminuição da neurotransmissão dopaminérgica no estriado (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Essa neurodegeneração ocorre na maioria dos pacientes que manifestam os clássicos sinais motores descritos por Charcot em 1880. Essa visão está começando a mudar, devido a descobertas recentes sobre a DP que demonstram uma maior complexidade dos sintomas e uma neuropatologia mais ampla. (DUNNING et al., 2012).

Além da neurodegeneração dos neurônios da SNpc, a DP é caracterizada neuropatologicamente pela presença de agregados protéicos denominados corpúsculos de Lewy, localizados no corpo

celular ou nos dendritos de neurônios (LEWY, 1912 apud GOEDERT et al., 2012; TRETIAKOFF, 1919 apud GOEDERT et al., 2012). O principal constituinte dos corpúsculos de Lewy é a proteína α -sinucleína (*asin*) na sua forma enovelada e insolúvel (SPILLANTINI et al., 1998). A *asin* é abundante nos terminais pré-sinápticos, nos quais 50% da proteína está associada à membrana sináptica e outros 50% estão no citosol. A *asin* apresenta uma função fisiológica na regulação da formação de vesículas sinápticas, facilitando a interação entre os endossomos primários e a fosfolipase D2. Mutações da *asin* prejudicam a formação de vesículas sinápticas disponíveis para o estoque da DA, levando ao acúmulo da DA no citosol. Como o metabolismo da DA produz espécies reativas de oxigênio (EROS), o mal funcionamento da *asin* é prejudicial à célula (LOTHARIUS; BRUNDIN, 2002).

Com base na análise patológica e anatômica de portadores da DP e a presença de *asin*, Braak et al. (2004) classificaram a DP em seis estágios (pré-sintomáticos e sintomáticos). As primeiras alterações neuropatológicas são observadas no núcleo dorsal motor do nervo vago (NDMV), Sistema Nervoso Entérico (SNE) e no bulbo olfatório (BO). Nesse estágio, os pacientes não apresentam nenhum comprometimento motor, portanto, são consideradas alterações pré-sintomáticas correspondentes ao estágio um de Braak. No segundo estágio, neurônios noradrenérgicos do loco cerúleo e serotoninérgicos dos núcleos da rafe são comprometidos. Conforme a doença se estende e os sintomas motores começam se manifestar, a SNpc e outras áreas do mesencéfalo e do prosencéfalo basal são afetadas, correspondendo aos estágios três e quatro de Braak, iniciando a fase sintomática da DP. Finalmente, a neurodegeneração atinge sua maior extensão, afetando o córtex cerebral (estágios cinco e seis). Nessa etapa a doença se manifesta em todas as suas dimensões clínicas (BRAAK et al., 2003; DEL TREDICI; BRAAK, 2012).

Em 2008, os estágios de Braak ganharam destaque, quando autópsias realizadas em portadores da DP, que receberam implante de células embrionárias neurais, revelaram *asin* tanto nos próprios neurônios quanto nos neurônios enxertados (LI et al., 2008). Os mecanismos pelos quais a *asin* se propaga de neurônio a neurônio estão sendo investigados por meio de estudos *in vitro* e *in vivo* (DESPLATS et al., 2009; PAN-MONTOJO et al., 2012). Resultados preliminares indicam que a propagação da *asin* possa envolver processos inflamatórios de maneira cíclica: a agregação de *asin* pode levar à ativação de células inflamatórias, como macrófagos e microglias,

aumentar a produção e liberação de citocinas e quimiocinas e resultar em aumento de EROS. Por sua vez, o aumento de EROS pode agravar o processo inflamatório e aumentar os agregados de *α*sin (GRIFFIN et al., 2006; BRUNDIN et al., 2008; LEMA TOMÉ et al., 2012). Outros estudos demonstram que a propagação da *α*sin pode ocorrer por meio de processos de exocitose e endocitose de neurônio a neurônio; dessa maneira contribuindo a para a propagação da neurodegeneração (DESPLATS et al., 2009; PAN-MONTOJO et al., 2012).

Na comunidade científica ainda existem dúvidas quanto a ocorrência ou não do decurso temporal do parkinsonismo de acordo com os estágios progressivos de Braak (KALAITZAKIS et al., 2008; BEACH et al., 2009). Contudo, as estatísticas demonstram que a maioria dos pacientes exibem comprometimento olfatório e gastrointestinal. Esses dados, em conjunto, possibilitaram o surgimento de duas hipóteses majoritárias para a propagação da DP: (1) Hipótese retrógrada: a propagação ocorre pela rota gastrointestinal desde o SNE até o Sistema Nervoso Central (SNC), via NDMV e núcleo intermedio-lateral da medula espinhal (NIME); (2) Hipótese anterógrada: a propagação ocorre desde o BO até o mesencéfalo, por meio de outras áreas olfativas e do sistema límbico (HAWKES et al., 2007).

1.3. DO INTESTINO AO CÉREBRO: IMPLICAÇÕES PARA A DOENÇA DE PARKINSON

No século XIX foi postulado que o SNE seria o segundo cérebro (LEBOUVIER et al., 2009). No final da década de 20 do século seguinte, Walter Cannon foi pioneiro nos estudos sobre a motilidade gastrointestinal, enfatizando o processamento cerebral das funções gastrointestinais. Hoje há um maior reconhecimento de que o eixo íntestino-cérebro é composto de comunicações bidirecionais: conexões neurais, hormonais e imunológicas que atuam mantendo a homeostase do organismo. Dessa maneira, a disfunção desse eixo pode levar a consequências patológicas (CRYAN; DINAN, 2012). Existe cerca de 200 a 600 milhões de neurônios no SNE humano, o mesmo número de neurônios presentes na medula espinhal. O tamanho e complexidade do SNE não são surpreendentes quando se considera que a superfície gastrointestinal é 100 vezes maior que a superfície da pele, possui a maior população de microorganismos comensais e apresenta 2/3 das células do sistema imune de todo organismo. Sua complexidade é

incomparável com a do SNC, porém esses fatos demonstram a sua importância para a homeostase do organismo (MAYER, 2011).

O SNE é formado por uma rede neural integrada, organizada em dois plexos ganglionares: plexo miotérico (PM) e plexo submucoso (PS), formado por neurônios e células da glia. Os neurônios do PM controlam a atividade da musculatura lisa do intestino e os do PS, controlam a liberação de secreções. Essa regulação das funções gastrointestinais é dependente da liberação de neurotransmissores específicos: peptídeo intestinal vasoativo, óxido nítrico, acetilcolina e substância P, entre muitos outros (SCHEMANN; NEUNLIST, 2004). Há ainda neurônios dopaminérgicos que parecem exercer função inibitória no intestino de roedores (LI et al., 2006).

A comunicação entre o intestino e o cérebro ocorre por vias aferentes e eferentes. Os neurônios aferentes primários, que carregam a informação sensorial para o SNC, são localizados nos nervos vagais e nervos simpáticos (esplâncnicos). Os aferentes primários esplâncnicos possuem seu corpo celular na lâmina I da medula espinhal e terminam no intestino e eles estão envolvidos na sensação de dor no trato gastrointestinal. Os aferentes primários vagais se projetam desde o trato gastrointestinal até o núcleo do trato solitário, iniciando uma série de reflexos vagais que afetam a mastigação, a motilidade gastrointestinal e as secreções. Os terminais de alguns aferentes vagais terminam muito próximos às células imunes da mucosa e respondem a uma variedade de sinalizações secretadas por mastócitos, linfócitos, incluindo triptase, histamina, serotonina (5-HT) e diversas citocinas (LEBOUVIER et al., 2009; MAYER, 2011).

As vias eferentes parassimpáticas consistem em nervos vagais que controlam a motilidade e as secreções do trato gastrointestinal e em nervos sacrais que regulam funcionalmente a parte distal do cólon e o reto (LEBOUVIER *et al.*, 2009). A inervação do trato gastrointestinal superior se origina no núcleo da medula e no NDMV. Todos os eferentes vagais utilizam a acetilcolina como principal neurotransmissor.

O SNE também se comunica com o SNC através do sistema imune. Os aferentes vagais podem responder a produtos secretados por mastócitos, macrófagos e a muitos mediadores inflamatórios, sugerindo uma função do nervo vago em situações inflamatórias (EK et al., 1998; GOEHLER et al., 2000; GOEHLER et al., 2005).

O eixo intestino-cérebro tem grande importância para DP considerando a hipótese anterógrada de propagação da neuropatologia.

As primeiras associações da DP e o acometimento do SNE foram realizadas por Qualman et al. (1984) e Wakabayashi et al. (1990). No entanto, apenas com os estudos de Braak et al. (2006), o assunto voltou a ser investigado.

Portadores da DP apresentam diversos sintomas associados às disfunções gastrointestinais. Os mais comuns são: constipação, dificuldade de mastigação, retardo do esvaziamento gástrico, boca seca ou excesso de salivação, disfagia e refluxo gastroesofágico (PFEIFFER, 2003; WOLTERS, 2009; CERSOSIMO et al., 2012).

A disfagia, com ou sem excesso de salivação, pode estar relacionada aos problemas motores e também ao comprometimento da motilidade da faringe e do esôfago. Na DP, o retardo no esvaziamento gástrico pode causar náuseas, desconforto abdominal e contrações estomacais anormais. Essa sintomatologia pode alterar a absorção da L-DOPA e facilitar a absorção de neurotoxinas (CHAUDHURI et al., 2006; WOLTERS, 2009). A constipação é um dos sintomas não-motores mais comuns, afetando mais de 50% dos portadores da DP e 87 % daqueles que sofrem de problemas gastrointestinais (CERSOSIMO et al., 2012). Como consequência, sofrem com inchaço abdominal, dores e náuseas. A constipação se manifesta entre 10 a 20 anos antes dos sintomas motores da DP (SAVICA et al., 2010). Os sintomas gastrointestinais não melhoram com a terapia dopaminérgica convencional, sugerindo que mecanismos não-dopaminérgicos estejam envolvidos. O tratamento farmacológico para a constipação inclui uso de laxantes diariamente (ex: polietilenoglicol), agonistas do receptor 5-HT₄, antagonistas dos receptores dopaminérgicos periféricos, colinomiméticos e misoprostol (WOLTERS, 2009).

Estudos histológicos correlacionam essa sintomatologia com a presença de corpúsculos de Lewy em neurônios do PM e PS observados em biópsias de rotina da porção distal do cólon, em portadores da DP (FORSYTH et al., 2011; DERKINDEREN et al., 2011; POUCKET et al., 2012). O mecanismo pelo qual os agregados de α sin se formam no intestino ainda é desconhecido, mas acredita-se que a inflamação e a produção de EROS local possam estar relacionadas. O primeiro estudo que associa diretamente a inflamação intestinal e a DP revelou, no cólon de portadores da DP, um aumento significativo de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interferon (IFN)- γ , interleucina (IL)-6, IL-1 β e de marcadores gliais (DEVOS et al., 2013).

Contrastando com a grande quantidade de estudos envolvendo modelos animais da DP baseados em neurotoxinas e seus efeitos no SNC, poucos estudos incluem o SNE. Em 2007, Anderson et al. encontraram redução de 40% dos neurônios dopaminérgicos no cólon de camundongos que receberam administração aguda de 1-metil-4 fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), bem como aumento da motilidade do cólon mas nenhuma alteração no esvaziamento gástrico, ao contrário do que é observado na clínica. Em um modelo de administração crônica do MPTP em primatas não-humanos foi observado um aumento do número de neurônios nitrérgicos e uma redução do número de neurônios dopaminérgicos no PS. Em 2009, Lin e colaboradores demonstraram que animais transgênicos que super-expressam α sin apresentam redução da motilidade do cólon. Outros estudos, com o modelo da injeção unilateral de 6-Hidróxidopamina (6-OHDA) encontraram diminuição dos neurônios nitrérgicos e dismotilidade do cólon (TIAN et al., 2008; BLANDINI et al., 2009), diminuição da expressão de receptores D_2 , bem como, aumento da expressão do transportador de dopamina (DAT) e da tirosina hidroxilase (TH) no PS dos animais lesionados (COLUCCI et al., 2012).

Em outro modelo animal da DP, a administração intraperitoneal da rotenona em ratos desencadeou diversos efeitos no SNE: aumento da expressão de α sin no intestino; diminuição da contratilidade do cólon; neurodegeneração dos neurônios entéricos do OS; e, retardo do esvaziamento gástrico (DROLET et al., 2009). Recentemente Pan-Montojo e colaboradores demonstraram que a administração crônica e i.g. de rotenona pode desencadear alterações gastrointestinais em camundongos, tais como: aumento da expressão de α sin, neurodegeneração dos neurônios colinérgicos do SNE e ativação de astrócitos (PAN-MONTOJO et al., 2010) e que a progressão das alterações neuropatológicas desde o SNE até o SNC pode ser dependente do nervo vago (PAN-MONTOJO et al., 2012).

1.4. EXPOSIÇÃO A TOXINAS AMBIENTAIS E A INCIDÊNCIA DA DOENÇA DE PARKINSON

Em 1983, Langston e Ballard reportaram que um grupo de usuários de drogas ilícitas desenvolveu uma forma de parkinsonismo causada pela substância MPTP (LANGSTON; BALLARD, 1983). Esse incidente originou não somente um importante modelo animal para estudo da DP, mas também impulsionou pesquisas que buscam

compreender como agentes ambientais, com propriedades e mecanismos de ação similares aos do MPTP poderiam ser responsáveis por grande parte dos casos de DP.

Estudos epidemiológicos identificaram diversas classes de riscos e de compostos ambientais que estão relacionados à patogênese da DP, como por exemplo, o estilo de vida rural, consumo de água de poços (GORELL et al., 1998; ZORZON et al., 2002), dieta, exposição a metais pesados, solventes industriais (JOLLOW et al., 2009) e à pesticidas (KAMEL et al., 2007; TANNER et al., 2011). Entre esses, os pesticidas, herbicidas e fungicidas tem recebido maior atenção quanto aos riscos de desencadear a DP (CANNON; GREENAMYRE, 2011). Essas pesquisas incluem estudos de caso, caso-controle, auto-relato, tornando difícil concluir se essa é uma relação causal e ainda se envolve um ou mais tipos de pesticidas combinados (BROWN et al., 2006; MORETTO; COLOSIO, 2013).

Os danos anatômicos e comportamentais subsequentes à exposição a pesticidas podem ser classificados temporalmente em dois tipos: 1) agudos- que se manifestam rapidamente após a exposição podem resultar em alterações neurológicas e fenotípicas reversíveis ou irreversíveis, podendo ou não iniciar uma disfunção e/ou morte celular e 2) crônicos- necessitam semanas ou anos para produzirem disfunções celulares e/ou morte celular a ponto de gerar alterações neurológicas detectáveis, como por exemplo a neurodegeneração (CANNON; GREENAMYRE, 2011).

Estudos epidemiológicos encontraram relações positivas entre dieldrin, maneb, combinações de maneb e paraquat, ou de paraquat e rotenona e a DP. Entre esses, os mais fortemente relacionados são a rotenona e o paraquat, dois pesticidas amplamente utilizados na agricultura. (KAMEL et al., 2007). A DP esteve 2,5 vezes mais frequente entre os indivíduos que foram expostos à rotenona comparando com àqueles indivíduos que não foram expostos (TANNER et al., 2011).

A rotenona é utilizada na piscicultura da Ásia e da América do Sul, desde o século XVII. Apesar de ser utilizada há muitos anos, existem poucos estudos sobre seus resíduos em alimentos (CABRAS et al., 2002). Nos últimos anos ela tornou-se mais utilizada por se tratar de um pesticida orgânico, considerado pouco perigoso por sua instabilidade e susceptibilidade à fotodegradação. A rotenona é um inseticida botânico obtido de plantas leguminosas das espécies *Derris elliptica*, *Lonchocarpus nicou*, e *Tephrosia vogelii*. Ela é um inseticida de amplo

espectro, muito utilizado para o controle de pulgões e tripés, em frutas e vegetais. Apresenta um papel secundário como acaricida (JARDIM et al., 2009).

A utilização da rotenona foi proibida na União Européia e restringida nos Estados Unidos em 2007 (SCHAPIRA, 2010). No entanto, no Brasil a rotenona é amplamente comercializada e utilizada.

1.5. MODELOS ANIMAIS DE PARKINSONISMO BASEADOS EM NEUROTOXINAS

Os modelos animais disponíveis para o estudo da DP podem fornecer informações importantes para melhor compreensão da neuropatologia, assim como, serem utilizados na descoberta de novos fármacos para tratamento. No entanto, os modelos animais atuais são limitados e não conseguem mimetizar perfeitamente o estado da DP (BOVÉ et al., 2005).

Os critérios vigentes para um modelo ideal da DP incluem: apresentar os sinais motores característicos da neurodegeneração dopaminérgica nigroestriatal e apresentar a formação de corpúsculos de Lewy nos neurônios remanescentes. Um modelo mais completo também deveria apresentar: neurodegeneração central de outros sistemas de neurotransmissores (noradrenérgico, serotoninérgico e colinérgico); neurodegeneração de outras estruturas (loco cerúleo, núcleo pedunculopontino, núcleos da rafe, NDMV, núcleo anterior olfatório); alterações comportamentais relacionadas à neurodegeneração dessas outras estruturas e alterações periféricas (CICCHETTI et al., 2009).

De uma maneira geral, os modelos animais baseados em toxinas focam em interromper ou diminuir a circuitaria nigroestriatal. Esses modelos incluem 6-OHDA, MPTP, rotenona, paraquat, maneb entre outros (FLEMING et al., 2012). No entanto cada uma dessas neurotoxinas apresenta particularidades, diferindo quanto aos mecanismos de ação e quanto aos efeitos comportamentais produzidos (BOVÉ; PERIER, 2012).

A 6-OHDA foi a primeira toxina utilizada como modelo da DP e até hoje é um dos mais importantes modelos que existe. Devido à sua semelhança estrutural com a DA e Noradrenalina (NA), essa substância é captada pelos neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos através do transportador de DA (DAT) e do transportador de NA, respectivamente. No entanto a 6-OHDA não atravessa a barreira hematoencefálica (BHE), o que requer uma administração local da toxina. Uma vez no

interior dos neurônios, a toxina inibe os complexos I e IV da cadeia respiratória mitocondrial e produz radicais livres (BOVÉ et al., 2005). Sinais motores e não-motores acompanhados de alterações neuroquímicas induzidas pela 6-OHDA foram descritas em roedores (FERRO et al., 2005; TADAIESKY et al., 2008; SANTIAGO et al., 2010; SILVA, 2012).

Em 1983 Langston e colaboradores descobriram o MPTP e a administração dessa toxina passou a ser utilizada como modelo experimental da DP. A toxicidade do MPTP deve-se ao seu metabólito tóxico, 1-metil-4-fenilpirídio (MPP+). O MPTP é convertido em MPP+ pela enzima monoamina oxidase-B presente nos astrócitos, e atravessa a BHE se ligando ao DAT. É um inibidor do complexo I que pode ser administrado sistemicamente, ou por vias intracranial e intranasal (i.n.). Após uma administração aguda sistêmica ou intracranial, a neurodegeneração ocorre rapidamente e não progressivamente (MEREDITH et al., 2008). Um protocolo alternativo, foi publicado por Prediger et al. (2006) no qual os autores demonstraram que a infusão i.n. aguda de MPTP poderia levar à diminuição da expressão da TH na SNpc em 15% após 7 dias e esse efeito se manteve até 21 dias após a administração.

O paraquat é um dos herbicidas mais populares. Apesar da sua proibição nos Estados Unidos da América e na União Européia, ainda é utilizado em países menos desenvolvidos (TANNER et al., 2011). Apresenta estrutura similar a do MPP+ e sua toxicidade deve-se à formação de EROS e inibição do complexo III mitocondrial. Apresenta mecanismos indiretos de excitotoxicidade, estimulando o efluxo de glutamato e ativando a enzima Oxidnitrico-sintase neuronal a produzir peroxinitrito (DRECHSEL; PATEL, 2008). A administração crônica e sistêmica de paraquat leva à neurodegeneração dos neurônios dopaminérgicos, aumento da expressão de α syn e a alterações comportamentais típicas do parkinsonismo em roedores (BROOKS et al., 1999; GOLLAMUDI et al., 2012).

O maneb é outro agrotóxico amplamente utilizado cujas propriedades neurotóxicas atingem o sistema glutamatérgico e dopaminérgico. É um inibidor do complexo III, contribuindo para o aumento de EROS e disfunção mitocondrial. A sua administração sistêmica pode desencadear alterações comportamentais típicas do parkinsonismo, porém não foi observada especificidade de lesão dopaminérgica (MORATO et al., 1989). Também foi desenvolvido um modelo da DP que utiliza a combinação de paraquat e maneb

(THIRUCHELVAM et al., 2000). Nele ocorre aumento da expressão de α sin e diminuição da TH na SNpc (GOLLAMUDI et al., 2012).

1.5.1. A rotenona como modelo animal de parkinsonismo

A rotenona é uma molécula altamente lipossolúvel que atravessa a BHE e inibe o complexo I mitocondrial, também denominado NADH desidrogenase. O complexo I oxida NADH, transferindo elétrons para a coenzima Q10 (Ubiquinona) e transloca prótons para o espaço intermembranas da matriz mitocôndrial, formando um gradiente eletroquímico para a síntese de ATP. A rotenona se liga ao término do complexo I e facilita o estado de redução eletroquímica, ocasionando uma perda de elétrons que se combinam com O_2 para formando superóxido. Essa formação de EROS desencadeia danos celulares por estresse oxidativo. Além do estresse oxidativo, a inibição do complexo I pode sensibilizar os neurônios dopaminérgicos à uma crise energética mediada pelos receptores NMDA. Também podem ocorrer a formação de poros transitórios que aumentam a permeabilidade da membrana mitocondrial, ocasionando despolarização e facilitam a morte celular por apoptose. A inibição do complexo I pela rotenona também pode aumentar o influxo de Ca^{2+} provocado pela inibição do complexo I. A elevação sustentada dos níveis de Ca^{2+} na mitocôndria pode aumentar a permeabilidade da membrana mitocodrial, difundindo o Ca^{2+} para o citoplasma dos neurônios dopaminérgicos. O Ca^{2+} também pode aumentar por meio dos receptores NMDA. Outro efeito desencadeado pela rotenona é elevar os níveis de glutamato deixando os neurônios dopaminérgicos susceptíveis a excitotoxicidade glutamatérgica (Fig.1) (MARTINEZ; GREENAMYRE, 2012)

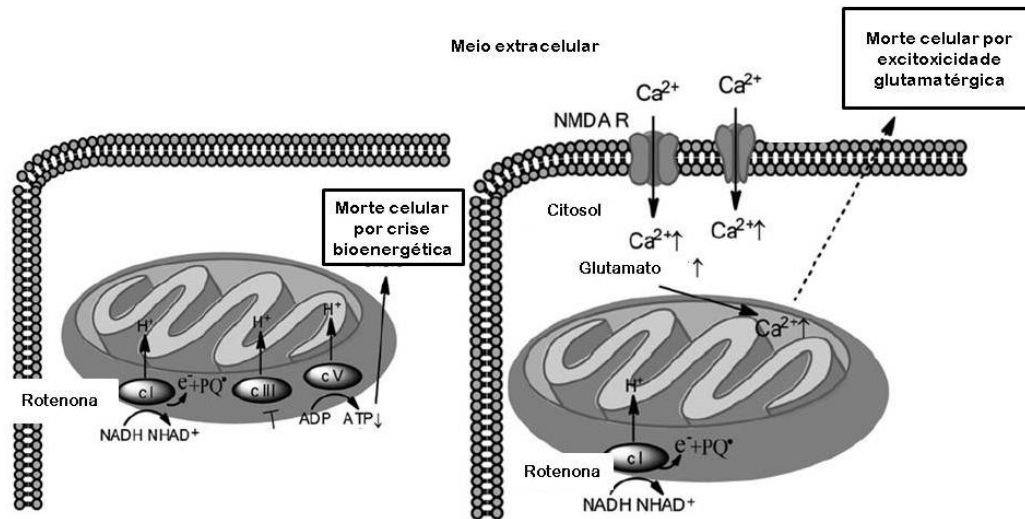


Figura 1 – Mecanismos de neurotoxicidade da rotenona. Esquema ilustrativo dos possíveis mecanismos de neurotoxicidade da rotenona. A rotenona se liga ao complexo I mitocondrial inibindo-o e comprometendo a função mitocondrial. Uma das consequências na inibição do complexo I é a diminuição da produção de ATP, podendo implicar em morte neuronal por crise energética. Outra consequência é o aumento do influxo de Ca^{2+} para dentro da célula, por meio dos receptores NMDA, culminando em morte celular por excitotoxicidade (Adaptado de: Martinez; Greenamyre, 2012).

A rotenona foi utilizada pela primeira vez como um modelo experimental da DP em 1985, quando Heikkila injetou a toxina diretamente no prosencéfalo medial de ratos Sprague-Dawley e teve como resultado a diminuição da concentração dopaminérgica e serotoninérgica estriatal (GREENAMYRE et al., 2010). Mais tarde, com as especulações de que a DP poderia estar associada à inibição sistêmica do Complexo I, muitos pesquisadores passaram a administrar a rotenona sistemicamente (MIZUNO et al., 1990; SCHAPIRA et al., 1990; FERRANTE et al., 1997). Betarbet et al., (2000) demonstraram que a administração intra-venosa e prolongada de rotenona induz neurodegeneração nigroestriatal progressiva em ratos, de maneira que essa se inicia nos terminais nervosos dos neurônios dopaminérgicos do estriado e retrógradamente se estende para o corpo celular. A lesão produzida é acompanhada de alterações posturais e motoras. Além disso, nesses experimentos a rotenona induziu a formação de inclusões citoplasmáticas de α -sin, uma limitação dos modelos até então utilizados (6-OHDA e MPTP).

Estudos subsequentes caracterizaram diversas alterações neuropatológicas e comportamentais induzidas pela administração sistêmica da rotenona em ratos, como por exemplo: aumento do estresse oxidativo (SHERER et al., 2003), ativação aguda e sustentada da microglia, ativação de astrócitos, modificação e translocação e do alelo DJ-1 para mitocôndria, alteração da via proteolítica da ubiquitina-proteasssoma; ativação de vias apoptóticas (SONIA ANGELINE et al., 2012); diminuição da testosterona plasmática (ALAM et al., 2004); diminuição dos fotoreceptores da retina (ESTEVE-RUDD et al., 2011); acúmulo de α -sin no SNE e gastroparesia (GREENE et al., 2009); alterações motoras reversíveis por L-DOPA e apomorfina (ALAM; SCHMIDT, 2002; ALAM et al., 2004; CANNON et al., 2009); comportamento tipo-depressivo (MORAIS et al., 2012) e distúrbios de sono paradoxal (LIMA et al., 2012).

Outros protocolos de administração local da rotenona também resultaram em efeitos que mimetizam as condições encontradas na DP, por exemplo: a infusão intra-estriatal ocasionou prejuízos motores, diminuição de neurônios dopaminérgicos e alterações metabólicas em ratos (ROJAS et al., 2009); a administração intra-nigral de rotenona desencadeou efeitos do tipo-depressivo (SANTIAGO et al., 2010), prejuízos cognitivos e alterações neuroquímicas nigroestriatais em ratos (MOREIRA et al., 2012).

Apesar dos estudos prévios realizados com ratos demonstrarem o potencial da rotenona como um modelo para estudo da DP, Richter et al. (2007) encontraram sinais motores, porém, desacompanhados de alterações neuropatológicas após administração subcutânea e crônica a camundongos de diversas idades. Inden et al. (2007) demonstraram, pela primeira vez, que a administração oral crônica de rotenona poderia desencadear efeitos motores, aumento da expressão de α -sin no SNC, neurodegeneração da SNpc em camundongos da linhagem C57BL/6. Posteriormente, Pan-Montojo et al. (2010, 2012), demonstraram que a administração intragástrica (i.g.) crônica de rotenona resultaria em acúmulo de α -sin, ativação de astrócitos, neurodegeneração do SNE, Sistema Nervoso Autônomo e SNC de camundongos da linhagem C57BL/6. Tendo em vista que o sistema gastrointestinal é uma das principais barreiras entre o organismo e o meio ambiente e a contaminação por pesticidas pode ocorrer por via oral (v.o.), esses dois últimos modelos passaram a ser importantes (LEBOUVIER et al., 2009). Outra via de administração importante, com relação à influência ambiental na DP, seria a via i.n.. No entanto, Rojas e colaboradores (2009) não encontram sinais de parkinsonismo em camundongos submetidos a inalação crônica de rotenona.

2. JUSTIFICATIVA

Considerando a importância da barreira intestinal para a absorção de neurotoxinas ambientais e as evidências epidemiológicas que associam positivamente a ingestão de pesticidas e o aumento da incidência da DP, é surpreendente notar que poucos estudos até hoje exploraram a hipótese anterógrada de propagação dessa neuropatologia. Uma das possíveis limitações para esse fato pode ser a falta um modelo experimental que reproduzisse as condições neuropatológicas da propagação do parkinsonismo desde o SNE até o SNC, como observado em humanos. Nesse contexto, a administração por v.o. da rotenona proposta por Inden e colaboradores (2007) pareceu ser uma oportunidade de estudar os efeitos da exposição a pesticidas no SNE e as consequências para a neuropatologia central. No entanto, Inden e colaboradores (2007) se limitaram a explorar os efeitos nigroestriatais, deixando de explorar os efeitos locais de ação da rotenona no intestino e a fase pré-sintomática da DP. A elucidação dos mecanismos envolvidos na instalação e progressão da neuropatologia permitiria diagnosticar a DP com mais precisão e talvez viabilizar a descoberta de novos alvos farmacológicos para tratamento.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi investigar a progressão temporal do parkinsonismo induzido pela administração por v.o. do pesticida rotenona considerando os efeitos locais no trato gastrointestinal, efeitos comportamentais, neuroquímicos e histológicos observados em camundongos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar os efeitos da administração prolongada por 7 e 28 dias da rotenona na função motora dos animais.
- 2) Verificar os efeitos da administração aguda e prolongada por 7 e 28 dias de rotenona na motilidade gastrointestinal.
- 4) Investigar a resposta inflamatória local, no cólon, causada pela administração aguda e prolongada por 7 e 28 dias de rotenona, avaliando a migração de granulócitos e os danos histológicos induzidos.
- 3) Investigar os efeitos da administração prolongada por 7 dias de rotenona na função olfativa dos camundongos.
- 4) Verificar a possível relação entre o comprometimento motor e olfatório observado e as concentrações de monoaminas do estriado e no bulbo olfatório, respectivamente, após administração prolongada de rotenona por 7 e 28 dias.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente trabalho foi realizado mediante aprovação do comitê de ética para o uso de animais da Universidade Federal de Santa Catarina (PP00647/2011). O número de animais utilizados em cada experimento foi o mínimo necessário para obtenção de dados confiáveis (ANEXO A).

4.2. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos da linhagem *Swiss* provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis, Brasil), com idade de 10 a 12 semanas e peso entre 40 e 50 gramas. Os camundongos foram mantidos em caixas coletivas plásticas (42 x 34 x 17 cm), contendo aproximadamente 10 animais, exceto para os experimentos de discriminação olfativa e reconhecimento social, nos quais os animais foram mantidos em gaiolas individuais, durante 72 h antes do experimento. As condições de temperatura (23 ± 2 °C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas, fase clara as 7:00 às 19 horas) foram mantidas controladas. Água e ração especial para roedores foram providas *ad libitum* salvo durante o experimento de verificação do trânsito gastrointestinal. O mesmo grupo de animais foi utilizado para a contagem do número de bolos fecais e verificação do trânsito gastrointestinal. Nos experimentos cujo objetivo foi verificar o perfil inflamatório no cólon foram utilizados os mesmos animais. Para o teste de reconhecimento social e para a análise das concentrações de monoaminas no bulbo olfatório foram utilizados os mesmos animais. Os demais experimentos foram realizados em grupos de animais independentes.

4.3. DROGAS E REAGENTES

Para a realização dos experimentos a rotenona (Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América) foi diluída em carboximetil-celulose

(CMC) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América) a 0,5% em salina (NaCl 0,9%) e administrada a um volume de 10 ml/kg. O Azul de Evans (Sigma, Aldrich Estados Unidos da América) foi diluído à 0,5% em salina (NaCl 0,9%).

As doses de rotenona utilizadas foram escolhidas de acordo com Inden et al. (2007) e com experimentos de padronização realizados no Laboratório de Psicofarmacologia da UFSC, cujos resultados estão inclusos neste trabalho.

4.4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.4.1. Testes comportamentais

Todos os experimentos comportamentais foram realizados seguindo estritamente normas internacionais de cuidado e manuseio de animais para experimentação científica. Cada bloco de experimentos foi realizado no mesmo período do dia, durante a fase clara, de modo a minimizar as influências de flutuações do ritmo circadiano dos animais. As salas de experimentação foram mantidas com a temperatura de 23 ± 2 °C e luminosidade (aproximadamente 100 lux) controladas no período de habituação (1 hora antes dos experimentos) e durante o experimento.

4.4.1.1. Avaliação da função motora

A avaliação da função motora dos animais foi realizada mediante dois experimentos comportamentais: 1) Atividade motora espontânea na arena do campo aberto e 2) Avaliação da coordenação motora no rotarod, em dois diferentes protocolos experimentais. No primeiro protocolo experimental, os animais receberam administrações por v.o. de rotenona (10 mg/kg, 30 mg/kg ou 60 mg/kg) ou apenas o veículo (CMC 0,5%) por 7 dias e tiveram sua função motora verificada. No segundo protocolo, os camundongos receberam a rotenona 30 mg/kg ou o veículo (CMC 0,5%) durante 28 dias e foram avaliados no campo aberto e no rotarod. Todos os testes foram realizados 24 h após o término das administrações da rotenona.

4.4.1.1.1. Atividade motora espontânea na arena do campo aberto

Os animais tiveram sua atividade motora espontânea avaliada na arena do campo aberto (40 cm×50 cm×63 cm). Os animais foram colocados no centro da arena permitindo sua movimentação livre por 5 min (min). Durante os experimentos, um sistema de câmera de vídeo, posicionado sobre o aparato, capturou as imagens que foram analisadas posteriormente pelo programa ANY-Maze (Stoelting, USA) (BAILLOO et al., 2010). A distância percorrida em m e a velocidade média em m/s foram utilizadas como parâmetro de atividade locomotora espontânea. O número de animais utilizados por grupo experimental foi de dez a treze animais.

4.4.1.1.2. Avaliação da coordenação motora no teste do Rotarod

A coordenação motora dos animais foi testada no rotarod de acordo com a metodologia descrita previamente (DUTRA et al., 2012). O aparelho de rotarod consiste em um cilindro com 2,5 cm de diâmetro, subdividido em seis compartimentos divididos por discos de 25 cm de diâmetro. O cilindro girava a uma velocidade constante de cinco rotações por minuto (RPM). Os camundongos foram treinados 48 horas (h) antes do início do tratamento farmacológico, sendo que aqueles que não permaneceram 120 segundos (s) no aparelho foram desconsiderados para a execução do experimento. No dia do teste a latência para queda foi quantificada e o tempo máximo de permanência dos animais no aparelho foi fixado em 60 s. O número de animais utilizados por grupo experimental foi de dez animais.

4.4.1.2. Testes comportamentais para verificação da função olfatória

Os testes comportamentais para verificação da função olfatória foram realizados após 7 dias de administrações com a rotenona (30 mg/kg) ou com o veículo (CMC 0,5%). Nos últimos 3 dias de tratamento os animais permaneceram isolados em gaiolas individuais.

4.4.1.2.1. Discriminação olfatória

O teste da discriminação olfatória foi realizado de acordo com experimentos prévios realizados no Laboratório de Psicofarmacologia da UFSC (PREDIGER et al., 2006; TADAIESKY et al., 2008) e foi adaptada para camundongos de acordo com Aguiar et al. (2010). Os

animais foram mantidos 72 h em gaiolas de isolamento. O teste consiste em colocar o camundongo durante 5 min em uma caixa dividida em dois compartimentos idênticos, separados por uma porta aberta, de forma que o animal pode escolher entre um compartimento contendo a serragem retirada da caixa previamente ocupada por ele (compartimento familiar) e outro contendo serragem nova (compartimento não familiar). Cada animal foi colocado inicialmente no compartimento familiar próximo à porta e o tempo gasto pelo camundongo em cada compartimento (familiar e não familiar) foi registrado. Em geral, camundongos adultos são capazes de discriminar entre os dois compartimentos, tendo preferência pelo compartimento familiar, impregnado com o seu próprio odor em relação ao local com odor neutro. O número de animais utilizados por grupo experimental foi de doze a treze animais por grupo.

4.4.1.2.2. Reconhecimento social

A memória social de curto prazo foi avaliada através do teste de reconhecimento social cuja metodologia foi descrita por DANTZER et al. (1987), padronizada previamente no Laboratório de Psicofarmacologia (PREDIGER et al., 2004; TADAYESKI et al., 2008) e foi adaptada para camundongos de acordo com Aguiar et al., (2010). Camundongos adultos (três meses) foram mantidos isolados em gaiolas individuais por 72 h. Um grupo de camundongos jovens (um mês de idade) da mesma linhagem foi mantido em grupos de 10 animais por gaiola e serviram como estímulos sociais para os camundongos adultos. Os animais jovens foram isolados em gaiolas durante 20 min antes do início do experimento. A tarefa de reconhecimento social consiste em duas apresentações sucessivas (5 min cada), separadas por um intervalo de 30 min, nas quais o camundongo jovem foi colocado na gaiola do camundongo adulto. No final da primeira apresentação, o jovem foi removido e mantido em uma gaiola individual durante o período de intervalo e re-exposto ao camundongo adulto. Ambas as apresentações foram filmadas e posteriormente analisadas. O tempo gasto pelo adulto investigando o jovem (cheirando, lambendo e se aproximando) em ambas as sessões foi registrado e utilizado como parâmetro de medida do reconhecimento social. O teste do reconhecimento social envolve um tipo de memória olfativa de curta duração. Roedores aptos a reconhecerem o jovem diminuem o tempo de investigação na segunda apresentação. O número de animais utilizados por grupo experimental foi de oito animais por grupo.

4.4.2. Avaliação da motilidade gastrointestinal

A avaliação da motilidade gastrointestinal foi realizada por meio de duas metodologias: 1) contagem do número de bolos fecais em 1 hora de coleta; 2) verificação do trânsito gastrointestinal. Essa sequência experimental foi realizada em 3 intervalos de tempo: após 12 h, 7 dias e 28 dias de tratamento. No primeiro experimento os animais receberam a rotenona (10, 30 ou 60 mg/kg) ou o veículo por 7 dias e, 24 horas após, tiveram a motilidade gastrointestinal avaliada. No experimento agudo e prolongado (28 dias) os animais receberam apenas a dose de rotenona 30 mg/kg ou o veículo e foram avaliados quanto aos parâmetros de avaliação da motilidade gastrointestinal.

4.4.2.1. Contagem do número de bolos fecais em 1 hora de coleta

A medida de atividade do cólon foi mensurada por meio da contagem do número de bolos fecais em 1 hora. Para este experimento, os animais foram isolados em gaiolas individuais, livre de serragem e foram privados de comida e água por 1 hora. Os experimentos foram realizados entre 9 h00 e 11h00 da manhã. O número de animais utilizados por grupo experimental foi de nove a dez animais por grupo.

4.4.2.2. Trânsito gastrointestinal

Nesse experimento os animais foram deixados previamente em jejum por 6 h e o trânsito gastrointestinal superior foi avaliado pela administração v.o. de 0,1 ml de solução de Azul de Evans a 5%, suspenso em solução salina 0,9% baseado em DE WINTER et al., (2009). Decorridos vinte minutos, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e o intestino foi retirado cuidadosamente com o auxílio de material cirúrgico para a medida da distância percorrida pelo Azul de Evans. Os resultados foram expressos em porcentagem do trânsito gastrointestinal percorrido pelo Azul de Evans em relação ao comprimento total desde o piloro até a válvula ileocecal. O número de animais utilizados por grupo experimental foi de nove a dez animais por grupo.

4.4.3. Avaliação da migração de células inflamatórias para o cólon

A avaliação da migração de células inflamatórias para o cólon foi realizada por meio de dois procedimentos: 1) Atividade da enzima

mieloperoxidase (MPO); 2) Análise histológica do cólon. Essa sequência experimental foi realizada em 3 intervalos de tempo: agudamente (12 h) e após 7 dias e 28 dias de tratamento com rotenona 30 mg/kg ou o veículo.

4.4.3.1. Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

A migração de granulócitos foi quantificada indiretamente pela medida da atividade da enzima MPO de acordo com Schneider et al. (1996) e padronizada em estudos prévios por Hara et al. (2008), no departamento de Farmacologia da UFSC. Para isso, partes do cólon descendente foram dissecadas, coletadas e imediatamente armazenadas em freezer à -80 °C. Para o preparo das amostras, essas foram homogeneizadas em tampão EDTA/NaCl (pH 4,7) e centrifugadas à 10.000 RPM, à 4 °C, durante 15 min. O precipitado resultante foi suspenso em tampão 1 (NaCl 0,1 M; NaPO₄ 0,02 M; Na/EDTA 0,015 M; pH 7,4). Posteriormente, foi adicionado 333 µL de NaCl à 0,2% e, após 30 segundos, 333 µL de NaCl à 1,6% contendo glicose 5%. A solução foi centrifugada a 10.000 RPM, à 4 °C, durante 15 min. O precipitado formado foi suspenso em tampão 2 (NaPO₄ 0,5 M e 5 % de hexadeciltrimetilamônio (H-TAB); pH 5,4). O volume adicionado dos tampões foi calculado proporcionalmente ao peso de cada amostra, de modo que a cada 5g de tecido foram adicionados 100 ml de tampão. As amostras obtidas foram congeladas e descongeladas três vezes em nitrogênio líquido. Após o último descongelamento 25 µl do sobrenadante foram utilizados para o ensaio de atividade da MPO. A reação enzimática para MPO foi realizada na presença de tetrametilbenzidina 1,6 mM, NaPO₄ 80 mM e peróxido de hidrogênio 0,3 mM. As amostras foram centrifugadas novamente à 10.000 RPM, à 4 °C, durante 15 min. A absorbância foi medida a 690 nm e os resultados foram expressos como densidade óptica por miligrama de tecido. O número de animais utilizados por grupo experimental foi de quatro a cinco por grupo.

4.4.3.2. Análise histológica do cólon

Para o preparo dos cortes histológicos, partes do cólon descendente foram coletadas e mantidas em paraformaldeído 4%, por 48 h e em etanol 70% por outras 24 h. As amostras foram então

desidratadas por passagens consecutivas em etanol, 70%, 80%, 90% e finalmente em etanol absoluto. Posteriormente, foram submetidas a dois banhos de xilol (xileno), por 30 min cada, para clareamento e diafanização. Sendo então colocados na parafina por um período de 3 h para inclusão. Cortes teciduais de 5 µm de espessura foram obtidos através da utilização de um micrótomo (Leica Co.) e posicionados sobre lâminas, que foram mantidas em estufa a uma temperatura de 60-70 °C até a completa fusão da parafina. Posteriormente, os tecidos foram desparafinizados em xilol e submetidos a passagens sucessivas em etanol absoluto. Após esse processo as lâminas foram então lavadas com água destilada. Na sequência, as lâminas foram coradas em banho de hematoxilina por 2 min, sendo posteriormente, lavadas em água destilada e embebidas em solução de eosina por 3 min. E por fim, submetidas a sucessivos banhos de etanol e xilol.

Os cortes foram avaliados histologicamente e o dano histológico microscópico foi classificado de acordo com a escala de alterações histológicas proposta por Neurath et al. (1995) (Tabela 1) . Para tanto se utilizou um microscópio ótico (Eclipse 50i; Nikon, Melville, NY, Estados Unidos da América), em aumento de 100x e 400x. As imagens foram obtidas através da câmera digital (DS-5M-L1) acoplada ao microscópio. O número de animais utilizados por grupo experimental foi de cinco animais por grupo, sendo uma amostra de tecido por animal

Tabela 1 - Análise histológica e avaliação do dano microscópico do cólon de acordo com os escores propostos por Neurath et al. (1995)

<i>Escore Histológico</i>	<i>Descrição</i>
0	Sem sinais de inflamação (infiltração normal no tecido).
1	Praticamente sem dano e pouca infiltração (pouquíssima diferença em relação ao normal).
2	Infiltração moderada de leucócitos.
3	Grande quantidade de infiltração de leucócitos; Aumentada densidade vascular; Espessamento da parede do cólon (mais grosso do que o normal).
4	Infiltração transmural; Perda de células caliciformes; Aumento da densidade vascular

4.4. ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES DE MONOAMINAS CEREBRAIS POR MEIO DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

Para verificar o efeito da administração de rotenona sobre as concentrações de monoaminas no SNC, foi verificado o conteúdo estriatal e do bulbo olfatório dos camundongos. As análises foram realizadas no corpo estriado dos animais que receberam a rotenona (10, 30 e 60 mg/kg) ou o veículo por 7 dias e em outro grupo de animais que recebeu rotenona 30 mg/kg ou o veículo durante 28 dias. O bulbo olfatório dos grupos que receberam a rotenona 30 mg/kg ou o veículo durante 7 dias e que realizaram o teste de reconhecimento social foram retirados para análise cromatográfica.

Todos os camundongos foram submetidos a eutanásia por deslocamento cervical, as estruturas foram rapidamente removidas e congeladas. Os tecidos foram mantidos à -80°C em uma solução de 0,1 M de ácido perclórico contendo 0,02% de metabisulfito de sódio e uma concentração conhecida de dihidroxibenzilamina, como padrão interno.

As concentrações de DA, 5-HT e seus respectivos metabólitos, ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) e o ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), foram mensuradas por HPLC (FERRO et al., 2005; SILVA, 2012). O equipamento utilizado para quantificação foi um sistema modular de cromatografia líquida de alta eficiência da marca Waters, modelo Alliance e2695, composto por uma bomba quaternária, um desgaseificador, um injetor automático refrigerado, além de um aquecedor de coluna, sendo o módulo acoplado a um detector eletroquímico amperométrico modelo Waters 2465 (Waters, Milford, MA, Estados Unidos da América). A célula analítica de fluxo é composta de um eletrodo de trabalho de carbono vítreo (GC-WE) com 2 mm de diâmetro e, operado em corrente contínua, ajustada a um potencial de oxidação de +400 mV, com um eletrodo de referência de Ag/AgCl *in situ* (ISAAC) e um eletrodo auxiliar de aço inoxidável. O programa computacional utilizado para controle, aquisição e processamento dos dados foi o Empower 2[®] (Waters Co.).

A fase móvel foi composta por 90 mM de NaHPO₄, 50 mM de ácido cítrico, 1,7 mM de 1-heptanosulfonato de sódio, 50 µM de EDTA dissódico, 10% de Acetonitrila (CH₃CN) e H₂O ultrapura (Milli-Q, Millipore). A fase móvel teve o pH ajustado para 3,0 com hidróxido de sódio e, em seguida, a fase móvel foi filtrada através de uma membrana

de acetato de celulose com porosidade de 0,45 μm (Millipore) e desgaseificada a vácuo em banho de ultrassom de 40 kHz por 10 minutos.

O fluxo foi bombeado de modo isocrático a 0,30 mL por minuto, através de uma coluna de fase reversa (C18) modelo Synergi Hydro-RP, 150 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro interno, empacotada com partículas de 4 μm de diâmetro (Phenomenex, Torrance, USA). A coluna foi protegida por uma guarda coluna (C18) com 20 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro interno (Alltech, Deerfield, USA), ambas utilizadas na temperatura de 35°C. Para equilíbrio completo da coluna cromatográfica, a fase móvel foi bombeada a um fluxo de 0,1 ml/min durante 12 horas antes de iniciar as análises.

As amostras de tecido foram submetidas a um banho de ultrassom, de 40 kHz, por 10 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 15.000 RPMs durante 30 min, à 4°C. O sobrenadante foi mantido em microtubos do autoinjeter a uma temperatura de 4°C e uma alíquota de 20 μL de cada amostra foi injetada no cromatógrafo a cada 8 min.

As amostras foram quantificadas através das curvas de calibração construídas com os padrões dos analitos dissolvidos em 0,1 M de ácido perclórico contendo 0,02% de metabisulfito de sódio. As concentrações utilizadas para a construção das curvas foram de 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500 ng/mL de cada analito. A partir da análise das amostras de calibração, a equação da curva de calibração foi determinada por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A curva de calibração foi traçada lançando-se no eixo “x” as diferentes concentrações das soluções padrões versus a área dos picos de cada analito que foi lançada no eixo “y”. Para o cálculo das concentrações dos analitos nas amostras obtidas nos experimentos empregou-se a equação $[y = ax + b]$, onde x é a concentração do analito na amostra (ng/mL) e y é a área extraída dos picos do analito nos cromatogramas, a é a inclinação da reta e b o valor do intercepto. Finalmente, os valores obtidos foram expressos em ng/mg de tecido úmido. O número de animais utilizados neste experimento foi de 6 a 8 animais por grupo.

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados amostrais dos grupos controles de todos os experimentos foram submetidos ao teste Kolmogorov-Smirnov para verificar a distribuição dos dados. Considerando os resultados, os dados paramétricos foram avaliados pelo teste t monocaudal, não-pareado em experimentos com dois grupos experimentais independentes. No caso de mais de dois grupos independentes, os dados paramétricos foram analisados por análise de variância (ANOVA) de 1 via (tratamento) . Quando houve necessidade, utilizou-se o pós-teste de Newman-Keuls. Os dados não-paramétricos foram analisados pelo teste U de Mann-Whitney, quando havia dois grupos experimentais independentes. Os dados paramétricos estão representados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e os dados não-paramétricos estão representados por mediana \pm intervalo interquartil. O nível mínimo de significância considerado para todos os testes foi $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas com o programa Statistica 7 (StatSoft Inc, Estados Unidos da América) e GraphPad 5 (GraphPad Soft Inc, Estados Unidos da América).

5. RESULTADOS

5.1. EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO (V.O.) DA ROTENONA NA FUNÇÃO MOTORA

5.1.1. Efeitos da administração da rotenona (10 mg/kg, 30 mg/kg, 60 mg/kg) por sete dias, na função motora.

Os animais receberam administrações (v.o.) de diferentes doses de rotenona (10, 30 e 60 mg/kg) por 7 dias e foram testados na arena do campo aberto e no rota rod 24 h após o término das administrações. A Fig. 2 A representa os resultados obtidos no teste do campo aberto e a Fig. 2 B representa o teste do rotarod. O grupo que recebeu rotenona 60 mg/kg reduziu a distância percorrida em comparação com o grupo controle e com o grupo rotenona 10 mg/kg ($p < 0,05$) (Fig. 2A). O grupo que recebeu rotenona 30 mg/kg apresentou a distância percorrida diminuída somente em relação ao grupo rotenona (10 mg/kg) ($p < 0,05$) [F (3, 41) = 5,0; $P < 0,005$]. Além disso, a rotenona 60 mg/kg foi capaz de reduzir significativamente a velocidade média dos animais no campo aberto, em relação ao grupo controle e ao grupo rotenona 10 mg/kg ($p < 0,05$) [F (3, 41) = 4,2; $P < 0,05$] (Fig. 2B).

O tratamento com rotenona 60 mg/kg afetou a coordenação motora dos animais diminuindo significativamente a latência para queda no rotarod comparando com o controle e com os demais grupos que receberam a rotenona ($p < 0,05$) [F (3, 33) = 4,0; $P < 0,05$] (Fig. 3).

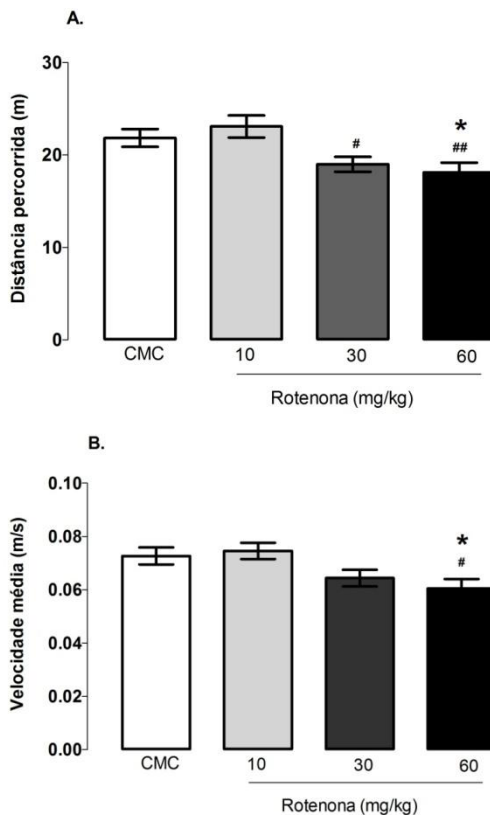


Figura 2- Efeito da administração da rotenona (7 dias) em diferentes doses na atividade motora espontânea no campo aberto. Os camundongos receberam a rotenona (10, 30 ou 60 mg/kg) ou o veículo (CMC 0,5%) por gavagem durante 7 dias e foram submetidos ao teste do campo aberto no 8º dia. (A) Distância percorrida (m). (B) Velocidade média (m/s). Os valores estão expressos pela média \pm E.P.M. Os símbolos denotam diferenças significantes: $*p \leq 0,05$ em comparação com o grupo controle (CMC 0,5%) e $\# p \leq 0,05$ em comparação com o grupo rotenona 10 mg/kg. A análise estatística foi realizada pela ANOVA de uma via seguida do teste pós-hoc de Newman-Keuls (n=10-13 por grupo).

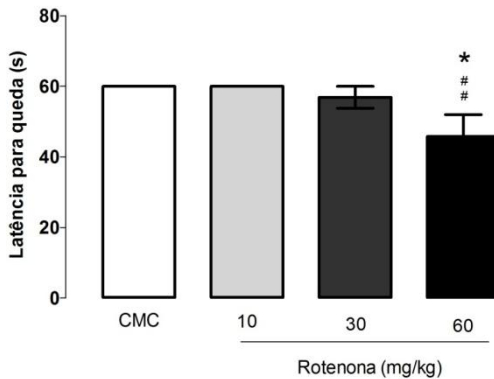


Figura 3- Efeito da administração da rotenona (7 dias) em diferentes doses na na coordenação motora dos animais no rotarod. Os camundongos receberam a rotenona nas doses de 10, 30, e 60 ,g/kg ou o veículo (CMC 0,5%) por gavagem durante 7 dias e no 8º dia foram colocados no rotarod (à 5 r.p.m.) para mensurar a latência para queda (s). Os valores estão expressos pela média \pm E.P.M. Os símbolos denotam diferenças significativas: * $p \leq 0,05$ em comparação com o grupo controle (CMC 0,5%) e # $p \leq 0,05$ em comparação com o grupo rotenona 10 mg/kg e rotenona 30 mg/kg. A análise estatística foi realizada pela ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls (n=9-10 por grupo).

5.1.2. Alterações motoras induzidas pela administração da rotenona (30 mg/kg) por 28 dias

Tendo em vista os resultados obtidos até então, nesta sequência experimental foi avaliado se a rotenona (30 mg/kg) é capaz de induzir alterações progressivas que desencadeassem prejuízos motores após administração prolongada de 28 dias. As Fig. 4 e 5 ilustram os resultados obtidos no teste do campo aberto e no rotarod, respectivamente. O tratamento diário com rotenona, durante 28 dias, induziu prejuízos motores detectáveis em ambos os testes. A Fig. 4A demonstra que os animais que receberam rotenona diminuíram significativamente a distância percorrida (em m) em relação ao grupo controle ($t=2,8$; $df=20$, $p < 0,01$). Da mesma forma, a rotenona diminuiu significativamente a velocidade média (em m/s) dos camundongos no

campo aberto comparando com o controle ($t=3.0$; $df=20$, $p<0,01$) (Fig. 4B).

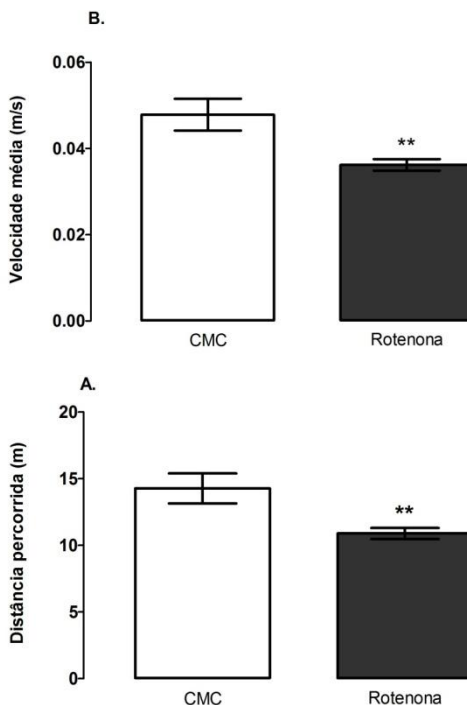


Figura 4- Efeito da administração diária de rotenona (30 mg/kg) por 28 dias na atividade motora espontânea no campo aberto. Os camundongos receberam rotenona 30 mg/kg ou o veículo (CMC 0,5%) por gavagem durante 28 dias e foram submetidos ao teste do campo aberto no 29º dia. (A) Distância percorrida (m). (B) Velocidade média (m/s). Os valores estão expressos pela média \pm E.P.M. Os símbolos denotam diferenças significativas: ** $p\leq 0,01$ em comparação com o grupo controle (CMC 0,5%). A análise estatística foi realizada pelo teste *t-Student* ($n=11$ por grupo).

No teste do rotarod, a rotenona diminuiu significativamente a latência para queda (s) demonstrando prejuízos na coordenação motora dos animais em relação aos que receberam o veículo ($t=2,1$; $df=16$, $p<0,05$) (Fig. 5).

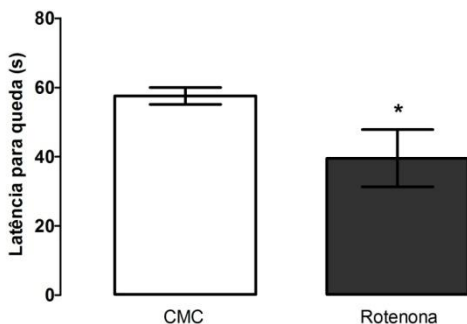


Figura 5- Efeito da administração diária por 28 dias de rotenona (30 mg/kg) na coordenação motora no teste do rotarod. Os camundongos receberam a rotenona (30 mg/kg) ou o veículo (CMC 0,5%) por gavagem durante 28 dias e no 29º dia foram colocados no rotarod (à 5 R.P.M.) para mensurar a latência para queda (s). O tempo máximo de permanência no rotarod foi considerado 60 s. Os valores estão expressos pela média \pm E.P.M. Os símbolos denotam diferenças significativas: $*p \leq 0,05$ em comparação com o grupo controle (CMC 0,5%). A análise estatística foi teste *t-Student* (n=9 por grupo).

5.2. EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO (V.O.) DE ROTENONA NAS CONCENTRAÇÕES DE MONOAMINAS ESTRIATAIS

5.2.1. Efeitos da administração da rotenona (10, 30 e 60 mg/kg) por sete dias, na concentração de monoaminas estriatais

Sabendo que os sinais motores da DP geralmente se manifestam quando 80% da concentração DA está diminuída no estriado, foram realizados experimentos de HPLC para determinar a concentração de 5-HT, DA e respectivos metabólitos no estriado dos camundongos que receberam diferentes doses de rotenona (10, 30 e 60 mg/kg), por 7 dias. Os dados estão representados na Tabela 2. Ao contrário da hipótese formulada, não houve diferença entre os grupos.

Tabela 2 - Concentrações de DA, 5-HT e respectivos metabólitos no estriado após a administração de rotenona 10, 30 e 60 mg/kg (HPLC)

<i>Estriado</i>	<i>Rotenona</i>			
	<i>CMC 0,5%</i>	<i>10 mg/kg</i>	<i>30 mg/kg</i>	<i>60 mg/kg</i>
DA	7048 ± 368,5	6673 ± 516,3	7303±520,2	9048±735,2
DOPAC	365,1 ± 43,89	276,1 ± 26,23	259,1±37,37	590,0±113,9
DOPAC /DA	0,05417 ± 0,0059	0,04167± 0,0026	0,03578± 0,0005	0,06217± 0,0010
5-HT	473,4 ± 23,77	483,7± 27,73	488,2± 31,07	522,4± 25,85
5-HIAA	132,6± 23,93	123,8± 20,99	111,2± 12,75	121,7± 19,05
5-HIAA/5-HT	0,2465± 0,0199	0,24650± 0,0020	0,2458± 0,009	0,2351± 0,0360

NOTA: Os dados estão representados como média ± E.P.M

5.2.2. Efeitos da administração da rotenona (30 mg/kg) por 28 dias na concentração de monoaminas no estriado (HPLC).

Novas análises foram realizadas para verificar as concentrações de monoaminas após 28 dias de tratamento. Os resultados das análises estão expressos na Tabela 3. Novamente, a concentração de DA, 5-HT e metabólitos do grupo tratado com rotenona, não diferiu do grupo controle.

Tabela 3 - Concentrações de DA, 5-HT e metabólitos no estriado após a administração de rotenona 30 mg/kg por 28 dias (HPLC)

<i>Estriado</i>	<i>CMC 0,5%</i>	<i>Rotenona</i>
DA	10678 ± 965,2	11291 ± 695,5
DOPAC	794,7± 67,46	791,2± 40,40
DOPAC /DA	0,07543± 0,003	0,07076± 0,002
5-HT	989,3± 66,99	1097± 78,76
5-HIAA	405,9± 33,68	411,8± 30,53
5-HIAA/5-HT	0,4101± 0,0168	0,3763± 0,0172

NOTA: Os dados estão representados como média ± E.P.M

5.3. EFEITOS DA ROTENONA NA MOTILIDADE GASTROINTESTINAL

5.3.1 Efeitos da administração da rotenona (10, 30, 60 mg/kg) por 7 dias, na motilidade gastrointestinal

A Fig. 6 ilustra os efeitos da rotenona na motilidade gastrointestinal. A fig 6A demonstra que não houve diferenças estatísticas no número de bolos fecais produzidos após 1 hora de coleta. A Fig. 6B ilustra os efeitos da rotenona no trânsito gastrointestinal. A rotenona 30 mg/kg foi capaz de diminuir significativamente o trânsito gastrointestinal dos animais (15,35%), comparando com os animais que receberam o veículo ($p < 0,05$). A dose intermediária de rotenona também foi capaz de diminuir o trânsito gastrointestinal em 21,02% comparando com a rotenona 10 mg/kg ($p < 0,01$) e em 13,34% comparando com a rotenona 60 mg/kg ($p < 0,05$) [F (3, 30) = 5,5; $P < 0,005$].

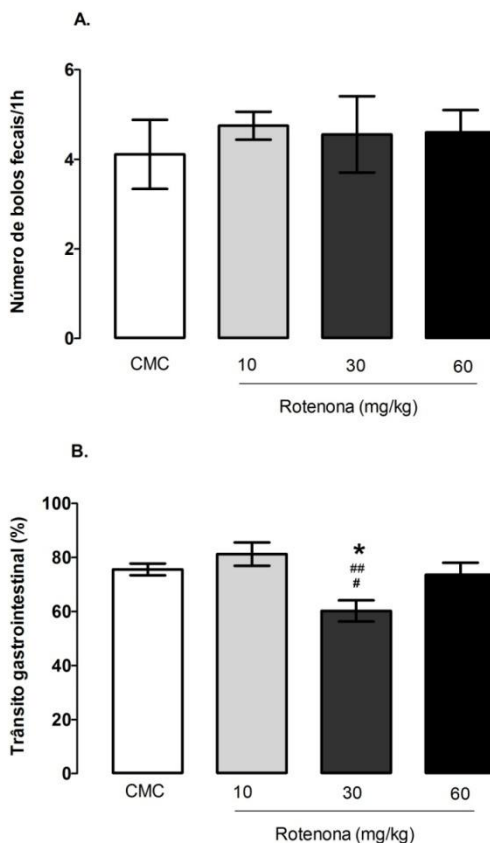


Figura 6 - Efeito da administração da rotenona em diferentes doses na motilidade gastrointestinal após 7 dias de administração. Os painéis A e B representam a avaliação da atividade do cólon e a verificação do trânsito gastrointestinal superior, respectivamente. Os valores estão expressos pela média \pm E.P.M. Os símbolos denotam diferenças significativas: * $p \leq 0,05$ em comparação com o grupo controle (CMC 0,5%); # $p \leq 0,05$ em comparação com o grupo rotenona à 60 mg/kg e ## $p \leq 0,01$. A análise estatística foi realizada pela ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls (n= 8-9 por grupo).

5.3.2. Efeitos da administração aguda de rotenona (30 mg/kg) no trânsito gastrointestinal

O grupo de experimentos realizados a seguir foi desenvolvido a fim de verificar a evolução temporal da motilidade gastrointestinal após administração (v.o.) de rotenona (30 mg/kg). A Fig.7 representa os resultados obtidos para administração aguda de rotenona. Não houve diferença significativa entre o grupo rotenona e o grupo controle na contagem de bolos fecais em uma hora de coleta (Fig. 7A). No entanto, o trânsito gastrointestinal encontra-se diminuído em 10% em comparação com o controle, 12 h após a administração de rotenona ($t=1,9$; $df=12$, $p<0,05$) (Fig. 7B).

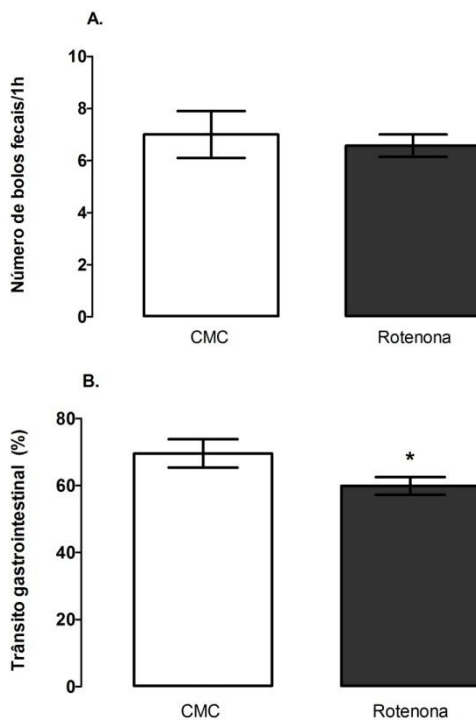


Figura 7- Efeito da administração aguda da rotenona (30 mg/kg) na motilidade gastrointestinal. Os painéis A e B representam a avaliação da atividade do cólon e a verificação do trânsito gastrointestinal superior, respectivamente. Os valores estão expressos pela média ± E.P.M. Os símbolos denotam diferenças significativas: Os símbolos denotam diferenças significativas: * $p \leq 0,05$ em comparação com o grupo controle (CMC 0,5%). A análise estatística foi realizada pelo teste t de Student (n= 7 por grupo).

5.3.3. Efeitos da administração da rotenona (30 mg/kg) por 28 dias na motilidade gastrointestinal

Com o intuito de verificar se o efeito da rotenona (30 mg/kg) persistiria no trânsito gastrointestinal a rotenona foi administrada durante 28 dias e no 29º dia a motilidade gastrointestinal foi mensurada. A Fig. 8A representa o resultado para o número de bolos fecais obtidos em 1h de coleta e a Fig.8B ilustra o resultado da avaliação do trânsito gastrointestinal. Após 28 dias de tratamento não existem alterações na motilidade gastrointestinal.

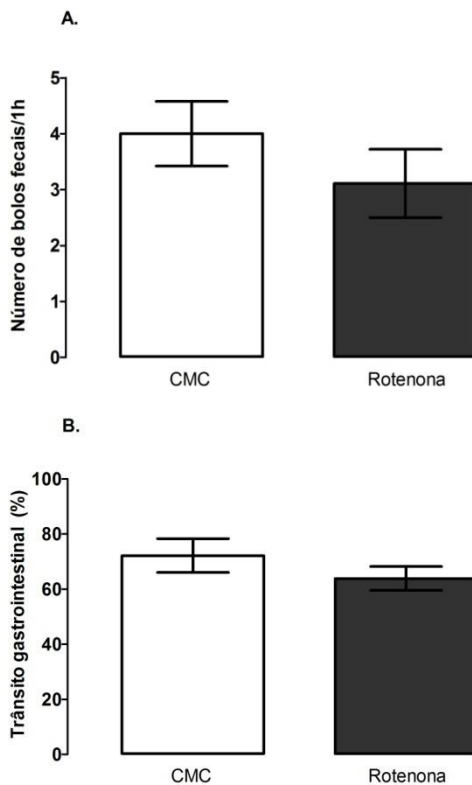


Figura 8- Efeito da administração diária por 28 dias de rotenona (30 mg/kg) na motilidade gastrointestinal. Os painéis A e B representam a avaliação da atividade do cólon e a verificação do trânsito gastrointestinal, respectivamente. Os valores estão expressos pela média \pm E.P.M. A análise estatística foi realizada pelo teste de t de Student (n= 7-9 por grupo).

5.4. EFEITOS DA ROTENONA (30 MG/KG) NA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS PARA O CÓLON

5.4.1. Efeito agudo da administração da rotenona (30 mg/kg) na atividade da MPO no cólon

A migração de granulócitos foi mensurada indiretamente por meio da atividade da MPO, 12 horas após a administração da rotenona. A Fig. 9 indica migração de granulócitos, indiretamente verificada pelo aumento de 80% da atividade da MPO no cólon dos animais do grupo rotenona comparando com o grupo controle ($t=2,2$; $df=8$, $p<0,05$).

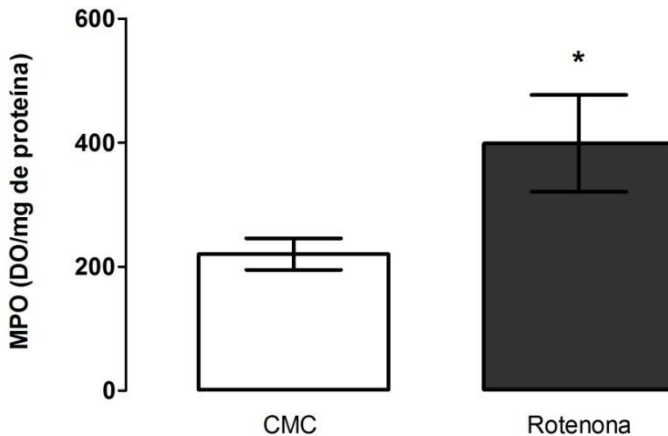


Figura 9 - Efeito da administração aguda da rotenona (30 mg/kg) na ativação da enzima MPO. Os camundongos receberam a rotenona 30 mg/kg ou o veículo (CMC 0,5%) e 12h depois uma amostra do cólon descendente foi dissecada para o ensaio de atividade da enzima MPO. O símbolo denota diferença significativa: $*p\leq 0,05$ em comparação com o grupo controle (CMC 0,5%). Os valores estão expressos pela média \pm E.P.M da densidade óptica (DO) por peso do tecido (em mg de proteína). A análise estatística foi realizada pelo teste t de Student ($n=5$ por grupo).

5.4.2. Efeitos da administração da rotenona (30 mg/kg) por 7 dias na atividade da MPO no cólon

Os resultados obtidos estão representados na Fig. 10. Não foram encontradas diferenças entre o grupo tratado com rotenona e o grupo controle na migração de granulócitos após 7 dias de tratamento.

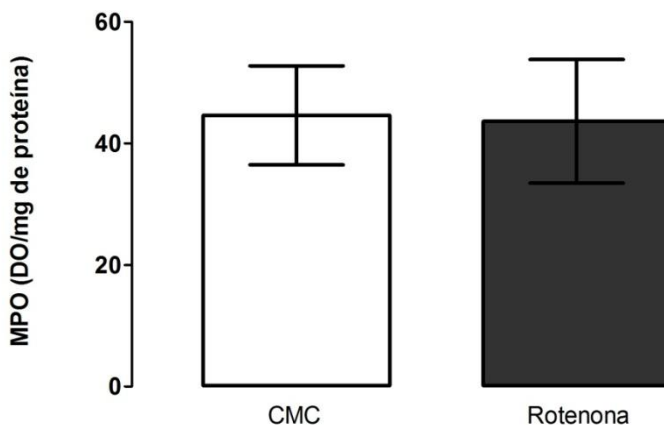


Figura 10- Efeito da administração da rotenona 30 mg/kg na ativação da enzima MPO, após 7 dias de tratamento. Os camundongos receberam a rotenona 30 mg/kg ou o veículo (CMC 0,5%) por gavagem durante 7 dias e no 8º dia uma amostra do cólon foi dissecada para o ensaio de atividade da enzima MPO. Os valores estão expressos pela média \pm E.P.M da densidade óptica (DO) por peso do tecido (em mg de proteína). A análise estatística foi realizada pelo teste t de Student e não houve diferença entre os grupos (n=5-6 por grupo).

5.4.3. Efeitos da administração da rotenona (30 mg/kg) por 28 dias na atividade da MPO no cólon

Da mesma maneira, foram realizados experimentos que verificassem a migração de granulócitos induzida pela rotenona após 28 dias de tratamento. Os resultados obtidos para a atividade da MPO estão representados na Fig. 11. Não foram encontradas diferenças entre o grupo tratado com rotenona e o grupo controle após 28 dias de tratamento.

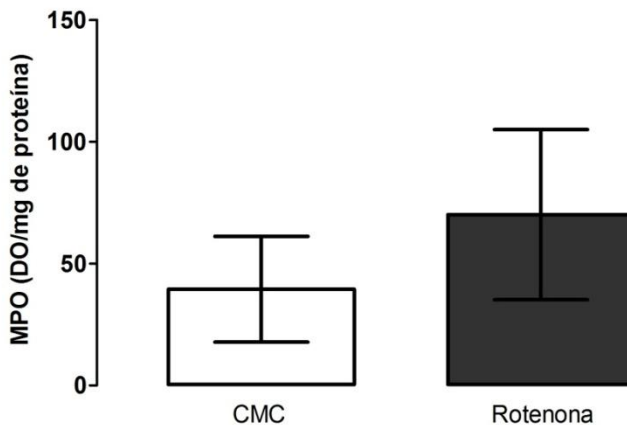


Figura 11- Efeito da administração da rotenona 30 mg/kg na ativação da enzima MPO, após 28 dias de tratamento. Os camundongos receberam a rotenona 30 mg/kg ou o veículo (CMC 0,5%) por gavagem durante 28 dias e no 29º dia uma amostra do cólon foi dissecada para o ensaio de atividade da enzima MPO. Os valores estão expressos pela média \pm E.P.M da densidade óptica (DO) por peso do tecido (em mg de proteína). A análise estatística foi realizada pelo teste t de Student e não houve diferença entre os grupos (n=4-5 por grupo).

5.4.4. Modificações histológicas no cólon de animais após administração aguda de rotenona (30 mg/kg)

A análise histológica do cólon dos animais que tratados agudamente com o veículo ou com a rotenona revelou infiltração normal, sem sinais de inflamação no grupo controle e pouca a moderada infiltração de leucócitos no grupo rotenona. A análise estatística dos escores atribuídos ao dano microscópico do cólon revelou diferenças entre o grupo controle o grupo rotenona, 12 h após a administração ($U=1,0;p<0,05$) (Fig.12 e 13).

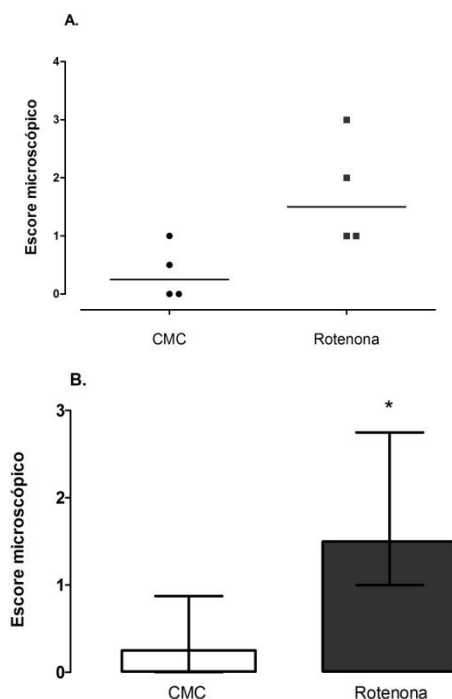
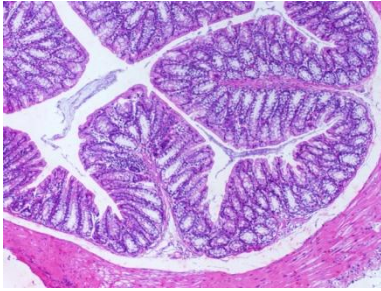


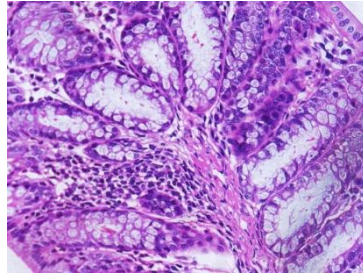
Figura 12- Escores atribuídos à análise do dano microscópico histológico do cólon induzido pela rotenona. (A) Valores individuais atribuídos ao dano microscópico histológico de cada amostra de cólon analisada. (B) Os valores estão expressos pela mediana \pm intervalo interquartil. O símbolo denota diferença significativa: $*p \leq 0,05$ em comparação com o grupo controle (CMC 0,5%). A análise estatística foi realizada pelo teste U de Mann-Whitney ($n=4$ por grupo).

A.



CMC

100 x



CMC

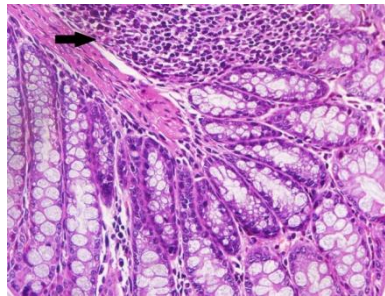
400 x

B.



Rotenona

100 x



Rotenona

400 x

Figura 13- Modificações histológicas induzidas pela rotenona após 12 h. Os camundongos receberam a rotenona 30 mg/kg ou o veículo (CMC 0,5%) por gavagem e 12 h depois uma amostra do cólon foi dissecada para as análises histológicas. Os painéis (A) e (B) mostram o perfil histológico de micrografias ópticas de cortes do cólon (aumento 100 x e 400x) dos grupos controle e rotenona 30 mg/kg, respectivamente. No painel (B) é possível observar pouca a moderada infiltração de leucócitos 12 h após o tratamento com a rotenona.

5.4.5. Modificações histológicas no cólon de animais que receberam administrações de rotenona (30 mg/kg) por 7 dias

As modificações histológicas após 7 dias de exposição à rotenona ou o veículo estão representadas na Fig. 14 e Fig 15. A análise microscópica dos animais controles revelou a ausência ou uma moderada infiltração de leucócitos no grupo controle, enquanto que o grupo que recebeu rotenona apresentou moderada à intensa infiltração de leucócitos e perda parcial de células caliciformes, havendo, portanto, diferenças significativas entre os dois grupos ($U=4,5$; $p<0,05$).

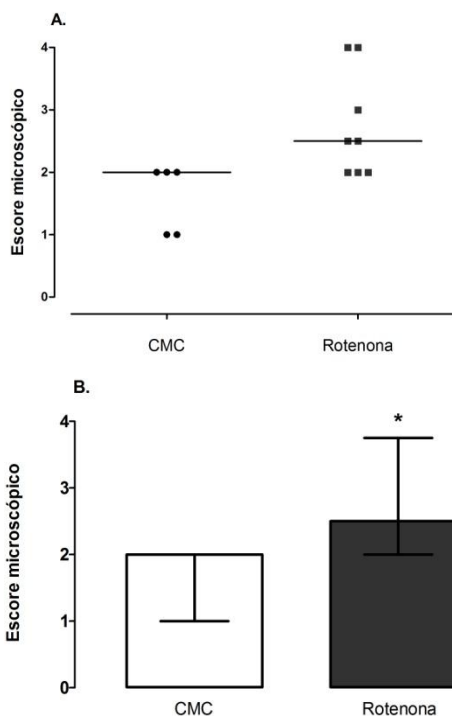
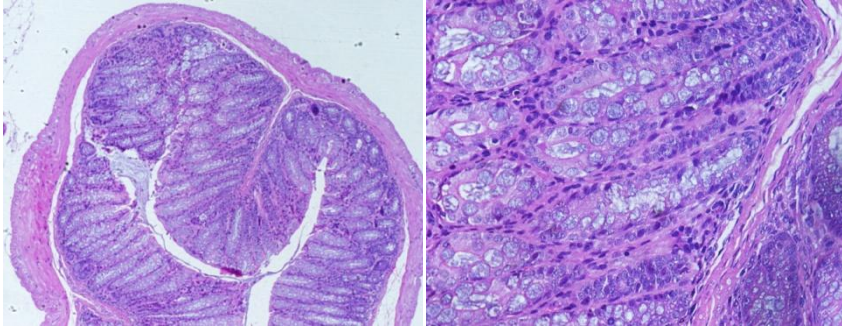


Figura 14- Escores atribuídos à análise do dano microscópico histológico do cólon induzido pela rotenona após 7 dias de tratamento. (A) Valores individuais atribuídos ao dano microscópico histológico de cada amostra de cólon analisada. (B) Os valores estão expressos pela mediana \pm intervalo interquartil. O símbolo denota diferença significativa: $*p\leq 0,05$ em comparação com o grupo controle (CMC 0,5%). A análise estatística foi realizada pelo teste U de Mann-Whitney ($n=5-8$ por grupo).

A.



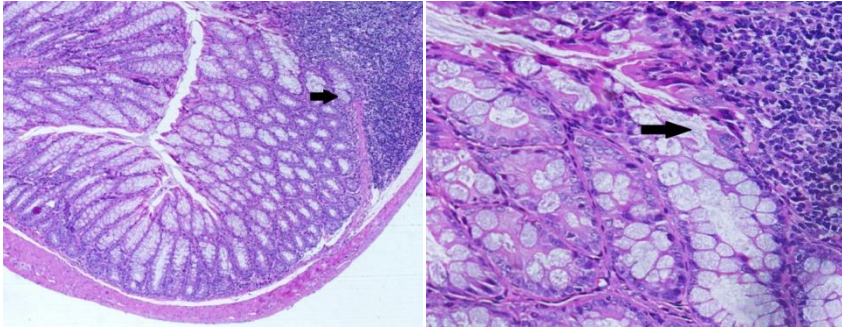
CMC

100 x

CMC

400 x

B.



Rotenona

100 x

Rotenona

400 x

Figura 15-Modificações histológicas induzidas pela rotenona após 7 dias de tratamento. Os painéis (A) e (B) mostram o perfil histológico de micrografias ópticas de cortes do cólon (aumento 100 x e 400x) dos grupos controle e rotenona 30 mg/kg, respectivamente. No painel (B) a seta indica o infiltrado leucocitário e a perda parcial de células de caliciformes após o tratamento com a rotenona.

5.4.6. Modificações histológicas no cólon de animais que receberam administrações de rotenona (30 mg/kg) por 28 dias

Após 28 dias, a análise microscópica dos animais controles revelou-se praticamente sem dano e pouca infiltração de leucócitos no grupo controle, enquanto que o grupo que recebeu rotenona apresentou moderada infiltração de leucócitos havendo, portanto, diferenças significativas entre os dois grupos ($U=4,5$; $p<0,05$) (Fig.16 e Fig.17).

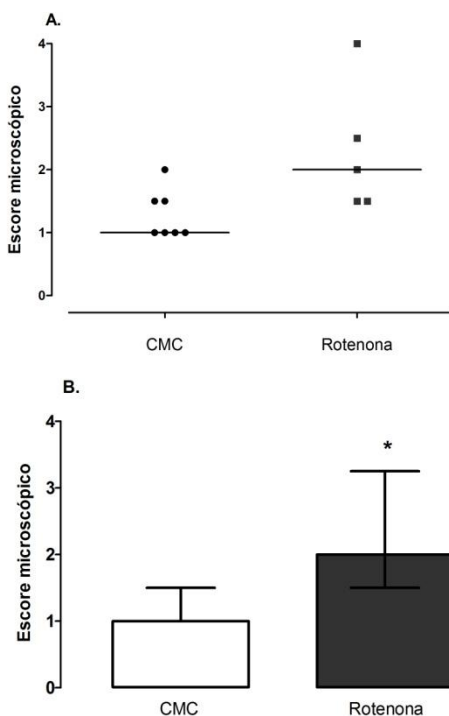
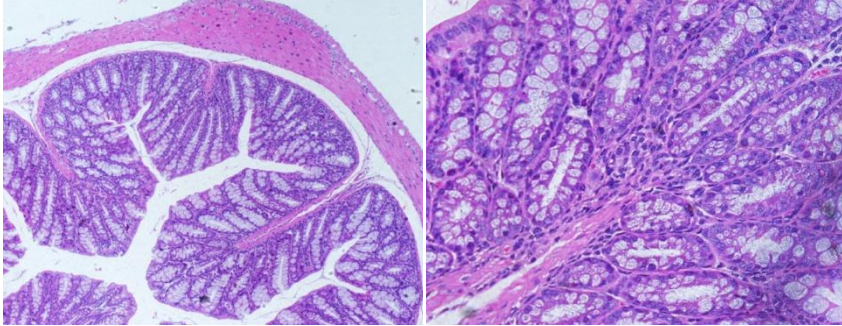
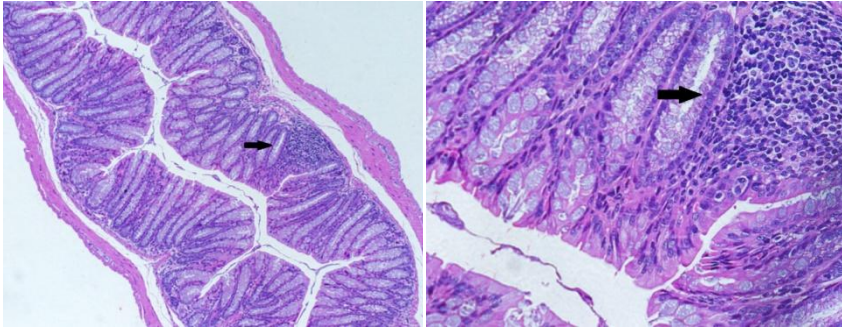


Figura 16- Escores atribuídos à análise do dano microscópico histológico do cólon induzido pela rotenona após 28 dias de tratamento. (A) Valores individuais atribuídos ao dano microscópico histológico de cada amostra de cólon analisada. (B) Os valores estão expressos pela mediana \pm intervalo interquartil. O símbolo denota diferença significativa: $*p\leq 0,05$ em comparação com o grupo controle (CMC 0,5%). A análise estatística foi realizada pelo teste U de Mann-Whitney ($n=5-8$ por grupo).

A.

CMC
100xCMC
400x

B.



Rotenona

100x

Rotenona

400x

Figura 17- Modificações histológicas induzidas pela rotenona (30 mg/kg) após 28 dias de tratamento. Os camundongos receberam a rotenona 30 mg/kg ou o veículo (CMC 0,5%) por gavagem durante 28 dias e no 29º dia uma amostra do cólon foi dissecada para as análises histológicas. Os painéis (A) e (B) mostram o perfil histológico de micrografias ópticas de cortes do cólon (aumento 100 x e 400x) dos grupos controle e rotenona 30 mg/kg, respectivamente. No painel (B) é possível observar o a infiltração moderada após o tratamento com a rotenona.

5.5 ALTERAÇÕES NA FUNÇÃO OLFATÓRIA INDUZIDAS PELA ADMINISTRAÇÃO DA ROTENONA (30 MG/KG) POR 7 DIAS

Visando estudar outras alterações pré-motoras possivelmente induzidas pelo tratamento com a rotenona foi realizado o conjunto de experimentos cujos resultados estão descritos a seguir. Nestes experimentos foi escolhido o tempo de tratamento de 7 dias e a dose de rotenona de 30 mg/kg, pois esse intervalo de tempo e essa dose apresentaram alterações nas funções gastrointestinais. A Fig. 18 representa os efeitos da administração de rotenona 30 mg/kg por 7 dias nas funções olfatórias dos animais, avaliadas em dois testes comportamentais. A Fig. 18A ilustra os resultados do teste da discriminação olfatória. Os animais do grupo controle, com funções olfatórias intactas, foram capazes de discriminar os dois compartimentos (familiar e não familiar), preferindo o compartimento familiar [F 4,46=21; $p < 0,0001$]. De forma contrária, os animais que receberam rotenona não foram capazes de discriminar entre os dois compartimentos: esses permaneceram menos tempo no compartimento familiar em comparação ao grupo controle. Corroborando esses resultados, o tratamento com a rotenona prejudicou o reconhecimento social dos animais; ou seja, não houve diminuição no tempo de investigação do camundongo jovem na 2ª apresentação, enquanto que os animais controle reconheceram o jovem e diminuíram significativamente o tempo de reconhecimento social na 2ª apresentação. Além disso, nesse teste o grupo rotenona exibiu menor tempo de exploração do jovem na primeira apresentação, indicando menor comportamento social [F (4,28)=4; $p < 0,001$] (Fig. 18B).

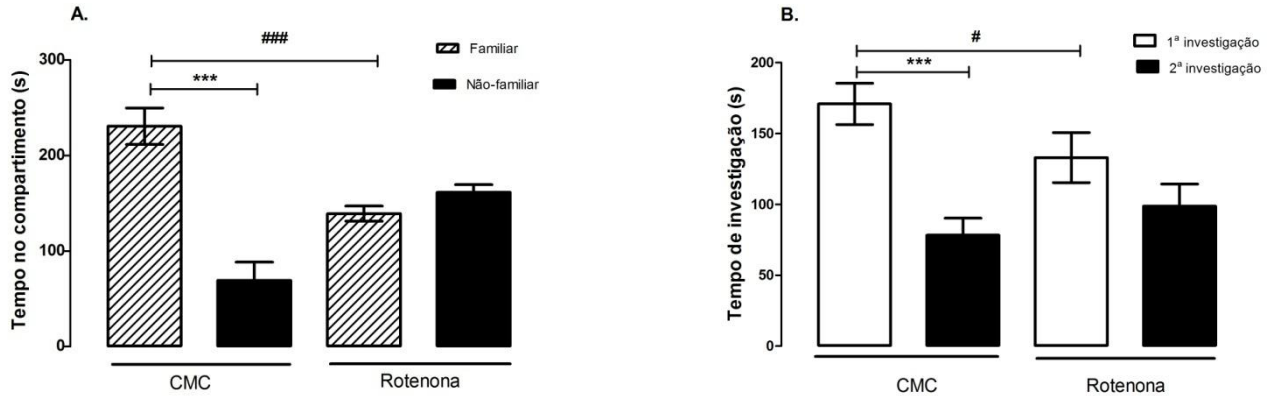


Figura 18- Efeito da administração da rotenona na discriminação olfatória e no reconhecimento social. Após 7 dias de tratamento com rotenona (30 mg/kg) ou com o veículo (CMC 0,5%) os camundongos tiveram a função olfatória testada. (A) Discriminação olfatória. (B) Reconhecimento social. Os valores estão expressos pela média \pm E.P.M. Os símbolos denotam diferenças significativas: *** $p \leq 0,001$ em comparação com grupo controle (CMC 0,5%); # $p \leq 0,05$ em comparação com o grupo rotenona e ### $p \leq 0,001$ em comparação com o grupo rotenona. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via (n=12-13 para discriminação olfatória e n=8 por grupo para o reconhecimento social)

5.6. ALTERAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DE MONOAMINAS NO BULBO OLFATÓRIO INDUZIDAS PELA ADMINISTRAÇÃO DA ROTENONA (30 MG/KG) POR 7 DIAS (HPLC)

A Fig. 19 ilustra os resultados obtidos na análise das concentrações de monoaminas e seus metabólitos no bulbo olfatório, por HPLC. Após 7 dias de tratamento, houve aumento significativo da taxa de renovação de 5-HT no bulbo olfatório dos animais que receberam rotenona ($t=2,0$; $df=10$, $p<0,05$). Não houve diferenças significativas nas concentrações de DA, 5-HT e taxa de renovação da DA.

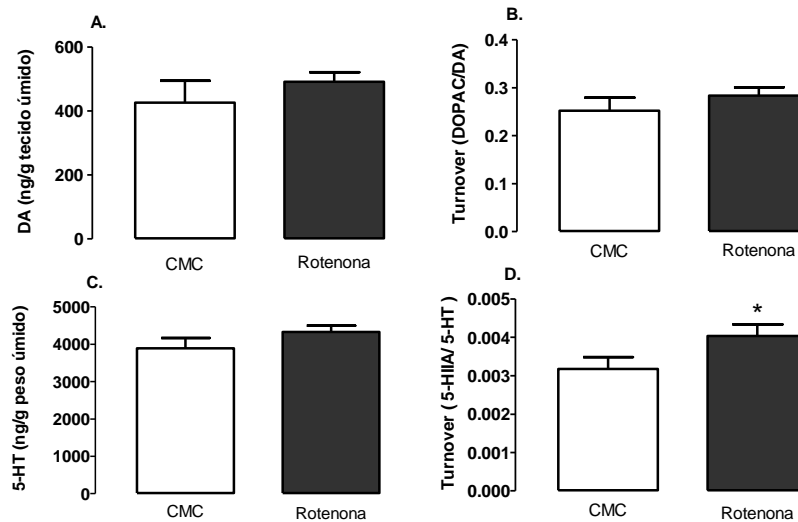


Figura 19- Efeito da administração prolongada de rotenona (7 dias) nas concentrações de monoaminas no bulbo olfatório. Os camundongos receberam a rotenona (30 mg/kg) ou o veículo (CMC 0,5%) por gavagem durante 7 dias. No 8º dia foram submetidos a teste do reconhecimento social, em seguida foram eutanasiados e o bulbo olfatório foi dissecado para mensuração de monoaminas por HPLC. Os valores estão expressos pela média \pm E.P.M. O símbolo denota diferença significativa: * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo controle (CMC 0,05%) (n= 6 por grupo).

5.7. PRINCIPAIS EFEITOS INDUZIDOS PELA ADMINISTRAÇÃO AGUDA E PROLONGADA DE ROTENONA (30 MG/KG)

Tabela 4 - Resumo dos principais efeitos motores, olfatórios, gastrointestinais induzidos pela administração aguda e prolongada de rotenona (30 mg/kg)

<i>Rotenona</i> 30 mg/kg	12 h	7 dias	28 dias
			↓ Atividade
Alterações Motoras	—	ns	↓ Coordenação
Alterações neuroquímicas estriatais	—	ns	ns
Alterações neuroquímicas bulbo olfatório	—	↑ Taxa de renovação da 5-HT	—
Alterações olfatórias	—	↓ Discriminação olfatória	—
		↓ Reconhecimento social	—
Alterações na motilidade gastrointestinal	↓ Trânsito gastrointestinal	↓ Trânsito gastrointestinal	ns
Migração de neutrófilos (côlon)	↑ MPO	ns	ns
Infiltrado leucocitário (côlon)	↑ Pouco Infiltrado	↑ Moderado à intenso	↑ Moderado

NOTA: As setas representam aumento ou diminuição significativa. Dados não significativos estão representados pela abreviatura “ ns”. O traço indica experimento não realizado

6. DISCUSSÃO

A maioria dos estudos envolvendo modelos animais da DP induzidos por neurotoxinas descrevem a patologia como uma doença exclusiva do SNC desencadeando os sinais motores clássicos. A idéia de que a DP pode ser iniciada fora do SNC surgiu dos estudos de Braak (2006) e pode ser considerada recente em comparação ao surgimento do primeiro modelo animal da DP elaborado por Ungerstedt (1968). No estudo de Braak foi sugerido que o processo patológico se iniciaria em dois lugares distintos e simultâneos: no BO-núcleo olfatório anterior e nos plexos MP e SM do SNE. Em seguida, acometeria os neurônios pré-ganglionares parassimpáticos do NDMV e os pré-ganglionares e pós-ganglionares simpáticos do NIML da medula espinhal. Posteriormente, as lesões estendem-se para centros supra-espinhais como *locus coeruleus*, núcleos da rafe, amígdala, SNpc e outras regiões prosencefálicas. No encéfalo, a patologia se propagaria em um sentido caudal-rostral.

Qualquer hipótese plausível que tente explicar os casos idiopáticos da DP deveria incorporar esses componentes extra-nigrais e a sintomatologia não-motora. Qualquer especulação sobre a causa ou o princípio da DP deveria envolver os sistemas olfatório e o gastrointestinal que, geralmente, são acometidos antes dos clássicos sinais motores aparecerem (HAWKES et al., 2007). Portanto, estudos pré-clínicos que utilizem modelos animais na tentativa de compreender as alterações neuropatológicas da DP devem levar isso em consideração. Dentro dessa perspectiva o Laboratório de Psicofarmacologia da UFSC tem se dedicado a utilizar modelos animais que permitam estudar os sinais pré-motores da doença: distúrbios emocionais (TADAIESKY et al., 2008; SILVA, 2012); cognitivos (GEVAERD et al., 2001) olfativos (PREDIGER et al., 2005) e, finalmente, os distúrbios gastrointestinais do SNE.

Evidências de que a rotenona pode acometer o SNE em roedores surgiram com os achados de Greene e colaboradores (2009) que demonstram que o tratamento com a rotenona é capaz de reduzir a atividade dos neurônios inibitórios que inervam o cólon proximal e retardar o esvaziamento gástrico. Na sequência, quatro outros trabalhos mostraram a associação entre a rotenona e efeitos gastrointestinais (DROLET et al., 2009; PAN-MONTOJO et al., 2010; PAN-MONTOJO et al., 2012; TASSELLI et al., 2013). Isso explica, parcialmente a

escolha do modelo experimental de trabalho. Outro motivo para a escolha da rotenona é que a exposição a esse pesticida é considerada um fator de risco importante para o desenvolvimento da DP, baseado em estudos epidemiológicos recentes (TANNER et al., 2009; TANNER et al., 2011). Sendo a barreira gastrointestinal a maior interface entre o organismo e o ambiente, escolhemos o modelo de administração v.o. da rotenona proposto por Inden e colaboradores (2007) como o ponto de partida para o presente trabalho.

Sendo assim a primeira etapa do trabalho foi padronizar o modelo da DP pela rotenona. Primeiramente, caracterizamos a faixa de dose que causasse efeitos na função motora, bem como doses sub-efetivas, que poderiam ser utilizadas para o estudo da sintomatologia pré-motora. Nossos resultados indicaram que, após 7 dias de tratamento, apenas a maior dose de rotenona (60 mg/kg) foi capaz de ocasionar prejuízos motores detectáveis pelos testes comportamentais. De fato, Inden e colaboradores (2007) não encontraram prejuízos motores nas doses de 10 mg/kg e 30 mg/kg neste intervalo de tempo. No entanto, após 28 dias de administrações diárias com a rotenona (30 mg/kg) ocorreram prejuízos na coordenação motora e diminuição da atividade espontânea dos animais. Nesse intervalo de tempo, nossos dados replicaram os resultados de Inden et al., 2007 bem como os de outros grupos que utilizam esse modelo de administrações para investigar novas abordagens terapêuticas que revertam os déficits motores encontrados (SALAMA et al., 2012; PARAMESHWARAN et al., 2012).

Os resultados obtidos com a administração v.o. em camundongos apresentaram semelhanças com a condição clínica. Na clínica, os sinais motores da DP tornam-se evidentes em pacientes que já se encontram num estágio avançado, no qual há grande comprometimento do SNC. A manifestação dos sinais motores tem sido correlacionada com a neurodegeneração dos neurônios dopaminérgicos em 50-60% e a diminuição da dopamina no estriado em 60-80% (VIVES-BAUZA, 2009). Sabendo disso, mensuramos as concentrações de monoaminas estriatais por HPLC após sete e vinte e oito dias de tratamento, com a hipótese que os prejuízos motores observados nos testes comportamentais pudessem estar relacionados à diminuição de dopamina estriatal. Contudo, os resultados obtidos refutaram nossa hipótese de trabalho.

Trabalhos prévios demonstram que, mesmo após administração prolongada de rotenona, existe grande variabilidade entre os animais

quanto ao desenvolvimento de lesões nigroestriatais, mesmo entre aqueles que apresentam comprometimento motor (BETARBET et al., 2006; SHERER et al., 2003; INDEN et al., 2007). A neurodegeneração dopaminérgica induzida pela rotenona parece ser progressiva e sutil, verificada pela diminuição da expressão da enzima TH na SNpc e 15% de diminuição da DA estriatal (INDEN et al., 2007) ou, ainda, nenhuma alteração da expressão TH no estriado (PAN-MONTOJO et al., 2010). O fato de não termos encontrado correlações positivas em nossos resultados pode ser devido à pequena lesão induzida pela rotenona na SNpc, insuficiente para reduzir significativamente a DA no estriado. Até onde sabemos, não existem artigos publicados sobre os efeitos da rotenona em camundongos Swiss. Portanto, ainda se considera a possibilidade de que a heterogeneidade dessa linhagem e o esquema de tratamento da rotenona tenham contribuído para uma maior variabilidade na sua suscetibilidade à lesão dopaminérgica estriatal.

Estudos em modelos animais e estudos clínicos demonstram que a interpretação das lesões nigroestriatais apenas observando os níveis monoaminérgicos estriatais é incompleta, pois existem muitos mecanismos compensatórios nos gânglios da base. Nos estágios iniciais da neurodegeneração dopaminérgica a concentração de DA no estriado pode se manter normal ou aumentar, devido à redução da retroalimentação negativa e à diminuição da recaptção de DA pelos neurônios remanescentes (SCHULTZ, 2007; JELLINGER, 2012). No presente estudo utilizamos doses não tóxicas de rotenona que induzissem os estágios iniciais do parkinsonismo, portanto, é possível que estejam ocorrendo mecanismos compensatórios descritos no estriado. Maiores esclarecimentos serão obtidos com experimentos de imunistoquímica nos gânglios da base que estão em fase de padronização.

Além disso, o desempenho dos camundongos nos testes do campo aberto e do rotarod não consistem, exclusivamente, em análises diretas da função dos gânglios da base, mas também, da integridade de diversos sistemas de neurotransmissão em diferentes áreas do SNC (MEREDITH; KANG, 2006). A predominância dos efeitos da rotenona sobre a SNpc é relacionada com a formação de produtos tóxicos derivados da metabolização da DA e à desestabilização dos microtúbulos, porém a inibição mitocondrial do complexo I pode afetar outras regiões cerebrais como hipotálamo, locus coeruleo, núcleos da rafe (YOSHIMOTO et al., 2012; MORAIS et al., 2012). Sabendo disso, sugere-se que o comprometimento motor encontrado possa envolver

outros sistemas de neurotransmissores não-dopaminérgicos, por exemplo, o sistema serotoninérgico e/ou noradrenérgico.

A natureza lenta, progressiva e moderada dos efeitos motores provocados pela rotenona, somada ao possível efeito sobre outros sistemas de neurotransmissores, vai de acordo com o propósito do presente estudo, cujo enfoque principal foi a sintomatologia pré-motora da DP.

Condizente com a hipótese retrógrada de propagação da DP, na qual a propagação da patologia ocorre pela rota gastrointestinal desde o SNE até o SNC, verificamos os efeitos locais da administração (v.o.) da rotenona durante sete dias. Em um experimento utilizando diferentes doses de rotenona, nossos resultados mostram que apenas a dose intermediária (30 mg/kg) causou prejuízo no trânsito gastrointestinal superior. Ao contrário do que esperávamos, em nenhum dos grupos tratados houve diminuição no número de bolos fecais produzidos.

As alterações gastrointestinais induzidas pela rotenona já foram estudadas por outros grupos, mas o mecanismo dessas alterações permanece desconhecido. Greene e colaboradores (2009) verificaram que a administração (i.p.) de rotenona é capaz de diminuir o esvaziamento gástrico associado à disfunção dos neurônios inibitórios do SNE e das projeções nervosas vagais que controlam o relaxamento do piloro. Apesar dos autores terem verificado alterações no SNE em partes do cólon, a diminuição da defecação induzida pela rotenona foi mínima e transitória, possivelmente associada à perda de massa corpórea nos animais tratados. No presente trabalho essa associação não pode ser feita pois não houve diferença significativa no peso dos animais tratados com rotenona em relação ao veículo (dados não mostrados).

Recentemente, Pan-montojo e colaboradores (2010) mostraram que alterações no SNE, como ativação de astrócitos, aumento da expressão de α -sin e neurodegeneração colinérgica, induzidas pela administração (v.o.) de rotenona precedem os efeitos sobre a motilidade colônica, havendo redução do número de bolos fecais somente após 3 meses de administração. Em outro modelo da DP, a administração (i.p.) de MPTP, prejudica a resposta de relaxamento da musculatura do cólon, devido à neurodegeneração dos neurônios inibitórios dopaminérgicos no SNE (ANDERSON et al., 2007). No cólon, a dopamina endógena atua inibindo a contração muscular se ligando aos receptores D₁ e D₂ (LI et al., 2006). Apesar de não termos investigado diretamente os efeitos da

rotenona sobre as sub-populações de neurônios inibitórios e excitatórios do SNE, nossos resultados estão de acordo com estudos prévios que relacionam a disfunção do tônus inibitório do SNE ao prejuízo da motilidade gastrointestinal.

A presença marcante de α -sin no SNE e as disfunções gastrointestinais em estágios iniciais da DP geraram especulações sobre os mecanismos envolvidos na formação dos agregados e sua formação da α -sin para o SNC. Uma hipótese é que o mecanismo de propagação da α -sin envolva processos inflamatórios. Dessa maneira, o contato com toxinas ambientais ou com patógenos poderia ativar e recrutar macrófagos residentes na lâmina própria, levando à secreção de mediadores (citocinas, quimiocinas, EROS, etc), os quais podem acarretar em dano tecidual e induzir acúmulo de α -sin no SNE. O acúmulo de α -sin no SNE pode alterar a atividade normal do intestino, que no início pode ser observada por alterações da motilidade gastrointestinal. Os agregados de α -sin podem ser liberados pelas células nervosas danificadas, ativando novamente as respostas inflamatórias. A transmissão de α -sin pode ocorrer célula à célula, a partir do SNE, via NDMV e NIML da medula espinhal até o SNC (BRUNDIN et al., 2008).

Os modelos da DP induzidos pela rotenona reproduzem a característica neuropatológica observada na clínica de aumento da expressão de α -sin nos SNE e SNC. No modelo da rotenona, a relação entre a dismotilidade intestinal associada à presença de agregados de α -sin no SNE foi descrita por Drolet et al., 2009. Recentemente, Pan-montojo e colaboradores (2012) demonstraram que a administração (v.o.) de rotenona poderia induzir a progressão do parkinsonismo em camundongos através da propagação da α -sin de neurônio a neurônio. A administração da rotenona estimularia a liberação da α -sin dos neurônios do SNE para a matriz extra-celular e a captação da mesma por células não-neuronais ou por neurônios pré-sinápticos. Dessa maneira a α -sin seria transportada para corpo celular, onde se acumularia. Esta progressão ocorre principalmente via neurônios dos sistemas simpático e parassimpático. A presença de α -sin pode potencializar as ações da rotenona sob o Complexo I da cadeia respiratória, desestabilizando microtúbulos, formando poros na membrana celular e levando a formação de EROS.

A dinâmica inter-relação positiva entre o acúmulo dos agregados de α -sin e o aumento de células inflamatórias e evidências obtidas em outros estudos fez com que formulássemos a hipótese de que

a diminuição do trânsito gastrointestinal está relacionada à inflamação intestinal.

Recentemente, o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL1- β) foi encontrado no cólon de portadores da DP (DEVOS et al., 2013.). Essa descoberta consistiu na primeira evidência direta em humanos de que a inflamação gastrointestinal está presente na DP. A inflamação gastrointestinal encontrada é independente da severidade do quadro clínico e os autores sugerem que a inflamação intestinal seja intensa no início da doença, quando as células inflamatórias são ativadas e secretam mediadores químicos, e diminua com a continuidade do quadro clínico.

.Além disso, pesquisas com animais deficientes para o gene que codifica a proteína quinase *rica* em *leucina repetição 2*, o qual está associado a maioria dos casos familiares da DP, demonstram que esses animais são mais susceptíveis ao desenvolvimento de colite (LIU; GUTHRIE, 2011).

De maneira pioneira, nossos resultados demonstraram que a rotenona irritou o cólon dos roedores desencadeando um processo de inflamação agudo e crônico no cólon dos animais. Doze horas após a administração da rotenona houve aumento da migração de granulócitos, mensurada indiretamente pela atividade da enzima MPO. A MPO está presente nos grânulos do citoplasma dos neutrófilos, mastócitos e macrófagos e auxilia na atividade microbicida e destruição tecidual pela formação de produtos tóxicos como EROS (KLEBANOFF, 2005; CLAUDINO, 2010). Além disso, pelas análises histológicas do cólon observamos aumento leve, mas significativo do infiltrado de células inflamatórias, entretanto sem lesão tecidual, doze horas após a administração da rotenona. No entanto, sete dias após o tratamento com a rotenona, observamos aumento moderado e significativo infiltrado de leucócitos e dano tecidual moderado a intenso, com perda parcial das células caliciformes, secretoras de muco. Após vinte e oito dias de tratamento, o influxo de leucócitos foi atenuado assim como o dano tecidual, mas ainda permaneceu significativo.

As alterações no trânsito gastrointestinal encontradas neste trabalho coincidem temporalmente com a ativação e recrutamento sustentado das células inflamatórias, de modo que, após doze horas e sete dias de tratamento, há diminuição do trânsito gastrointestinal superior porém, após vinte e oito dias de tratamento, as diferenças entre grupo controle e tratado já não são significativas, sugerindo um papel importante da inflamação local para a diminuição da motilidade. Com

base na análise da atividade da MPO em conjunto com a histologia, sugere-se que, agudamente, o infiltrado seja constituído predominantemente de neutrófilos; e, nos animais tratados prolongadamente com rotenona, por linfócitos. A motilidade gastrointestinal é dependente da homeostase do intestino como um todo, e a atenuação da resposta inflamatória no cólon pode estar relacionada à melhora na motilidade após vinte e oito dias de tratamento.

No quadro clínico pós-cirúrgico de íleo paralítico, no qual a relação entre inflamação e diminuição da motilidade já está melhor definida, sabe-se que a ocorrência e a sustentação do infiltrado leucocitário pode ativar vias aferentes que conduzem informações ao tronco cerebral, resultando em um reflexo inibitório adrenérgico, via NIML da medula espinhal, diminuindo a contração da musculatura da parte superior do intestino (DE JONGE et al., 2003; BOECKXSTAENS; DE JONGE, 2009). Além disso, os leucócitos recrutados podem liberar substâncias ativas que danificam a musculatura intestinal, como é o caso da COX-2, e resultar na diminuição da motilidade. Em modelos animais de íleo paralítico, manipulações cirúrgicas no cólon induzem diminuição do trânsito gastrointestinal, de modo que esses efeitos são interpretados como uma alteração da motilidade colônica. Neste caso, a retomada da motilidade gastrointestinal é extremamente dependente do retorno da atividade colônica (TÜRLER et al., 2002).

As consequências de um quadro persistente de inflamação gastrointestinal podem levar a danos que extrapolam o local inicial da inflamação, devido à alteração da permeabilidade da barreira gastrointestinal. Algumas evidências preliminares em humanos mostram aumento da permeabilidade gastrointestinal em portadores da DP (FORSYTH, 2011). Caso isso se confirme, o aumento da permeabilidade gastrointestinal levaria a maior exposição do SNE e também dos nervos que conectam o intestino ao cérebro ao estresse oxidativo a aos produtos pró-inflamatórios produzidos pelas células do sistema imune residentes e pela microbiota.

Considerando os estágios de Braak, paralelamente ao comprometimento gastrointestinal acontecem prejuízos olfativos relacionados a formação de agregados de α -sin no BO-núcleo olfatório anterior. Uma das possibilidades para o aparecimento dos sintomas olfativos no início da patologia é que agentes ambientais penetrem o epitélio olfatório e atinjam o SNC por via do nervo olfatório ou do epitélio olfatório (DOTY et al., 1988). Nesse sentido, nas últimas três

décadas muitos estudos investigaram se a administração i.n. ou a inalação de neurotoxinas poderia resultar em danos ao SNC associados à DP (PREDIGER et al., 2012). O modelo de administração i.n. do MPTP foi padronizado no laboratório de Psicofarmacologia da UFSC e reproduziu uma série de alterações fenotípicas do parkinsonismo em roedores (PREDIGER et al., 2005). No entanto a administração i.n. dos pesticidas rotenona e paraquat não reproduziram as alterações neuropatológicas do parkinsonismo (ROJO et al. , 2007)

De maneira interessante, nossos resultados demonstram pela primeira vez que a administração v.o. de rotenona pode prejudicar as funções olfativas de camundongos. Primeiramente, o tratamento com rotenona v.o. afetou a discriminação olfativa. O teste da discriminação olfativa baseia-se na observação que roedores adultos preferem permanecer em ambientes impregnados com o seu próprio cheiro do que em ambientes inodoros (CARR et al. ,1976). Após sete dias de administrações de rotenona v.o. os animais não foram capazes de discriminar entre os dois compartimentos. Além disso, os camundongos que receberam a rotenona pelo mesmo intervalo de tempo, não foram capazes de reconhecer o camundongo jovem na segunda apresentação. O teste do reconhecimento social é um teste que avalia a memória olfativa de curta duração dos roedores e o desempenho dos animais nesse teste tem sido utilizado em nosso laboratório como parâmetro da função olfativa (PREDIGER et al., 2005; PREDIGER et al., 2005; TADAIESKY et al., 2008). Nossas avaliações comportamentais corroboram resultados prévios que utilizam outras neurotoxinas como MPTP, 6-OHDA e reserpina (PREDIGER et al., 2004; PREDIGER et al., 2005; TADAIESKY et al., 2008).

Na tentativa de explicar as alterações comportamentais encontradas, mensuramos as concentrações de monoaminas e metabólitos no BO. Nossos resultados indicam aumento na taxa de renovação de 5-HT no bulbo olfatório que pode ser devido à diminuição da 5-HT nos núcleos da rafe e da onde partem as fibras serotoninérgicas que vão para o BO. Alterações no sistema serotoninérgico dos núcleos da rafe já foram descritas neste modelo de administração v.o. da rotenona (YOSHIMOTO et al., 2012).

As projeções serotoninérgicas são necessárias para um funcionamento normal da circuitaria bulbar. Nesse sentido foi demonstrado que a depleção farmacológica das projeções serotoninérgicas no BO causa prejuízos na memória olfativa (MCLEAN; SHIPLEY, 1987; DULCY et al., 2010). Ainda, a 5-HT é

capaz de melhorar a memória social mediante ativação dos receptores 5-HT₄ (LETTY et al., 1997).

Sabe-se que o bulbo olfatório é uma das poucas estruturas, no SNC de mamíferos, onde os neurônios são continuamente gerados. A zona subventricular produz uma população proliferativa de células estaminais ao longo de toda a vida. Na sequência, as células-tronco produzem progenitores neuronais que migram através do fluxo migratório rostral para o BO para substituir as células mortas. O equilíbrio entre a neurogênese e a apoptose de células olfatórias é muito importante para a memória e discriminação olfatórias (LIU et al., 2011). A administração sistêmica de LPS pode desencadear a produção de citocinas pró-inflamatórias que atravessam a BHE, ativando respostas imunológicas centrais e resultando em apoptose no BO (MORI et al., 2005). É possível que nossos resultados estejam relacionados a um desequilíbrio entre neurogênese e apoptose provocado pela inflamação periférica induzida pela rotenona.

O aparecimento do comprometimento olfatório em nosso modelo é surpreendente, pois no caso do presente estudo, não existe conexão direta entre o local de administração da toxina (Sistema gastrointestinal) e o Sistema olfatório. No entanto, recentemente, Del Tredici et al. (2010) mostraram que a glândula sub-mandibular de portadores da DP também contém agregados de α -sin. Este estudo levou à hipótese de que o muco que conecta o Sistema olfatório, as glândulas salivares e o SNE seria um possível substrato entre os dois sistemas, explicando o surgimento de anosmia e dos problemas gastrointestinais nos estágios iniciais da DP (REICHMANN, 2011). Desde então, a saliva de portadores da DP tem sido investigada na busca de possíveis biomarcadores (CERSOSIMO et al., 2011; CERSOSIMO et al., 2012; DEVIC et al., 2011). Contudo, ainda não existem estudos em modelos animais que possam elucidar os mecanismos dessas conexões.

7. CONCLUSÕES

Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstram que a administração v.o. com rotenona pode induzir alterações pré-motoras e motoras sugestivas de parkinsonismo em camundongos *Swiss*. Entretanto, poucas alterações neuroquímicas foram encontradas no SNC. No modelo utilizado, as alterações no sistema gastrointestinal e olfativo precedem as alterações motoras. Esses resultados ressaltam a importância da v.o. como porta de entrada para toxinas ambientais e o epitélio gastrointestinal como a primeira barreira de contato entre pesticidas, agentes químicos e o organismo. Além disso, nossos resultados reforçam a importância dos sinais pré-motores do parkinsonismo como uma importante ferramenta a ser utilizada para diagnóstico da DP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, A. S. et al. High-intensity physical exercise disrupts implicit memory in mice: involvement of the striatal glutathione antioxidant system and intracellular signaling. **Neuroscience**, v. 171, n. 4, p. 1216-1227, Dez 2010.

ALAM, M.; MAYERHOFER, A.; SCHMIDT, W. J. The neurobehavioral changes induced by bilateral rotenone lesion in medial forebrain bundle of rats are reversed by L-DOPA. **Behav Brain Res**, v. 151, n. 1-2, p. 117-124, Maio 2004.

ALAM, M.; SCHMIDT, W. J. Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. **Behav Brain Res**, v. 136, n. 1, p. 317-324, Out 2002.

ANDERSON, G. et al. Loss of enteric dopaminergic neurons and associated changes in colon motility in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Exp Neurol**, v. 207, n. 1, p. 4-12, Set 2007.

BAILOO, J. D.; BOHLEN, M. O.; WAHLSTEN, D. The precision of video and photocell tracking systems and the elimination of tracking errors with infrared backlighting. **J Neurosci Methods**, v. 188, n. 1, p. 45-52, Abr 30 2010.

BARBOSA, M. T. et al. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: a community-based survey in Brazil (the Bambuí study). **Mov Disord**, v. 21, n. 6, p. 800-808, Jun 2006.

BEACH, T. G. et al. Unified staging system for Lewy body disorders: correlation with nigrostriatal degeneration, cognitive impairment and motor dysfunction. **Acta Neuropathol**, v. 117, n. 6, p. 613-634, Jun 2009.

BETARBET, R. et al. Intersecting pathways to neurodegeneration in Parkinson's disease: effects of the pesticide rotenone on DJ-1, alpha-synuclein, and the ubiquitin-proteasome system. **Neurobiol Dis**, v. 22, n. 2, p. 404-420, Maio 2006.

BETARBET, R. et al. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. **Nat Neurosci**, v. 3, n. 12, p. 1301-1306, Dez 2000.

BLANDINI, F. et al. Functional and neurochemical changes of the gastrointestinal tract in a rodent model of Parkinson's disease. **Neurosci Lett**, v. 467, n. 3, p. 203-207, Dez 2009.

BOECKXSTAENS, G. E.; DE JONGE, W. J. Neuroimmune mechanisms in postoperative ileus. **Gut**, v. 58, n. 9, p. 1300-1311, Set 2009

BOVÉ, J. et al. Toxin-induced models of Parkinson's disease. **NeuroRx**, v. 2, n. 3, p. 484-494, Jul 2005.

BOVÉ, J. PERIER, C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v.211, 51-76, Jun 2012.

BRAAK, H. et al. Stanley Fahn Lecture 2005: The staging procedure for the inclusion body pathology associated with sporadic Parkinson's disease reconsidered. **Mov Disord**, v. 21, n. 12, p. 2042-2051, Dez 2006.

_____. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. **Cell Tissue Res**, v. 318, n. 1, p. 121-134, Out 2004.

_____. Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. **J Neural Transm**, v. 110, n. 5, p. 517-536, Maio 2003.

BROOKS, A. I. et al. Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. **Brain Res**, v. 823, n. 1-2, p. 1-10, Mar 1999.

BROWN, T. P. et al. Pesticides and Parkinson's disease--is there a link? **Environ Health Perspect**, v. 114, n. 2, p. 156-164, Feb 2006.

BRUNDIN, P. et al. Research in motion: the enigma of Parkinson's disease pathology spread. **Nat Rev Neurosci**, v. 9, n. 10, p. 741-745, Out 2008.

CABRAS, P. et al. Rotenone residues on olives and in olive oil. **J Agric Food Chem**, v. 50, n. 9, p. 2576-2580, Abr 2002.

CANNON, J. R.; GREENAMYRE, J. T. The role of environmental exposures in neurodegeneration and neurodegenerative diseases. **Toxicol Sci**, v. 124, n. 2, p. 225-250, Dez 2011.

CANNON, J. R. et al. A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. **Neurobiol Dis**, v. 34, n. 2, p. 279-290, Maio 2009.

CARR, W. J. et al. Olfactory recognition of conspecifics by domestic Norway rats. **J Comp Physiol Psychol**, v. 90, n. 9, p. 821-828, Set 1976.

CERSOSIMO, M. G. et al. Gastrointestinal manifestations in Parkinson's disease: prevalence and occurrence before motor symptoms. **J Neurol**, Dez 2012.

CERSOSIMO, M. G. et al. Alpha-synuclein immunoreactivity in minor salivary gland biopsies of Parkinson's disease patients. **Mov Disord**, v. 26, n. 1, p. 188-190, Jan 2011.

CHAUDHURI, K. R. et al. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. **Lancet Neurol**, v. 5, n. 3, p. 235-245, Mar 2006.

CICCHETTI, F.; DROUIN-OUELLET, J.; GROSS, R. E. Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? **Trends Pharmacol Sci**, v. 30, n. 9, p. 475-483, Set 2009.

CLAUDINO, R.F. **Envolvimento das endotelinas, atuando através de receptores ET_A, na manifestação dos sintomas de colite experimental em modelos murinos**. 2010. 109 f..Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

COLUCCI, M. et al. Intestinal dysmotility and enteric neurochemical changes in a Parkinson's disease rat model. **Auton Neurosci**, v. 169, n. 2, p. 77-86, Ago 2012.

CRYAN, J. F.; DINAN, T. G. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. **Nat Rev Neurosci**, v. 13, n. 10, p. 701-712, Out 2012.

DANTZER, R. et al. Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 91, n. 3, p. 363-8, 1987.

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

DE JONGE, W. J. et al. Postoperative ileus is maintained by intestinal immune infiltrates that activate inhibitory neural pathways in mice. **Gastroenterology**, v. 125, n. 4, p. 1137-1147, Out 2003.

DE WINTER, B. Y. et al. Involvement of afferent neurons in the pathogenesis of endotoxin-induced ileus in mice: role of CGRP and TRPV1 receptors. **Eur J Pharmacol**, v. 615, n. 1-3, p. 177-184, Ago 2009.

DEL TREDICI, K.; BRAAK, H. Lewy pathology and neurodegeneration in premotor Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 27, n. 5, p. 597-607, Abr 2012.

DEL TREDICI, K. et al. Lewy pathology in the submandibular gland of individuals with incidental Lewy body disease and sporadic Parkinson's disease. **Acta Neuropathol**, v. 119, n. 6, p. 703-13, Jun 2010.

DERKINDEREN, P. et al. Parkinson disease: the enteric nervous system spills its guts. **Neurology**, v. 77, n. 19, p. 1761-1767, Nov 2011.

DESPLATS, P. et al. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 31, p. 13010-13015, Ago 2009.

DEVIC, I. et al. Salivary α -synuclein and DJ-1: potential biomarkers for Parkinson's disease. **Brain**, v. 134, n. Pt 7, p. e178, Jul 2011.

DEVOS, D. et al. Colonic inflammation in Parkinson's disease. **Neurobiol Dis**, v. 50, p. 42-48, Fev 2013.

DOTY, R. L.; DEEMS, D. A.; STELLAR, S. Olfactory dysfunction in parkinsonism: a general deficit unrelated to neurologic signs, disease stage, or disease duration. **Neurology**, v. 38, n. 8, p. 1237-1244, Ago 1988.

DRECHSEL, D. A.; PATEL, M. Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. **Free Radic Biol Med**, v. 44, n. 11, p. 1873-1886, Jun 2008.

DROLET, R. E. et al. Chronic rotenone exposure reproduces Parkinson's disease gastrointestinal neuropathology. **Neurobiol Dis**, v. 36, n. 1, p. 96-102, Out 2009.

DULCY, C. P.; GANESH, A.; RAJAN, E. Olfactory bulb serotonin level modulates olfactory recognition in the neonate rat. **Indian J Exp Biol**, v. 48, n. 11, p. 1078-1082, Nov 2010.

DUNNING, C. J. et al. Can Parkinson's disease pathology be propagated from one neuron to another? **Prog Neurobiol**, v. 97, n. 2, p. 205-219, Maio 2012.

DUTRA, R. C. et al. Euphol, a tetracyclic triterpene produces antinociceptive effects in inflammatory and neuropathic pain: the involvement of cannabinoid system. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 4, p. 593-605, Sep 2012.

DUVOISIN, R. History of parkinsonism. **Pharmacol Ther**, v. 32, n. 1, p. 1-17, 1987.

EK, M. et al. Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1beta: role of endogenous prostaglandins. **J Neurosci**, v. 18, n. 22, p. 9471-9479, Nov 1998.

ESTEVE-RUDD, J. et al. Rotenone induces degeneration of photoreceptors and impairs the dopaminergic system in the rat retina. **Neurobiol Dis**, v. 44, n. 1, p. 102-115, Out 2011.

FERRANTE, R. J. et al. Systemic administration of rotenone produces selective damage in the striatum and globus pallidus, but not in the substantia nigra. **Brain Res**, v. 753, n. 1, p. 157-162, Abr 1997.

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. **J Neurosci Methods**, v. 148, n. 1, p. 78-87, Out 2005.

FLEMING, S. M.; SCHALLERT, T.; CIUCCI, M. R. Cranial and related sensorimotor impairments in rodent models of Parkinson's disease. **Behav Brain Res**, v. 231, n. 2, p. 317-322, Jun 2012.

FORSYTH, C. B. et al. Increased intestinal permeability correlates with sigmoid mucosa alpha-synuclein staining and endotoxin exposure markers in early Parkinson's disease. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e28032, 2011.

GEVAERD, M. S. et al. L-Dopa restores striatal dopamine level but fails to reverse MPTP-induced memory deficits in rats. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 4, n. 4, p. 361-370, Dez 2001.

GOEDERT, M. et al. 100 years of Lewy pathology. **Nat Rev Neurol**, v. 9, n. 1, p. 13-24, Dez 2012.

GOEHLER, L. E. et al. Vagal immune-to-brain communication: a visceral chemosensory pathway. **Auton Neurosci**, v. 85, n. 1-3, p. 49-59, Dez 2000.

_____. Activation in vagal afferents and central autonomic pathways: early responses to intestinal infection with *Campylobacter jejuni*. **Brain Behav Immun**, v. 19, n. 4, p. 334-344, Jul 2005.

GOLLAMUDI, S. et al. Concordant signaling pathways produced by pesticide exposure in mice correspond to pathways identified in human Parkinson's disease. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e36191, 2012.

GORELL, J. M. et al. The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. **Neurology**, v. 50, n. 5, p. 1346-1350, Maio 1998.

GREENAMYRE, J. T. et al. Lessons from the rotenone model of Parkinson's disease. **Trends Pharmacol Sci**, v. 31, n. 4, p. 141-2; author reply 142-143, Abr 2010.

GREENE, J. G.; NOORIAN, A. R.; SRINIVASAN, S. Delayed gastric emptying and enteric nervous system dysfunction in the rotenone model of Parkinson's disease. **Exp Neurol**, v. 218, n. 1, p. 154-161, Jul 2009.

GRIFFIN, W. S. et al. Interleukin-1 mediates Alzheimer and Lewy body pathologies. **J Neuroinflammation**, v. 3, p. 5, 2006.

HARA, D. B. et al. The relevance of kinin B1 receptor upregulation in a mouse model of colitis. **Br J Pharmacol**, v. 154, n. 6, p. 1276-1286, Jul 2008.

HAWKES, C. H.; DEL TREDICI, K.; BRAAK, H. Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 33, n. 6, p. 599-614, Dez 2007.

INDEN, M. et al. Neurodegeneration of mouse nigrostriatal dopaminergic system induced by repeated oral administration of rotenone is prevented by 4-phenylbutyrate, a chemical chaperone. **J Neurochem**, v. 101, n. 6, p. 1491-1504, Jun 2007.

JARDIM, I. C. S. F. et al. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – um enfoque às maçãs. **Quim. Nova**, v. 32, n. 4, 996-1012, 2009.

JELLINGER, K. A. Neuropathology of sporadic Parkinson's disease: evaluation and changes of concepts. **Mov Disord**, v. 27, n. 1, p. 8-30, Jan 2012.

JOLLOW, D. J. et al. Trichloroethylene risk assessment: a review and commentary. **Crit Rev Toxicol**, v. 39, n. 9, p. 782-797, 2009.

KALAITZAKIS, M. E. et al. Controversies over the staging of alpha-synuclein pathology in Parkinson's disease. **Acta Neuropathol**, v. 116, n. 1, p. 125-8; author reply 129-131, Jul 2008.

KAMEL, F. et al. Pesticide exposure and self-reported Parkinson's disease in the agricultural health study. **Am J Epidemiol**, v. 165, n. 4, p. 364-374, Feb 2007.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **J Leukoc Biol**, v. 77, n. 5, p. 598-625, Maio 2005.

LANGSTON, J. W.; BALLARD, P. A. Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. **N Engl J Med**, v. 309, n. 5, p. 310, Ago 1983.

LEBOUVIER, T. et al. The second brain and Parkinson's disease. **Eur J Neurosci**, v. 30, n. 5, p. 735-741, Set 2009.

LEMA TOMÉ, C. M. et al. Inflammation and α -Synuclein's Prion-like Behavior in Parkinson's Disease-Is There a Link? **Mol Neurobiol**, Abr 2012.

LEWY, F. Paralysis agitans. I. Pathologische Anatomie. In *Handbuch der Neurologie* Vol. 3 (eds Lewandowsky, M. & Abelsdorff, G.) 920–933 (Springer-Verlag, Berlin, 1912) apud GOEDERT, M. et al. 100 years of Lewy pathology. **Nat Rev Neurol**, v. 9, n. 1, p. 13-24, Dez 2012.

LETTY, S. et al. 5-HT₄ receptors improve social olfactory memory in the rat. **Neuropharmacology**, v. 36, n. 4-5, p. 681-687, 1997 Abr-Maio 1997. I

LI, J. Y. et al. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. **Nat Med**, v. 14, n. 5, p. 501-503, Maio 2008.

LI, Z. S. et al. Physiological modulation of intestinal motility by enteric dopaminergic neurons and the D2 receptor: analysis of dopamine receptor expression, location, development, and function in wild-type and knock-out mice. **J Neurosci**, v. 26, n. 10, p. 2798-2807, Mar 2006.

LIMA, M. M. et al. Motor and non-motor features of Parkinson's disease - a review of clinical and experimental studies. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 11, n. 4, p. 439-449, Jun 2012.

LIN, X. et al. Leucine-rich repeat kinase 2 regulates the progression of neuropathology induced by Parkinson's-disease-related mutant alpha-synuclein. **Neuron**, v. 64, n. 6, p. 807-27, Dez 2009.

LIU, H.; GUTHRIE, K. M. Neuronal replacement in the injured olfactory bulb. **Exp Neurol**, v. 228, n. 2, p. 270-282, Abr 2011.

LOTHARIUS, J.; BRUNDIN, P. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. **Nat Rev Neurosci**, v. 3, n. 12, p. 932-942, Dez 2002.

MARTINEZ, T. N.; GREENAMYRE, J. T. Toxin models of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Antioxid Redox Signal**, v. 16, n. 9, p. 920-934, Maio 2012.

MAYER, E. A. Gut feelings: the emerging biology of gut-brain communication. **Nat Rev Neurosci**, v. 12, n. 8, p. 453-466, Ago 2011.

MCLEAN, J. H.; SHIPLEY, M. T. Serotonergic afferents to the rat olfactory bulb: II. Changes in fiber distribution during development. **J Neurosci**, v. 7, n. 10, p. 3029-3039, Out 1987.

MEISSNER, W. G. et al. Priorities in Parkinson's disease research. **Nat Rev Drug Discov**, v. 10, n. 5, p. 377-393, Maio 2011.

MEREDITH, G. E. et al. Modeling PD pathogenesis in mice: advantages of a chronic MPTP protocol. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 14 Suppl 2, p. S112-5, 2008.

MEREDITH, G. E.; KANG, U. J. Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: a new look at an old problem. **Mov Disord**, v. 21, n. 10, p. 1595-1606, Out 2006.

MIZUNO, Y.; SUZUKI, K.; OHTA, S. Postmortem changes in mitochondrial respiratory enzymes in brain and a preliminary observation in Parkinson's disease. **J Neurol Sci**, v. 96, n. 1, p. 49-57, Abr 1990.

MORAIS, L. H. et al. Characterization of motor, depressive-like and neurochemical alterations induced by a short-term rotenone administration. **Pharmacol Rep**, v. 64, n. 5, p. 1081-1090, Set 2012.

MORATO, G. S.; LEMOS, T.; TAKAHASHI, R. N. Acute exposure to maneb alters some behavioral functions in the mouse. **Neurotoxicol Teratol**, v. 11, n. 5, p. 421-425, 1989 Sep-Out 1989.

MOREIRA, C. G. et al. Behavioral, neurochemical and histological alterations promoted by bilateral intranigral rotenone administration: a new approach for an old neurotoxin. **Neurotox Res**, v. 21, n. 3, p. 291-301, Abr 2012.

MORETTO, A.; COLOSIO, C. The role of pesticide exposure in the genesis of Parkinson's disease: Epidemiological studies and experimental data. **Toxicology**, v. in press, 2013.

MORI, K. et al. Peripheral lipopolysaccharide induces apoptosis in the murine olfactory bulb. **Brain Res**, v. 1039, n. 1-2, p. 116-129, Mar 2005.

NEURATH, M. F. et al. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. **J Exp Med**, v. 182, n. 5, p. 1281-1290, Nov 1995.

OBESO, J. A. et al. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. **Nat Med**, v. 16, n. 6, p. 653-661, Jun 2010.

PAN-MONTOJO, F. et al. Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. e8762, 2010.

_____. Environmental toxins trigger PD-like progression via increased alpha-synuclein release from enteric neurons in mice. **Sci Rep**, v. 2, p. 898, 2012.

PARAMESHWARAN, K. et al. Protection by an antioxidant of rotenone-induced neuromotor decline, reactive oxygen species generation and cellular stress in mouse brain. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 101, n. 3, p. 487-492, Maio 2012.

PFEIFFER, R. F. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. **Lancet Neurol**, v. 2, n. 2, p. 107-116, Feb 2003. ISSN 1474-4422.

POUCLET, H. et al. A comparison between rectal and colonic biopsies to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. **Neurobiol Dis**, v. 45, n. 1, p. 305-309, Jan 2012.

PREDIGER, R. D. et al. Intranasal administration of neurotoxicants in animals: support for the olfactory vector hypothesis of Parkinson's disease. **Neurotox Res**, v. 21, n. 1, p. 90-116, Jan 2012.

PREDIGER, R. D. et al. The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. **Exp Neurol**, v. 202, n. 2, p. 391-403, Dez 2006.

PREDIGER, R. D.; BATISTA, L. C.; TAKAHASHI, R. N. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. **Neurobiol Aging**, v. 26, n. 6, p. 957-964, Jun 2005.

QUALMAN, S. J. et al. Esophageal Lewy bodies associated with ganglion cell loss in achalasia. Similarity to Parkinson's disease. **Gastroenterology**, v. 87, n. 4, p. 848-856, Out 1984.

REICHMANN, H. View point: etiology in Parkinson's disease. Dual hit or spreading intoxication. **J Neurol Sci**, v. 310, n. 1-2, p. 9-11, Nov 2011.

RICHTER, F.; HAMANN, M.; RICHTER, A. Chronic rotenone treatment induces behavioral effects but no pathological signs of parkinsonism in mice. **J Neurosci Res**, v. 85, n. 3, p. 681-691, Fev 2007.

ROJAS, J. C. et al. Striatal neuroprotection with methylene blue. **Neuroscience**, v. 163, n. 3, p. 877-889, Out 2009.

ROJO, A. I. et al. Chronic inhalation of rotenone or paraquat does not induce Parkinson's disease symptoms in mice or rats. **Exp Neurol**, v. 208, n. 1, p. 120-6, Nov 2007.

SALAMA, M. et al. Regenerative effects of umbilical cord matrix cells (UCMCs) in a rodent model of rotenone neurotoxicity. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 34, n. 2, p. 338-344, Set 2012.

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. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 34, n. 6, p. 1104-1114, Ago 2010.

SAVICA, R.; ROCCA, W. A.; AHLKOG, J. E. When does Parkinson disease start? **Arch Neurol**, v. 67, n. 7, p. 798-801, Jul 2010.

SCHAPIRA, A. H. Future strategies for neuroprotection in Parkinson's disease. **Neurodegener Dis**, v. 7, n. 1-3, p. 210-212, 2010.

SCHAPIRA, A. H. et al. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. **J Neurochem**, v. 54, n. 3, p. 823-827, Mar 1990.

SCHEMANN, M.; NEUNLIST, M. The human enteric nervous system. **Neurogastroenterol Motil**, v. 16 Suppl 1, p. 55-59, Abr 2004.

SCHNABEL, J. Secrets of the shaking palsy. **Nature**, v. 466, n. 7310, p. S2-5, Ago 2010.

SCHNEIDER, T.; ISSEKUTZ, A. C. Quantitation of eosinophil and neutrophil infiltration into rat lung by specific assays for eosinophil peroxidase and myeloperoxidase. Application in a Brown Norway rat model of allergic pulmonary inflammation. **J Immunol Methods**, v. 198, n. 1, p. 1-14, Out 1996.

SCHULTZ, W. Multiple dopamine functions at different time courses. **Annu Rev Neurosci**, v. 30, p. 259-288, 2007.

SHERER, T. B. et al. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. **J Neurosci**, v. 23, n. 34, p. 10756-10764, Nov 2003.

SILVA, T. P. **Alterações comportamentais, neuroquímicas e neuroimunológicas induzidas por lesão estriatal com 6-OHDA**, 2012. 49 f.. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SONIA ANGELINE, M. et al. Rotenone-induced parkinsonism elicits behavioral impairments and differential expression of parkin, heat shock proteins and caspases in the rat. **Neuroscience**, v. 220, p. 291-301, Set 2012.

SPILLANTINI, M. G. et al. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 11, p. 6469-6473, Maio 1998.

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, Out 2008.

TANNER, C. M. et al. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. **Environ Health Perspect**, v. 119, n. 6, p. 866-872, Jun 2011.

_____. Occupation and risk of parkinsonism: a multicenter case-control study. **Arch Neurol**, v. 66, n. 9, p. 1106-1113, Set 2009.

TASSELLI, M. et al. Effects of oral administration of rotenone on gastrointestinal functions in mice. **Neurogastroenterol Motil**, Jan 2013.

THIRUCHELVAM, M. et al. Potentiated and preferential effects of combined paraquat and maneb on nigrostriatal dopamine systems: environmental risk factors for Parkinson's disease? **Brain Res**, v. 873, n. 2, p. 225-234, Ago 2000.

TIAN, Y. M. et al. Alteration of dopaminergic markers in gastrointestinal tract of different rodent models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 153, n. 3, p. 634-644, Maio 2008.

TRETIAKOFF, C. Contribution à l'étude de l'anatomie pathologique du locus niger de Soemmering avec quelques déductions relatives à la pathogénie des troubles du tonus musculaire et de la maladie de Parkinson. Thesis, University of Paris (1919) apud GOEDERT, M. et al. 100 years of Lewy pathology. **Nat Rev Neurol**, v. 9, n. 1, p. 13-24, Dez 2012.

TÜRLER, A. et al. Colonic postoperative inflammatory ileus in the rat. **Ann Surg**, v. 236, n. 1, p. 56-66, Jul 2002.

UNGERSTEDT, U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. **Eur J Pharmacol**, v. 5, n. 1, p. 107-110, Dez 1968.

VIVES-BAUZA, C. et al. Is there a pathogenic role for mitochondria in Parkinson's disease? **Parkinsonism Relat Disord**, v. 15 Suppl 3, p. S241-4, Dez009.

VOON, V. et al. Chronic dopaminergic stimulation in Parkinson's disease: from dyskinesias to impulse control disorders. **Lancet Neurol**, v. 8, n. 12, p. 1140-1149, Dez 2009.

WAKABAYASHI, K. et al. Parkinson's disease: an immunohistochemical study of Lewy body-containing neurons in the

enteric nervous system. **Acta Neuropathol**, v. 79, n. 6, p. 581-583, 1990.

WOLTERS, E. C. H. Non-motor extranigral signs and symptoms in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 15 Suppl 3, p. S6-12, Dez 2009.

YOSHIMOTO, K. et al. Administration of rotenone enhanced voluntary alcohol drinking behavior in C57BL/6J mice. **Leg Med (Tokyo)**, v. 14, n. 5, p. 229-238, Set 2012.

ZORZON, M. et al. Familial and environmental risk factors in Parkinson's disease: a case-control study in north-east Italy. **Acta Neurol Scand**, v. 105, n. 2, p. 77-82, Fev 2002.

ANEXO A

Resultado de Solicitação de Protocolo**Protocolo**

PP00647

Título

Avaliação sintomas pré-motores e motores do parkinsonismo induzido pela rotenona em camundongos

Data de Entrada

20/05/2011

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

06/09/2011

Considerações

Ofício nº 106/CEUA/PRPE/2011

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Reinaldo Naoto Takahashi / Farmacologia / Centro de Ciências Biológicas

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por dois anos, para a utilização de 864 camundongos (Mus musculus).
- Procedência do animal: Biotério Central UFSC.

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ONLINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)**Data 06/12/2013**

Data 06/09/2011

Parecer(es):

Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE