



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

**A lesão dopaminérgica como modelo de estágio pré-motor da
doença de Parkinson: efeitos do antagonismo do receptor CB₁**

Meigy Tavares Tadaiesky

Florianópolis – SC
2010



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

**A lesão dopaminérgica como modelo de estágio pré-motor da
doença de Parkinson: efeitos do antagonismo do receptor CB₁**

Meigy Tavares Tadaiesky

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

Florianópolis – SC
2010

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

T1211 Tadaiesky, Meigy Tavares

A lesão dopaminérgica como modelo de estágio pré-motor da doença de Parkinson [tese] : efeitos do antagonismo do receptor CB1 / Meigy Tavares Tadaiesky ; orientador, Reinaldo Naoto Takahashi. - Florianópolis, SC, 2010.

79 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Parkinson, Doença de. 3. Depressão. 4. Cognição. 5. Ansiedade. I. Takahashi, Reinaldo Naoto. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

Ao Samuel

A vida é para quem topa qualquer parada. Não para quem pára em qualquer topada.

(Bob Marley, 1945- 1981).

AGRADECIMENTOS

À minha família: pai e mãe, irmãs, avós, tias, tios, primos, primas e cunhados, pelo apoio incondicional que sempre recebi. Este trabalho é em parte para vocês. Quero agradecer especialmente aos meus pais, Niltomiro e Izabel, sem os quais nada seria possível, pelo incessante incentivo e força que sempre me deram. Foi por acreditarem em mim que eu terminei mais essa etapa da minha vida. Às minhas irmãs, Liany e Nayara, por serem verdadeiras irmãs e amigas. E às tias Izete e Ivete, por estarem sempre presentes, ainda que a quilômetros de distância. Obrigada por tudo.

Ao professor Dr. Reinaldo Naoto Takahashi, pela orientação e pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório.

Aos demais professores do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, pelos preciosos ensinamentos durante minha pós-graduação.

Ao professor Dr. Cláudio da Cunha e à doutoranda Patrícia Dombrowski, da Universidade Federal do Paraná, pelo apoio prestado com a realização dos experimentos de HPLC. Da mesma forma aos colegas Eduardo Ferreira e Cláudia Figueiredo, pela valiosa ajuda com a imunistoquímica.

Às amigas de longa data, geograficamente distantes e ainda assim próximas, Sibelle e Beth, por sempre me motivarem e incentivarem.

À amiga e colega de laboratório Vanessa, na companhia de quem percorri grande parte desta caminhada. Pela amizade, companhia, risadas, broncas, conselhos, incentivo e pela motivação nos momentos de desânimo.

Aos demais colegas do Laboratório de Psicofarmacologia, antigos e atuais: Luciano, Rui, Pamplona, Leandro, Pablo, Robson, Manu, Daniel, Rafael, Assini, Carina e Thiago, pelas valiosas sugestões e críticas, por compartilharem seus conhecimentos e pela disponibilidade para ajudar nas vezes que foi preciso. Também pelos

happy hours. Especialmente à Cris, por tudo isso mencionado, mas principalmente pela amizade.

A todos os colegas do departamento pela boa convivência, sobretudo a Maria, Ligia e Elaine, pelas palavras de apoio.

Ao colega e conterrâneo Inácio, que junto com sua divertida irmã me hospedou quando vim prestar a seleção de doutorado. Obrigada por ter apresentado Floripa, pelos passeios, praias e trilhas.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Sem vocês nada funcionaria. Em especial, meus sinceros agradecimentos à Rita, que sempre nos atendeu com presteza e boa-vontade, por ser não apenas uma excelente profissional, mas também uma boa amiga.

À família Gasperi, pelos almoços de final de semana e pelo carinho com que me receberam em sua casa.

Aos meus cachorrinhos, Lobinho e Picuchita, pela amizade incondicional e por me despertarem todas as manhãs com lambidas no rosto.

Aos animais que tiveram sua vida sacrificada para que este trabalho fosse realizado. Espero que seu sacrifício não tenha sido em vão.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro.

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser, mas graças a Deus não somos o que éramos.”

Martin Luther King

(1929–1968)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	IV
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS	VII
RESUMO	VIII
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 A doença de Parkinson	2
1.2 Sintomas pré-motores da DP	3
1.3 Principais modelos de DP em roedores	5
1.4 O modelo da 6-OHDA	6
1.5 O sistema endocanabinóide e a DP	8
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Animais	17
3.2 Drogas e Soluções	17
3.3 Procedimentos Experimentais	17
3.3.1 Experimento 1: Efeitos da administração de 6-OHDA nas alterações comportamentais precoces em ratos	17
3.3.2 Experimento 2: Efeitos da administração de SR141716A nas alterações comportamentais precoces em ratos tratados com 6-OHDA	18
3.4 Cirurgia Estereotáxica	19
3.5 Testes Comportamentais	21
3.5.1 Testes de avaliação de parâmetros comportamentais	21
3.5.1.1 Teste do Consumo de Sacarose	21
3.5.1.2 Teste do Nado Forçado	21
3.5.1.3 Teste do Labirinto em Cruz Elevado	22

3.5.2 Testes de avaliação do desempenho cognitivo.....	24
3.5.2.1 Teste do Labirinto Aquático de Morris – Versão com Pista	24
3.5.2.2 Teste do Reconhecimento Social	24
3.5.3 Teste de avaliação da função olfatória	26
3.5.3.1 Teste da Discriminação Olfatória.....	26
3.5.4 Teste de avaliação da atividade motora	27
3.5.4.1 Teste do Campo Aberto	27
3.6 Análises Neuroquímicas	27
3.6.1 Imunoistoquímica para TH	27
3.6.2 Determinação Dos Níveis Cerebrais de DA, NA e 5-HT por HPLC	29
3.6.3 Análise dos Dados e Estatística.....	29
4 RESULTADOS.....	31
4.1 Experimento 1	31
4.1.1 Efeitos da administração de 6-OHDA nas alterações comportamentais precoces em ratos.....	31
4.1.1.1 Efeitos da administração intraestriatal de 6-OHDA nos parâmetros emocionais.....	31
4.1.1.1.1 Teste do Consumo de Sacarose.....	31
4.1.1.1.2 Teste do Nado Forçado	31
4.1.1.1.3 Teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	31
4.1.1.2 Efeitos da administração de 6-OHDA no desempenho cognitivo	32
4.1.1.2.1 Teste do Labirinto Aquático de Morris – Versão com Pista ...	32
4.1.1.2.2 Teste do Reconhecimento Social	33
4.1.1.3 Efeitos da administração intraestriatal de 6-OHDA na função olfatória.....	35
4.1.1.3.1 Teste da Discriminação Olfatória.....	35
4.1.1.4 Efeitos da administração intraestriatal de 6-OHDA na locomoção	36

4.1.1.4.1 Teste do Campo Aberto.....	36
4.1.2 Análises Neuroquímicas.....	38
4.1.2.1 Imunoistoquímica para TH.....	38
4.1.2.2 Determinação Dos Níveis Cerebrais de DA, NA e 5-HT por HPLC	38
4.2 Experimento 2	45
4.2.1 Efeitos da administração de SR141716A nas alterações comportamentais precoces em ratos tratados com 6-OHDA.....	45
4.2.1.1 Efeitos da administração de SR141716A nos parâmetros emocionais de ratos tratados com 6-OHDA.....	45
4.2.1.1.1 Teste do Nado Forçado.....	45
4.2.1.2 Efeitos da administração de SR141716A nos parâmetros cognitivos de ratos tratados com 6-OHDA	45
4.2.1.2.1 Teste do Reconhecimento Social.....	45
4.2.2 Análises Neuroquímicas.....	47
4.2.2.1 Determinação Dos Níveis Cerebrais de DA, NA e 5-HT por HPLC	47
5 DISCUSSÃO.....	52
6 CONCLUSÕES.....	62
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG	- 2-araquidonil-glicerol-éter
5-HIAA	- Ácido 5-hidroxi-indoacético
5-HT	- Serotonina
6-OHDA	- 6-hidroxidopamina
ANOVA	- Análise de variância
CB ₁	- Receptor canabinóide tipo-1
CB ₂	- Receptor canabinóide tipo-2
CEUA	- Comitê de Ética para Uso de Animais
DA	- Dopamina
DAB	- 3,3-diaminobenzidina
DOPAC	- Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
DP	- Doença de Parkinson
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
EP	- Erro padrão
H ₂ O ₂	- Peróxido de hidrogênio
HPLC-ED	- Cromatografia Líquida de Alta Pressão com Detecção Eletroquímica
HVA	- Ácido homovanílico
MPTP	- 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NA	- Noradrenalina
NADA	- N-araquidonil-dopamina
S _{Nc}	- Substância Negra parte compacta
TH	- Tirosina-hidroxilase
THC	- Δ ⁹ -tetraidrocanabinol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mecanismos de neurotoxicidade induzida por 6-OHDA.....	8
Figura 2- Estrutura química dos endocanabinóides	9
Figura 3- Localização dos receptores CB1 e TRPV1 em subpopulações neuronais específicas nos circuitos dos gânglios basais.....	13
Figura 4- Esquema dos efeitos modulatórios dos endocanabinóides e seus receptores na atividade dos principais neurotransmissores que operam nos circuitos dos núcleos da base	14
Figura 5- Cronograma de realização do Experimento 1.....	18
Figura 6- Cronograma de realização do Experimento 2.....	19
Figura 7- Esquema representativo da administração de 6-OHDA	20
Figura 8- Esquema representativo do teste do consumo de sacarose ...	21
Figura 9- Ilustração representativa do teste do nado forçado.....	22
Figura 10- Ilustração representativa do teste do labirinto em cruz elevado	23
Figura 11- Ilustração representativa da versão com pista do teste do labirinto aquático de Morris	25
Figura 12- Ilustração representativa do teste do reconhecimento social	26
Figura 13- Ilustração representativa do teste da discriminação olfatória	27
Figura 14- Ilustração representativa do teste do campo aberto	28
Figura 15- Efeitos da administração de 6-OHDA no teste do consumo de sacarose	32
Figura 16- Efeitos da administração de 6-OHDA no teste do nado forçado.....	33
Figura 17- Efeito da administração de 6-OHDA nos parâmetros de atividades espaço-temporais no teste do labirinto em cruz elevado.....	34
Figura 18- Efeitos da administração de 6-OHDA na versão com pista do teste do labirinto aquático	35
Figura 19- Efeitos da administração de 6-OHDA no tempo de investigação social.....	36

Figura 20- Efeitos da administração de 6-OHDA no número de neurônios TH-positivos no corpo estriado e SNc	40
Figura 21- Efeitos da administração de 6-OHDA nos níveis de DA, DOPAC, HVA, NA e 5-HT no corpo estriado de ratos uma semana após a cirurgia	41
Figura 22- Efeitos da administração de 6-OHDA nos níveis de DA, DOPAC, HVA, NA e 5-HT no corpo estriado e córtex pré-frontal de ratos três semanas após a cirurgia	43
Figura 23- Efeitos da administração de SR141716A no teste do nado forçado em ratos tratados com 6-OHDA	46
Figura 24- Efeitos da administração de SR141716A no tempo de investigação social em ratos tratados com 6-OHDA	47
Figura 25- Hemisfério esquerdo de rato com a subdivisão do corpo estriado em seis áreas	55

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Efeitos da administração de 6-OHDA no teste da discriminação olfatória de ratos três semanas após a cirurgia..... 37
- Tabela 2-** Efeitos da administração de 6-OHDA na atividade locomotora espontânea uma e três semanas após a cirurgia..... 37
- Tabela 3-** Efeitos da administração de 6-OHDA nos níveis de DA, DOPAC, HVA, NA e 5-HT no córtex pré-frontal e hipocampo uma semana após a cirurgia 42
- Tabela 4-** Efeitos da administração de 6-OHDA nos níveis de DA, DOPAC, HVA, NA e 5-HT no hipocampo três semanas após a cirurgia 44
- Tabela 5-** Efeitos da administração aguda de SR141716A (3 mg/kg) i.p. nos níveis de neurotransmissores no corpo estriado, córtex pré-frontal e hipocampo uma semana após a administração de 6-OHDA 48
- Tabela 6-** Efeitos da administração aguda de SR141716A (0,5 mg/kg) i.p. nos níveis de neurotransmissores no corpo estriado, córtex pré-frontal e hipocampo três semanas após a administração de 6-OHDA .. 51

RESUMO

Além dos sinais motores clássicos, a doença de Parkinson é caracterizada por déficits cognitivos e emocionais, os quais precedem as alterações motoras, como tem sido demonstrado por diversos autores. O presente estudo teve como principal objetivo investigar se uma degeneração parcial dos neurônios dopaminérgicos induzida pela administração de 6-hidroxi-dopamina seria capaz de induzir alterações comportamentais pré-motoras em ratos. O curso temporal da lesão nigroestriatal foi avaliado através de imunistoquímica para tirosina-hidroxilase e os níveis de dopamina, noradrenalina e serotonina foram analisados em várias regiões cerebrais através de Cromatografia Líquida de Alta Pressão com Detecção Eletroquímica. Foram realizados testes para avaliar uma variedade de funções comportamentais, incluindo atividade locomotora, comportamento tipo-depressivo, anedonia, ansiedade e memória nos ratos lesionados com 6-hidroxi-dopamina. A infusão bilateral de 6-hidroxi-dopamina no corpo estriado de ratos causou lesão precoce dos terminais dopaminérgicos no corpo estriado e corpos celulares na substância negra. A lesão nigroestriatal foi acompanhada por uma perda precoce de dopamina no corpo estriado, que permaneceu estável por um período de três semanas de observação. Além disso, foi observada uma redução tardia de dopamina no córtex pré-frontal, porém não no hipocampo. Alterações noradrenérgicas e serotoninérgicas foram também observadas após a administração de 6-hidroxi-dopamina. Os resultados indicam que os ratos lesionados com 6-hidroxi-dopamina apresentaram uma redução no consumo de sacarose e um aumento no tempo de imobilidade no teste do nado forçado, sugerindo um efeito tipo anedônico - depressivo. Além disso, foi observada uma atividade do tipo ansiogênica no teste do labirinto em cruz elevado, bem como alterações cognitivas na versão com pista do labirinto aquático de Morris e no teste do reconhecimento social. Estes achados sugerem que a degeneração dopaminérgica parcial, associada a alterações dopaminérgicas, noradrenérgicas e serotoninérgicas no corpo estriado e córtex pré-frontal pode ter causado os déficits emocionais e cognitivos observados neste modelo de fase inicial da doença de Parkinson. Evidências recentes em modelos animais sugerem que o bloqueio dos receptores canabinóides CB₁ poderia ser benéfico para o alívio da inibição motora típica da doença de Parkinson. Desta forma, nós investigamos se a administração de SR141716A, um antagonista seletivo dos receptores CB₁, seria capaz de reduzir os déficits

emocionais e cognitivos observados, respectivamente, no teste do nado forçado e do reconhecimento social neste modelo de doença de Parkinson pré-motora. Os resultados mostraram que, uma semana após a cirurgia, no teste no nado forçado, o aumento do tempo de imobilidade observado nos animais tratados com 6-hidroxidopamina foi reduzido pela injeção aguda de 3 mg/kg de SR141716A, enquanto que doses menores (0,5 e 1 mg/kg) não foram efetivas. Três semanas após a cirurgia, o aumento no tempo de investigação no teste do reconhecimento social causado pela administração de 6-hidroxidopamina foi atenuado pela exposição aguda a baixas doses de SR141716A. As análises de Cromatografia Líquida de Alta Pressão mostraram alterações nos níveis estriatais de dopamina e nos níveis de noradrenalina e serotonina no córtex pré-frontal após a injeção de SR141716A. Esses resultados sugerem que o receptor CB₁ pode desempenhar um papel importante nos estágios iniciais da doença de Parkinson.

ABSTRACT

In addition to classic motor symptoms, Parkinson's disease is characterized by cognitive and emotional deficits, which have been demonstrated to precede motor impairments. The present study addresses the question of whether a partial degeneration of dopaminergic neurons using 6-hydroxydopamine in rats is able to induce premotor behavioral signs. The time-course of nigrostriatal damage was evaluated by tyrosine hydroxylase-immunohistochemistry and the levels of dopamine, noradrenaline and serotonin in various brain regions were analyzed by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. Tests that assessed a variety of behavioral functions, including locomotor activity, depression, anhedonia, anxiety and memory were conducted on 6-hydroxydopamine-lesioned rats. Bilateral infusion of 6-hydroxydopamine in the striatum of rats caused early damage of dopaminergic terminals in striatum and in cell bodies in substantia nigra pars compacta. The nigrostriatal lesion was accompanied by early loss of dopamine in the striatum, which remained stable through a three-weeks period of observation. In addition, a late loss of dopamine in the prefrontal cortex, but not in the hippocampus, was seen. Additional noradrenergic and serotonergic alterations were observed after 6-hydroxydopamine administration. Six-hydroxydopamine - lesioned rats showed decreased sucrose consumption and an increased immobility time in the forced swimming test, an anhedonic-depressive-like effect. In addition, an anxiogenic-like activity was seen in the elevated plus maze test and cognitive impairments were observed on the cued version of the Morris water maze and social recognition tests. These findings suggest that partial striatal dopaminergic degeneration and parallel dopaminergic, noradrenergic and serotonergic alterations in striatum and prefrontal cortex may have caused the emotional and cognitive deficits observed in this rat model of early phase Parkinson's disease. Recent evidence in animal models suggests that the blockade of cannabinoid CB₁ receptors might alleviate motor dysfunction typical of Parkinson's disease. Therefore, we investigated whether antagonism of CB₁ receptors would improve emotional and cognitive deficits in the rat model of pre-motor Parkinson's disease induced by an intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. Our results showed that immobility time was reduced by acute 3 mg/kg SR141716A, while 0.5 and 1 mg/kg doses were not effective. Three weeks after surgery, a 6-

hydroxydopamine-induced increase in investigation time in social recognition test was improved by low doses of SR141716A. High-Performance Liquid Chromatography analysis demonstrated alterations in striatal dopamine as well as noradrenaline and serotonin in prefrontal cortex after SR141716A injection. These findings suggest a role for CB₁ receptors in the early symptoms caused by degeneration of dopaminergic neurons in striatum, as observed in Parkinson's disease.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é o segundo transtorno neurodegenerativo relacionado à idade mais comum em humanos, atrás apenas da doença de Alzheimer. A prevalência desta doença é de aproximadamente 0,15% da população total mundial, crescendo para 0,5% em pessoas com mais de 50 anos de idade (Stoof et al., 1999). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2000), existem aproximadamente 222 mil parkinsonianos no Brasil, sendo que 2% dos brasileiros acima dos 60 anos são acometidos por este transtorno. Com o crescente envelhecimento da população, acredita-se que o número de pessoas diagnosticadas com DP deve aumentar rapidamente nos próximos 20 anos.

Clinicamente, a DP é caracterizada pelos sinais motores cardinais: tremor em repouso, diminuição dos movimentos voluntários, bradicinesia, rigidez, postura curvada e instabilidade postural. A DP tem como principal característica neuropatológica a lesão dos neurônios dopaminérgicos localizados na substância negra parte compacta (SNc), que enviam projeções para os gânglios da base, ocasionando uma redução nos níveis de dopamina (DA) no corpo estriado, além de alterações em suas conexões com o córtex pré-frontal (Araki et al., 2001; Blandini et al., 2000). Entretanto, a neuropatologia da DP não está restrita à via nigroestriatal, de forma que anormalidades histológicas são também encontradas em outros grupos celulares dopaminérgicos e não-dopaminérgicos (Dauer & Przedborski, 2003).

A causa primária da DP não está completamente esclarecida. Entretanto, estudos epidemiológicos têm destacado que alguns fatores ambientais podem estar associados a um aumento no risco do desenvolvimento da DP, tais como a exposição a alguns tipos de herbicidas e pesticidas (Fall et al., 1999; Vanacore et al., 2002). Além disso, embora a natureza do processo neurodegenerativo verificado na DP não seja conhecida, descobertas recentes sugerem que esta poderia estar associada a um estado de estresse oxidativo desencadeado por um ou mais fatores, como envelhecimento cerebral, predisposição genética, anomalias mitocondriais, produção de radicais livres e toxinas ambientais (Alexi et al., 2000; Olanow et al., 1998). De fato, os neurônios dopaminérgicos são particularmente sensíveis ao estresse oxidativo, devido a fatores como o metabolismo da DA, auto-oxidação, níveis

aumentados de ferro e reduzidos de glutatona total quando comparados a outras regiões cerebrais (Berg et al., 2004; Jenner, 2003).

1.2 Sintomas pré-motores da DP

Desde a sua descrição inicial, feita por James Parkinson (1817) em seu estudo “*Essay on the Shaking Palsy*”, a DP vem sendo caracterizada como um distúrbio do movimento, sendo o seu diagnóstico baseado na presença de dois ou mais sinais motores cardinais. Entretanto, os pacientes parkinsonianos somente desenvolvem esses critérios clínicos quando aproximadamente 60-70% dos neurônios da SNc encontram-se degenerados e os níveis estriatais de DA são reduzidos em 70-80% (Barrio et al., 1997; Deumens et al., 2002).

Nos últimos anos vem crescendo o número de trabalhos demonstrando que uma série de distúrbios nos domínios emocional, cognitivo e psicossocial observados na DP frequentemente ocorre antes do aparecimento das disfunções motoras. Na verdade, a DP parece tratar-se de uma doença multidimensional, estando associada, além da sintomatologia da perda dos movimentos, a diversos sintomas que resultam em uma perda na qualidade de vida do indivíduo (Gupta e Bathia, 2000). Dentre os sintomas verificados na DP, destacam-se: depressão (Cummings, 1992; Oertel et al., 2001; Santamaria et al., 1986), ansiedade (Maricle et al., 1995; Richard et al., 2004; Witjas et al., 2002) e prejuízos cognitivos (Dubois e Pillon, 1997; Goldman et al., 1998; Owen et al., 1995). O fato destas alterações se desenvolverem antes do aparecimento dos sinais motores e do diagnóstico da DP sugere fortemente a ocorrência de alterações cerebrais na fase inicial da doença que levariam a uma maior predisposição ao desenvolvimento de sintomas psiquiátricos e alterações cognitivas. Embora a depleção de DA seja a maior responsável pelas alterações motoras características da DP, acredita-se que alterações em outros neurotransmissores, principalmente noradrenalina (NA), serotonina (5-HT) e acetilcolina, estejam associadas ao amplo espectro de sintomas motores e não-motores nos pacientes com DP.

A depressão é o transtorno neuropsiquiátrico mais comum na DP. As estimativas de sua prevalência variam entre 2,7-76%, com uma prevalência média de cerca de 35%, precedendo os sinais motores em diversos pacientes. A severidade da depressão na DP pode variar desde uma distímia leve até depressão maior (Leentjens et al., 2003). A anedonia, uma manifestação específica da depressão, caracterizada por

uma perda de interesse em atividades que costumavam ser prazerosas, foi demonstrada estar presente em 45% dos indivíduos com DP e em 79% do subgrupo com depressão (Lemke et al., 2006). A depressão na DP parece possuir uma base biológica resultante da lesão dos sistemas serotoninérgico, noradrenérgico e/ou dopaminérgico, e frequentemente antecede os sinais motores. Embora a base patofisiológica da depressão na DP não seja bem compreendida, estudos com tomografia com emissão de pósitrons têm demonstrado alterações dopaminérgicas e noradrenérgicas, além de níveis reduzidos de ácido 5-hidroxi-indoacético (5-HIAA) no fluido cerebrospinal e redução na ligação cortical ao receptor 5HT_{1A} nos indivíduos com depressão associada à DP ausentes nos indivíduos com DP sem depressão (Remy et al., 2005). Ainda não está claro se estas alterações poderiam identificar indivíduos com risco futuro de desenvolver a DP.

Diversos estudos têm demonstrado uma alta prevalência de ansiedade na DP, sendo considerada o segundo transtorno afetivo mais comum, atrás apenas da depressão, podendo também preceder os sinais motores. O índice de prevalência de ansiedade é incerto, devido a este sintoma não ser extensivamente estudado na DP. Entretanto, estimativas sugerem que acima de 40% dos pacientes com DP apresentam sintomas de ansiedade (Richard, 2005), podendo apresentar comorbidade com depressão (Menza et al., 1993), causando um impacto negativo na qualidade de vida dos indivíduos (Marinus et al., 2002). A ansiedade pode se apresentar como ataques de pânico, fobias ou desordem de ansiedade generalizada.

Disfunções cognitivas também estão presentes em todos os estágios da DP. Estudos têm demonstrado que acima de 50% dos pacientes com DP apresentam algum tipo de alteração intelectual, mesmo nos primeiros estágios da doença. Nas fases iniciais e intermediárias da doença ocorrem déficits cognitivos moderados, enquanto que em estágios mais avançados tem sido relatada a ocorrência de demência em cerca de 11 a 36% dos pacientes com DP (Giladi et al., 2000). A presença de disfunções cognitivas e demência afeta de maneira adversa a prognose da DP (Parashos et al., 2002), podendo contribuir para o aumento na tendência a quedas (Wielinski et al., 2005) e interferindo com várias atividades diárias (Devos et al., 2007). A associação entre a DP e disfunções cognitivas sugere uma interação entre o processo neurodegenerativo que ocorre na DP e cognição, devida possivelmente a uma disfunção das conexões fronto-estriatais (Brandt et al., 2004; Wood & Troster, 2003).

O período em que estes sintomas surgem é conhecido como fase pré-motora da doença. Durante esta fase ocorre uma progressão do processo neuropatológico na ausência de manifestações motoras concomitantes (Becker et al., 2002). A fisiopatologia dos sintomas pré-motores da DP ainda não é bem conhecida. Entretanto, existe um interesse crescente por estas anormalidades clínicas pré-motoras, principalmente porque esses sintomas podem permitir a identificação de indivíduos com alto risco para o desenvolvimento futuro de DP.

1.3 Principais modelos de DP em roedores

A maior parte do conhecimento adquirido a respeito dos mecanismos envolvidos com a DP deriva de inúmeros estudos conduzidos nas últimas quatro décadas em modelos animais que reproduzem as características patológicas e comportamentais da doença. Idealmente, um modelo animal deve possuir uma etiologia e características similares ao equivalente humano. Desta forma, é interessante que o maior número possível de aspectos da doença seja replicado.

A maioria dos estudos que utilizam modelos animais de DP é voltada à investigação de alterações motoras (Aguiar et al., 2008; Capitelli et al., 2008; Silvestrin et al., 2009) enquanto os estudos que investigam as alterações não-motoras da doença são ainda escassos. Entre estes, as alterações de memória têm recebido maior atenção (Da Cunha et al., 2001; Ferro et al., 2005; Prediger et al., 2005), porém poucos têm investigado a ocorrência de alterações emocionais como depressão e ansiedade. O desenvolvimento de modelos que reproduzam as alterações pré-motoras da DP possui o propósito de estudar os aspectos fisiológicos da doença, bem como auxiliar no desenvolvimento de terapias neuroprotetoras.

Recentes descobertas genéticas levaram ao desenvolvimento de diferentes modelos genéticos de DP. Entretanto, nenhum dos modelos propostos apresenta a degeneração típica dos neurônios dopaminérgicos. Desta forma, atualmente entre os vários modelos animais utilizados de DP, as neurotoxinas são a ferramenta mais popular para a indução de neurodegeneração seletiva do sistema nigroestriatal. Diversos modelos de degeneração dopaminérgica *in vivo* utilizando neurotoxinas tais como a rotenona, o maneb, o paraquat e as mais frequentemente utilizadas, 1-metil 4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) e 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), têm sido desenvolvidos para o estudo da DP (Betarbet et al., 2002).

1.4 O modelo da 6-OHDA

O modelo de DP baseado na injeção local da neurotoxina 6-OHDA é ainda hoje o procedimento mais comumente utilizado para a obtenção de lesão nigroestriatal em roedores. A primeira demonstração dos efeitos biológicos da 6-OHDA foi realizada há mais de 40 anos, quando Porter e cols. (1963) demonstraram que esse agente, um análogo estrutural das catecolaminas DA e NA, era capaz de induzir uma depleção de NA eficiente e duradoura nos nervos simpáticos do coração. Alguns anos depois, Ungerstedt (1968) demonstrou que a injeção bilateral de 6-OHDA na SNc era capaz de causar degeneração anterógrada do sistema dopaminérgico nigroestriatal, causando acinesia e uma taxa de mortalidade muito alta, gerando, assim, o primeiro modelo de DP. Desde então, o modelo da 6-OHDA ainda é a ferramenta mais utilizada na replicação da perda de neurônios dopaminérgicos da SNc que ocorre na DP, devido à sua relativa baixa complexidade e custo do procedimento, além de ser altamente reproduzível, em contraste com modelos mais recentes. Mais ainda, ao contrário de outras toxinas utilizadas para induzir parkinsonismo, tais como o MPTP, a 6-OHDA apresenta baixo risco de toxicidade relacionada à sua manipulação, representando, assim, um composto ideal para ser utilizado no laboratório.

A 6-OHDA é tóxica tanto a nível periférico quanto central; entretanto, por não cruzar a barreira hematoencefálica, esta toxina deve ser injetada diretamente no cérebro através de cirurgia estereotáxica para produzir toxicidade no sistema nervoso central. Os efeitos neurotóxicos da 6-OHDA ocorrem através do acúmulo da toxina nos neurônios catecolaminérgicos, seguido por alterações na homeostase celular e dano neuronal. O armazenamento intracelular de 6-OHDA é mediado pelos transportadores de membrana de DA e NA, que reconhecem e captam a 6-OHDA devido à sua similaridade estrutural com as catecolaminas endógenas.

Uma vez infundida no cérebro, a 6-OHDA produz espécies citotóxicas através de mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos (Choi et al., 1999): a oxidação de 6-OHDA pela monoamina oxidase gera peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual, além de ser citotóxico, induz a produção de outros radicais de oxigênio. Além disso, a 6-OHDA passa por um processo de auto-oxidação, gerando H_2O_2 , espécies reativas do oxigênio e quinonas que atacam os grupos nucleófilos endocelulares. Os aumentos nos níveis de espécies reativas do oxigênio e outras espécies

reativas resultam em uma rápida depleção das enzimas antioxidantes endocelulares, levando a uma neurotoxicidade amplificada na estrutura e metabolismo celular e resultando em dano neuronal (Blum et al., 2001). Além de exacerbar o estresse oxidativo endocelular, a 6-OHDA pode induzir neurotoxicidade através da alteração da função mitocondrial, tendo sido demonstrado que esta toxina prejudica a atividade do complexo I em mitocôndrias isoladas (Glinka & Youdim, 1995).

Quando realizada em áreas cerebrais específicas, a administração de 6-OHDA resulta em déficits fisiológicos e comportamentais. A injeção de 6-OHDA é comumente associada à administração de bloqueadores do transportador de NA, como a desipramina, a fim de reduzir a captação desta neurotoxina por neurônios noradrenérgicos e aumentar a seletividade para neurônios dopaminérgicos. A Figura 1 indica os mecanismos de toxicidade da 6-OHDA e a ação da desipramina.

A magnitude da lesão depende da dose de 6-OHDA injetada e do local de injeção. Diferentes modelos utilizando 6-OHDA em roedores têm sido desenvolvidos com o passar dos anos, a fim de se obter um grau de neurodegeneração que varia do massivo ao moderado. A injeção de 6-OHDA na SNc ou no trato nigroestriatal leva a uma destruição imediata e virtualmente completa dos neurônios dopaminérgicos da SNc e, em menor grau, da área tegmentar ventral, resultando em depleção de 80-90% de DA estriatal. Essa metodologia produz um modelo de DP severa.

Nos anos 90, foi proposta uma variação do procedimento original, na qual a 6-OHDA é injetada no corpo estriado, onde os terminais dos neurônios da SNc estão localizados (Sauer & Oertel, 1994). Quando injetada no corpo estriado, a 6-OHDA produz uma degeneração retrógrada lenta do sistema nigroestriatal (Lee et al., 1996) que mimetiza melhor a progressão da DP, desta forma viabilizando a investigação de tratamentos neuroprotetores (Georgievska et al., 2002).

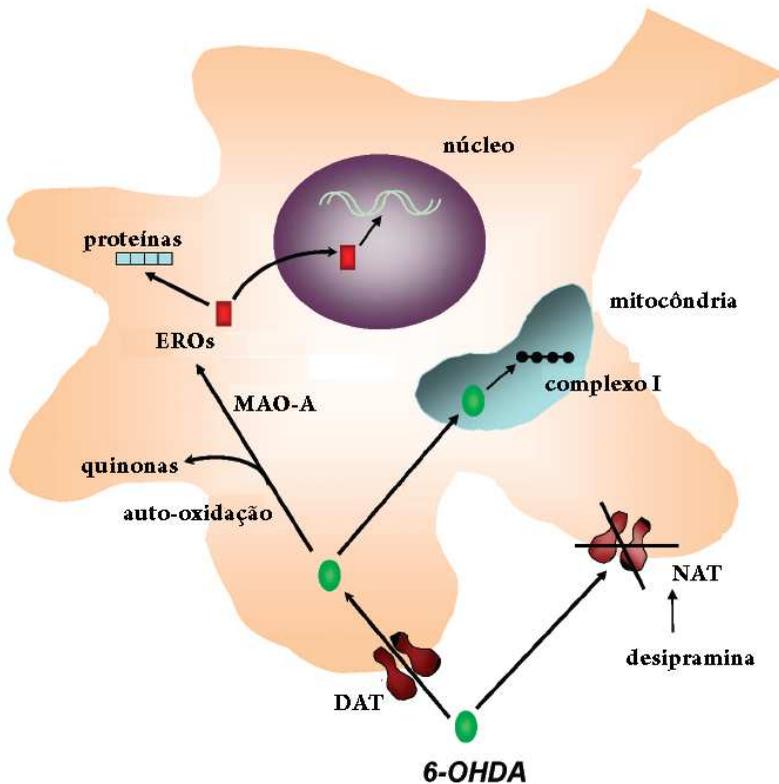


Figura 1. Mecanismos de neurotoxicidade induzida por 6-OHDA. EROs: espécies reativas do oxigênio; DAT: transportador de DA; NAT: transportador de NA. Modificado de Simola et al. (2007).

1.5. O sistema endocanabinóide e a DP

A descoberta do principal componente psicotrópico das preparações de *Cannabis sativa*, o composto lipofílico Δ^9 -tetraidrocanabinol (THC), por Gaoni & Mechoulam (1964), não foi acompanhada imediatamente pela caracterização molecular do receptor correspondente no cérebro de mamíferos. Foi somente após duas décadas que o primeiro receptor específico para o THC, denominado receptor canabinóide tipo-1 (CB₁), pôde ser identificado (Devane et al.,

1988) e em seguida clonado após uma triagem de diversos receptores órfãos acoplados à proteína G previamente caracterizados por sua afinidade pelo THC (Matsuda et al., 1990). O segundo receptor canabinóide identificado, denominado CB₂, demonstrou ser bastante diferente do CB₁, tanto em sua sequência de aminoácidos quanto em sua localização em tecidos de mamíferos (Munro et al., 1993). Enquanto o receptor CB₁ demonstrou ser extremamente abundante no cérebro, e por isso sugerido como responsável pela ação psicoativa do THC, o receptor CB₂ apresentava maiores níveis de expressão em células do sistema imunológico.

A clonagem dos receptores canabinóides abriu caminho para a identificação de seus ligantes endógenos, ou endocanabinóides. O primeiro endocanabinóide a ser descoberto foi a anandamida (*N*-araquidonil-etanolamina), por Devane e colaboradores (1992), logo seguido pela descoberta de que um metabólito endógeno previamente conhecido, o 2-araquidonil-glicerol (2-AG), também apresentava alta afinidade pelos receptores CB₁ e CB₂ (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995). Outros endocanabinóides (Figura 2) têm sido propostos durante os últimos vinte anos, incluindo o 2-araquidonil-glicerol éter (éter de noladin) (Hanus et al., 2001), a *N*-araquidonil-dopamina (NADA) (Bisogno et al., 2000; Huang et al., 2002) e a virodamina (Porter et al., 2002), porém sua atividade farmacológica e metabolismo ainda são pouco conhecidos. Desta forma, a anandamida e o 2-AG ainda são conhecidos como os principais endocanabinóides.

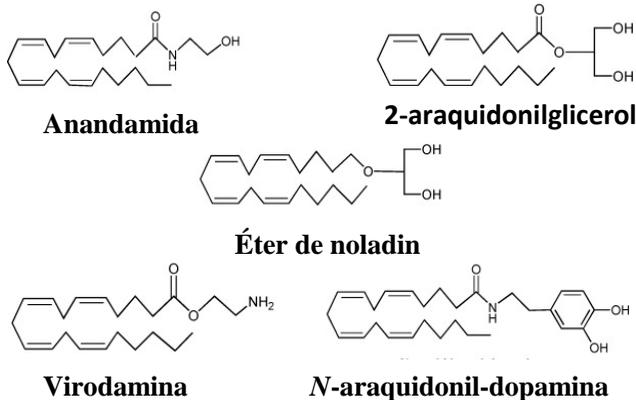


Figura 2. Estrutura química dos endocanabinóides. Modificado de Di Marzo (2009).

Atualmente, sabe-se que tanto o receptor CB_1 quanto o CB_2 estão muito mais amplamente distribuídos do que se acreditava originalmente. Por exemplo, o fígado, atualmente, é conhecido como uma fonte de níveis baixos, porém funcionalmente importantes, de CB_1 (Osei-Hyiaman et al., 2005). Quanto aos receptores CB_2 , embora sua existência no cérebro tenha sido inicialmente descartada, estudos mais recentes têm demonstrado sua expressão em baixas quantidades também neste órgão, não apenas durante condições de neuroinflamação (Ashton & Glass, 2007; Van Sickle et al., 2005; Onaivi et al., 2008). Dessa forma, a idéia original de que os receptores CB_1 possuíam um papel exclusivamente no cérebro e os receptores CB_2 no sistema imune evoluiu para o conceito de que ambos os tipos de receptores canabinóides são capazes de controlar tanto funções centrais e periféricas, incluindo desenvolvimento, transmissão e inflamação neuronal, funções cardiovascular, respiratória e reprodutiva, liberação e ação de hormônios, formação óssea e metabolismo energético, bem como funções celulares tais como arquitetura celular, proliferação, motilidade, adesão e apoptose (Guzmán et al., 2002; Di Marzo et al., 2004; Pertwee, 2005).

Na verdade, não apenas o nível de expressão dos receptores canabinóides, como também as concentrações teciduais dos principais endocanabinóides passam por mudanças significativas após estímulos fisiológicos e patológicos (Pertwee, 2005; Di Marzo, 2009). Essa “plasticidade” do sistema endocanabinóide é claramente observada no sistema nervoso central, onde participa de respostas adaptativas ao estresse crônico, excitotoxicidade, lesão neuronal, e neuroinflamação (Bisogno & Di Marzo, 2007), bem como mecanismos mais fisiológicos, como alterações sinápticas em processos cognitivos, motivacionais e afetivos e suas alterações patológicas (Moreira & Lutz, 2008). A biosíntese, ação e degradação dos endocanabinóides são ativadas “por demanda” e normalmente restritas temporal e espacialmente, graças à natureza lipofílica desses compostos, suas vias biosintéticas fosfolípido-dependentes e a sensibilidade ao Ca^{2+} de algumas de suas enzimas biosintéticas.

Nos últimos anos tem havido um interesse crescente na compreensão do papel dos receptores canabinóides na função neural e, mais especificamente, no complexo papel modulatório desempenhado pelos receptores CB_1 nos núcleos da base, estruturas cerebrais sabidamente afetadas na DP. Esses estudos têm contribuído para o

entendimento acerca da participação do receptor CB₁ na geração de sintomas da DP.

Os núcleos da base contêm a mais alta densidade de receptores CB₁ (Mailleux et al., 1992), bem como de anandamida e 2-araquidonilglicerol (Di Marzo et al., 2000) do cérebro. O globo pálido externo e a substância negra parte reticulada/globo pálido interno, que recebem eferentes estriatais, contêm altos níveis dos endocanabinóides anandamida e 2-AG (Bisogno et al., 1999; Di Marzo et al., 2000), bem como de CB₁ (Fernández-Ruiz & González, 2005). Os receptores CB₁ estão localizados presinápticamente nos terminais nervosos dos neurônios de projeção estriatal (Herkenham et al., 1991; Tsou et al., 1998; Hohmann and Herkenham, 2000; Fusco et al., 2004), o que explica os altos níveis de RNAm deste subtipo de receptor encontrados no caudado-putâmen (Mailleux & Vanderhaeghen, 1992). De fato, os receptores CB₁ estão localizados nos neurônios estriatais que se projetam para a substância negra parte reticulada/globo pálido interno (a chamada via estriatal eferente “direta”) e para o globo pálido externo (a chamada via estriatal eferente “indireta”). Ambos os grupos de neurônios utilizam ácido γ -aminobutírico (GABA) como neurotransmissor (Hohmann and Herkenham, 2000; Julián et al., 2003). Os receptores CB₁ também estão presentes em pré-sinapses de neurônios glutamatérgicos nos circuitos dos núcleos da base, incluindo os aferentes ao corpo estriado que se originam de estruturas corticais (Köfalvi et al., 2005; Uchigashima et al., 2007). Por outro lado, os neurônios dopaminérgicos nigroestriatais não contêm receptores CB₁, embora contenham o receptor vaniloide TRPV1 (Mezey et al., 2000; de Lago et al., 2004; Lastres-Becker et al., 2005; Tzavara et al., 2006), um receptor funcionalmente relacionado ao sistema canabinóide e que também está presente em diferentes estruturas dos núcleos da base, como o corpo estriado (Maccarrone et al., 2008) e globo pálido (Cristino et al., 2006). Ver a Figura 3.

A presença de receptores CB₁ em sinapses GABAérgicas e glutamatérgicas nos núcleos da base, bem como a presença de receptores TRPV1 nos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais permitem aos endocanabinóides controlar diretamente a função desses três neurotransmissores. Além disso, a localização pré-sináptica desses receptores sugere que os endocanabinóides controlam principalmente eventos pré-sinápticos, tais como a síntese, liberação ou recaptação desses neurotransmissores (Fernández-Ruiz, 2009). Ver a Figura 4.

Estudos com indivíduos parkinsonianos (Lastres-Becker et al., 2001), bem como em modelos animais da DP (Di Marzo et al., 2000;

Lastres-Becker et al., 2001; Pisani et al., 2005), têm demonstrado a existência de uma hiperatividade da neurotransmissão canabinóide. Dessa forma, tem sido proposto que antagonistas dos receptores canabinóides CB₁ poderiam apresentar ação antiparkinsoniana, podendo ser úteis no alívio da hipocinesia e como adjuvantes na terapia com levodopa. Em concordância com esta hipótese, um estudo prévio demonstrou que o antagonista seletivo do receptor canabinóide CB₁ SR141716A potencializa a ação antiparkinsoniana de agonistas do receptor dopaminérgico D2 em modelos experimentais (Di Marzo et al., 2000), enquanto que agonistas CB₁ reduzem esta resposta antiparkinsoniana (Maneuf et al., 1997).

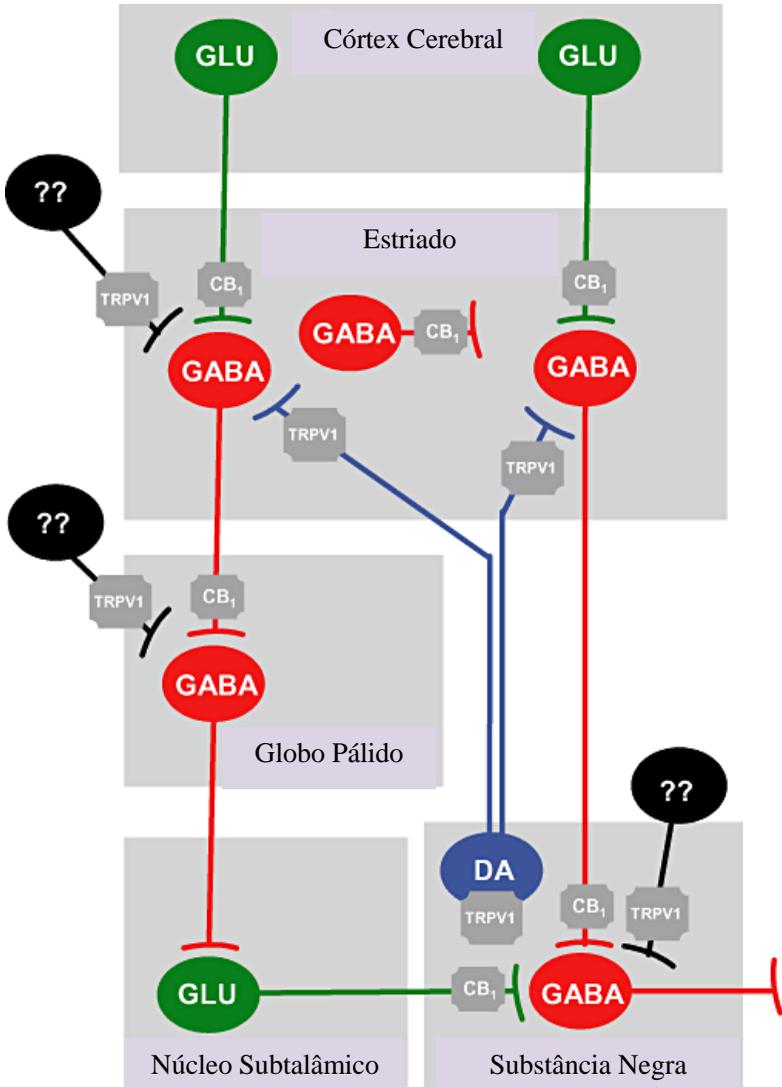


Figura 3. Localização dos receptores CB₁ e TRPV1 em subpopulações neuronais específicas nos circuitos dos núcleos da base. As vias regulatórias estão indicadas em azul, enquanto que as vias inibitórias e excitatórias estão indicadas em vermelho e verde, respectivamente. Neurônios desconhecidos estão representados em preto. GLU, glutamato. Modificado de Fernández-Ruiz (2009).

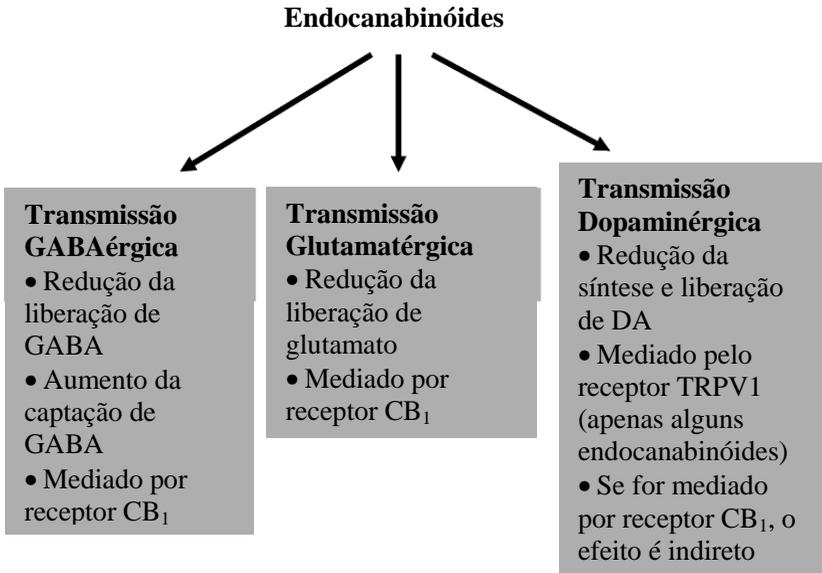


Figura 4. Esquema dos efeitos modulatórios dos endocanabinóides e seus receptores na atividade dos principais neurotransmissores que operam nos circuitos dos núcleos da base. Modificado de Fernández-Ruiz (2009).

Assim, tendo em vista as considerações mencionadas anteriormente ressaltando a relevância do desenvolvimento de modelos que reproduzam as alterações pré-motoras da DP, bem como as evidências implicando o envolvimento do sistema canabinóide nas alterações verificadas na DP, o presente estudo propôs investigar as seguintes hipóteses:

1. A degeneração dopaminérgica nigroestriatal parcial, em um grau insuficiente para induzir alterações motoras, seria capaz de causar alterações emocionais e cognitivas similares às que ocorrem na fase inicial da DP?

2. O antagonismo do receptor CB₁, proposto para a redução das alterações motoras na DP, teria um papel benéfico nos prejuízos emocionais e cognitivos em um modelo animal da doença?

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Para testar as hipóteses propostas, o presente estudo apresentou como objetivo geral investigar os efeitos da administração intraestriatal de 6-OHDA e de SR141716A em testes comportamentais que avaliam as funções emocionais e cognitivas de ratos. Para alcançar o objetivo geral proposto, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar o efeito da administração intraestriatal de 6-OHDA na reatividade emocional de ratos através do teste do consumo de sacarose e do nado forçado.

2. Estudar o efeito da administração intraestriatal de 6-OHDA nos níveis de ansiedade de ratos através do teste do labirinto em cruz elevado.

3. Avaliar o efeito da administração intraestriatal de 6-OHDA na memória de procedimento e social de ratos através da versão com pista do labirinto aquático de Morris e do teste do reconhecimento social, respectivamente.

4. Investigar a influência da administração intraestriatal de 6-OHDA na função olfatória e locomoção de ratos através do teste da discriminação olfatória e do campo aberto, respectivamente.

5. Investigar o efeito da administração intraestriatal de 6-OHDA nos neurônios dopaminérgicos da substância negra e corpo estriado de ratos através de imunistoquímica para tirosina-hidroxilase (TH).

6. Avaliar a influência da administração intraestriatal de 6-OHDA sobre as concentrações de DA e seus metabólitos, além de NA e 5-HT no corpo estriado, córtex pré-frontal e hipocampo de ratos através de Cromatografia Líquida de Alta Pressão com Detecção Eletroquímica (HPLC-ED).

7. Verificar o efeito da administração de SR141716A na reatividade emocional de ratos tratados com 6-OHDA através do teste do nado forçado.

8. Avaliar a influência da administração de SR141716A na memória social de ratos tratados com 6-OHDA através do teste do reconhecimento social.

9. Caracterizar o efeito da administração de SR141716A sobre as concentrações de DA e seus metabólitos, além de NA e 5-HT no corpo estriado, córtex pré-frontal e hipocampo de ratos tratados com 6-OHDA através de HPLC-ED.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com idade de três meses, além de ratos com idade de um mês para o teste do reconhecimento social, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em caixas de moradia, em grupos de 6-7, em ambiente com temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e ciclo de claro/escuro (12/12 h) controlados automaticamente. Os animais tiveram livre acesso a alimentação e água até o momento do experimento. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA/UFSC).

3.2 Drogas e Soluções

Nos experimentos realizados, as seguintes drogas foram utilizadas: 6-OHDA (dissolvida em solução salina com ácido ascórbico 0,1%, Sigma, EUA), SR141716A (dissolvido em solução salina com DMSO 10% e Tween 80 0,1%, Sanofi-Aventis, França), desipramina (dissolvida em solução salina, Sigma, EUA), xilazina (10 mg/ml; Rompun®, Bayer, Brasil) e cetamina (58 mg/ml; Dopalen®, Agribrands, Brasil).

3.3 Procedimentos Experimentais

3.3.1 Experimento 1: Efeitos da administração de 6-OHDA nas alterações comportamentais precoces em ratos.

Os animais foram separados em dois grupos (n=10). Um grupo recebeu 6-OHDA e o outro, veículo (grupo Sham), sendo que animais dos dois grupos foram mantidos nas mesmas caixas de moradia. Para a avaliação de alterações comportamentais precoces, os testes foram realizados após o intervalo de uma semana após a cirurgia estereotáxica. Os testes em que não foram observados prejuízos nos animais tratados com 6-OHDA foram repetidos em outros grupos de animais no intervalo de três semanas após a administração da droga, de forma a comparar o curso temporal das alterações comportamentais em relação às modificações neuroquímicas. Após o término dos testes comportamentais, os ratos foram decapitados, os cérebros removidos e

as concentrações de DA e seus metabólitos, além de NA e 5-HT, foram analisadas no corpo estriado, córtex pré-frontal e hipocampo através de HPLC-ED. A Figura 5 mostra o cronograma de realização do Experimento 1.

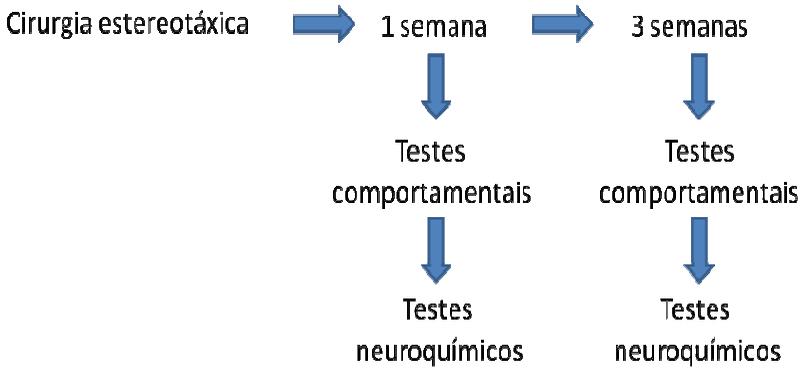


Figura 5. Cronograma de realização do Experimento 1.

3.3.2 Experimento 2: Efeitos da administração de SR141716A nas alterações comportamentais precoces em ratos tratados com 6-OHDA.

Os efeitos da administração de SR141716A foram avaliados no teste do nado forçado e no teste do reconhecimento social.

Para o teste do nado forçado os animais foram separados em cinco grupos (n=10): Sham; 6-OHDA; 6-OHDA+SR (0,5 mg/kg); 6-OHDA+SR (1 mg/kg) e 6-OHDA+SR (3 mg/kg). Para o teste do reconhecimento social os animais foram separados em quatro grupos (n=10): Sham; 6-OHDA; 6-OHDA+SR (0,5 mg/kg) e 6-OHDA+SR (1 mg/kg). O grupo Sham recebeu veículo e os grupos restantes receberam 6-OHDA, sendo que os animais que receberam veículo ou 6-OHDA foram mantidos na mesma caixa de moradia. SR141716A ou veículo foram administrados intraperitonealmente (i.p.) 30 min antes da segunda sessão do teste do nado forçado ou da primeira sessão no teste do reconhecimento social. Os testes foram realizados após o mesmo intervalo em que foram observadas alterações no Experimento 1. Após o término dos testes comportamentais, os ratos foram decapitados, os cérebros removidos e as concentrações de DA e seus metabólitos, além

de NA e 5-HT, foram analisadas no corpo estriado, córtex pré-frontal e hipocampo através de HPLC-ED. A Figura 6 mostra o cronograma de realização do Experimento 2.

3.4 Cirurgia Estereotáxica

Cada animal foi anestesiado com uma injeção i.p. de 1 ml/kg de uma solução combinada (1:2) de xilazina e cetamina. Uma vez verificada a perda total dos reflexos, procedeu-se a tricotomia da parte superior da cabeça do animal.

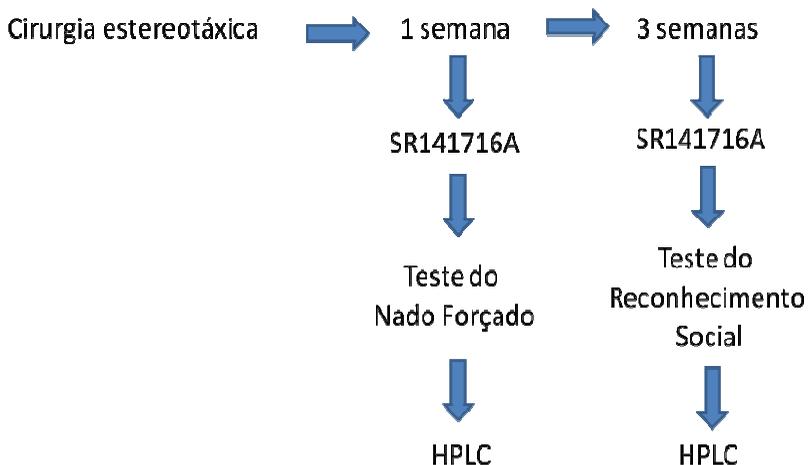


Figura 6. Cronograma de realização do Experimento 2.

Após a adaptação do animal ao aparelho estereotáxico, realizou-se a assepsia da área desejada com álcool iodado. Injetou-se então uma solução de lidocaína com adrenalina por via subcutânea, com o objetivo de obter efeito anestésico local e vasoconstritor. Em seguida, realizou-se uma incisão longitudinal no escalpo para a exposição da calota craniana permitindo a visualização da sutura lambdóide. O crânio foi posicionado no aparelho estereotáxico de forma que o bregma e o lambda ficassem situados em um mesmo plano horizontal.

Foi feita a administração de 6-OHDA (12 µg por injeção) ou veículo, em um volume de 2,5 µl à velocidade de 0,5 µl/min durante 5 min bilateralmente na porção ventrolateral do corpo estriado dorsal. A

infusão estereotáxica foi realizada de acordo com as coordenadas do atlas de Paxinos & Watson (2005): AP: 1,1 mm, ML: $\pm 3,2$ mm e DV: - 7,2 mm em relação ao bregma e à superfície externa do osso craniano, utilizando uma micro-seringa Hamilton de 10 μ l conectada a um tubo de polietileno (PE 10; Clay Adams, EUA) e este conectado a uma agulha injetora (0,3 mm de diâmetro) confeccionada a partir de agulhas odontológicas.

Previamente ao procedimento de infusão, o tubo de polietileno e a micro-seringa Hamilton foram preenchidos com água destilada e uma bolha, formada através da aspiração de ar, foi feita entre a água destilada e a droga. Dessa forma, durante a infusão, o movimento da bolha que era visível através do tubo de polietileno indicava o fluxo da droga administrada.

Em seguida, a agulha foi introduzida no corpo estriado através de uma cânula-guia confeccionada a partir de uma agulha descartável de 25 x 7 mm e a administração da droga foi feita com o auxílio de uma bomba de infusão. Após a injeção, a agulha injetora permaneceu no local por mais dois minutos, de forma a facilitar a difusão da solução. Em seguida à infusão bilateral, foi feita a sutura do escalpo e o animal retirado do aparelho estereotáxico. A Figura 7 ilustra o procedimento de administração de 6-OHDA.

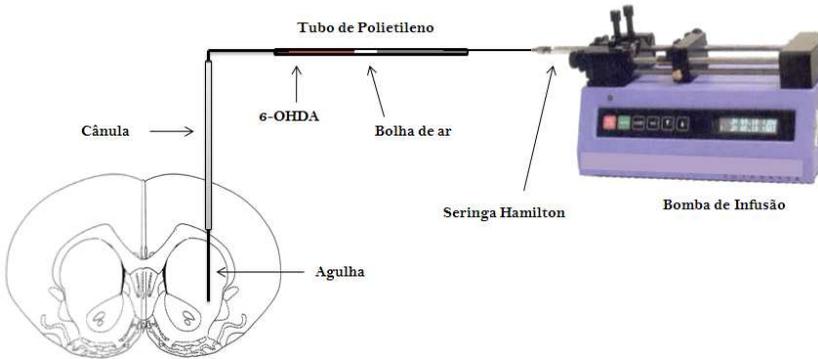


Figura 7. Esquema representativo da administração de 6-OHDA.

3.5 Testes Comportamentais

3.5.1 Testes de avaliação de parâmetros emocionais

3.5.1.1 Teste do Consumo de Sacarose

O consumo de sacarose é frequentemente utilizado como uma medida de anedonia em roedores (Craft & DeVries, 2006). Após uma semana de recuperação da cirurgia, os animais foram transferidos a caixas de moradia individuais com acesso livre a alimentação. Cada rato tinha acesso a duas garrafas com água durante a fase de 24 h de habituação, a fim de adaptar os animais à ingestão de líquidos de duas garrafas. Após a fase de adaptação a água de uma das garrafas foi substituída por solução de sacarose a 0,8%, conforme descrito previamente (Slattery et al., 2007) e 24 h depois as garrafas foram invertidas de sua posição inicial de forma a evitar vieses relacionados à posição das garrafas (Figura 8). O consumo de água e solução de sacarose foi estimado nos grupos 6-OHDA e Sham através da pesagem das garrafas.

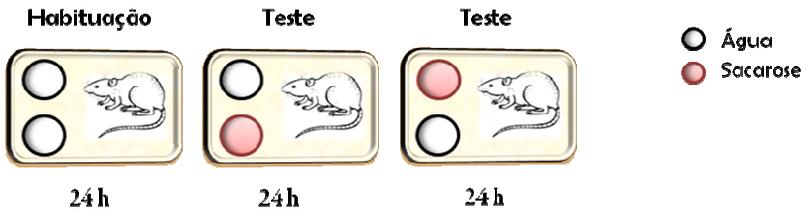


Figura 8. Esquema representativo do teste do consumo de sacarose.

3.5.1.2 Teste do Nado Forçado

O procedimento foi descrito previamente por Porsolt et al. (1978). Cerca de uma semana após a cirurgia, os ratos foram habituados à sala experimental por 30 min antes do teste. Os ratos foram colocados em cilindros individuais (40 cm de altura e 17 cm de diâmetro) contendo água (profundidade da água: 30 cm; temperatura: 25 ± 1 °C). Foram realizadas duas sessões (uma sessão inicial de 15 min seguida 24 h depois por uma sessão de 5 min). O tempo total de imobilidade foi registrado manualmente durante os 5 min da segunda sessão. A

imobilidade foi definida como flutuação sem movimento, exceto aqueles necessários para manter a cabeça do rato acima da água. A água do interior dos cilindros era substituída após cada sessão experimental. A Figura 9 ilustra o teste do nado forçado.



Figura 9. Ilustração representativa do teste do nado forçado (www.inec-usp.org).

3.5.1.3 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz elevado consistiu de dois braços abertos (50 x 10 x 0,75 cm) e dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm), arranjados de forma que os braços idênticos ficassem dispostos em posição oposta entre si. Os braços emergiam de uma plataforma central (10 x 10 cm) e o aparato ficava suspenso a uma altura de 50 cm acima do nível do chão (Figura 10).

Os testes foram realizados sob condições de iluminação reduzida. Os ratos foram colocados na plataforma central e submetidos a uma sessão experimental de 5 min. Após esse período o labirinto era limpo cuidadosamente com papel toalha e álcool 5%.

Os parâmetros comportamentais avaliados no labirinto em cruz elevado foram:

- Frequência de entradas dos animais com as quatro patas nos braços abertos e nos braços fechados do labirinto.

- Tempo de permanência dos animais com as quatro patas nos braços abertos e nos braços fechados do labirinto.



Figura 10. Ilustração representativa do teste do labirinto em cruz elevado (www.jefferson.edu/neurosurgery/research/cocainewithdrawal.cfm).

Estas medidas tradicionais foram usadas para se calcular a porcentagem do número de entradas nos braços abertos em relação ao número total de entradas nos quatro braços e a porcentagem de tempo nos braços abertos durante os 5 min de exposição ao labirinto, medidas inversamente relacionadas ao nível de ansiedade dos animais.

Uma vez que efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos podem ser confundidos com alterações na atividade motora, a locomoção dos ratos também foi avaliada com base no número de entradas nos braços fechados e número de entradas total, parâmetros considerados como indicadores da atividade locomotora de roedores no labirinto em cruz elevado (Dawson & Tricklebank, 1995).

3.5.2 Testes de avaliação do desempenho cognitivo

3.5.2.1 Teste do Labirinto Aquático de Morris – Versão com Pista

O teste do Labirinto aquático de Morris foi realizado em um tanque circular similar ao descrito por Morris et al. (1982), confeccionado em fibra e pintado de preto, com 1,7 m de diâmetro interno, 0,8 m de altura e preenchido com água a uma profundidade de 0,6 m, mantida a 25 °C. Uma plataforma (10 × 10 cm) confeccionada em plexiglas transparente foi mantida submersa 1–1,5 cm abaixo da superfície da água. Os pontos de partida dos animais foram marcados na face externa do tanque como norte, sul, leste e oeste, dividindo o tanque em quatro quadrantes imaginários: nordeste, sudeste, sudoeste e noroeste. O aparato ficava localizado em uma sala sob iluminação incandescente indireta.

Os animais foram submetidos à versão com pista do labirinto aquático de Morris conforme descrito previamente por Miyoshi et al. (2002) e reproduzido em nosso laboratório (Prediger et al., 2006). O procedimento experimental consistiu de quatro dias de treino, com quatro sessões consecutivas por dia. Antes de cada seção a plataforma era disposta no centro de um dos quadrantes imaginários. A posição da plataforma era sinalizada através de uma bola de 7 cm de diâmetro anexada ao topo, a qual ficava visível sobre a superfície da água. Em cada seção os animais eram colocados no interior do tanque em um dos quatro vértices dos quadrantes imaginários com as faces voltadas para a borda. A posição inicial dos animais e da plataforma variava entre as seções de forma pseudo-randômica. Se o rato não encontrasse a plataforma durante o período de 60 s, era gentilmente conduzido à mesma. O animal então permanecia na plataforma por 10 s e era removido do tanque por 20 s antes de ser colocado na próxima posição inicial randômica. Foram registrados os tempos de latência para encontrar a plataforma a partir das posições iniciais (Figura 11).

3.5.2.2 Teste do Reconhecimento Social

A memória social de curta duração foi avaliada através do teste do reconhecimento social conforme descrito por Dantzer et al. (1987) e padronizado em nosso laboratório (Prediger & Takahashi, 2003). Ratos adultos foram mantidos isolados em caixas plásticas (42 × 34 × 17 cm) e foram utilizados após três dias de habituação ao novo ambiente. O teste

foi realizado em uma sala de observação, à qual os ratos foram habituados por 30 min antes do início do experimento. Um grupo de ratos jovens (idade de um mês) foi isolado em caixas individuais por 30 min antes do início do experimento. O teste consistiu de duas apresentações sucessivas (5 min cada) em que um rato jovem foi colocado na caixa de um rato adulto e o tempo gasto pelo adulto investigando o jovem (cheirando, lambendo, se aproximando, etc.) foi registrado. Ao fim da primeira apresentação, o jovem foi removido e mantido em uma caixa individual durante o período de 30 min, sendo re-exposto ao adulto após esse intervalo. Neste tipo de teste, se o intervalo entre as duas apresentações for menor que 40 min, o rato adulto reconhece o rato jovem, reduzindo o tempo de investigação social durante a segunda apresentação (Figura 12).

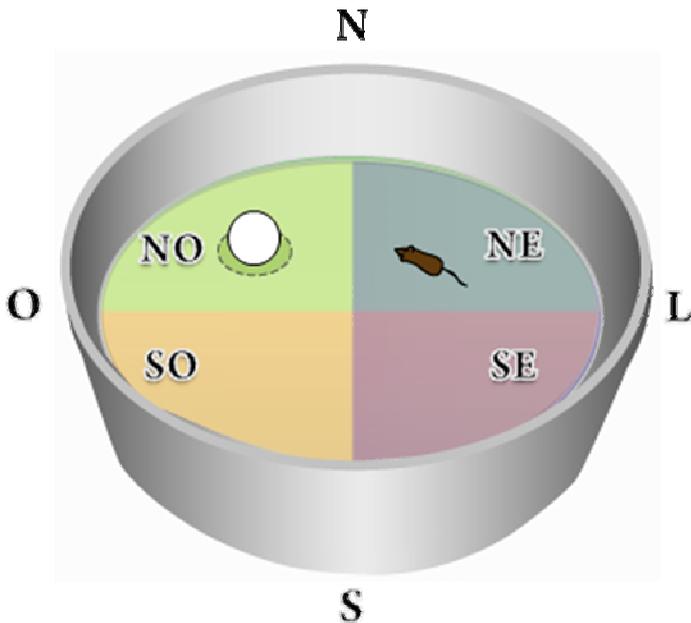


Figura 11. Ilustração representativa da versão com pista do teste do labirinto aquático de Morris (adaptado de www.majorityrights.com/index.php/weblog/C30/).

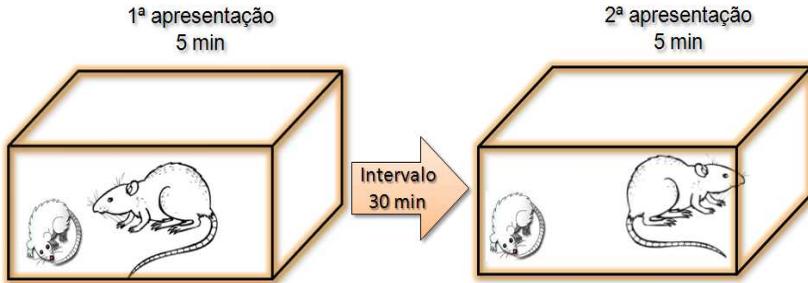


Figura 12. Ilustração representativa do teste do reconhecimento social.

3.5.3 Teste de avaliação da função olfatória

3.5.3.1 Teste da Discriminação Olfatória

A fim de descartar possíveis alterações na capacidade discriminativa olfatória dos animais que pudessem interferir no teste do reconhecimento social, foi realizado o teste da discriminação olfatória, procedimento adaptado de Dluzen & Kefalas (1996) e padronizado em nosso laboratório (Prediger et al., 2006). Previamente, os animais foram mantidos em caixas isoladas durante 48 h. O teste consistiu em colocar cada rato durante 5 min em uma caixa, a qual foi dividida em dois compartimentos idênticos ($30 \times 30 \times 20$ cm) separados por uma porta aberta, de forma que o animal poderia escolher entre um compartimento contendo serragem nova e outro com serragem retirada da caixa previamente ocupada pelo animal (compartimento familiar) por 48 h antes do teste. Cada animal foi colocado inicialmente no centro do compartimento não-familiar e o tempo gasto pelo rato em cada compartimento (familiar x não familiar) foi registrado. Em geral, ratos machos adultos são capazes de discriminar entre o compartimento familiar e o não familiar, ficando muito mais tempo no compartimento familiar, uma vez que eles têm preferência por seu próprio odor em relação a um odor neutro (Figura 13).

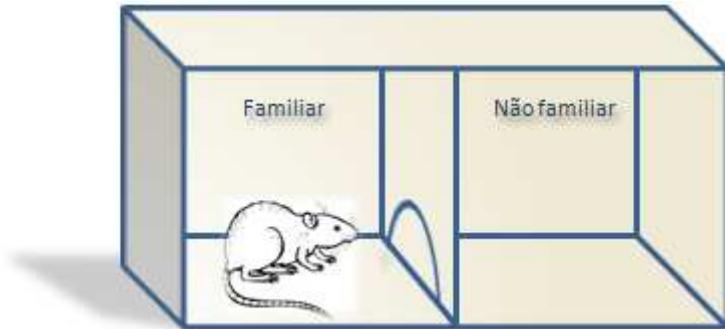


Figura 13. Ilustração representativa do teste da discriminação olfatória.

3.5.4 Teste de avaliação da atividade motora

3.5.4.1 Teste do Campo Aberto

Para avaliar possíveis alterações motoras induzidas pela administração de 6-OHDA, os animais foram testados durante 5 min no campo aberto uma e três semanas após a cirurgia. O aparato, feito de madeira e fórmica, era formado por uma caixa de cor branca (100 × 100 cm), com 40 cm de altura, dividido por linhas pretas em 25 quadrantes de 20 x 20 cm. Durante os experimentos, cada rato foi colocado no centro do campo aberto, sendo registrado o número de quadrantes cruzados e o número de atos de levantar (Figura 14).

3.6 Análises Neuroquímicas

3.6.1 Imunoistoquímica para TH

Uma e três semanas após o tratamento com 6-OHDA, foi realizada perfusão intracardíaca nos animais, inicialmente com solução salina e em seguida com solução fixadora de formaldeído 4% em 0,1 M de tampão fosfato (pH 7,4). Os cérebros foram removidos e mantidos durante a noite na mesma solução. Foram realizadas secções cerebrais (3 μ M) do corpo estriado e mesencéfalo. Para a imunoistoquímica foi utilizado o anticorpo monoclonal de camundongo anti-TH (1:200, catálogo MAB318; Millipore, Chemicon International, Billerica, MA,

EUA). A recuperação do antígeno por alta temperatura foi realizada através da imersão das lâminas com as secções em água a 95-98 °C em tampão citrato trissódico 10 mM pH 6,0, por 45 min. A ligação não específica foi bloqueada através da incubação das lâminas durante 1 h com soro normal de cabra diluído em PBS. Após a incubação durante a noite a 4 °C com anticorpos primários, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo secundário Envision plus (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA) pronto para uso, por 1 h a temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas com PBS e a visualização foi realizada com o uso de DAB (3,3'-diaminobenzidina) (Dako Cytomation) em solução cromógena e as lâminas coradas com hematoxilina de Harris. As secções cerebrais dos grupos Sham e 6-OHDA foram processadas nas mesmas condições. As imagens digitais foram feitas através de uma câmera digital Sight DS-5M-L1 conectada a um microscópio de luz Eclipse - 80i (Nikon, Melville, NY, EUA). Os parâmetros para aquisição das imagens foram idênticos para as secções dos grupos Sham e 6-OHDA. Foram obtidas três imagens da substância negra e do corpo estriado para cada rato. As imagens digitalizadas foram transferidas para um computador e a intensidade média do pixel da marcação para TH foi calculada utilizando o software NIH ImageJ 1.36b (NIH, Bethesda, MD, EUA). Foi calculada a média dos valores obtidos nas imagens de cada região para cada rato. Os resultados estão demonstrados como porcentagem de área com marcação para TH.

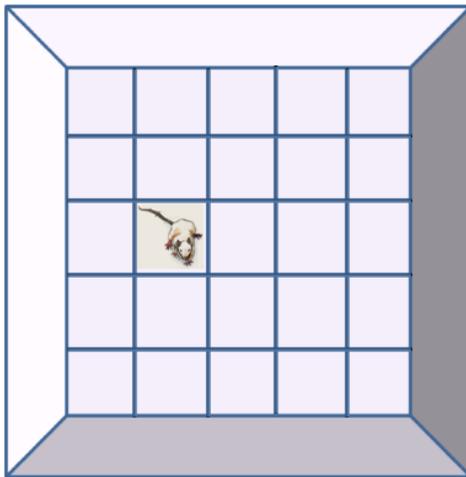


Figura 14. Ilustração representativa do teste do campo aberto.

3.6.2 Determinação Dos Níveis Cerebrais de DA, NA e 5-HT por HPLC

Para a determinação dos níveis de DA, ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), NA e 5-HT no cérebro, os ratos foram sacrificados por decapitação uma e três semanas após a administração de 6-OHDA, ao término dos testes comportamentais. Os cérebros foram removidos imediatamente e as estruturas corpo estriado, córtex pré-frontal e hipocampo foram dissecadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -70 °C. As concentrações de DA, DOPAC, HVA, NA e 5-HT no corpo estriado, córtex pré-frontal e hipocampo foram analisadas por HPLC-ED de fase reversa. O sistema consistiu de uma coluna de fase reversa Synergi Fusion-RP C-18 (150 x 4,6 mm de diâmetro interno, diâmetro da partícula 4 µm) equipada com uma pré-coluna de 4 x 3 µm (SecurityGuard Cartridges Fusion-RP); um detector eletroquímico (ESA Coulochem III) com o eletrodo ajustado a 350 mV e uma bomba LC-20AT (Shimadzu) equipada com um injetor manual Rheodyne 7725. A coluna foi mantida no interior de um forno regulador de temperatura (25°C - Shimadzu). Os potenciais de oxidação foram ajustados a 100 mV para o primeiro eletrodo e a 450 mV para o segundo eletrodo. DA, DOPAC, HVA, NA e 5-HT foram detectados no segundo eletrodo. As amostras de tecido foram homogeneizadas por uma caneta sonicadora em 0,1 M de ácido perclórico contendo metabisulfito de sódio a 0,02% e padrão interno. Após centrifugação a 10000 G durante 30 min, 4°C, 20 µl do supernadante foi injetado no cromatógrafo. A fase móvel, utilizada a uma taxa de 1 ml/min, possuía a seguinte composição: 20 g de ácido cítrico monohidratado (Merck), 200 mg de ácido octano-1-sulfônico (Merck), 40 mg de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Sigma), 900 ml de água. O pH da solução tampão foi ajustado para 4,0 e em seguida filtrado através de um filtro de 0,45 µm. Metanol (Merck) foi adicionado de forma a obter uma composição final de metanol a 10% (v/v). As áreas de pico dos padrões externos foram utilizadas para quantificar os picos das amostras.

3.6.3 Análise dos Dados e Estatística

A análise estatística foi realizada através do software GraphPad Prisma (Versão 5). Todos os dados foram expressos como média ± erro padrão (EP). Para os testes do consumo de sacarose, nado forçado,

labirinto em cruz elevado e análises de HPLC do Experimento 1, bem como para as análises de HPLC do Experimento 2, a análise estatística dos resultados foi feita utilizando-se teste *t* de Student. Para o teste do reconhecimento social no Experimento 1 e teste do nado forçado no Experimento 2 a análise estatística foi feita por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida por teste post-hoc de Bonferroni. As latências de escape no labirinto aquático de Morris para as sessões individuais (analisadas por dia) e as análises de imunoistoquímica do Experimento 1, bem como os dados do teste do reconhecimento social do Experimento 2 foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida por teste post-hoc de Bonferroni. O valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

4 RESULTADOS

4.1 Experimento 1

4.1.1 Efeitos da administração de 6-OHDA nas alterações comportamentais precoces em ratos.

4.1.1.1 Efeitos da administração intraestriatal de 6-OHDA nos parâmetros emocionais

4.1.1.1.1 Teste do Consumo de Sacarose

Uma semana após a cirurgia, os animais foram submetidos ao teste do consumo de sacarose. Durante a fase inicial de adaptação, na qual os ratos foram habituados a beber das duas garrafas (ambas preenchidas com água), não foram observadas diferenças significativas no consumo entre os ratos dos grupos Sham e 6-OHDA. A Figura 15 ilustra a média do consumo de água e solução de sacarose durante 48 h uma semana após a cirurgia. Ambos os grupos nitidamente consumiram mais sacarose do que água. A comparação por teste *t* de Student mostrou que os ratos do grupo Sham consumiram significativamente mais sacarose do que os do grupo 6-OHDA [$F(1,13) = 1,29, P < 0,05$]. Além disso, não foram observadas diferenças no consumo total de água durante esse período.

4.1.1.1.2 Teste do Nado Forçado

O teste do nado forçado foi utilizado para monitorar o comportamento tipo-depressivo dos animais. Uma semana após a cirurgia, o teste *t* de Student indicou que o tratamento com 6-OHDA aumentou significativamente o tempo de imobilidade [$F(1,35) = 10,7, P < 0,001$] (Figura 16).

4.1.1.1.3 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

Três semanas após a cirurgia, a administração de 6-OHDA reduziu significativamente as porcentagens de entrada nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado [$F(1,12) = 5,28, P < 0,01$] (Figura 17A). Mais ainda, os ratos tratados com 6-OHDA apresentaram

uma tendência de redução no tempo gasto nos braços abertos ($P=0,07$) (Figura 17B). O tratamento com 6-OHDA não alterou o número de entradas nos braços fechados e totais, parâmetros considerados como uma medida da atividade motora dos animais (Figuras 17C e D, respectivamente).

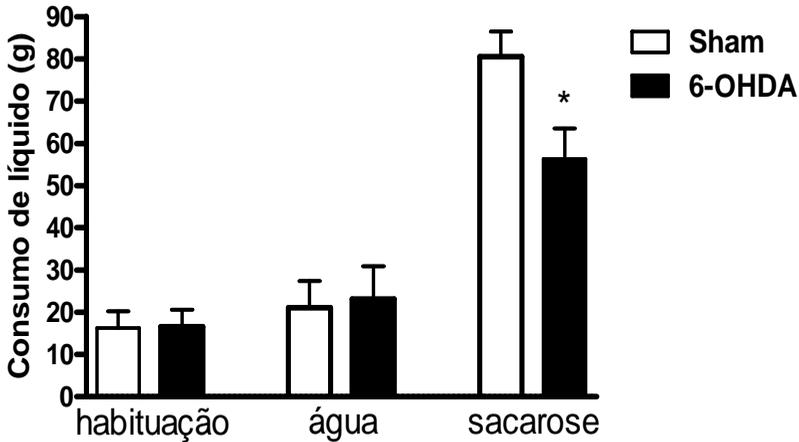


Figura 15. Efeitos da administração de 6-OHDA no teste do consumo de sacarose. Os animais tratados com 6-OHDA consumiram menos solução de sacarose do que os do grupo Sham. Os valores são expressos como média \pm EP. * $P<0,05$ (em comparação com o grupo Sham, teste t de Student).

4.1.1.2 Efeitos da administração de 6-OHDA no desempenho cognitivo

4.1.1.2.1 Teste do Labirinto Aquático de Morris – Versão com Pista

Três semanas após a administração de 6-OHDA, os ratos foram avaliados na versão com pista do labirinto aquático de Morris. Neste período, os animais não apresentaram alterações motoras evidentes que pudessem confundir a interpretação dos dados nesse teste de memória (Tabela 2). Os efeitos da lesão estriatal no desempenho dos ratos na versão com pista do labirinto aquático estão apresentados na Figura 18.

Ambos os grupos foram capazes de aprender a tarefa, uma vez que a média da latência de escape melhorou em relação aos dias de treino. Entretanto, os animais tratados com 6-OHDA gastaram mais tempo para encontrar a plataforma. A ANOVA de duas vias (tratamento x medidas repetidas) revelou um efeito significativo para o fator tratamento [$F(1,13) = 25,91$, $P < 0,0001$] e medidas repetidas [$F(1,13) = 83$, $P < 0,0001$], porém não para a interação entre essas variáveis [$F(1,13) = 0,76$, $P > 0,05$]. Análise subsequente através do teste de Bonferroni indicou diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos 6-OHDA e Sham do primeiro ao terceiro dias do teste.

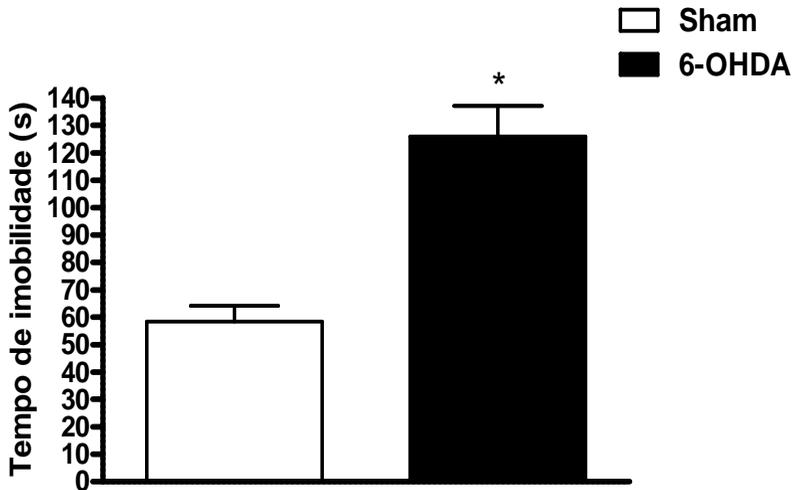


Figura 16. Efeitos da administração de 6-OHDA no teste do nado forçado. O tratamento com 6-OHDA aumentou o tempo de imobilidade. Os valores são expressos como média \pm EP. * $P < 0,05$ (em comparação com o grupo Sham, teste t de Student).

4.1.1.2.2 Teste do Reconhecimento Social

A Figura 19 indica o efeito da injeção de 6-OHDA na memória de reconhecimento social de ratos. Três semanas após a cirurgia, a ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni indicou que os ratos Sham gastaram menos tempo investigando o rato jovem na

segunda apresentação do que na primeira. Por outro lado, os ratos tratados com 6-OHDA empregaram tanto tempo investigando o rato jovem na segunda apresentação quanto na primeira [$F(1,15) = 4,43$, $P < 0,05$], refletindo um prejuízo evidente na capacidade de reconhecimento dos animais.

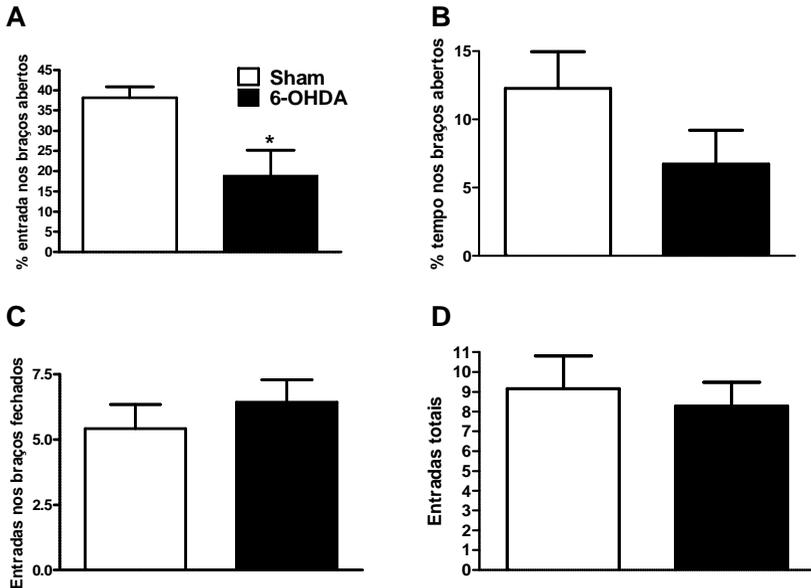


Figura 17. Efeito da administração de 6-OHDA nos parâmetros de atividades espaço-temporais no teste do labirinto em cruz elevado. O tratamento com 6-OHDA reduziu a porcentagem de entrada nos braços abertos. (A) % entrada nos braços abertos (B) % tempo nos braços abertos (C) Entradas nos braços fechados (D) Entradas totais. Os valores são expressos como média ± EP. * $P < 0,05$ (em comparação com o grupo Sham, teste t de Student).

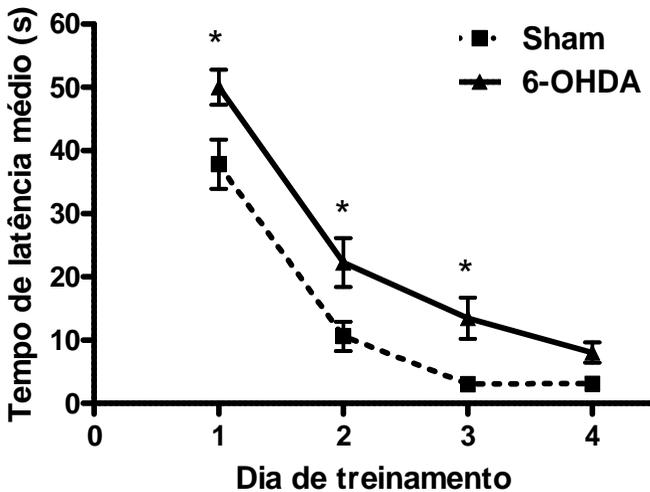


Figura 18. Efeitos da administração de 6-OHDA na versão com pista do teste do labirinto aquático. Os animais tratados com 6-OHDA gastaram mais tempo para encontrar a plataforma. Os valores são expressos como média \pm EP para encontrar a plataforma submersa durante os quatro dias de treino, com quatro sessões consecutivas por dia. As latências de escape para as sessões individuais foram analisadas por dia. $*P < 0,05$ (em comparação com o grupo Sham, teste de Bonferroni após ANOVA de duas vias).

4.1.1.3 Efeitos da administração intraestriatal de 6-OHDA na função olfatória

4.1.1.3.1 Teste da Discriminação Olfatória

A fim de descartar um possível efeito deletério da 6-OHDA na capacidade de discriminação olfatória dos ratos que pudesse confundir a análise dos prejuízos cognitivos observados no teste do reconhecimento social, o teste da discriminação olfatória foi realizado três semanas após a cirurgia. Os resultados estão ilustrados na Tabela 1. O teste *t* de Student indicou que três semanas após a cirurgia ambos os grupos foram capazes de discriminar entre os compartimentos familiar e não-familiar,

ficando muito mais tempo no ambiente familiar do que no compartimento não-familiar.

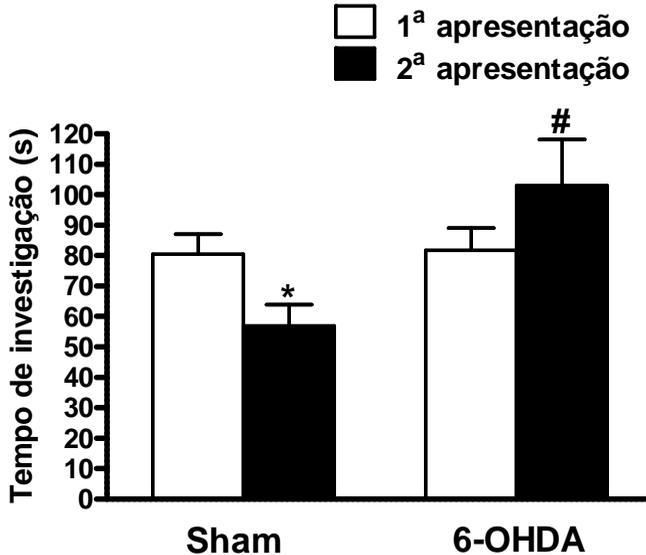


Figura 19. Efeitos da administração de 6-OHDA no tempo de investigação social. Os animais tratados com 6-OHDA não apresentaram redução no tempo de investigação durante a segunda apresentação em comparação com a primeira. Os valores são expressos como média \pm EP. * $P < 0,05$ (em comparação com a primeira apresentação do mesmo grupo, teste de Bonferroni após ANOVA de uma via). # $P < 0,05$ (em comparação com a segunda apresentação do grupo Sham, teste de Bonferroni após ANOVA de uma via).

4.1.1.4 Efeitos da administração intraestriatal de 6-OHDA na locomoção

4.1.1.4.1 Teste do Campo Aberto

A atividade locomotora dos animais foi avaliada uma e três semanas após a cirurgia a fim de descartar a possibilidade dos efeitos

observados nos testes emocionais e cognitivos pela administração de 6-OHDA estarem diretamente relacionados a um prejuízo motor dos animais. A Tabela 2 resume os efeitos da administração intraestriatal de 6-OHDA na atividade locomotora dos animais avaliada através do teste do campo aberto. O comportamento exploratório, avaliado através do número de quadrantes percorridos e do número de levantamentos, não foi afetado pela administração de 6-OHDA uma e três semanas após a cirurgia. Ambos os grupos apresentaram uma redução no número de quadrantes percorridos e levantamentos na terceira semana, refletindo o fenômeno de habituação dos animais ao ambiente.

Tabela 1. Efeitos da administração de 6-OHDA no teste da discriminação olfatória de ratos três semanas após a cirurgia.

Grupo	% tempo no compartimento	
	Familiar	Não-familiar
Sham	56,8±3,2	*43,2±4,9
6-OHDA	54±3	*46±3

Os valores são expressos como média ± EP. * $P < 0,05$ (em comparação com a porcentagem de tempo gasto no ambiente familiar, teste t de Student).

Tabela 2. Efeitos da administração de 6-OHDA na atividade locomotora espontânea uma e três semanas após a cirurgia.

Parâmetros	Primeira semana		Terceira semana	
	Sham	6-OHDA	Sham	6-OHDA
Nº de quadrantes percorridos	89±9,2	79±6	59,6±9,3	43,7±11,4
Nº de levantamentos	20,3±2,7	19,7±2,5	12,7±2,5	12±2,9

Os valores são expressos como média ± EP.

4.1.2 Análises Neuroquímicas

4.1.2.1 Imunoistoquímica para TH

Uma semana após a cirurgia, os neurônios TH-positivos foram detectados no corpo estriado dos ratos tratados com veículo e 6-OHDA. O efeito do tratamento foi estatisticamente significativo [$F(3,3) = 31,42$, $P < 0,01$]. A magnitude dessa diferença persistiu após três semanas; a interação entre o tratamento e o tempo não foi estatisticamente significativa [$F(3,3) = 0,57$, $P > 0,05$].

Na SNc, o número de neurônios TH-positivos foi reduzido com a administração de 6-OHDA mesmo uma semana após a cirurgia; o efeito do tratamento foi estatisticamente significativo [$F(3,4) = 48,43$, $P < 0,001$]. A redução no número de neurônios TH-positivos persistiu até a terceira semana, porém foi observada uma recuperação parcial dos neurônios dopaminérgicos nesse período de tempo, sendo que a interação entre o tratamento e o tempo foi estatisticamente significativa [$F(3,4) = 9,19$, $P < 0,05$].

A Figura 20 mostra microfotografias representativas da imunoistoquímica para TH no corpo estriado (Figura 20A) e SNc (Figura 20B) em cada intervalo de tempo. As Figuras 20C e D indicam a porcentagem de área marcada nos grupos 6-OHDA e Sham após uma e três semanas no corpo estriado e SNc, respectivamente.

4.1.2.2 Determinação Dos Níveis Cerebrais de DA, NA e 5-HT por HPLC

A fim de determinar a relação entre as alterações comportamentais induzidas por 6-OHDA em ratos e as alterações neuroquímicas na neurotransmissão dopaminérgica, noradrenérgica e serotoninérgica, os níveis de DA, DOPAC, HVA, NA e 5-HT no corpo estriado, córtex pré-frontal e hipocampo foram avaliados uma e três semanas após a administração intraestriatal de 6-OHDA. Os níveis de DA [$F(1,21) = 3,23$, $P < 0,0001$], seus metabólitos DOPAC [$F(1,21) = 1,10$, $P < 0,005$] e HVA [$F(1,21) = 13,79$, $P < 0,01$], além de 5-HT [$F(1,21) = 2,62$, $P < 0,005$] foram reduzidos no corpo estriado mesmo uma semana após a cirurgia. Foi observada uma depleção dopaminérgica de 59% no corpo estriado dos ratos lesionados com 6-

OHDA. Mais ainda, houve um aumento nos níveis de NA nessa área [$F(1,6) = 6,96, P < 0,005$] (Figura 21).

Conforme esperado, os níveis de DA no córtex pré-frontal foram muito menores do que no corpo estriado ($121 \pm 44,7$ ng de DA/g tecido úmido). Os níveis de DA, DOPAC, HVA e 5-HT nessa área não foram afetados por 6-OHDA, tendo sido observada uma redução nos níveis de NA [$F(1,14) = 3,23, P < 0,05$] (Tabela 3). Não foram observadas diferenças nos níveis de neurotransmissores no hipocampo.

Três semanas após a cirurgia, DA [$F(1,21) = 1,74, P < 0,005$], DOPAC [$F(1,21) = 1,42, P < 0,005$] e HVA [$F(1,21) = 1,06, P < 0,005$] ainda estavam reduzidos no corpo estriado. Neste intervalo de tempo, o volume da lesão nos terminais dopaminérgicos permaneceu substancialmente inalterado (51,36%). Além disso, o aumento nos níveis de NA [$F(1,6) = 1,32, P < 0,005$] persistiu nessa área (Figuras 22A e B). Por outro lado, neste intervalo de tempo, DA [$F(1,6) = 1,77, P < 0,05$] e DOPAC [$F(1,20) = 1,83, P < 0,05$] apresentavam-se reduzidos no córtex pré-frontal quando comparados com o grupo Sham, enquanto não foram observadas alterações nos níveis de NA e 5-HT (Figuras 22C e D). Não foram observadas diferenças no hipocampo, exceto por uma redução nos níveis de DOPAC [$F(1,6) = 1,31, P < 0,05$] (Tabela 4).

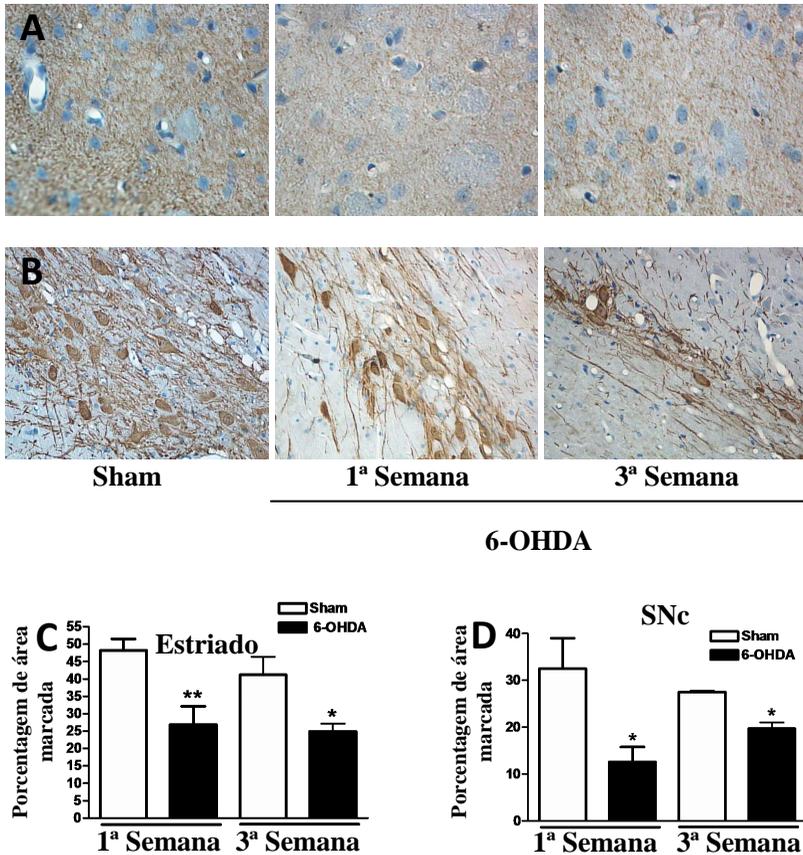


Figura 20. Efeitos da administração de 6-OHDA no número de neurônios TH-positivos no corpo estriado e SNc. (A) Microfotografias representativas de secções coronais cerebrais contendo o corpo estriado de animais dos grupos Sham e 6-OHDA, sacrificados uma ou três semanas após a injeção intraestriatal de 6-OHDA. (B) Microfotografias representativas de secções coronais cerebrais contendo a SNc de animais dos grupos Sham e 6-OHDA, sacrificados uma ou três semanas após a injeção intraestriatal de 6-OHDA. (C) Redução temporal de neurônios dopaminérgicos no corpo estriado. (D) Redução temporal de neurônios dopaminérgicos na SNc. Os valores são expressos como média \pm EP. * $P < 0,05$ (em comparação com o respectivo grupo Sham, teste de Bonferroni após ANOVA de duas vias).

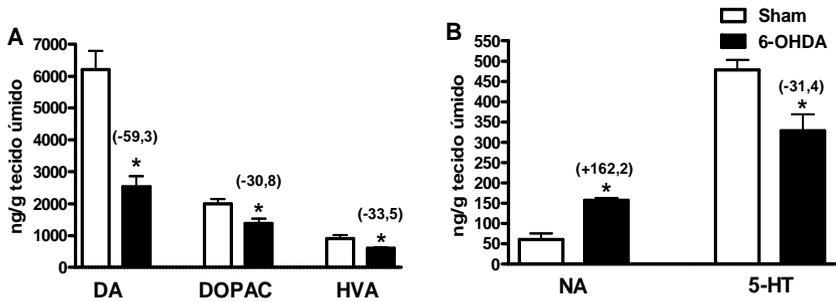


Figura 21. Efeitos da administração de 6-OHDA nos níveis de DA, DOPAC, HVA, NA e 5-HT no corpo estriado de ratos uma semana após a cirurgia. (A) Níveis de DA, DOPAC e HVA nos ratos Sham e 6-OHDA. (B) Níveis de NA e 5-HT nos ratos Sham e 6-OHDA. Os valores são expressos como média \pm EP. * $P < 0,05$ (em comparação com o grupo Sham, teste t de Student). Os números em parênteses indicam porcentagem de variação calculada considerando o valor de Sham como 100%.

Tabela 3. Efeitos da administração de 6-OHDA nos níveis de DA, DOPAC, HVA, NA e 5-HT no córtex pré-frontal e hipocampo uma semana após a cirurgia.

		Grupo							
Região	DA	DOPAC		HVA		NA		5-HT	
		Sham	6-OHDA	Sham	6-OHDA	Sham	6-OHDA	Sham	6-OHDA
CPF	121±44,7	97±73,9	73,9±2,8	125±19,1	81,9±1,4	238,1±21,1	*177,4±17,9	415,4±53,7	327,5±51,8
HIP	33,3±0,2	30,9±1,9	24,9±1,3	21±3,2	65,6±27,3	66,8±44,6	405,8±137	237,8±34,3	104±34

Os valores são expressos como média ± EP. * $P < 0,05$ (em comparação com o grupo Sham, teste t de Student). Abreviações: HIP, hipocampo; CPF, córtex pré-frontal.

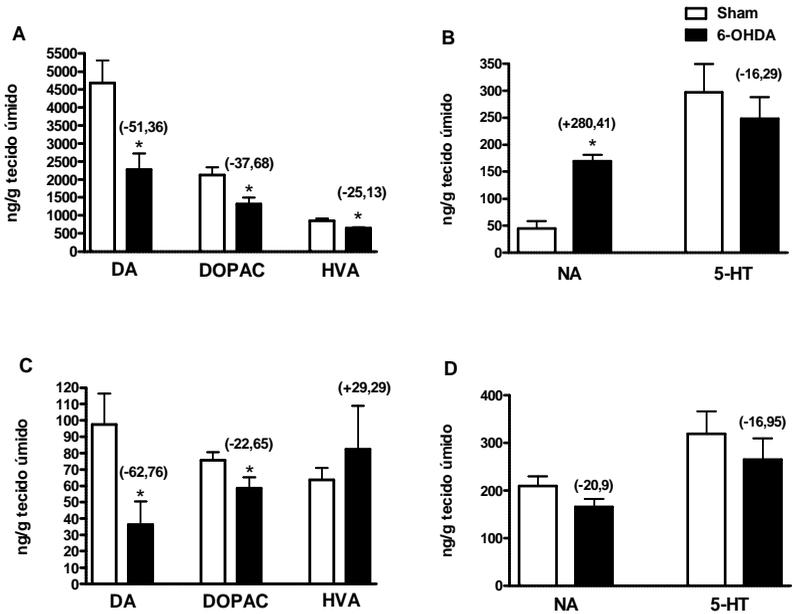


Figura 22. Efeitos da administração de 6-OHDA nos níveis de DA, DOPAC, HVA, NA e 5-HT no corpo estriado e córtex pré-frontal de ratos três semanas após a cirurgia. (A, B) Corpo estriado. (C, D) Córtex pré-frontal. Os valores são expressos como média \pm EP. * $P < 0,05$ (em comparação com o grupo Sham, teste t de Student). Os números em parênteses indicam porcentagem de variação calculada considerando o valor de Sham como 100%.

Tabela 4. Efeitos da administração de 6-OHDA nos níveis de DA, DOPAC, HVA, NA e 5-HT no hipocampo três semanas após a cirurgia.

		Grupo								
DA		DOPAC		HVA		NA		5-HT		
Região	Sham	6-OHDA	Sham	6-OHDA	Sham	6-OHDA	Sham	6-OHDA	Sham	6-OHDA
HIP	35,8±2,8	23,4±7,8	28,2±3,2	*17,6±2,8	36,7±8,2	53,9±14,2	274,7±23,1	195,9±44,4	150,4±33,6	116,4±59,6

Os valores são expressos como média ± EP.* $P < 0,05$ (em comparação com o grupo Sham, teste *t* de Student).
Abreviação: HIP, hipocampo.

4.2 Experimento 2

4.2.1 Efeitos da administração de SR141716A nas alterações comportamentais precoces em ratos tratados com 6-OHDA.

4.2.1.1 Efeitos da administração de SR141716A nos parâmetros emocionais de ratos tratados com 6-OHDA

4.2.1.1.1 Teste do Nado Forçado

No teste do nado forçado (Figura 23), o grupo tratado com 6-OHDA apresentou um aumento no tempo de imobilidade quando comparado ao grupo Sham ($P<0,05$). O tratamento agudo com SR141716A (3 mg/kg, i.p.) reverteu o aumento no tempo de imobilidade induzido pelo tratamento com 6-OHDA.

4.2.1.2 Efeitos da administração de SR141716A nos parâmetros cognitivos de ratos tratados com 6-OHDA

4.2.1.2.1 Teste do Reconhecimento Social

No teste do reconhecimento social, a ANOVA de duas vias (tratamento x apresentação do rato jovem) não revelou efeito significativo para a interação entre os fatores [$F(1,32) = 2,31; P=0,08$]. Entretanto, indicou um efeito significativo para o tratamento [$F(1,32) = 27,3; P<0,0001$] e para a apresentação do rato jovem [$F(1,32) = 8,0; P<0,0001$]. O teste post-hoc de Bonferroni mostrou que os ratos tratados com 6-OHDA apresentaram um prejuízo evidente na capacidade de reconhecimento do rato jovem em comparação com os ratos Sham, uma vez que o grupo 6-OHDA empregou tanto tempo investigando o rato jovem durante o segundo encontro quanto na primeira exposição. Os grupos 6-OHDA + SR empregaram menos tempo investigando o rato jovem durante a segunda exposição quando comparada à primeira. Os resultados estão ilustrados na Figura 24.

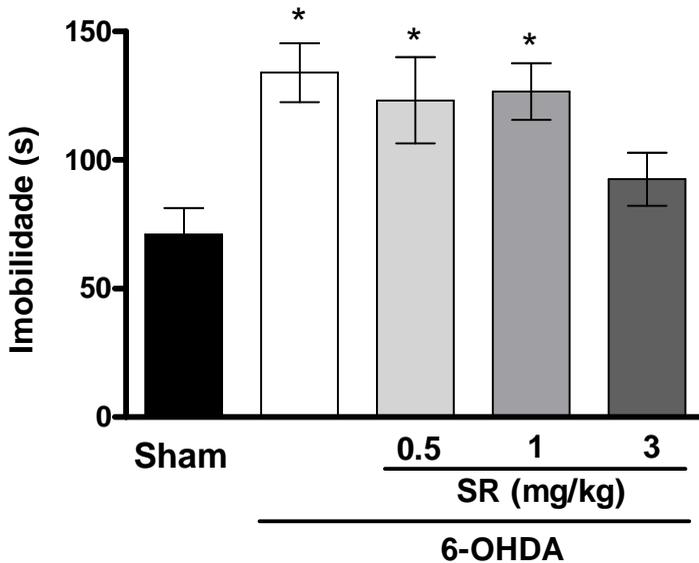


Figura 23. Efeitos da administração de SR141716A no teste do nado forçado em ratos tratados com 6-OHDA. O tratamento com SR141716A (3 mg/kg, i.p) uma semana após a cirurgia previniu o aumento no tempo de imobilidade induzido pela administração de 6-OHDA. Os valores são expressos como média \pm EP. * $P < 0,05$ (em comparação com o grupo Sham, teste de Bonferroni após ANOVA de uma via).

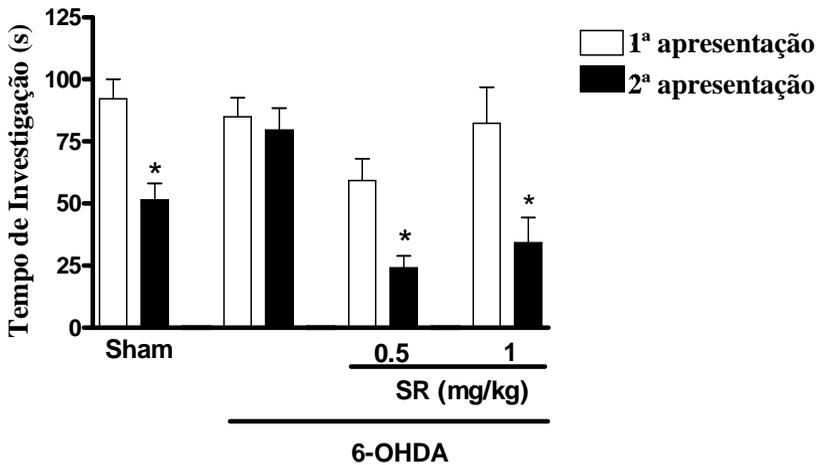


Figura 24. Efeitos da administração de SR141716A no tempo de investigação social em ratos tratados com 6-OHDA. Os animais tratados com SR141716A (0,5 e 1 mg/kg) apresentaram redução no tempo de investigação durante a segunda apresentação em comparação com a primeira. Os valores são expressos como média \pm EP. * $P < 0,05$ (em comparação com a primeira apresentação do mesmo grupo, teste de Bonferroni após ANOVA de duas vias). # $P < 0,05$ (em comparação com a segunda apresentação do grupo Sham, teste de Bonferroni após ANOVA de duas vias).

4.2.2 Análises Neuroquímicas

4.2.2.1 Determinação Dos Níveis Cerebrais de DA, NA e 5-HT por HPLC

Após o teste do nado forçado, os níveis de neurotransmissores no corpo estriado, córtex pré-frontal e hipocampo foram avaliados nos ratos tratados com 6-OHDA e nos ratos tratados com 6-OHDA que receberam a dose efetiva de SR141716A (3 mg/kg). Os resultados mostraram um aumento significativo nos níveis estriatais de DA (70%), DOPAC (61%), e HVA (73%) nos ratos tratados com 6-OHDA que receberam SR141716A ($P < 0,05$). Não foram observadas diferenças significantes nos níveis estriatais de NA e 5-HT e nos níveis de DA,

DOPAC, HVA, NA e 5-HT no córtex pré-frontal e hipocampo dos ratos tratados com 6-OHDA que receberam SR141716A quando comparados aos ratos tratados com 6-OHDA que receberam veículo. Os resultados estão ilustrados da Tabela 5.

Tabela 5. Efeitos da administração aguda de SR141716A (3 mg/kg) i.p. nos níveis de neurotransmissores no corpo estriado, córtex pré-frontal e hipocampo uma semana após a administração de 6-OHDA.

Grupo		DOPAC		HVA		NA		5-HT	
Região	6-OHDA	6-OHDA+SR	6-OHDA	6-OHDA	6-OHDA+SR	6-OHDA	6-OHDA+SR	6-OHDA	6-OHDA+SR
EST	1685±253,6	2869±451,7*	932,1±101,7	600,8±111,1	1043±169,6*	119,5±7,5	135,1±8,4	228,5±15,4	275,3±26,5
CPF	17,7±6,8	8,7±1,9	20±8,9	23,7±7,9	24,24±11,2	144,2±29,5	155,9±7,9	266,9±68,1	387,6±95,5
HIP	30,9±1,9	30,4±1,3	22,2±2,5	18,2±3	22,7±10,61	237,8±34,3	273,8±42,2	104±34	167,2±50,2

Os valores são expressos como média ± EP. * $P < 0,05$ (em comparação com o grupo Sham, teste t de Student). Abreviações: EST, corpo estriado; HIP, hipocampo; CPF, córtex pré-frontal.

Na terceira semana após a administração de 6-OHDA, após o teste do reconhecimento social, os níveis de neurotransmissores foram avaliados no corpo estriado, córtex pré-frontal e hipocampo (Tabela 6) nos ratos tratados com 6-OHDA e nos ratos tratados com 6-OHDA que receberam a dose efetiva de 0,5 mg/kg de SR141716A. Os níveis de NA (98%) e 5-HT (135%) no córtex pré-frontal aumentaram significativamente no grupo tratado com SR141716A ($P < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos no corpo estriado e hipocampo.

Tabela 6. Efeitos da administração aguda de SR141716A (0,5 mg/kg) i.p. nos níveis de neurotransmissores no corpo estriado, córtex pré-frontal e hipocampo três semanas após a administração de 6-OHDA.

Grupo		DOPAC		HVA		NA		5-HT	
Região	6-OHDA	6-OHDA+SR	6-OHDA	6-OHDA	6-OHDA+SR	6-OHDA	6-OHDA+SR	6-OHDA	6-OHDA+SR
EST	1364±337,2	2099±759,9	1266±223	777,2±107,8	828,4±74,4	131±19,5	125,7±6,5	227,9±15,7	248,1±32,2
CPF	16,8±4,1	17,1±4,7	20,2±11,7	35,1±7,5	42,5±5,3	104,9±29	208,7±16,6*	198,4±107,1	467,3±24,0*
HIP	23,4±7,8	28±4,4	17,6±2,8	53,9±14,2	32,8±8,5	195,9±44,4	297,5±28,2	116,4±59,6	165,6±41,6

Os valores são expressos como média ± EP. * $P < 0,05$ (em comparação com o grupo Sham, teste *t* de Student). Abreviações: EST, corpo estriado; HIP, hipocampo; CPF, córtex pré-frontal.

5 DISCUSSÃO

A primeira hipótese formulada nesse estudo propunha que alterações emocionais e cognitivas, similares às que ocorrem na DP, poderiam ser reproduzidas em um modelo animal de DP em ratos, através da degeneração dopaminérgica nigroestriatal. O modelo da 6-OHDA em ratos é bastante útil como ferramenta para o estudo da doença. Entretanto, a DP, por tratar-se de uma doença progressiva, é subdividida em diferentes estágios, caracterizados por uma degeneração progressiva da via nigroestriatal e um declínio correspondente nos níveis estriatais de DA. Portanto, para se obter um modelo animal de alterações não motoras da doença, era importante definir, inicialmente, qual estágio da DP se pretendia mimetizar. Uma série de estudos vem demonstrando que distúrbios nos domínios emocional e cognitivo observados na DP ocorrem frequentemente antes do aparecimento das disfunções motoras. Além disso, levou-se em consideração que prejuízos motores nos animais poderiam prejudicar a interpretação dos resultados obtidos. Dessa forma, pareceu importante produzir um modelo animal em que a degeneração dopaminérgica na substância negra e conseqüente depleção de DA no corpo estriado fossem suficientes para reproduzir um estágio da DP em que alterações emocionais e cognitivas são esperadas, porém alterações motoras ainda não são evidentes.

Quando os sinais motores da DP emergem, cerca de 60% dos neurônios dopaminérgicos da SNC sofreram degeneração e os níveis estriatais de DA foram reduzidos cerca de 80% (Barrio et al., 1997; Lindner et al., 1999), sendo que resultados similares têm sido obtidos em modelos animais (Deumens et al., 2002). Assim, para mimetizar a fase pré-motora da doença, era importante produzir um modelo de DP no qual a depleção de DA fosse menor que 80% e insuficiente para causar prejuízos motores.

Em pesquisa pré-clínica, modelos de DP em rato têm sido desenvolvidas com o foco na via nigroestriatal. Essa via dopaminérgica é lesionada em diferentes níveis para mimetizar a DP. Os alvos de injeção de 6-OHDA são (a) o local de origem da via nigroestriatal, i.e., a SNC; (b) o feixe neuronal que se projeta parcialmente para o corpo estriado, i.e., o feixe prosencefálico medial; e (c) o sítio terminal da via nigroestriatal, i.e., o corpo estriado. Além disso, as lesões podem ser unilaterais ou bilaterais.

A lesão unilateral no feixe prosencefálico medial por 6-OHDA é virtualmente completa, sendo que muitos poucos neurônios

dopaminérgicos sobrevivem. Por esta razão este modelo é útil como um modelo de estágio avançado da DP. Além disso, outra desvantagem desse modelo é que não apenas os axônios dopaminérgicos do grupo A9, da SNc, passam pelo feixe prosencefálico medial. Os axônios do grupo A10, que terminam no núcleo acumbens, também se projetam pelo feixe prosencefálico medial. Portanto, a lesão no feixe prosencefálico medial também afeta essa via. Além da lesão unilateral no feixe prosencefálico medial, foram desenvolvidos modelos em que essa região foi lesionada bilateralmente. Esses modelos têm sido limitados em seu uso, pois os ratos apresentam adipsia e afagia intensas (Ungerstedt, 1971).

A lesão com 6-OHDA na SNc mimetiza melhor a DP em relação à perda celular dopaminérgica. As lesões unilaterais na SNc causam uma depleção de neurônios dopaminérgicos de cerca de 90% nesta região (Carman et al., 1991). Quando comparada ao feixe prosencefálico medial (aproximadamente 97% de perda de neurônios TH-positivos na SNc), a perda celular de neurônios dopaminérgicos na SNc é menos extensa após lesão nessa região. Portanto, o modelo da administração de 6-OHDA na SNc se aproxima mais da situação patológica de um estágio avançado da DP. Além das lesões unilaterais na SNc, modelos com injeção bilateral na SNc também foram desenvolvidos, tendo sido demonstrado que pequenas lesões bilaterais produzem alterações motoras nos animais (Van Oosten & Cools, 1999). Uma dificuldade em relação à utilização da SNc como alvo da injeção de 6-OHDA é o pequeno tamanho dessa estrutura. É muito difícil injetar 6-OHDA nessa estrutura sem lesionar estruturas adjacentes (por exemplo, a área tegmentar ventral). Isso é refletido por uma redução nos neurônios dopaminérgicos na área tegmentar ventral de cerca de 30% após a lesão na SNc, como demonstrado por Carman e colaboradores (Carman et al., 1991).

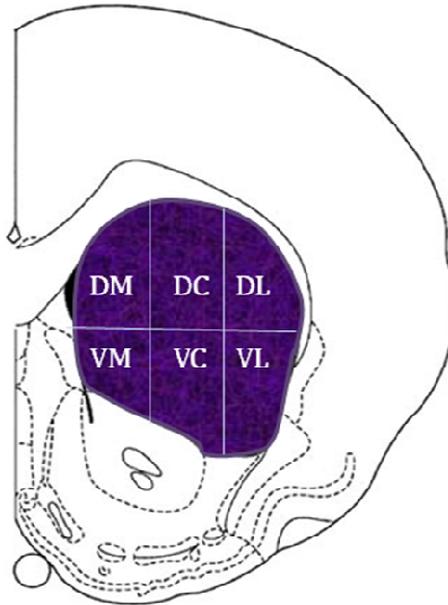
As lesões parciais no corpo estriado apresentam a vantagem de serem facilmente realizadas, além das alterações comportamentais e bioquímicas se aproximarem mais da situação humana. Outra vantagem da lesão estriatal consiste no fato de que lesões mais seletivas podem ser obtidas, através da administração da neurotoxina em subáreas dessa estrutura, como ilustra a Figura 25. Alguns estudos têm utilizado a porção dorsolateral do corpo estriado como local de administração de 6-OHDA (Amalric et al., 1995; Chang et al., 1999), enquanto outros utilizam a porção ventrolateral (Cousins & Salamone, 1996; Lindner et al., 1999) ou outras áreas do corpo estriado (Kirir et al., 1998; Lee et al., 1996; Roedter et

al., 2001). Uma vez que o putâmen representa a área com maior depleção de DA no cérebro de pacientes com DP (Nyberg et al., 1983), e considerando que o putâmen em humanos é equivalente à região ventrolateral do corpo estriado de ratos (Kirik et al., 1998), escolhemos essa região para realizar lesões parciais com a administração de 6-OHDA.

A maioria dos modelos de DP em ratos envolve lesões unilaterais (Gregório et al., 2009; Silvestrin et al., 2009; Solis et al., 2007). Esses modelos têm sido muito úteis em pesquisas pré-clínicas de DP, apresentando vantagens como a avaliação de drogas que agem na neurotransmissão dopaminérgica através do comportamento rotacional, causado pelo desequilíbrio entre os dois hemisférios cerebrais. Pode ainda ser utilizado para avaliar prejuízos motores específicos através de testes como o “forelimb use asymmetry”. Neste estudo, utilizamos a administração bilateral de 6-OHDA por entender que ela apresenta alguns pontos positivos em relação à administração unilateral. O primeiro é que a DP afeta o cérebro bilateralmente, portanto esse modelo reproduz melhor a doença do que a administração unilateral da neurotoxina. Além disso, na administração bilateral não ocorre compensação do lado intacto em relação ao lado afetado (Van Oosten & Cools, 1999). Portanto, um modelo bilateral seria preferível em relação a mecanismos compensatórios. Em um modelo de DP em ratos a compensação durante o experimento complica a interpretação dos resultados, tornando difícil distinguir entre a recuperação funcional e a compensação após a lesão. Em modelos com lesões bilaterais, a compensação durante um experimento também pode ocorrer, porém se exclui a possibilidade de ser causada pelo hemisfério não lesionado do cérebro. Outra vantagem do uso da administração bilateral está na possibilidade de avaliar a função cognitiva dos animais, através de testes como o labirinto aquático de Morris.

A depressão está entre as condições psiquiátricas que acompanham a DP mais comuns. Mais ainda, tem sido demonstrado que a depressão pode preceder o aparecimento de sinais motores da DP (Nilsson et al., 2001; Schurman et al., 2002). Os resultados obtidos no teste do consumo de sacarose demonstraram que a administração intraestriatal de 6-OHDA causou uma redução precoce no consumo dessa substância, avaliado uma semana após o tratamento com 6-OHDA. O teste do consumo de sacarose tem sido amplamente utilizado como modelo animal de depressão, sugerindo um estado de anedonia nesses animais (Craft & DeVries, 2006). Nossos resultados estão de acordo com um

estudo prévio, que demonstra que a administração de reserpina, uma droga utilizada como modelo de DP, reduz a preferência pelo consumo de sacarose em camundongos (Skalisz et al., 2002). Um ponto que merece consideração é que, nesse teste, o efeito da 6-OHDA é avaliado tanto no consumo de sacarose quanto no consumo de água pelos animais. Esta medida é importante para descartar possíveis prejuízos motores dos animais, considerando a degeneração causada por 6-OHDA na via nigroestriatal e seu conhecido efeito motor. Entretanto, uma vez que, na dose empregada, não foi observado efeito da 6-OHDA no consumo de água, tanto no período de adaptação quanto na fase de teste, os resultados indicam que, no protocolo utilizado neste estudo, o efeito dessa neurotoxina no teste do consumo de sacarose foi devido à indução de anedonia, e não a uma alteração motora dos animais.



bregma 1.20 mm

Figura 25. Hemisfério esquerdo de rato com a subdivisão do corpo estriado em seis áreas. Abreviações: DM, dorsomedial; DC, dorsocentral; DL, dorsolateral; VM, ventromedial; VL, ventrolateral. Adaptado de Deumens et al. (2002).

A anedonia nos animais tratados com 6-OHDA foi acompanhada por um desespero comportamental, avaliado através do teste do nado forçado, um dos testes mais comumente utilizados para avaliar o comportamento “tipo depressivo” em roedores (Borsini & Meli, 1988; Petit-Demouliere et al., 2005), refletido por um aumento no tempo de flutuação no teste do nado forçado, o que indica um estado emocional negativo. Esses efeitos anedônico e tipo-depressivo foram correlacionados a alterações neuroquímicas no corpo estriado. Foi observada uma redução evidente na imunomarcagem para TH no intervalo de tempo de uma semana após a administração de 6-OHDA. A perda celular observada no presente estudo foi parcial: 55,75% dos terminais nervosos dopaminérgicos no corpo estriado sobreviveram, uma redução menor do que os 70% de perda de neurônios dopaminérgicos que acarreta o início de alterações motoras, dado corroborado pela ausência de alterações locomotoras no teste do campo aberto. Da mesma forma, a redução de células TH-positivas na SNc foi evidente no mesmo período de tempo e também resultou em reduções incompletas no número de corpos celulares dopaminérgicos, o que está de acordo com estudos prévios (Blandini et al., 2007; Lindner, 1999; Sauer & Oertel, 1994). Assim, embora não se possa descartar a existência de alterações motoras pequenas o suficiente para não serem detectadas pelos testes comportamentais utilizados, os presentes resultados sugerem que a ocorrência de anedonia e comportamento tipo-depressivo não é influenciada por possíveis sinais motores.

A administração de 6-OHDA no corpo estriado também resultou em uma depleção parcial de DA, DOPAC, HVA e 5-HT, o que é consistente com estudos prévios (Henze et al., 2005; Chen et al., 2007; Aguiar et al., 2008), além de um aumento nos níveis de NA, possivelmente devido a uma resposta compensatória à redução de DA. No que diz respeito à depleção estriatal de 5-HT causada pela administração de 6-OHDA, deve ser levado em conta o fato de que, em nossos experimentos, os terminais serotoninérgicos não foram protegidos da lesão por 6-OHDA, o que poderia explicar os baixos níveis de 5-HT no corpo estriado. Desta forma, considerando a notória função do sistema serotoninérgico nos processos emocionais, é possível que as alterações observadas nos testes do consumo de sacarose e nado forçado possam estar relacionadas, ainda que parcialmente, às alterações serotoninérgicas.

De fato, há evidências fisiopatológicas de alterações serotoninérgicas na depressão associada à DP (Schrag, 2004), de forma que

uma “hipótese serotoninérgica” foi proposta para explicar a depressão na DP (Mayeux, 1990). Portanto, não podemos excluir a participação serotoninérgica nas alterações emocionais encontradas nos testes comportamentais empregados neste estudo. As alterações nos sistemas dopaminérgico, noradrenérgico e serotoninérgico estriatais sugerem, deste modo, que um ou mais desses sistemas de neurotransmissores desempenha um importante papel no comportamento tipo-depressivo neste modelo de DP, fornecendo suporte à teoria de que esses neurotransmissores estejam envolvidos na depressão associada à DP (Schrag, 2004).

Além das alterações tipo-depressão, uma resposta ansiogênica, quantificada como uma redução na porcentagem do número de entradas nos braços abertos em relação ao número total de entradas no teste do labirinto em cruz elevado tornou-se evidente em um intervalo de tempo maior após a administração de 6-OHDA (três semanas após a lesão). Neste intervalo de tempo, a redução no número de neurônios dopaminérgicos persistiu tanto no corpo estriado quanto na SNc. A redução nos níveis estriatais de DA, DOPAC e HVA, bem como o aumento nos níveis de NA se mantiveram, e não diferiram significativamente dos níveis observados na primeira semana. Por outro lado, a perda de DA e DOPAC no córtex pré-frontal se tornou evidente apenas após esse intervalo de tempo, sugerindo um efeito progressivo da lesão por 6-OHDA. Esse resultado sugere que a resposta ansiogênica causada por 6-OHDA poderia estar relacionada à depleção dopaminérgica no córtex pré-frontal, uma vez que não foram observadas alterações no número de entradas nos braços abertos no período de uma semana após a cirurgia. De fato, esta hipótese é reforçada por um estudo prévio que demonstrou que a administração de 6-OHDA, quando realizada diretamente no córtex pré-frontal, induz um efeito ansiogênico significativo avaliado através do teste do labirinto em cruz elevado (Espejo, 1997).

Embora a maioria dos eferentes dopaminérgicos do córtex pré-frontal sejam oriundos da área tegmentar ventral, alguns desses eferentes originam-se da área central da SNc (Albanese & Bentivoglio, 1982). Por esta razão, a depleção de DA observada no córtex pré-frontal consecutiva à administração intraestriatal de 6-OHDA em ratos poderia explicar este aumento nos níveis de ansiedade dos animais. Este resultado sugere, portanto, que a depleção pré-frontal de DA pode desempenhar um papel importante na modulação da ansiedade da DP.

Estudos em humanos através de diversos testes neuropsicológicos demonstram que pacientes com DP sem demência apresentam uma redução na capacidade de aquisição de aprendizado associativo; esses achados sugerem que o corpo estriado desempenha um papel importante não apenas no aprendizado e realização de tarefas motoras, mas também é essencial para o processamento de associações, conhecido como aprendizado de hábito (Knowlton et al., 1996; Hay et al., 2002). Além do corpo estriado, o córtex pré frontal também tem sido implicado como um componente da rede neural responsável pela aprendizagem associativa (Suzuki, 2008). Em experimentos com roedores, a versão com pista do labirinto aquático de Morris consiste numa tarefa de estímulo-resposta ou de hábito, em que o aprendizado de roedores consiste em associar uma pista colocada sobre a plataforma como um sinal visual que indica um local seguro de pouso no labirinto aquático. Consistente com estudos prévios que reportam que injeções bilaterais de 6-OHDA ou MPTP na SNc prejudica o desempenho de ratos na versão com pista do labirinto aquático de Morris (Miyoshi et al., 2002; Ferro et al., 2005), a injeção intraestriatal de 6-OHDA realizada neste estudo induziu alterações similares neste teste. Mais ainda, a porcentagem de depleção de DA estriatal observada foi similar a estudos anteriores que demonstraram déficits em testes de aprendizado e memória (Lindner et al., 1999; Gevaerd et al., 2001; Miyoshi et al., 2002; Ferro et al., 2005). Quanto aos prejuízos cognitivos encontrados neste teste, nossos achados fornecem suporte à hipótese de uma combinação do envolvimento de DA no corpo estriado e córtex pré-frontal na memória de hábito, uma vez que não foram observados déficits significantes na ausência de alterações dopaminérgicas no córtex pré-frontal, uma semana após a administração de 6-OHDA.

Além de alterações no teste do labirinto aquático, nossos achados demonstram um efeito deletério da administração de 6-OHDA em um teste de memória de curta duração muito sensível, o teste do reconhecimento social em ratos. Os animais tratados com 6-OHDA empregaram tanto tempo investigando o rato jovem durante a segunda apresentação quanto no primeiro encontro, demonstrando um prejuízo na capacidade de reconhecer o rato jovem após um curto período de tempo (30 min). Considerando o fato de esta resposta ter ocorrido em associação com uma redução nos níveis dopaminérgicos no córtex pré-frontal, é possível que esta alteração comportamental esteja relacionada a uma depleção de DA nessa área. Em um estudo conduzido por Fernandez Espejo (2003), entretanto, o autor demonstrou que a

administração de 6-OHDA diretamente no córtex pré-frontal de ratos não causou alterações na memória social dos animais, indicado por uma redução no tempo de investigação a um rato jovem quando da segunda exposição ao animal. Esses resultados, em conjunto, podem indicar que é necessária uma redução nos níveis de DA simultaneamente no córtex pré-frontal e corpo estriado para a indução de alterações no teste do reconhecimento social uma vez que, em nosso trabalho, a depleção de DA no córtex pré-frontal que ocorreu concomitantemente às alterações na memória de reconhecimento social foi acompanhada por alterações nos níveis dopaminérgicos estriatais.

É importante observar que a lesão dopaminérgica é capaz de induzir anosmia em ratos (Prediger et al., 2006), o que poderia levar a uma dificuldade na interpretação dos resultados obtidos no teste do reconhecimento social. Dessa forma, consideramos importante avaliar se a injeção de 6-OHDA alteraria esta função. Os presentes resultados demonstram uma ausência de prejuízo no reconhecimento de odores nos ratos tratados com 6-OHDA, avaliados três semanas após a cirurgia.

O teste de discriminação olfatória utilizado neste estudo, previamente padronizado em nosso laboratório (Prediger et al., 2006), foi baseado em observações iniciais feitas por Carr et al. (1976), que demonstraram que ratos machos adultos apresentam uma preferência significativa por seu próprio odor em relação à ausência de odor. A capacidade de ambos os grupos Sham e 6-OHDA discriminarem entre os compartimentos familiar e não-familiar sugere que as alterações observadas no teste do reconhecimento social refletem de fato um déficit cognitivo, e não simplesmente um prejuízo olfatório.

Consistente com evidências prévias de que lesões na via nigroestriatal não causaram alterações nos níveis hipocampais de DA (Miyoshi et al., 2002), no presente estudo os níveis dopaminérgicos hipocampais dos animais tratados com 6-OHDA não foram alterados pela lesão nigroestriatal, o que pode sugerir que esta área não está envolvida nas alterações comportamentais emocionais e cognitivas encontradas neste estudo. Entretanto, é preciso considerar que os níveis hipocampais de DA são muito baixos; assim, não podemos excluir a possibilidade de que a análise de HPLC tenha sido incapaz de detectar pequenas diferenças nos níveis de DA nesta área.

Em nossa segunda hipótese, avaliamos se o bloqueio dos receptores CB₁ seria capaz de atenuar os prejuízos induzidos por 6-OHDA no teste do reconhecimento social e do nado forçado.

No teste do nado forçado, os animais tratados com 6-OHDA apresentaram uma tendência maior ao desespero comportamental quando comparados com os animais Sham e com aqueles tratados com SR141716A, sugerindo, portanto, que o bloqueio dos receptores CB₁ restaura a resposta normal desses animais quando expostos a um estímulo aversivo inescapável. A redução do aumento na imobilidade induzida por 6-OHDA no teste do nado forçado pela administração de SR141716A foi evidente com a utilização da dose de 3 mg/kg, porém não com doses menores (0,5 e 1 mg/kg), sugerindo que baixas doses desse antagonista CB₁ podem não ser suficientes para induzir este efeito tipo-antidepressivo neste modelo animal de DP. Este resultado está de acordo com a atividade tipo-antidepressiva encontrada por Griebel e colaboradores (2005), que demonstraram que a administração de SR141716A reduziu o tempo de imobilidade no teste do nado forçado com a dose de 3 mg/kg, porém não com a dose de 1 mg/kg em ratos.

De fato, embora nosso estudo seja o primeiro relato de que temos conhecimento acerca do efeito comportamental do antagonista do receptor CB₁ em um modelo de sintomas depressivos associados à DP, a ação dos antagonistas CB₁ na emocionalidade tem sido evidenciada em outros modelos animais de depressão em roedores. O efeito tipo-antidepressivo tem sido demonstrado em modelos que utilizam camundongos, ratos e gerbils, e em modelos que utilizam diferentes medidas dependentes (Griebel et al., 2005; Shearman et al., 2003; Tzavara et al., 2003).

Evidências acerca do envolvimento dos receptores CB₁ nos efeitos tipo-antidepressivos da administração de SR141716A e de outro antagonista CB₁ – AM251 – advêm de sua especificidade pelos receptores CB₁ e de estudos farmacológicos de interação com agonistas. Desta forma, o agonista do receptor CB₁ CP55940 preveniu os efeitos tipo-antidepressivos do AM251. Outro dado importante relacionando os receptores CB₁ ao mecanismo de ação tipo-antidepressivo desses compostos advém da demonstração de que camundongos nocaute para o receptor CB₁ não apresentam os efeitos tipo-antidepressivos do AM251 (Shearman et al., 2003), evidenciando a importância desse receptor no efeito tipo-antidepressivo desses antagonistas canabinóides.

Nossos resultados sugerem que os mecanismos relacionados aos efeitos tipo-antidepressivos do SR141716A possivelmente envolvem o aumento dos níveis de dopamina no corpo estriado, uma vez que a administração aguda de 3 mg/kg de SR141716A produziu elevações nos níveis de DA, DOPAC e HVA no corpo estriado dos ratos tratados com

6-OHDA. Essa hipótese é reforçada pela demonstração de que o aumento no tempo de imobilidade no teste do nado forçado após o tratamento com 6-OHDA ter sido acompanhado por uma redução nos níveis de DA e seus metabólitos no corpo estriado. Entretanto, embora o aumento nos níveis de DA e seus metabólitos tenha sido significativo nos ratos tratados com 6-OHDA, isso ocorreu mais provavelmente como uma consequência do bloqueio dos receptores CB₁ localizados nos neurônios GABAérgicos estriatonigrais do que como um efeito direto desse antagonista canabinóide nas projeções dopaminérgicas nigroestriatais. De fato, neurônios dopaminérgicos nigroestriatais não contêm receptores CB₁, ao menos no cérebro adulto, embora esses receptores estejam co-localizados com os receptores dopaminérgicos D1 e D2 nas projeções estriatais (Herkenham et al., 1991).

O efeito agudo do SR141716A no funcionamento da memória de curta duração neste modelo de DP pré-motora foi avaliado através do teste do reconhecimento social. A capacidade de reconhecimento social, prejudicada nos ratos tratados com 6-OHDA, foi recuperada por SR141716A. Neste trabalho, nós demonstramos que SR141716A também é capaz de aliviar o prejuízo causado por 6-OHDA na memória de reconhecimento social de curta duração. Pode-se, portanto, levantar a hipótese de que esta droga poderia ser útil para o tratamento das alterações de memória associadas com a DP.

Os receptores canabinóides CB₁ estão sabidamente envolvidos em processos cognitivos, incluindo memória, tanto em humanos quanto em animais (Boucher et al., 2009; Hampson & Deadwyler, 1999; Lundqvist, 2005). Terranova e colaboradores (1996) demonstraram previamente que a administração de SR141716A facilita a memória de curta duração no teste do reconhecimento social. Nossos resultados demonstram que os déficits no reconhecimento social foram acompanhados por alterações nos níveis de neurotransmissores no córtex pré-frontal. Os experimentos que avaliam os efeitos do SR141716A na memória social também implicam essa área nesse tipo de memória, já que a melhora no reconhecimento pela administração de SR141716A foi associada a aumentos nos níveis de NA e 5-HT no córtex pré-frontal.

6 CONCLUSÕES

Os dados aqui apresentados permitem concluir que:

1- Os resultados confirmaram a primeira hipótese, demonstrando que a lesão estriatal com 6-OHDA foi capaz de induzir anedonia e desespero comportamental em ratos, além de um efeito ansiogênico e um prejuízo na memória de procedimento e na memória social de curta duração.

2- Os prejuízos comportamentais apresentaram correlações com alterações neuroquímicas na SNC, estriado e córtex pré-frontal quando avaliados após intervalos de tempo distintos.

3- Não foram registradas alterações aparentes na atividade motora espontânea, o que indica a especificidade dos prejuízos comportamentais detectados.

4- Os resultados indicam que a degeneração da via nigroestriatal dopaminérgica por 6-OHDA e as alterações dopaminérgicas, noradrenérgicas e serotoninérgicas associadas se correlacionam com alterações emocionais e cognitivas em ratos, constituindo um modelo de DP pré-motora.

5- Os resultados confirmaram também a segunda hipótese, demonstrando que a administração de SR141716A reverteu as alterações induzidas por 6-OHDA no teste do nado forçado e do reconhecimento social.

6- Esses efeitos foram acompanhados por um aumento nos níveis de DA no estriado e nos níveis de NA e 5-HT no córtex pré-frontal.

7- Estes resultados, embora preliminares, trazem informações inéditas acerca do papel do receptor CB₁ nas alterações pré-motoras em modelos animais de DP.

8- Mais estudos são necessários para elucidar o papel de diferentes sistemas de neurotransmissores nas alterações comportamentais encontradas neste estudo, bem como do papel do receptor CB₁ nestas alterações.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, L.M.V; MACÊDO, D.S; VASCONCELOS, S.M.M; OLIVEIRA, A.A; DE SOUSA, F.C.F; VIANA, G.S.B. CSC, an adenosine A2A receptor antagonist and MAO B inhibitor, reverses behavior, monoamine neurotransmission, and amino acid alterations in the 6-OHDA-lesioned rats. *Brain Res* 2008; 1191: 192–199.

ALBANESE, A; BENTIVOGLIO, M. The organization of dopaminergic and non-dopaminergic mesencephalo-cortical neurons in the rat. *Brain Res* 1982; 238:421–425.

ALEXI, T; BORLONGAN, C.V; FAULL, R.L.M; WILLIAMS, C.E; CLARK, R.G; GLUCKMAN, P.D; HUGHES, P.E. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Prog. Neurobiol* 2000; 60: 409-470.

AMALRIC, M; MOUKHLES, H; NIEOULLON, A; DASZUTA, A. Complex deficits on reaction time performance following bilateral intrastriatal 6-OHDA infusion in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 1995; 7: 972–980.

ARAKI, T; MIKAMI, T; TANJI, H; MATSUBARA, M; IMAI, Y; MIZUGAKI, M; ITOYAMA Y. Biochemical and immunohistological changes in the brain of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated mouse. *Eur. J. Pharm. Sci* 2001; 12: 231-238.

ASHTON, J.C; GLASS, M. The cannabinoid CB2 receptor as a target for inflammation-dependent neurodegeneration. *Curr Neuropharmacol* 2007; 5:73–80.

BARRIO, J.R; HUANG, S.C; PHELPS, M.E. Biological imaging and molecular basis of dopaminergic disease. *Biochem. Pharmacol* 1997; 54: 341–348.

BECKER, G; MULLER, A; BRAUNE, S et al. Early diagnosis of Parkinson's disease. *J Neurol* 2002; (3):40–8.

BERG, D; YODIM, M.B; RIEDERER, P. Redox imbalance. *Cell Tissue Res* 2004; 318: 201-213.

BETARBET, R; SHERER, TB; GREENAMYRE, J.T. Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays* 2002; 24(4):308-318.

BISOGNO, T; BERRENDERO, F; AMBROSINO, G; CEBEIRA, M; RAMOS, J.A; FERNÁNDEZ-RUIZ, J et al. Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 256: 377–380.

BISOGNO, T; DI MARZO, V. Short- and long-term plasticity of the endocannabinoid system in neuropsychiatric and neurological disorders. *Pharmacol Res* 2007; 56: 428–442.

BISOGNO, T; MELCK, D; BOBROV, M.Y.U; GRETSKAYA, N.M; BEZUGLOV, V.V; DE PETROCELLIS, L. et al. N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. *Biochem J* 2000 351; 817–824.

BLANDINI, F; LEVANDIS, G; BAZZINI, E; NAPPI, G; ARMENTERO, M.T Time-course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes and behavioural alterations following intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine in the rat: new clues from an old model. *Eur J Neurosci* 2007; 25:397–405.

BLANDINI, F; NAPPI, G; TASSORELLI, C; MARTIGNONI, E Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson´s disease. *Prog. Neurobiol* 2000; 62: 63 – 88.

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

BORSINI, F; MELI, A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacol* 1988; 94: 147–160.

BOUCHER, A.A; VIVIER, L; METNA-LAURENT, M; BRAYDA-BRUNO, L; MONS, N; ARNOLD, J.C; MICHEAU, J. Chronic treatment with Delta(9)-tetrahydrocannabinol impairs spatial memory and reduces zif268 expression in the mouse forebrain. *Behav Pharmacol* 2009; 20: 45-55.

BRANDT, M; LABUDDA, K; KALBE, E; HILKER, R; EMMANS, D; FUCHS, G; KESSLER, J; MARKOWITSCH, H.J. Decision-making impairments in patients with Parkinson's disease. *Behav Neurol* 2004; 15: 77-85.

CAPITELLI, C; SERENIKI, A; LIMA M.M.S; REKSIDLER, A.B; TUFIK, S; VITAL, M.A.B.F. Melatonin attenuates tyrosine hydroxylase loss and hypolocomotion in MPTP-lesioned rats. *Eur J Pharmacol* 2008; 594 (1-3): 101-108.

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

CARR, W.J; YEE, L; GABLE, D; MARASCO, E. Olfactory recognition of conspecifics by domestic Norway rats. *J. Comp. Physiol. Psychol* 1976; 90, 821-828.

CHANG, J.W; WACHTEL, S.R; YOUNG, D; KANG, U.J. Biochemical and anatomical characterization of forepaw adjusting steps in rat models of Parkinson's disease: Studies on medial forebrain bundle and striatal lesions. *Neuroscience* 1999; 88: 617-628.

CHEN, H; JING, F.C; LI, C.L; TU, P.F; ZHENG, Q.S; WANG, Z.H. Echinacoside prevents the striatal extracellular levels of monoamine neurotransmitters from diminution in 6-hydroxydopamine lesion rats. *J Ethnopharmacol* 2007; 114:285-289.

CHOI, W.S; YOON, S.Y; OH, T.H; CHOI, E.J; O'MALLEY, K.L; OH, Y.J. Two distinct mechanisms are involved in 6-hydroxydopamine-and MPP+-induced dopaminergic neuronal cell death: role of caspases, ROS, and JNK. *J. Neurosci. Res* 1999; 57: 86-94.

COUSINS, M.S; SALAMONE, J.D. Involvement of ventrolateral striatal dopamine in movement initiation and execution: A microdialysis and behavioral investigation. *Neuroscience* 1996; 70: 849–859.

CRAFT, T.K; DEVRIES, A.C. Role of IL-1 in poststroke depressive-like behavior in mice. *Biol Psychiatry* 2006; 60:812-818.

CRISTINO, L; DE PETROCELLIS, L; PRYCE, G; BAKER, D; GUGLIELMOTTI, V; DI MARZO V. Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience* 2006; 139: 1405–1415.

CUMMINGS, J.L. Depression and Parkinson's disease: a review. *Am. J. Psychiatry* 1992; 149: 443-454.

DA CUNHA, C; GEVAERD, M.S; VITAL, M.A; MIYOSHI, E; ANDREATINI, R; SILVEIRA, R; TAKAHASHI, R.N; CANTERAS, N.S. Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. *Behav Brain Res* 2001; 28;124(1):9-18.

DANTZER, R; BLUTHE, R.M; KOOB, G.F; LE MOAL, M. Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides. *Psychopharmacol* 1987; 91: 363–368.

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

DAWSON, G.R; TRICKLEBANK, M.D. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends Pharmacol Sci* 1995; 16:33-36.

DE LAGO, E; DE MIGUEL, R; LASTRES-BECKER, I; RAMOS, J.A, FERNÁNDEZ-RUIZ, J. Involvement of vanilloid-like receptors in the effects of anandamide on motor behavior and nigrostriatal dopaminergic activity: in vivo and in vitro evidence. *Brain Res* 2004; 1007: 152–159.

DEUMENS, R; BLOKLAND, A; PRICKAERTS, J. Modeling Parkinson's Disease in Rats: An Evaluation of 6-OHDA Lesions of the Nigrostriatal Pathway *Exp Neurol* 2002; 175: 303–317.

DEVANE, W.A; DYSARZ F.A; JOHNSON, M.R; MELVIN, L.S; HOWLETT, A.C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 1988; 34: 605–613.

DEVOS, H; VANDENBERGHE, W; NIEUWBOER, A; TANT, M; BATEN, G; DE WEERDT, W. Predictors of fitness to drive in people with Parkinson disease. *Neurology* 2007; 69(14):1434-1441.

DI MARZO, V. The endocannabinoid system: its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation. *Pharmacol Res.* 2009 60(2):77-84.

DI MARZO, V; BIFULCO, M; DE PETROCELLIS, L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3(9):771-84.

DI MARZO, V; HILL, M.P; BISOGNO, T; CROSSMAN, A.R; BROTHIE, J.M. Enhanced levels of endogenous cannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB J* 2000; 14: 1432-1438.

DLUZEN, D.E; KEFALAS, G. The effects of intranasal infusion of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) upon catecholamine concentrations within olfactory bulbs and corpus striatum of male mice. *Brain Res.* 1996; 741: 215–219.

ESPEJO, E.F. Selective dopamine depletion within the medial prefrontal cortex induces anxiogenic-like effects in rats placed on the elevated plus maze. *Brain Res.* 1997; 11:762(1-2):281-4.

FALL, P.A; FREDRIKSON, M; AXELSON, O; GRANERUS, A.K. Nutritional and occupational factors influencing the risk of Parkinson's disease: a case-control study in southeastern Sweden. *Mov. Disord* 1999; 14: 28-37.

FERNANDEZ-ESPEJO, E; CARABALLO, I; DE FONSECA, F.R; EL BANOUA, F; FERRER, B; FLORES, J.A; GALAN-RODRIGUEZ, B. Cannabinoid CB1 antagonists possess antiparkinsonian efficacy only in rats with very severe nigral lesion in experimental parkinsonism. *Neurobiol Dis* 2005; 18: 591-601.

FERNÁNDEZ-RUIZ, J. The endocannabinoid system as a target for the treatment of motor dysfunction. *Br J Pharmacol* 2009; 156(7):1029-40.

FERNÁNDEZ-RUIZ, J; GONZÁLEZ, S. Cannabinoid control of motor function at the basal ganglia. *Handb Exp Pharmacol* 2005; 168:479-507.

FERRO, M.M; BELLISSIMO, M.I; ANSELMO-FRANCI, J.A; ANGELLUCCI, M.E; CANTERAS. 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* 2005 15; 148(1):78-87.

FUSCO, F.R; MARTORANA, A; GIAMPA, C; DE MARCH, Z; FARINI, D; D'ANGELO, V et al. Immunolocalization of CB1 receptor in rat striatal neurons: a confocal microscopy study. *Synapse* 2004; 53: 159–167.

GAONI, Y; MECHOULAM, R. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish, *J Am Chem Soc* 1964; 86: 1646–1647.

GEORGIEVSKA, B; KIRIK, D; ROSENBLAD, C; LUNDBERG, C; BJÖRKLUND, A. Neuroprotection in the rat Parkinson model by intrastriatal GDNF gene transfer using a lentiviral vector. *NeuroReport* 2002; 13: 75–82.

GEVAERD, M.S; TAKAHASHI, R.N; SILVEIRA, R; DA CUNHA, C. Caffeine reverses the memory disruption induced by intra-nigral MPTP injection in rats. *Brain Res Bull* 2001; 101:6.

GILADI, N; TREVES, T.A; PALEACU, D et al. Risk factors for dementia, depression and psychosis in long-standing Parkinson's disease. *J Neural Transm* 2000;107(1):59-71.

GLINKA, Y; YODIM, M.B. Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. *Eur. J. Pharmacol* 1995; 292: 329-332.

GOLDMAN, W.P; BATY, J.D; BUCKLES, V.D; SAHRMANN, S; MORRIS, J.C. Cognitive and motor functioning in Parkinson's disease – subjects with and without questionable dementia. *Arch. Neurol* 1998; 55: 674–680.

GONZÁLEZ, S; SCORTICATI, C; GARCÍA-ARENCIBIA, M; DE MIGUEL, R; RAMOS, J.A, FERNÁNDEZ-RUIZ, J. Effects of rimonabant, a selective cannabinoid CB1 receptor antagonist, in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* 2006; 1073-1074: 209-19.

GREGÓRIO; M.L, WIETZIKOSKI, E.C; FERRO, M.M; SILVEIRA, J.L; VITAL, M.A; DA CUNHA, C.J. Nicotine induces sensitization of turning behavior in 6-hydroxydopamine lesioned rat. *Neurotox Res* 2009; 15: 359-66.

GRIEBEL, G; STEMMELIN, J; SCATTON, B. Effects of the cannabinoid cb1 receptor antagonist rimonabant in models of emotional reactivity in rodents. *Biol Psychiatry* 2005; 57: 261-7.

GUPTA, A; BHATIA, S. Psychological functioning in patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism. Relat. Disord* 2000; 6: 185-190.

GUZMÁN, M; SÁNCHEZ, C; GALVE-ROPERH, I. Cannabinoids and cell fate. *Pharmacol Ther* 2002; 95(2):175-84.

HAMPSON, R.E; DEADWYLER, S.A. Cannabinoids, hippocampal function and memory. *Life Sci* 1999; 65: 715-23.

HANUS, L; ABU-LAFI, S; FRIDE, E; BREUER, A; VOGEL, Z; SHALEV, D.E. et al. 2-Arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB₁ receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 3662–3665.

HAY, J.F; MOSCOVITCH, M; LEVINE, B. Dissociating habit and recollection: evidence from Parkinson's disease, amnesia and focal lesion patients. *Neuropsychol* 2002; 40(8): 1324-34.

HENZE, C; EARL, C; SAUTTER, J; SCHMIDT, N; THEMANN, C; HARTMANN, A; OERTEL, WH. Reactive oxidative and nitrogen species in the nigrostriatal system following striatal 6-hydroxydopamine lesion in rats. *Brain Res* 2005; 1052:97–104.

HERKENHAM, M; LYNN, A.B; DE COSTA, B.R; RICHFIELD, E.K. Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Res* 1991; 547: 267–264.

HOHMANN, A.G; HERKENHAM, M. Localization of cannabinoid CB1 receptor mRNA in neuronal subpopulations of rat striatum: a double-label in situ hybridization study. *Synapse* 2000; 37: 71–80.

HUANG, S.M; BISOGNO, T; TREVISANI, .M.; AL-HAYANI, A.; DE PETROCELLIS, L; FEZZA, F. et al., An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 8400–8405.

IBGE (Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Censo Demográfico, 2000. Rio de Janeiro: IBGE.

JENNER, P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003; 53(3): S26-S38

JULIÁN, M.D; MARTIN, A.B; CUELLAR, B; RODRIGUEZ DE FONSECA, F; NAVARRO, M; MORATALLA, R et al. Neuroanatomical relationship between type 1 cannabinoid receptors and dopaminergic systems in the rat basal ganglia. *Neuroscience* 2003; 119: 309–318.

KIRIK, D; ROSENBLAD, C; BJORKLUND, A. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp. Neurol* 1998; 152:259–277.

KNOWLTON, B.J; MANGELS, J.A; SQUIRE, L.R. A neostriatal habit learning system in humans. *Science* 1996; 273: 1399-402.

KÖFALVI, A; RODRIGUES, R.J; LEDENT, C; MACKIE, K; VIZI, E.S; CUNHA, R.A et al. Involvement of cannabinoid receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rodent striatum: a combined immunochemical and pharmacological analysis. *J Neurosci* 2005; 25: 2874–2884.

LASTRES-BECKER, I.; CEBEIRA, M.; DE CEBALLOS, M.; ZENG BY; JENNER, P.; RAMOS, J.A.; FERNANDEZ-RUIZ, J.J. Increased cannabinoid CB1 receptor binding and activation of GTP-binding proteins in the basal ganglia of patients with Parkinson's disease and MPTP treated marmosets. *Eur J Neurosci* 2001; 14: 1827–1832.

LASTRES-BECKER, I; MOLINA-HOLGADO, F; RAMOS, J.A; MECHOULAM, R; FERNÁNDEZ-RUIZ, J. Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: relevance to Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2005; 19: 96–107.

LEE, C.S; SAUER, H; BJÖRKLUND, A. Dopaminergic neuronal degeneration and motor impairments following axon terminal lesion by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Neurosci* 1996; 72: 641–653.

LEENTJENS, A.F; VAN DEN AKKER, M; METSEMAKERS, J.F; LOUSBERG, R; VERHEY, F.R. Higher incidence of depression preceding the onset of Parkinson's disease: a register study. *Mov Disord* 2003; 18(4):414-8.

LEMKE, M.R; BRECHT, H.M; KOESTER, J; REICHMANN, H. Effects of the dopamine agonist pramipexole on depression, anhedonia and motor functioning in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 2006; 248: 266-270.

LINDNER, M.D; CAIN, C.K; PLONE, M.A; FRYDEL, B.R; BLANEY, T.J; EMERICH, D.F; HOANE, M.R Incomplete nigrostriatal dopaminergic cell loss and partial reductions in striatal dopamine produce akinesia, rigidity, tremor and cognitive deficits in middle-aged rats. *Behav Brain Res* 1999; 102:1–16.

LUNDQVIST, T. Cognitive consequences of cannabis use: comparison with abuse of stimulants and heroin with regard to attention, memory and executive functions. *Pharmacol Biochem Behav* 2005; 81: 319-30.

MACCARRONE, M; ROSSI, S; BARI, M; DE CHIARA, V; FEZZA, F; MUSELLA, A et al. Anandamide inhibits metabolism and physiological actions of 2-arachidonoylglycerol in the striatum. *Nat Neurosci* 2008; 11: 152–159.

MACKIE, K. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb Exp Pharmacol* 2005; 168: 299–325.

MAILLEUX, P; VANDERHAEGHEN, J.J. Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 1992; 48: 655–668.

MANEUF, Y.P; CROSSMAN, A.R; BROTCHE, J.M. The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 reduces D2, but not D1, dopamine receptor-mediated alleviation of akinesia in the reserpine-treated rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 1997; 148(1):265-70.

MARICLE, R.A; NUTT, J.G; CARTER, J.H. Mood and anxiety fluctuations in Parkinson's disease associated with levodopa infusion: preliminary findings. *Mov. Disord* 1995; 10: 329-332.

MARINUS, J; VISSER, M; MARTÍNEZ-MARTÍN, P; VAN HILTEN, J.J; STIGGELBOUT, A.M. A short psychosocial questionnaire for patients with Parkinson's disease: the SCOPA-PS. *J Clin Epidemiol* 2002; 56: 61-67.

MATSUDA, L.A.; LOLAIT, S.J; BROWNSTEIN, M.J; YOUNG, A.C; BONNER, T.I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned Cdna. *Nature* 1990; 346 561–564.

MAYEUX, R. The “serotonin hypothesis” for depression in Parkinson's disease. *Adv Neurol* 1990; 53:163–166.

MECHOULAM, R; BEN-SHABAT, S; HANUS, L; LIGUMSKY, M; KAMINSKI, N.E; SCHATZ, A.R; GOPHER, A; ALMOG, S; MARTIN, B.R; COMPTON, D.R; PERTWEE, R.G; GRIFFIN, G; BAYEWITCH, M; BARG, J; VOGEL, Z. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol* 1995; 50: 83–90.

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

MEZEY, E; TOTH, Z.E; CORTRIGHT, D.N; ARZUBI, M.K; KRAUSE, J.E; ELDE, R et al. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3655–3660.

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

MOREIRA, F.A; LUTZ, B. The endocannabinoid system: emotion, learning and addiction. *Addict Biol* 2008; 13: 196–212.

MORRIS, R.G.M; GARRUD, P; RAWLINS, J.N.P; O'KEEFE, J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 1982; 297: 681–683.

MUNRO S; THOMAS, K.L; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids, *Nature* 1993; 365: 61–65.

NILSSON, F.M, KESSING, L.V; BOLWIG, T.G. Increased risk of developing Parkinson's disease for patients with major affective disorder: a register study. *Acta Psychiatr Scand* 2001; 104:380–386.

NYBERG, P; NORDBERG, A; WESTER, .P; WINBLAD, B. Dopaminergic deficiency is more pronounced in putamen than in nucleus caudatus in Parkinson's patients. *Neurochem Pathol* 1983; 1: 193–202.

OERTEL, W.H; HOGLINGER, G.U; CARACENI, T; GIROTTI, F; EICHHORN, T; SPOTTKE, A.E; KRIEG, J.C; POEWE, W. Depression in Parkinson's disease. An update. *Adv. Neurol* 2001; 86: 373-383.

OLANOW, C.W; JENNER, P; BEAL, M.F. Cell death and neuroprotection in Parkinson's disease. *Ann. Neurol* 1998 44 (1): S1-S196.

ONAIWI, E.S; ISHIGURO, H; GONG, J.P; PATEL, S; MEOZZI, P.A; MYERS, L.et al., Brain neuronal CB2 cannabinoid receptors in drug abuse and depression: from mice to human subjects *Plos One* 2008; 3:1640.

OSEI-HYIAMAN, D; DEPETRILLO, M; PACHER, P; LIU, J; RADAIEVA, S; BÁT KAI, S et al. Endocannabinoid activation at hepatic CB₁ receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest* 2005; 115: 1298–1305.

OWEN, A.M; SAHAKIAN, B.J; HODGES, J.R; SUMMERS, B.A; POLKEY, C.E; ROBINS, T.W. Dopamine-dependent frontostriatal planning in early Parkinson's disease. *Neuropsychology* 1995; 9: 126–140.

PARASHOS, S.A, MARAGANORE, D.M, O'BRIEN, P.C, ROCCA, W.A. Medical services utilization and prognosis in Parkinson's disease: a population-based study. *Mayo Clin Proc* 2002; 77(9):918-25.

PARKINSON, J. An Essay on the Shaking Palsy. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2002; 14(2):222-36.

PAXINOS, G; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5th ed. San Diego: Academic Press; 2005.

PERTWEE, M. A natural high. *J Small Anim Pract* 2005; 46(4):208-9.

PETIT-DEMOULIERE, B; CHENU, F; BOURIN, M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacol* 2005; 177: 245–255.

PISANI, A; FEZZA, F; GALATI, S; BATTISTA, N; NAPOLITANO, S; FINAZZI-AGRÒ, A; BERNARDI, G; BRUSA, L; PIERANTOZZI, M; STANZIONE, P; MACCARRONE, M. High endogenous cannabinoid levels in the cerebrospinal fluid of untreated Parkinson's disease patients. *Ann Neurol* 2005; 57(5):777-9.

PORSOLT, R.D; ANTON, G; BLAVET, N; JALFRE, M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 1978; 47: 379–91.

PORTER, A.C; SAUER, J.M; KNIERMAN, M.D; BECKER, G.W; BERNA, M.J; BAO, J. et al. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB₁ receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 30: 1020–1024.

PORTER, C.C; TOTARO, J.A; STONE, C.A. Effect of 6-hydroxydopamine and some other compounds on the concentration of norepinephrine in the hearts of mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1963; 140:308-16.

PREDIGER, R.D.S; TAKAHASHI, R.N. Ethanol improves short-term social memory in rats. Involvement of opioid and muscarinic receptors. *Eur. J. Pharmacol* 2003; 462: 115–123.

PREDIGER, R.D; BATISTA, L.C; MEDEIROS, R; PANDOLFO, P; FLORIO, J.C; TAKAHASHI, R.N. The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2006; 202:391-403.

PREDIGER, R.D; DA CUNHA, C; TAKAHASHI, R.N Antagonistic interaction between adenosine A_{2A} and dopamine D₂ receptors modulates the social recognition memory in reserpine-treated rats. *Behav Pharmacol* 2005; 16(4):209-18

REMY, P; DODER, M; LEES, A; TURJANSKI, N; BROOKS, D. Depression in Parkinson' disease: loss of dopamine and noradrenaline innervations in the limbic system. *Brain* 2005; 128:1314–22.

RICHARD, I.H. Anxiety disorders in Parkinson's disease. *Adv Neurol* 2005; 96: 42-55.

RICHARD, I.H; FRANK, S; McDERMOTT, M.P; WANG, H; JUSTUS, A.W; LADONNA, K.A; KURLAN, R. The ups and downs Parkinson's disease: a prospective study of mood and anxiety fluctuations. *Cogn. Behav. Neurol* 2004; 17: 201-207.

ROEDTER, A; WINKLER, C; SAMII, M; WALTER, G. F; BRANDIS, A; NIKKHAH, G. Comparison of unilateral and bilateral intrastriatal 6-hydroxydopamine-induced axon terminal lesions: Evidence for interhemispheric functional coupling of the two nigrostriatal pathways. *J. Comp. Neurol* 2001; 432: 217–229.

SANTAMARIA, J; TOLOSA, E; VALLES, A. Parkinson's disease with depression: a possible subgroup of idiopathic parkinsonism. *Neurology* 1986; 36: 1130-1133.

SAUER, H; OERTEL, WH. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neurosci* 1994; 59:401-15.

SCHRAG, A. Psychiatric aspects of Parkinson's disease: an update. *J Neurol* 2004; 251:795–804.

SCHURMAN, A.G; VAN DEN AKKER, M; ENSINCK, K.T; METSEMAKERS, J.F; KNOTTNERUS, J.A; LEENTJENS, A.F; BUNTINX, F. Increased risk of Parkinson's disease after depression: a retrospective cohort study. *Neurology* 2002; 58: 1501–1504.

SHEARMAN, L.P; ROSKO, K.M; FLEISCHER, R; WANG, J; XU, S; TONG, X.S; ROCHA, B.A. Antidepressant-like and anorectic effects of the cannabinoid CB1 receptor inverse agonist AM251 in mice. *Behav Pharmacol* 2003; 14: 573-82.

SILVESTRO, R.B; FÜRSTENAU, L.; BATASSINI, C; OLIVEIRA, A; SOUZA, T.M. The footfault test as a screening tool in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's Disease. *J Neurosci Methods* 2009; 177: 317-321.

SIMOLA, N; MORELLI, M; CARTA, A.R. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotox Res* 2007; 11(3-4):151-67.

SKALISZ, L.L, BEJAMINI, V; JOCA, S.L; VITAL, M.A; DA CUNHA, C; ANDREATINI, R. Evaluation of the face validity of reserpine administration as an animal model of depression--Parkinson's disease association. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2002; 26(5): 879-83.

SLATTERY, D.A; MARKOU, A; CRYAN, J.F. Evaluation of reward processes in an animal model of depression. *Psychopharmacol (Berl)* 2007; 190:555-568.

SOLIS, O; LIMON, D.I; FLORES-HERNANDEZ, J; FLORES, G. Alterations in dendritic morphology of the prefrontal cortical and striatum neurons in the unilateral 6-OHDA-rat model of Parkinson's disease. *Synapse* 2007; 61:450-458.

STOOF, J.C.; WINOGRODZKA, A.; VAN MUISWINKEL, F.L.; WOLTERS, E.C.; VOORN, P.; GROENEWEGEN, H.J.; BOOIJ, J.; DRUKARCH, B. Leads for the development of neuroprotective treatment in Parkinson's disease and brain imaging methods for estimating treatment efficacy. *Eur. J. Pharmacol* 1999; 375: 75-86.

SUGIURA, T; KONDO, S; SUKAGAWA, A; NAKANE, S; SHINODA, A; ITOH, K. et al. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 215: 89-97.

SUZUKI, W.A. Associative learning signals in the brain. *Prog Brain Res* 2008; 169: 305-20.

TERRANOVA, J.P; STORME, J.J; LAFON, N; PÉRIO, A; RINALDI-CARMONA, M; LE FUR, G; SOUBRIÉ, P. Improvement of memory in

rodents by the selective CB1 cannabinoid receptor antagonist, SR 141716. *Psychopharmacol* 1996; 126(2):165-72.

TSOU, K; BROWN, S; SAÑUDO-PEÑA, M.C; MACKIE, K; WALKER, J.M Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB₁ receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 1998; 83: 393–411.

TZAVARA, E.T; DAVIS, R.J; PERRY, K.W; LI, X; SALHOFF, C; BYMASTER, F.P; WITKIN, J.M; NOMIKOS, G.G. The CB1 receptor antagonist SR141716A selectively increases monoaminergic neurotransmission in the medial prefrontal cortex: implications for therapeutic actions. *Br J Pharmacol* 2003; 138: 544-53.

TZAVARA, E.T; LI, D.L; MOUTSIMILLI, L; BISOGNO, T; DI MARZO, V; PHEBUS, L.A et al. Endocannabinoids activate transient receptor potential vanilloid 1 receptors to reduce hyperdopaminergic-related hyperactivity: therapeutic implications. *Biol Psychiatry* 2006; 59: 508–515.

UCHIGASHIMA, M; NARUSHIMA, M; FUKAYA, M; KATONA, I; KANO, M; WATANABE, M. Subcellular arrangement of molecules for 2-arachidonoyl-glycerol-mediated retrograde signaling and its physiological contribution to synaptic modulation in the striatum. *J Neurosci* 2007; 27: 3663–3676.

UNGERSTEDT, U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* 1968; 5:107-10.

UNGERSTEDT, U. Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta. Physiol. Scand. Suppl* 1971; 367: 95–122.

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

VAN SICKLE, M.D; DUNCAN, M; KINGSLEY, P.J; MOUIHATE, A; URBANI, P; MACKIE, K. et al. Identification and functional

characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors, *Science* 2005; 310: 329–332.

VANACORE, N; NAPPO, A; GENTILE, M; BRUSTOLIN, A; PALANGE, S; LIBERATI, A; DI REZZE, S; CALDORA, G; GASPARINI, M; BENEDETTI, F; BONIFATI, V; FORASTIERE, F; QUERCIA, A; MECO, G. Evaluation of risk of Parkinson's disease in a cohort of licensed pesticide users. *Neurol. Sci* 2002; 23(2): S119-S120.

WIELINSKI, C.L; ERICKSON-DAVIS, C; WICHMANN, R; WALDE-DOUGLAS, M; PARASHOS, S.A. Falls and injuries resulting from falls among patients with Parkinson's disease and other parkinsonian syndromes. *Mov Disord* 2005; 20(4):410-415.

WITJAS, T; KAPHAN, E; AZULAY, J.P; BLIN, O; CECCALDI, M; POUGET, J; PONCET, M; CHERIF, A.A. Nonmotor fluctuations in Parkinson's disease: frequent and disabling. *Neurology* 13: 408-413, 2002.

WOODS, S.P, TROSTER. A.I: Prodromal frontal executive dysfunction predicts incident dementia in Parkinson's disease. *J Int Neuropsychol Soc* 2003; 9: 17–24.