

WILLIAN GARGEL NUNES

**O EFEITO DA LACTACISTINA COMO MODELO ANIMAL DA
DOENÇA DE PARKINSON, AVALIANDO O COMPORTAMENTO
MOTOR E NÃO MOTOR DOS ANIMAIS**

CAMPO GRANDE

2019

WILLIAN GARGEL NUNES

**O EFEITO DA LACTACISTINA COMO MODELO ANIMAL DA
DOENÇA DE PARKINSON, AVALIANDO O COMPORTAMENTO
MOTOR E NÃO MOTOR DOS ANIMAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Albert Schiaveto de Souza

CAMPO GRANDE

2019

FOLHA DE APROVAÇÃO

WILLIAN GARGEL NUNES

O EFEITO DA LACTACISTINA COMO MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON, AVALIANDO O COMPORTAMENTO MOTOR E NÃO MOTOR DOS ANIMAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre

Resultado _____

Campo Grande (MS), 30 de setembro de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Albert Schiaveto de Souza (Presidente)
UFMS – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Alberto Ferreira Donatti
UFMS – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Prof. Dra. Karla de Michelis Mograbi
Estácio de Sá

Prof. Dra. Paula Felipe Martinez (Suplente)
UFMS - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

DEDICATÓRIA

Ao meu Deus.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Grande Arquiteto do Universo pois sem Seu inestimável Poder e Sabedoria não haveria chegado até onde estou.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo financiamento desse estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da UFMS e todos seus colaboradores e parceiros.

Agradeço em especial ao meu professor e orientador Dr. Albert Schiaveto de Souza, qual auxiliou-me em todas as etapas guiando pelo caminho correto, fornecendo seu conhecimento e tempo para que tudo seja possível, meu respeito e eterna gratidão.

Agradeço à minha amada esposa Lais Cristina, que em todos os momentos esteve ao meu lado, fornecendo seu apoio incondicional, compreendendo meus momentos de ausência e confortando quando presente.

Ao professor Dr. Alberto Ferreira Donatti, que mesmo antes do projeto e durante toda sua execução auxiliou-me com seu conhecimento e experiência.

A todos familiares, que caminharam em conjunto.

A colegas e todos outros que de algum modo, direta ou indiretamente colaboraram para a realização desse projeto.

“The greater the difficulty, the more the glory in surmounting it.”

Epicurus

RESUMO

NUNES, W.G. O EFEITO DA LACTACISTINA COMO MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON, AVALIANDO O COMPORTAMENTO MOTOR E NÃO MOTOR DOS ANIMAIS Campo Grande- MS; 2019. [Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

A Doença de Parkinson é uma doença com comprometimento principal da função motora extrapiramidal, caracterizado por uma grave perda de neurônios dopaminérgicos e a presença de aglomerados proteicos. Com a descoberta do Sistema Ubiquitina Proteassoma em lesões no tecido nervoso dos núcleos da base, supõe que sua falha favorece à agregação proteica e morte neuronal. Neste estudo comparamos modelos animais experimentais, utilizando para tal, 6-OHDA e Lactacistina, fármaco esse que atua na inibição do sistema ubiquitina proteassoma, que nesse estudo será por lesão unilateral na substância nigra parte compacta através do feixe prosencefálico medial. Foram utilizados 30 *Mus musculus* machos 30-40gramas, submetidos à cirurgia estereotáxica para infusão de 5µg de lactacistina e 3µg de 6-OHDA, e posteriormente submetidos à avaliação motora e não motora nos testes de: campo aberto, suspensão pela cauda, comportamento rotatório e avaliação da marcha. Na análise estatística dos dados foi considerado um nível de significância de 5%. Os resultados mostram que animais lesionados por lactacistina não apresentaram alterações motoras e não motoras significativas comparadas aos animais lesionados por 6-OHDA e ao grupo controle, observados nos testes de campo aberto e avaliação da marcha onde a presença de marcha festinante foi característica dos animais do grupo lactacistina, os animais lesionados por lactacistina apresentaram alterações emocionais, fato observado no teste de suspensão pela cauda, o comportamento rotatório tanto ipsilateral como contralateral, o grupo lactacistina apresentou maiores rotações comparadas ao grupo controle, corroborando com resultados obtidos pelos animais do grupo 6-OHDA, contudo um melhor resultado foi obtido nos momentos finais do experimento de comportamento rotatório, sugerindo assim um melhor efeito da lactacistina a longo prazo. A lactacistina se mostrou eficaz em demonstrar alterações motoras e não motoras apresentando um melhor desempenho em demonstrar efeitos de sinais e sintomas da doença de Parkinson, do que os animais do grupo 6-OHDA.

Palavras-chave: Ubiquitina. Proteasoma. Lactacistina. 6-OHDA. Parkinson.

ABSTRACT

NUNES W.G. L LACTACISTIN EFFECT AS AN ANIMAL MODEL OF PARKINSON'S DISEASE, EVALUATING MOTOR AND NON-MOTOR BEHAVIOR OF ANIMALS
Campo Grande- MS; 2019. [Dissertation – Federal University of Mato Grosso do Sul].

Parkinson's disease is a disease with major impairment of extrapyramidal motor function, characterized by severe loss of dopaminergic neurons and the presence of protein clusters. With the discovery of the Ubiquitin Proteasome System in lesions in the base nucleus nervous tissue, it assumes that its failure favors protein aggregation and neuronal death. In this study we compared experimental animal models using 6-OHDA and Lactacystin, which drug inhibits the proteasome ubiquitin system, which in this study will be by unilateral lesion in the nigra compact part through the medial forebrain beam. Thirty male *Mus musculus* 30-40 grams were submitted to stereotactic surgery for infusion of 5µg lactacystin and 3µg of 6-OHDA, and subsequently submitted to motor and non-motor evaluation in the tests of: open field, tail suspension, rotational behavior and gait assessment. Statistical analysis of the data considered a significance level of 5%. The results show that lactacystin-injured animals showed no significant motor and non-motor alterations compared to the 6-OHDA-injured animals and the control group, observed in the open field tests and gait evaluation where the presence of festinating gait was characteristic of the animals of the group. In the lactacystine group, the lactacystine-injured animals presented emotional alterations, a fact observed in the tail suspension test, the ipsilateral and contralateral rotational behavior, the lactacystine group presented higher rotations compared to the control group, corroborating the results obtained from the group 6 animals. OHDA, however, a better result was obtained in the final moments of the rotational behavior experiment, thus suggesting a better long-term effect of lactacystin. Lactacystin was effective in demonstrating motor and nonmotor abnormalities showing better performance in demonstrating effects of signs and symptoms of Parkinson's disease than animals in the 6-OHDA group.

KEY WORDS: Parkinson. Lactacystin, Ubiquitin. Proteasome. 6-OHDA.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	Representação dos núcleos da base (via direta e via indireta). Setas em vermelho indicam neurotransmissão excitatória e setas em preto neurotransmissão inibitória.....	15
FIGURA 2 –	Representação do processo de funcionamento do Sistema Ubiquitina Proteassoma.....	16
FIGURA 3 –	Representação esquemática de secção coronal do cérebro de camundongo demonstrando a região de administração lenta de 6-OHDA.....	24
FIGURA 4 –	Representação gráfica da cirurgia estereotáxica em roedores, para implantação de cânulas direcionadas ao estriado.....	24
FIGURA 5 –	Bomba de micro infusão utilizada para a colocação das drogas no estriado bilateralmente.....	25
FIGURA 6 –	Representação do cronograma das análises motoras e não motoras. Letra (d) representa dias.....	26
FIGURA 7 –	Foto ilustrando o teste de campo aberto.....	27
FIGURA 8 –	Esquema ilustrando os parâmetros comportamentais do teste de campo aberto.....	27
FIGURA 9 –	Representação da avaliação funcional da marcha. Pegadas dos camundongos mostrando o desvio látero-lateral (DLL), desvio ântero-posterior (DAP), comprimento do passo direito (CPD), comprimento do passo esquerdo (CPE) e Base de sustentação (BS). Pegadas em preto são referentes aos membros posteriores, enquanto que pegadas em vermelho são referentes aos membros anteriores.....	29
FIGURA 10 –	Representação esquemática do comportamento rotatório de ratos unilateralmente lesados com 6-OHDA após desafio com agonista indireto (figura central) ou direto (figura à direita) dos receptores dopaminérgicos.....	30
FIGURA 11 –	Representação do procedimento de perfusão cardíaca.....	31
FIGURA 12 –	Gráfico referente à número de quadrantes percorridos na área central no teste de campo aberto.....	35
FIGURA 13 –	Gráfico referente à número de quadrantes percorridos na área periférica no teste de campo aberto.....	36
FIGURA 14 –	Gráfico referente à número de quadrantes percorridos no teste de campo aberto.....	37

FIGURA 15 –	Gráfico referente à número de erguimentos realizados no teste de campo aberto.....	38
FIGURA 16 –	Gráfico referente à número de comportamentos de autolimpeza realizados no teste de campo aberto.....	39
FIGURA 17 –	Gráfico referente ao tempo despendido em segundos nos comportamentos de autolimpeza realizados no teste de campo aberto.....	40
FIGURA 18 –	Gráfico referente quantidade de bolos fecais encontrados durante a realização do teste de campo aberto.....	41
FIGURA 19 –	Gráfico referente ao tempo em segundos de mobilidade no teste de suspensão pela cauda.....	43
FIGURA 20 –	Gráfico referente ao tempo em segundos de imobilidade no teste de suspensão pela cauda.....	44
FIGURA 21 –	Gráfico referente ao comprimento do passo em centímetros no teste de avaliação da marcha.....	46
FIGURA 22 –	Gráfico referente ao desvio anteroposterior do passo em centímetros no teste de avaliação da marcha.....	47
FIGURA 23 –	Gráfico referente ao desvio látero-lateral do passo em centímetros no teste de avaliação da marcha.....	48
FIGURA 24 –	Gráfico referente à base de sustentação do passo em centímetros no teste de avaliação da marcha.....	49
FIGURA 25 –	Gráfico referente quantidade à quantidade de rotações ipsilaterais durante a realização do teste comportamento rotatório.....	51
FIGURA 26 –	Gráfico referente quantidade à quantidade de rotações contralaterais durante a realização do teste comportamento rotatório.....	52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	Resultados referentes aos parâmetros avaliados, no teste de campo aberto, em cada grupo experimental e em cada momento de análise.....	34
TABELA 2 –	Resultados referentes aos parâmetros avaliados, no teste de suspensão pela cauda, em cada grupo experimental e em cada momento de análise.....	42
TABELA 3 –	Resultados referentes aos parâmetros avaliados, no teste de avaliação da marcha, em cada grupo experimental e em cada momento de análise.....	45
TABELA 4 –	Resultados referentes ao número de rotações realizadas, no teste de comportamento rotatório, em cada grupo experimental e em cada momento de análise.....	50

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 –	Quadro com resultados das análises comparativas entre momentos e entre grupos.....	53
QUADRO 2 –	Resultados referentes aos parâmetros avaliados, no teste de suspensão pela cauda, em cada grupo experimental e em cada momento de análise.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-OHDA – 6-hidroxidopamina – ou – 2,4,5-tri-hidróxido fenil tilamina.

ABC – *Avidin-Biotin Complex* – Complexo Avidina-Biotina.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente.

d – Dias.

DP – Doença de Parkinson.

DUBs – Enzima desubiquitinadora.

E1 – Enzima ativadora de Ubiquitina.

E2 – Enzima conjugadora de Ubiquitina.

E3 – Enzima ubiquitina ligase.

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* – Cromatografia líquida de alta eficiência.

i.c. – Intracerebral.

i.p. – Intraperitoneal.

LC – Lactacistina.

M – Mol.

MFB – *Medial Forebrain Bundle* – feixe prosencefálico medial.

mRNA – *Messenger Ribonucleic Acid* – Ácido ribonucleico mensageiro.

NaCl – Cloreto de Sódio.

PBS – *Phosphate Buffered Saline* – Tampão fosfato salino.

pH – Potencial de Hidrogênio.

s.c. – Subcutânea.

SNJ – Soro Nominal de Juntamento.

SNpC – Substância Nigra parte Compacta.

TH – Tirosina Hidroxilase.

TMO – Tempo Médio de Imobilidade.

Ub – Ubiquitina.

UFMS – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

UPS – *Ubiquitine Proteasome System* – Sistema ubiquitina proteassoma.

LISTA DE SÍMBOLOS

cm – Centímetros.

cm² – Centímetros quadrados.

g – Grama

Kg – Quilograma.

mg – Miligrama.

min – Minuto.

mm – Milímetro.

n – Tamanho da amostra.

°C – Graus Célsius.

µg – Micrograma.

µL – Microlitro.

% – Percentual.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	11
2.OBJETIVOS	20
2.1Objetivo Geral.	20
2.2 Objetivos específicos.	20
3. METODOLOGIA	21
3.1 Animais.....	21
3.2 Drogas.....	21
3.3 Grupos.....	22
3.4 Procedimento cirúrgico Estereotaxia	23
3.6 Análise comportamental e motora.	25
3.6.1 Teste do Campo Aberto.	26
3.7.2 Teste de Suspensão Pela Cauda.....	28
3.7.3 Avaliação Funcional da Marcha.	28
3.7.4 Comportamento Rotatório.	29
3.7 Eutanásia por perfusão cardíaca.	30
3.5 Preparação do tecido..	32
3.7 Descarte dos animais.....	32
3.8 Análise estatística.	32
4. RESULTADOS	34
4.1 Campo Aberto.	34
4.1.1 Exploração central.....	35
4.1.2 Exploração periférica.....	36
4.1.3 Quantidade de Quadrantes.	37
4.1.4 Exploração Vertical.	38
4.1.5 Comportamento de Autolimpeza.....	38
4.1.6 Tempo de Autolimpeza.....	39
4.1.7 Quantidade de Bolos Fecais.	40
4.2 Suspensão pela Cauda.	41
4.2.1 Tempo em Movimento.....	42
4.2.2 Tempo em Imobilidade.....	43
4.3 Avaliação da marcha.....	44
4.3.1 Comprimento do passo.	45

4.3.2 Desvio anteroposterior.	46
4.3.3 Desvio látero-lateral.....	47
4.3.4 Base de sustentação.....	48
4.4 Comportamento rotatório.....	49
4.4.1 Rotação Ipsilateral.	50
4.4.2 Rotação contralateral.	51
5. DISCUSSÃO.	55
6. CONCLUSÃO.	62
REFERÊNCIAS.....	63
APÊNDICE I	78

1. INTRODUÇÃO

A Doença de Parkinson (DP), é definida como uma doença neurodegenerativa progressiva caracterizada por tremores, redução de movimento, rigidez muscular, instabilidade postural, depressão, alterações cognitivas, ansiedade, transtornos do sono, distúrbio olfatórios. Ocasionada pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos, relacionado a uma série de alterações morfofisiológicas localizadas em suma nos gânglios basais, em predominância na substância nigra parte compacta (SNc) e formação característica de corpos de Lewy (SPILLANTINI, M.G. *et al.* 1998; DAUER, W.; PRIYADARSHI, S. *et al.* 2001; MC'NAUGHT, K.S.P *et al.*, 2004; EKMAN, L.L., 2011; ANTONY, P.M.A. *et al.*, 2013; SCHAPIRA, A. H. V.; CHAUDHURI, K. R.; JENNER, P. 2017).

Ela é a segunda doença neurodegenerativa progressiva mais comum na humanidade, atingindo aproximadamente 0,3% de toda a população e 1-2% em adultos maiores de 60 anos, sendo a maioria dos casos esporádicos, sua prevalência no sexo masculino 2% frente ao feminino 1,3% para desenvolvimento da DP. Estudos sobre a incidência mundial da DP é de 15 à 19 casos por 100 mil habitantes/ano sendo que na maioria demonstra o pico de incidência mantém entre 70 a 79 anos de idade, estimativas de um aumento da incidência com o avançar da idade, e com uma projeção de 8,7 a 9,3 milhões de indivíduos em 2030 diagnosticados com a DP (SELKOE, 2004; DE LAU, L.M.; BRETELER, M.M, 2006; FLEURY.V., *et al.* 2018).

O agente etiológico continua até o momento desconhecido, porém a maioria dos casos tem como hipótese a combinação de agentes genéticos ou por mutações genéticas familiares, ambientais e comportamentais (XIAO, Q.; YANG, S.; LE, W., 2015). Ainda como a exposição à agentes químicos (herbicidas, pesticidas, adubos), por ingestão de água ou alimentos contaminados por esses agentes químicos ou por micro-organismos Actinomicetos (*Streptomyces*) esse encontrado em todo o globo terrestre, presente no solo e ambientes aquáticos, contaminando raízes de vegetais e tubérculos, que como síntese de seu metabolismo produzem lactacistina e epoxomicina que podem levar a alterações no sistema ubiquitina proteassoma (UPS), estima-se que uma das principais razões para essa perda neuronal seja uma falha no sistema ubiquitina proteassoma na degradação proteica, podendo essa falha ser induzida por agentes externos como por exemplo a lactacistina (LC) (ZHANG, Z *et al.*, 2012; KONIECZNY, J. *et al.* 2014). podendo estar associado a taxas elevadas da

Doença de Parkinson em áreas rurais (PRIYADARSHI *et al.*, 2001; XIAO, Q.; YANG, S.; LE, W., 2015).

Há ainda outros fatores correlacionados positivamente com o surgimento da DP, esses ainda não são conclusivos como: exposição ao manganês e chumbo, hipertensão arterial, ooforectomia. Em contrapartida, um menor risco está associado exposição ao tabaco, à ingestão de chás: preto, verde e café, e reposição de estrogênio após a menopausa. Algumas evidências limitadas de associação negativa, ou seja ação preventiva, sendo: consumo de álcool, atividade física, uso de alimentos antioxidantes, consumo de cafeína e com o hábito de fumar são consideradas com uma maior consistência (ELBA, Z.; MOISAN, F. ; 2008; WIRDEFELDT, K. *et al.*, 2011).

A hipótese de surgimento da DP por fatores ambientais foi postulada quando em 1982 usuários de meperidina sintética desenvolveram a síndrome parkinsoniana, e estudos posteriores confirmaram que tal substância estava contaminada por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridinimo (MPTP), e que os sintomas causados foram semelhantes à DP, visto que os efeitos tóxicos dos metabólicos do MPTP na indução do quadro de parkinsonismo em humanos é irreversível e estável devido aos danos de neurônios dopaminérgicos pelo MPTP (LANGSTON, J. W.; LANGSTON, E. B.; IRWIN, I. 1984; LANGSTON, J. W. *et al.*, 1999).

Diversos estudos já identificaram e demonstram que genes causadores da DP familiar monogênica de herança autossômica recessiva ou dominante e mutações estão vinculados à DP, sendo os genes *α -sinuclína (SNCA)*, *LRRK2*, *GBA*, *PINK1*, *ATP13A2 (ATPase tipo 13A2)*, *DJ-1*, *parkina*, *PARK5 (ubiquitina C-terminal hidrolase L1)* dentre outros (ANTONY, P.M.A. *et al.*, 2013).

Estudos mostram que a DP está relacionada a uma série de alterações morfofisiológicas e a morte de células secretoras de dopamina na SNc, e também a perda de células produtoras de acetilcolina no núcleo pedunculopontino; essa perda celular é causada por inúmeros fatores tais como: estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, processos inflamatórios, falha no UPS na degradação proteica e apoptose celular (MARK, M., 2005; LEVY, O.A. *et al.*, 2009; BENSAID, M. *et al.*, 2016).

Estudos demonstram que após a perda de aproximadamente 80% de neurônios dopaminérgicos aparecem alterações motoras e não motoras. Com relação aos sintomas da DP, podemos encontrar tanto sintomas motores: rigidez, hipocinesia, tremor em repouso, “congelamento” durante o movimento, instabilidade; como não motores: fadiga, dor, depressão, psicose, hipotensão postural, distúrbios

gastrointestinais, alteração do ciclo circadiano, distúrbios olfativos, alterações da percepção visual, depressão, ansiedade, demência (EKMAN, L.L., 2011; PONT-SUNYER, C., *et al.*, 2015). Efeitos não motores podem apresentar-se tanto previamente aos motores como no decorrer dos anos, (LI, X. *et al.*, 2013; PONT-SUNYER, C. *et al.*, 2015).

Apresentações clínicas variam entre os casos da DP onde 80% de causa mais comum da síndrome parkinsoniana, esta é caracterizada por sinais clássicos: tremores, bradicinesia, rigidez e instabilidade postural, os sintomas geralmente iniciam de modo unilateral, evoluindo para a bilateralidade (WEINTRAUB, D.; COMELLA, C.L.; HORN, S. 2008).

Segundo Weintraub *et al.*, (2008), o sintoma mais comum é o tremor em repouso, esse mais frequentemente apresentado por pacientes jovens e a bradicinesia em pacientes idosos. O tremor apresenta-se mais visível, todavia a bradicinesia ou acinesia é o sintoma mais debilitante da doença e um dos últimos sintomas apresentáveis, assim como alterações na marcha, já com quadro mais avançado da DP é a instabilidade postural. Outras alterações motoras podem surgir mais precocemente sem a percepção prévia do próprio paciente como a diminuição na mímica da face, fala monotônica e flexão de braço com perda do balançar (LEES, J. HARDY, J. REVESZ, T. 2009).

Conforme também Braak *et al.*, (2003) e Langston (2006), relatam que alterações não motoras precedem as alterações motoras da DP, tais sintomas como: problemas cognitivos e psiquiátricos, distúrbios autonômicos, alterações circadianas e sensoriais, esses surgem anos ou décadas antes dos sintomas motores, não apenas sintomas motores caracterizariam a DP mais sim a totalidade de sintomas motores e não motores, visto que essa doença apresenta-se de modo complexo.

A demência ou seu risco aparentemente está mais vinculado ao fator idade do que ao grau ou duração da DP, conforme Brown *et al.* (2001) a neurodegeneração clássica da DP está criticamente vinculada à processos de memória e aprendizagem. No entanto, segundo Dubois e Pillon (1997) relatam que deficiências de memória ocorrem comumente nos estágios iniciais da DP.

Todos os sintomas da DP tanto clássicos motores assim como problemas cognitivos, comportamentais, demência, distúrbios emocionais, apraxia de fala, depressão, dor, dentre muitos outros não-motores impactarão na qualidade de vida do portador, e tendo em vista que a qualidade de vida é um fator multi-dimensional:

física, mental e social (OPARA *et al.*, 2012). Foi constatado no Brasil que a duração e gravidade da DP, bem como o número de pessoas quais moram no mesmo lar que o doente foram os mais importantes preditores da qualidade de vida dos portadores da DP (SCHESTATSKY, P. *et al.*, 2006).

Para melhor compreender os danos fisiológicos que a DP acarreta, faz-se necessário entender quais áreas do sistema nervoso são afetadas, sendo essas principalmente os núcleos da base, que por sua vez incluem os núcleos: caudado, putâmen, globo pálido, núcleo subtalâmico e substância negra; o sub conjunto globo pálido e putâmen (núcleo lentiforme), assim como caudado e putâmen (estriado) estão localizados no cérebro. O núcleo subtalâmico se localiza inferiormente ao tálamo e lateralmente ao hipotálamo (diencéfalo); a substância nigra está localizada no mesencéfalo e possui dois subconjuntos a reticular e a compacta, essa responsável por proporcionar dopamina ao estriado. (KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. 2014).

Na substância negra, mais especificamente a parte compacta é a principal fornecedora de dopamina (DA) para o estriado. Já a parte reticular e porções internas do globo pálido são vias de saída do sistema de núcleos da base, essas vias de saída inibem o tálamo motor e o núcleo pedunculo pontino do mesencéfalo (KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. 2014).

O correto funcionamento dos núcleos da base é essencial para a execução de movimentos normais, todavia os neurônios desse núcleo não possuem conexão direta com neurônios motores inferiores. A participação na influência é exercida de modo indireto por meio do tálamo e de áreas de planejamento motor situadas no córtex cerebral e pelo núcleo pedunculo pontino (KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M., 2014).

As projeções dos neurônios dopaminérgicos da SNc modulam a transmissão de informações por meio de um efeito duplo-dependente do receptor ativado no estriado. Sua via direta, há ativação dos receptores de dopamina D1 e D5 estes excitam os núcleos de saída, facilitando a função motora. Já indireta, de saída, os receptores de dopamina ativados são os D2, D3 e D4 que por sua vez promovem um efeito inibitório sendo um efeito inibidor da atividade motora (NELSON, A.B.; KREITZER, A.C. 2014).

Na DP há a perda de DA que é liberada pela SNc para o estriado, resultando em efeitos distintos tanto na via direta como indireta. Na via indireta há a facilitação

das atividades neuronais, onde o estriado aumenta a inibição do globo pálido que por sua vez aumenta a atividade do núcleo subtalâmico. E na via direta, com efeito contrário, reduzindo a atividade, pois o estriado diminui a inibição dos núcleos de saída ocasionando um aumento de sua atividade inibitória no tálamo e tronco encefálico, sendo assim um facilitador para movimentos involuntários e dificultando os voluntários, melhor ilustrado na Figura 1. Fato presente na DP onde a via indireta está hiperativa, a atividade do globo pálido se torna sincronizada o que favorece oscilações patológicas nos núcleos da base resultando em distúrbios motores (REDGRAVE, P.; *et al.*, 2010; GITTIS, A. H.; *et al.*, 2014).

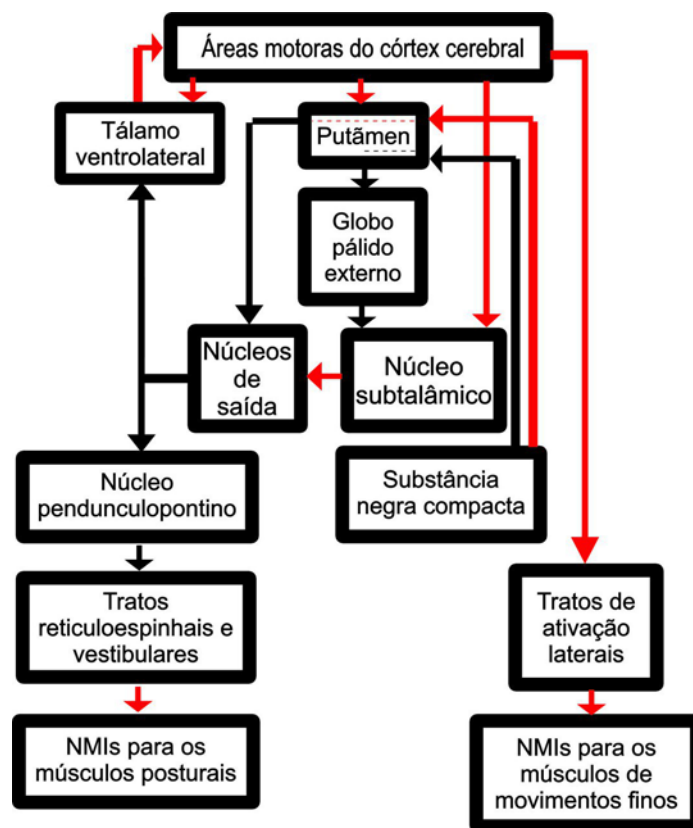


Figura 1 - Representação dos núcleos da base (via direta e via indireta). Setas em vermelho indicam neurotransmissão excitatória e setas em preto neurotransmissão inibitória. (EKMAN, 2000).

O UPS está presente em todas as células animais e é um processo que possui um papel importante na dinâmica celular, desde a degradação proteica, regulação do ciclo celular, síntese de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) e na resposta inflamatória. Um dos passos desse sistema é chamado de ubiquitinação, trata-se de um processo de marcação e reconhecimento de proteínas que não são desejáveis. O UPS é resultante da atuação de dois complexos proteicos, a ubiquitina e o proteassoma. A ubiquitina (Ub) trata-se de uma proteína de 76 aminoácidos, contendo

7 lisinas, das quais são capazes de ligarem-se a outras ubiquitina e formar uma cadeia de poliubiquitina. Já o complexo proteico chamado proteassoma, é capaz de degradar proteínas indesejadas ora marcadas pela ubiquitina em oligopeptídios (pequenas cadeias de 7 ou 9 aminoácidos), sendo essa degradação proteica conhecida como UPS, a qual está presente todos os processos celulares. (CIECHANOVER, A., 1998, GLICKMAN, M.H.; ADIR, N., 2004).

Nesse sistema a ubiquitinação atua no controle de degradação de proteínas, onde a ativação da Ub com a enzima ativadora de Ub (E1) é transferida para uma enzima conjugadora de Ub (E2) transferindo a Ub a enzima Ub ligase (E3) a qual liga a Ub a proteína (que será marcada para degradação), onde o proteassoma reconhece a proteína marcada pela ubiquitina, e pôr fim realiza a degradação resultando em complexos de aminoácidos menores. A ubiquitinação é um processo que pode ser revertido através da ação da enzima desubiquitinadora (DUBs), antes de que a proteína alvo entre em contato com o proteassoma, esse processo está ilustrado na Figura 2 (ZHANG, Y. *et al.*, 2001; BROEMER, M.; MEIER, P., 2009; TAURIELLO, D.V.F.; MAURICE, M.M., 2010; ZHANG, Z. *et al.*, 2012).

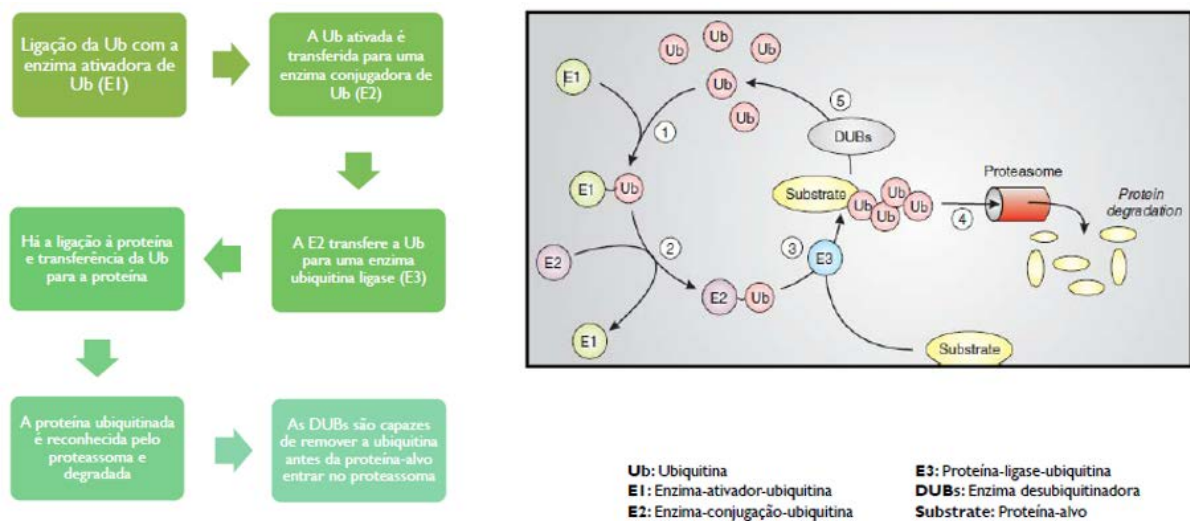


Figura 2 – Representação do processo de funcionamento do Sistema Ubiquitina Proteassoma. (Adaptado ZHANG, Z. *et al.*, 2012).

Na DP, estudos demonstram que mutações genéticas de genes codificadores de enzimas do UPS, parkin e ubiquitina C-terminal hidrolase L1. E que o gene parkin codifica a proteína parkin, e essa funciona como E3, favorecendo a ligação da Ub à proteína alvo. Entende-se que a falha na codificação da E3 e outras enzimas do UPS estão associados à origem de corpos de Lewy, pois a maior parte dessas estruturas

encontram-se proteínas ubiquitinizadas, onde o gene mutado leva à síntese de proteínas parkin não funcionais, ocasionando um aumento da concentração proteica tóxica. (KITADA, T. *et al.*, 1998; LEROY, E. *et al.*, 1998; ZHANG, Y. *et al.*, 2001; KLEIN, C.; WESTERNBERGUER, A., 2012; DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L., 2014).

Em casos de parkinsonismo esporádico há uma falha/defeito do proteassoma 26S na sua quantidade de anéis, no complexo catalítico central 20S nos neurônios dopaminérgicos da substância nigra parte compacta (SNpC) (VOGES, D.; ZWICKL, P.; BAUMEISTER, W., 1999), visto que tais anéis executam uma função estrutural, a diminuição no seu número acarreta comprometimento na atividade do proteassoma 26S, levando a acumulação de proteínas (α -sinucleína, tau, entre outras), tendo como resultado formação de corpos de Lewy (SPILLANTINI, M.G. *et al.*, 1998; DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S., 2003; MC'NAUGHT, K.S.P. *et al.*, 2003; MC'NAUGHT, K.S.P. *et al.*, 2004; EKMAN, L.L., 2011) e uma degeneração dos neurônios dopaminérgicos (RIEDER, p. *et al.*, 2006).

Desde a descoberta do UPS como um importante degradador de proteínas defeituosas ou desnecessárias à rotina celular, tem sido suposto que a falha desse sistema tem-se favorecido ao acúmulo e agregação dessas proteínas indesejadas, então formando, corpos de Lewy, sendo um papel importante na patogenicidade da DP. E seguindo esse conceito, uma falha do UPS, foi demonstrada na SN de pacientes com doença de Parkinson (MC'NAUGHT, K.S.P.; JENNER, P., 2001). Desempenhado um papel importante na patogênese da doença de Parkinson (MC'NAUGHT, K.S.P.; JENNER, P., 2001). Estudos sugerem que defeitos na capacidade do UPS em degradar proteínas indesejadas, são uma característica comum em cada uma das diferentes apresentações da doença de Parkinson, familiares e esporádicas (MC'NAUGHT, K.S.P. *et al.*, 2003; DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L., 2010).

Corpos de Lewy foram descritos pela primeira vez no início do séc. XX. Lewy (1912) apud Holdorff, B.; Silva, A.M.R.; Dodel, R. (2013) em suas palavras descreveu alterações encontradas em tecidos histológicos como “inclusões intracelulares” jamais vistas antes, quais eram encontradas em todos os casos de paralisia agitante que havia examinado, diferentemente de tecidos histológicos de controle. A presença de corpos de Lewy é considerado um importante marcador histopatológico da doença de Parkinson (SPILLANTINI, M.G. *et al.*, 1998).

Como definição corpos de Lewy são incursões citoplasmáticas em vacúolos neuronais ou agressomos; compostas por agregados proteicos anormais, com formas

esféricas a alongadas, contendo basicamente complexos não degradados de: α -sinucleína, ubiquitina, cristalina α -B, tau, neurofilamentos proteicos e agregados proteicos de tau (MC'NAUGHT, K.S.P. *et al.*, 2003; DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L., 2010; VERNON, A.C.; JOHANSSON, S.M.; MODO, M.M., 2010).

Para melhor contribuição ao conhecimento da associação do UPS com a lesão de neurônios dopaminérgicos, diversos fármacos têm sido administrados em modelos animais por vias diversas, tanto com distribuição local quanto sistemática (FORNAI, F. *et al.*, 2003; MC'NAUGHT, K.S.P. *et al.*, 2004; ZENG, B.Y. *et al.*, 2006; XIE, W. *et al.*, 2010). Diversos estudos demonstraram que a LC é um seletor e inibidor do UPS de modo irreversível levando a uma perda de neurônios dopaminérgicos na SN causando a uma menor concentração de dopamina nas projeções no estriado (MC'NAUGHT, K.S.P. *et al.*, 2004; VERNON, A.C.; JOHANSSON, S.M.; MODO, M.M., 2010; LORENC-KOCI *et al.*, 2011; MACKEY, S. *et al.*, 2013).

Entretanto até o momento não houve relato de um modelo como padrão ouro qual reflete as principais características da DP, e o ideal para o conhecimento e compreensão dessa doença. Sendo assim necessário mais estudos e pesquisas acadêmicas sobre o caso qual possua uma grande semelhança com os passos patológicos clínicos da DP (JENNER, P., 2008; MEREDITH, G.E.; SONSALLA, P.K.; CHESSELET, M.F., 2008; TERZIOGLU, M.; GALTER, D., 2008 CALDWELL, K.A. *et al.*, 2009; OLANOW, C.W.; KORDOWER, J.H 2009).

Desenvolver um modelo animal qual relacionasse com uma maior semelhança a características clínicas patológicas da doença de Parkinson é de extrema importância para o avanço no conhecimento e pesquisa tanto quanto para o tratamento e prevenção (EMBORG, 2004; OLANOW, C.W.; KORDOWER, J.H 2009).

Desde então foram elaborados modelos animais por meio de diversas substâncias, dentre elas algumas como: 6-OHDA, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), rotenona, lipopolisacarídeos (LPS), haloperidol, seserpina, paraquat, maneb ferro, expressão de α -sinucleína, dentre outros a fim de que se possa estudar os mecanismos da DP, entretanto até o momento não houve relato de um modelo qual possua uma grande semelhança com os passos patológicos clínicos da DP, sendo ideal para o conhecimento e compreensão dessa doença, sendo assim necessário mais estudos e pesquisas acadêmicas sobre o caso (MEREDITH *et al.*, 2008; TERZIOGLU, GALTER, 2008; CALDWELL *et al.*, 2009; OLANOW, C.W.; KORDOWER, J.H 2009).

A Universidade Federal de Mato Grosso do Sul é uma das maiores instituições de ensino e pesquisa do estado, com ampla infraestrutura para pesquisa, como biotério, biblioteca e laboratórios para a realização do projeto de estudo; sendo que o laboratório de Neurofisiologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, sob responsabilidade do Prof. Dr. Albert S. Souza está bem estabelecido como centro de pesquisa de diversas patologias neurofisiológicas em modelo animal.

Estabelecendo o estado de Mato Grosso do Sul como um centro emergente para o estudo a respeito dos mecanismos envolvidos dessa doença neurodegenerativa, atraindo para a região sul-mato-grossense mais pesquisadores, levando assim ao fortalecimento da pesquisa e a possibilidade de consolidar novos grupos de pesquisa com outros centros de estudo tanto regionais, nacionais e internacionais.

Decorrente disso o objetivo desse trabalho é observar o efeito da LC como inibidor irreversível do UPS, em comparação com modelo previamente utilizado com 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Viabilizando um modelo animal qual relaciona com uma maior semelhança às características clínicas patológicas da DP, sendo esse de extrema importância para o avanço no conhecimento e pesquisa, tanto para o tratamento como prevenção.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral.

Observar o efeito da falha do sistema ubiquitina proteassoma induzido pela lactacistina no modelo animal da doença de Parkinson

2.2 Objetivos específicos.

2.2.1. Avaliar o efeito das lesões neurológicas na SN decorrente da administração de 5µg de lactacistina e 3µg de 6-OHDA, no comportamento motor e não motor dos animais;

2.2.2 Verificar a eficácia da lesão neurológica por lactacistina em relação ao modelo animal de lesão por 6-OHDA da doença de Parkinson.

3. METODOLOGIA

3.1 Animais

A utilização de animais bem como todos os procedimentos realizados para esse estudo foi autorizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – UFMS, conforme disponível no Apêndice I.

Nesse estudo foram utilizados camundongos *Mus musculus*, machos adultos entre 50-60 dias de vida pesando entre 20-30g, oriundos do biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Os animais foram mantidos no biotério em ambiente controlado, com ciclo de luminosidade de 12h, temperatura ambiente (23°C +1°C), humidade 30-70%.

Cada animal nesse estudo possui um prontuário onde foram inseridos dados relativos a testes, procedimentos e/ou anotações específicas em particular.

3.2 Drogas

Inibidor do sistema ubiquitina proteassoma: Lactacistina > 95% HPLC (Sigma-Aldrich / L6785) (5µg/µL) diluída em solução tampão fosfato (PBS). Composto neurotóxico orgânico sintético: 6-OHDA (Sigma-Aldrich / H4381), 3µg/µL diluída em solução de ácido ascórbico 2% (Sigma-Aldrich / A4544). Agonista dopaminérgico não seletivo: Apomorfina (Sigma-Aldrich / A4393), diluída em água destilada (10mg/ml). Anestésicos, sedativo e relaxante muscular: Ketamina (70mg/Kg) e Xilasina (10mg/Kg).

3.2.1 Via de administração das drogas:

As drogas foram administradas por via subcutânea (s.c.), intraperitoneal (i.p.) e intracerebral (i.c.), conforme técnicas descritas a seguir.

3.2.1.1 Via subcutânea.

Para administração do agonista dopaminérgico não seletivo: Apomorfina (Sigma-Aldrich / A4393) na concentração de 0,6mg/Kg, foi utilizado por aplicação subcutânea (s.c.) aplicada entre as omoplatas, segurando o animal pela pele do pescoço ou mantendo-o contra superfície plana.

3.2.1.2 Via intraperitoneal.

Para administração de solução sedativa de Ketamina (70mg/Kg) e Xilasina (10mg/Kg), realizada através de punção com agulha 25x4,5 na metade posterior do abdome com o animal contido pelo dorso.

3.2.1.3 Via intracerebral.

Para a administração das drogas por via intracerebral os animais foram previamente anestesiados via i.p. com Ketamina (70mg/Kg) e Xilasina (10mg/Kg) com volume de 0,1 ml/10g, misturados na mesma seringa e posicionados no estereotático, sendo submetidos a procedimento cirúrgico para implantação unilateral da agulha de infusão. A agulha de aço inox é ligada a uma bomba de microinfusão por um tubo de polipropileno que foram direcionadas ao feixe prosencefálico medial "*Medial Forebrain Bundle* (MFB)". As drogas e os respectivos veículos foram então infundidos unilateralmente no lado esquerdo, a uma taxa de infusão de 0,5µL/minuto. Após a infusão da droga, a cânula de injeção foi deixada na mesma posição por mais 5 minutos para permitir a difusão da droga no tecido nervoso.

3.3 Grupos

Na composição dos grupos os animais foram divididos randomicamente em três grupos de acordo com a droga a ser administrada sendo eles: Grupo Salina (n=10), Grupo Lactacistina (n=10) e Grupo 6OHDA (n=10).

Grupo Salina (n=10) – Os animais receberam injeção i.c. 2µl de salina.

Grupo Lactacistina (n=10) – Os animais receberam por via i.c. 5µg/1,5µL de LC diluída em 2µl de PBS.

Grupo 6OHDA (n=10) – Os animais receberam por via i.c. 3µg/µL de 6-OHDA, diluída em 0,2µL solução de ácido ascórbico (Sigma/A4544) e PBS a fim de evitar a oxidação.

3.4 Procedimento cirúrgico Estereotaxia

Após passados 7 dias para ambientação, todos os animais foram anestesiados via infusão (i.p.) com solução sedativa composta por Ketamina (70mg/Kg) e Xilasina (10mg/Kg) previamente diluídos em solução salina fisiológica NaCl 0,9%. Assim que infundido o composto sedativo foi avaliado o estado de narcose através de presença ou ausência de sinais como: reflexo da cauda, reflexos flexores e corneano. Certificado o estado narcótico, estando o animal profundamente anestesiado o mesmo foi colocado sob superfície aquecida a fim de evitar estado de hipotermia. Para a preparação do sítio cirúrgico foi realizado tricotomia da região dorsal da cabeça, e posicionada em aparelho estereotático com auxílio das barras auriculares. Antes da incisão cirúrgica o sítio passou por assepsia da pele com solução de alcoólica de iodo, após preparo do sítio, administrado por via subcutânea anestésico local contendo lidocaína e vasoconstritor (norepinefrina 2%) profilaticamente minimizando risco de hemorragias. Logo após realizado incisão longitudinal na pele e tecido subcutâneo, expondo assim a calota craniana. Para melhor visualização das suturas ósseas, se caso necessário, utilizou-se solução de peróxido de hidrogênio. A torre do estereotático colocada em posição vertical (angulação zero) logo acima do bregma, a fim de efetuar a leitura e posicionamento do local de infusão da droga, de acordo com coordenadas do MFB obtidas no atlas de Paxinos, G.; Watson, C (2005) (2005) 1.34mm. posterior, + 1,17mm. lateral, e 5,1mm. ventral a partir do bregma. Determinado o local de infusão iniciou-se a trepanação da calota craniana com o auxílio de broca elétrica esférica parando o procedimento antes da dura máter. Uma agulha de aço inox é ligada a uma bomba de microinfusão por um tubo de polipropileno direcionadas ao MFB. As drogas e os respectivos veículos infundidos unilateralmente no lado esquerdo (4,5µL por hemisfério), a uma taxa de infusão de

0,5µL/minuto. Após a infusão da droga, a cânula de injeção fora mantida na mesma posição por mais 5 minutos para permitir a difusão da droga no tecido nervoso, sendo após este tempo retirada. Ao final a ferida cirúrgica foi suturada com linha de propileno. Os animais continuaram por tratamento profilático até o 3º dia subsequente da cirurgia, recebendo terapia analgésica, via intraperitoneal, por meio de injeções de buprenorfina, na dose de 0,05mg/Kg, a cada 8 horas.



Figura 3 – Representação esquemática de secção coronal do cérebro de camundongo demonstrando a região de administração lenta de 6-OHDA (PAXINOS, G.; WATSON, C. 2005).

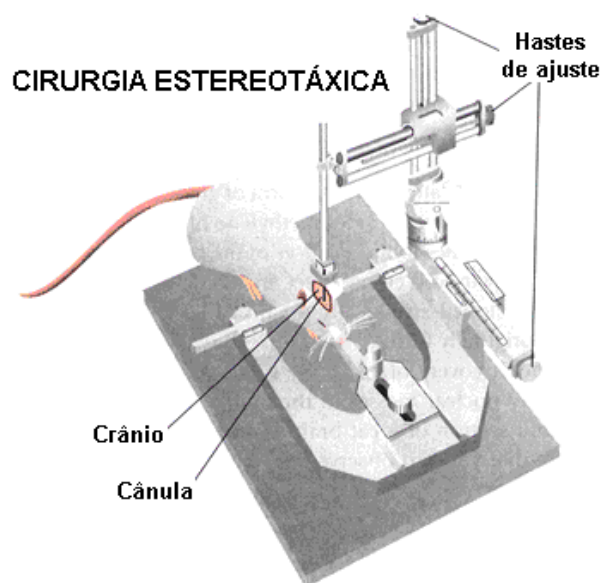


Figura 4 – Representação gráfica da cirurgia estereotóxica em roedores, para implantação de cânulas direcionadas ao estriado.(adaptado - ABDELWAHAB, M.; SANKAR, T.; PREUL, M. 2011)



Figura 5 – Bomba de micro infusão (FONTE PRÓPRIA).

3.6 Análise comportamental e motora.

Os testes para análise comportamental e motora foram realizados no Laboratório de Biofisiologia da UFMS, durante o período tido como noturno, sempre no mesmo horário, em ambiente controlado (iluminação, temperatura e isolamento acústico), minimizando possíveis interferências no comportamento dos animais.

A sequência escolhida para a realização dos testes foi: campo aberto, suspensão pela cauda, avaliação da marcha e comportamento rotatório. Sendo todos os grupos submetidos a um teste por vez, ou seja os animais de cada grupo passaram pelo teste de campo aberto, após todos os animais passarem por esse teste, o próximo teste foi aplicado, e assim por diante em todos os testes com todos os animais, esse método foi utilizado a fim de que cada animal possua um período de “descanso” entre os testes.

Todos os animais passaram por todos os testes em um momento antes da cirurgia estereotáxica, sendo o controle de cada animal e grupo, após o procedimento cirúrgico os animais permaneceram em recuperação durante sete dias, após esse período os testes foram realizados conforme cronograma exposto na Figura 6 tendo como base estudos anteriores. A avaliação funcional dos animais, foi realizada por meio do teste do campo aberto (WALSH; CUMMINS, 1976; WHIMBEY; DENENBERG, 1967), da avaliação funcional da marcha (MULLENIX, P.; NORTON, S.; CULVER, B. 1975), do teste de suspensão pela cauda (STÉRU, L. *et al.*, 1985) e

do teste de comportamento rotatório (UNGERSTEDT, U., ARBUTHNOTT, G.W., 1970).

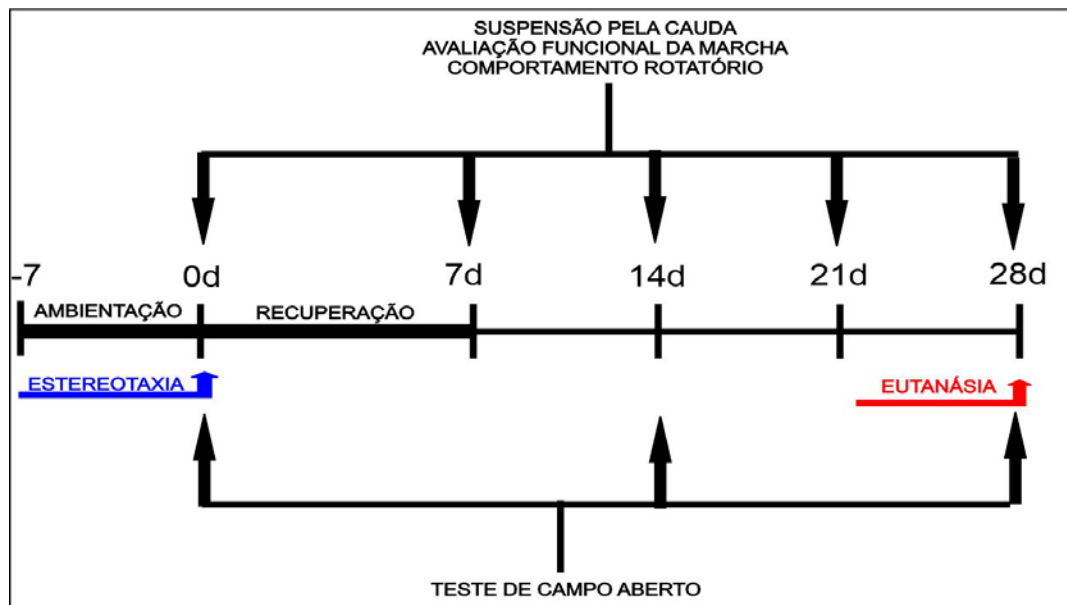


Figura 6 – Representação do cronograma das análises motoras e não motoras. Letra (d) representa dias.

3.6.1 Teste do Campo Aberto.

O teste foi realizado em uma arena cilíndrica, de 40 cm de diâmetro, com paredes de acrílico translúcido, de 30 cm. de altura, colocada sobre uma base de madeira recoberta de fórmica de cor branca, a qual é subdividida em 12 quadrantes de 104,7 cm² cada Figura 7, sendo o teste realizado uma única vez, durante 15 minutos. Sendo a arena de testes higienizada com solução alcoólica a 20% especialmente entres os testes com a finalidade de evitar odores que possam interferir no teste.

Nesse estudo, avaliamos, a frequência de comportamentos de exploração horizontal, que é a quantidade de quadrantes percorridos durante o teste; a exploração vertical, como sendo a quantidade de erguimentos realizados pelo animal; além de também a análise de tempo e comportamentos de autolimpeza assim como a quantidade de bolos fecais, no decorrer do teste.



Figura 7 – Foto ilustrando o teste de campo aberto (FONTE PRÓPRIA).

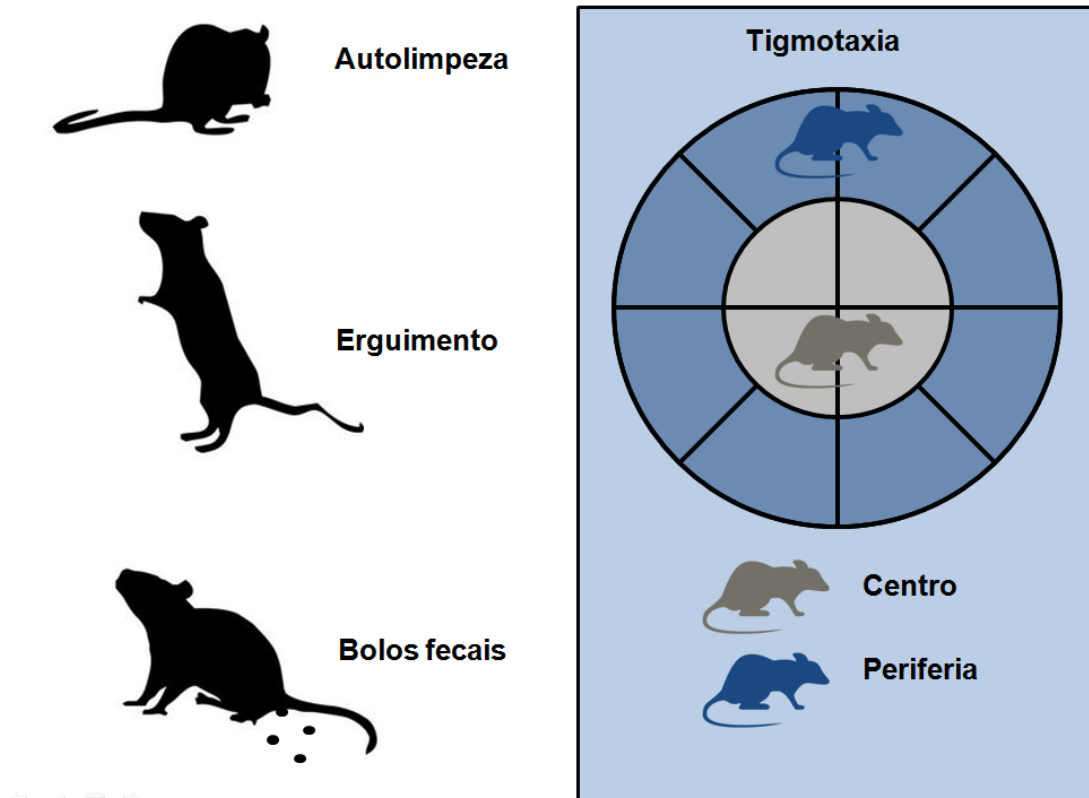


Figura 8 – Esquema ilustrando os parâmetros comportamentais do teste de campo aberto. (FONTE PRÓPRIA).

3.7.2 Teste de Suspensão Pela Cauda.

O teste de suspensão pela cauda consiste em suspender o animal sob uma armação a 30 cm da base, mantendo-o pela sua cauda com uma fita adesiva à 1 cm da ponta. O período em que o animal permanece no teste é de 6 min. e durante esse período foi realizado o registro em vídeo a fim de não haver perdas de dados, sendo esses colhidos como tempo, em segundos, em que o animal permanece em movimento (tempo em movimento) e o período, em segundos, que o animal permanece imóvel (tempo de imobilidade)

3.7.3 Avaliação Funcional da Marcha.

Para esta análise, as patas anteriores e posteriores dos animais foram impregnadas com uma solução aquosa composta por água destilada e corante alimentício de cores distintas, sendo as pegadas impressas durante o deslocamento do camundongo sobre uma plataforma de madeira (5 cm de largura e 29 cm de comprimento), forrada com um papel sulfite branco, em direção a uma casinhola escura situada ao final da plataforma.

Neste teste foram colhidos dados aos quais avaliados parâmetros como: o comprimento do passo CP (em centímetros) foi determinado pela distância média entre a região central de duas pegadas consecutivas; o desvio ântero-posterior (DAP) e látero-lateral (DLL) entre as pegadas ipsilaterais da pata anterior e posterior; a base de sustentação (BS) sendo aferida pela distância das pegadas das patas posteriores contralaterais.

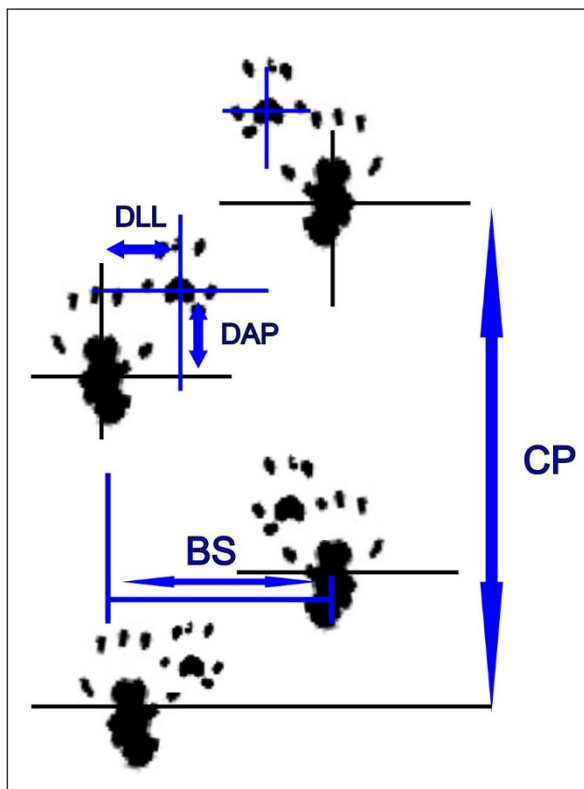


Figura 9 – Representação da avaliação funcional da marcha. Pegadas dos camundongos mostrando o desvio látero-lateral (DLL), desvio ântero-posterior (DAP), comprimento do passo (CP) e Base de sustentação (BS). Pegadas em maiores são referentes aos membros posteriores, enquanto que pegadas menores são referentes aos membros anteriores (FONTE PRÓPRIA).

3.7.4 Comportamento Rotatório.

O teste de comportamento rotatório foi realizado uma semana após procedimento estereotáxico e semanalmente até atingir 28 (d). Todos os animais realizaram o teste inicialmente para avaliação da rotação ipsilateral e após a administração de 1mg/Kg de apomorfina (s.c.), dissolvida em salina, a fim de verificar o comportamento contralateral. O animal para a realização do teste permanece confinado em recipiente cilíndrico de fundo cônico (25 cm. de diâmetro e 40 cm. de altura), e o número de rotações ipsilaterais e contralaterais à lesão, durante o tempo de 30 min. antes da aplicação de apomorfina e 30 min. após aplicação da apomorfina, o teste foi registrado através de monitoração por câmera de vídeo, fixada acima e focada no animal; sendo o teste realizado antes e após o tratamento administrado

(FORNAGUERA, J.; SCHWARTING, R.K.W., 1999; TATENHORST, L. *et al.*, 2014; ELLENBROEK, B.; YOUN, J., 2016).

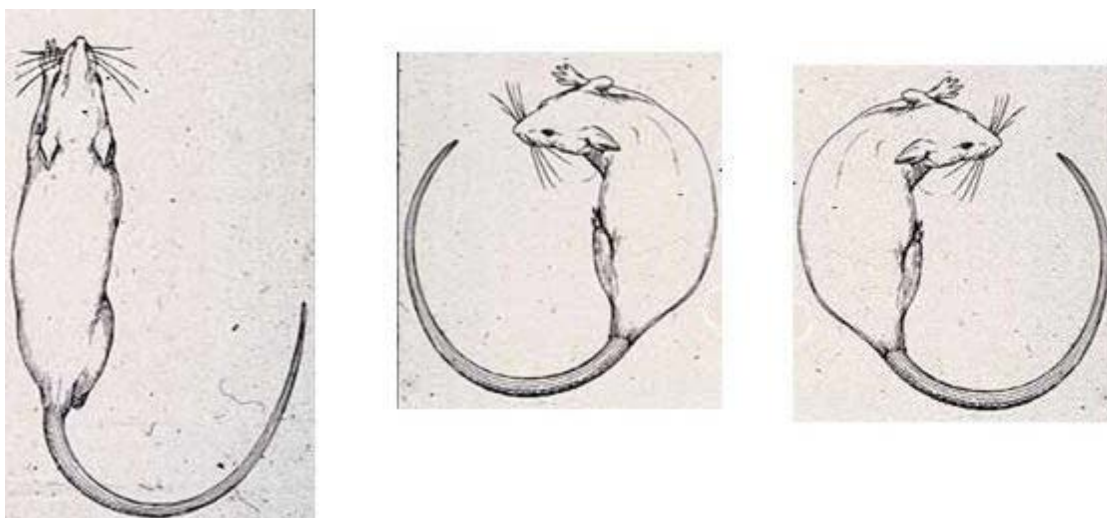


Figura 10 – Representação esquemática do comportamento rotatório de ratos lesados unilateralmente à esquerda com 6-OHDA após desafio com agonista indireto (figura central) ou direto (figura à direita) dos receptores dopaminérgicos (adaptado - UNGERSTEDT, U.; ARBUTHNOTT, G.W, 1970).

3.7 Eutanásia por perfusão cardíaca.

Após os testes comportamentais e motores, no momento de 28 dias conforme exposto na Figura 11, todos os animais foram submetidos à eutanásia por perfusão cardíaca, sendo utilizado protocolo proposto por Gage, G. J., Kipke, D. R., Shain, W. (2012). Os animais submetidos ao procedimento receberam anestesia (i.p.) com solução sedativa composta por Ketamina (70mg/Kg) e Xilasina (10mg/Kg) previamente diluídos em solução salina fisiológica cloreto de sódio (NaCl) 0,9%. Assim que infundido o composto sedativo e avaliado o estado de narcose através de presença ou ausência de sinais como: reflexo da cauda, reflexos flexores e corneano. Certificado o estado narcótico, estando o animal profundamente anestesiado, o animal colocado em decúbito dorsal e realizado incisão cirúrgica acompanhado a curva diafragmática logo abaixo do rebordo intercostal, logo após, realizado a abertura da caixa torácica pela dissecação das partes laterais e ventrais do diafragma e rebatimento da porção ventral do gradil costal, expondo a cavidade pleural, elevando o esterno e deixando uma visão clara dos principais vasos sanguíneos. Uma pequena incisão na extremidade do ventrículo esquerdo para inserção de uma agulha ligada ao sistema de perfusão com ponta romba até antes do arco aórtico, após uma incisão

no átrio direito do animal a fim de que seja possível realizar a drenagem. Com o intuito de troca de volume foi infundido através do sistema de perfusão solução PBS à temperatura ambiente durante período de aproximadamente 5 minutos com fluxo contínuo de 2 ml/min sendo substituído após esse período por paraformaldeído 4% tamponado em temperatura ambiente com fluxo de 2ml/minuto durante 30 minutos ou até a visualização do clareamento hepático (indicador de uma boa perfusão). Realizada a decapitação do animal e retirada da pele e tecidos expondo a calota craniana e dura-máter, sendo o tecido cerebral retirado para pós-fixação e armazenagem. Todos os passos realizados foram registrados de imediato em registro de cada animal o tempo demandado desde o início do procedimento e etapas realizadas.

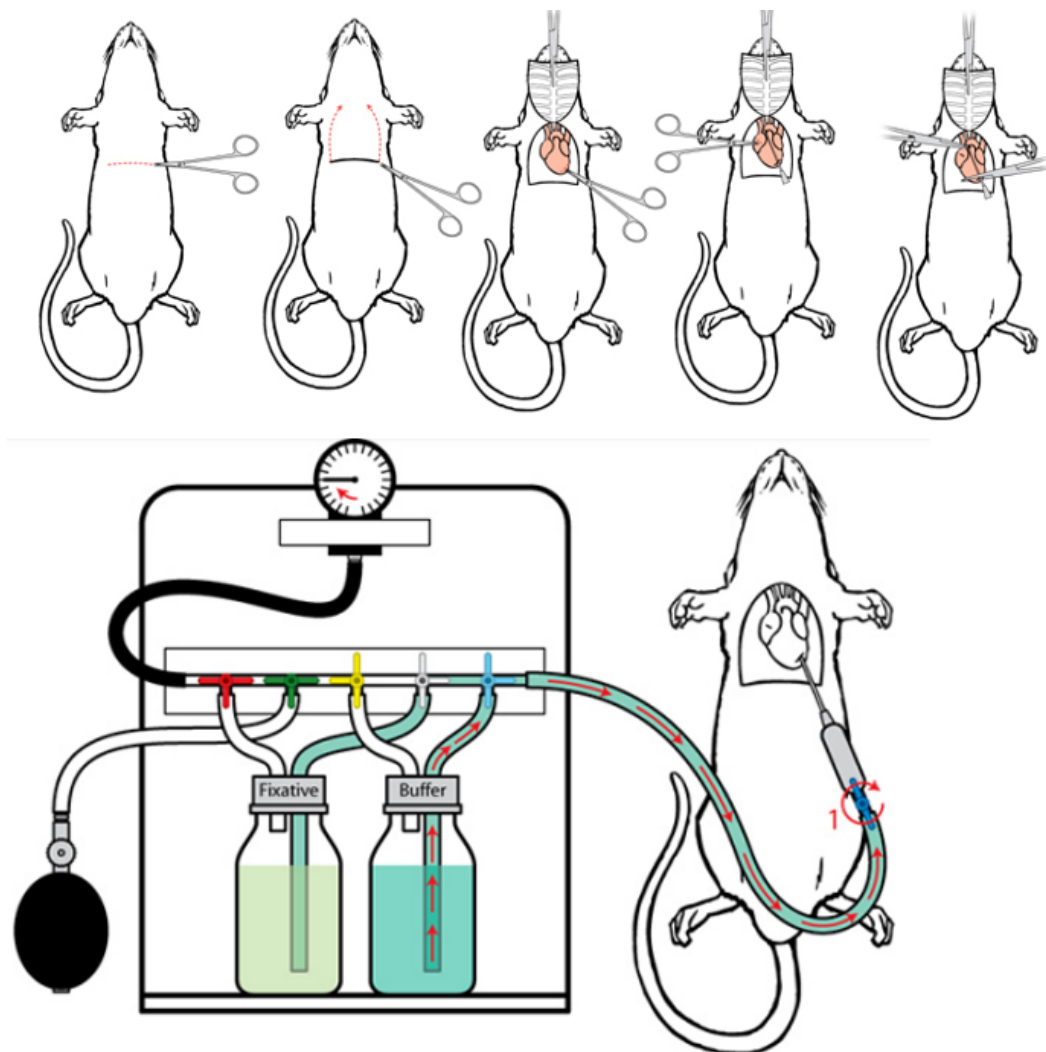


Figura 11 – Representação do procedimento de perfusão cardíaca. (GAGE, G. J., KIPKE, D. R., SHAIN, W., 2012).

3.5 Preparação do tecido.

O tecido cerebral retirado do animal logo após o procedimento de perfusão foi acondicionado em solução de formol 10% para a fixação mantido em refrigeração por no máximo três dias. Após esse período o tecido passou por procedimentos de desidratação seguindo por banhos sequenciais de solução alcoólica com 70% à 95%, com porcentagens elevadas de 5% à 5 % por um período de uma hora cada solução. Após a concentração chegar à 100% foi realizado mais três banhos com duração de uma hora cada. No término do terceiro banho, o tecido permaneceu por 12 horas com em solução álcool 100% + Xilol PA (1:1). Passado o período de 12 horas, o tecido foi banhado em Xilol PA por três vezes com a duração de cada banho de 90 min., resultando na completa diafanização da peça. Com o tecido cerebral já diafanizado o tecido foi incluído em parafina histológica seguindo os seguintes passos: três banhos em solução de parafina histológica com cera de abelha (parafina 1Kg +100g cera de abelha) em estufa com temperatura à 60°C. Após esse processo os tecidos já emblocados em parafina foram armazenados em local apropriado para posterior análise histológica.

3.7 Descarte dos animais.

Após a realização dos testes, os restos dos animais eutanasiados foram descartados em sacos de lixo na cor branca de acordo com a Resolução CONAMA nº358, de 29 de abril de 2005 e Resolução da Diretoria Colegiada ANVISA nº 306, de 7 de dezembro de 2004, onde os descartes encaminhados para destino apropriado pelo sistema de coleta de lixo biológico da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

3.8 Análise estatística.

O efeito do tratamento (grupo experimental), do momento de análise, bem como a interação entre estes fatores, em relação aos comportamentos avaliados neste estudo, tanto motores como não motores, foram realizados por meio do teste

ANOVA de duas vias de medidas repetitivas, seguido pelo pós-teste de Tukey. Os demais resultados foram apresentados na forma de estatística descritiva ou na forma de tabelas e gráficos. A análise estatística foi realizada por meio do programa SigmaPlot, versão 12.5, considerando um nível de significância de 5% (NORMAN, G.R., 1994; SHOT, 1990).

4. Resultados

4.1 Campo Aberto.

Os resultados das análises estatísticas referentes aos dados coletados no teste de campo aberto: exploração central e periférica, quantidade de quadrantes, exploração vertical, comportamento de autolimpeza, tempo de autolimpeza e quantidade de bolos fecais, estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1 – Resultados referentes aos parâmetros avaliados, no teste de campo aberto, em cada grupo experimental e em cada momento de análise.

Campo Aberto	Grupo experimental		
	Salina	Lactacistina	6OHDA
Exploração central (Grupo: p=0,457; Momento: p=0,220; Grupo x momento: p=0,003)			
Dia 0	17,40±4,55Aa	9,60±1,44Aa	22,80±4,31Aa
Dia 14	8,20±3,10Aa	20,10±5,71Aa	10,20±2,78Ba
Dia 28	7,00±1,64Aa	17,50±5,97Aa	13,00±3,43ABa
Exploração periférica (Grupo: p=0,0017; Momento: p<0,001; Grupo x momento: p<0,001)			
Dia 0	60,90±6,96Aab	32,20±2,83Ab	71,40±7,49Aa
Dia 14	53,70±7,99Aa	53,30±15,03Aa	33,80±5,25Ba
Dia 28	43,00±5,95Aa	52,90±18,11Aa	42,00±8,45Ba
Quantidade de quadrantes (Grupo: p=0,980; Momento: p=0,258; Grupo x momento: p=0,001)			
Dia 0	78,30±10,67Aab	41,00±3,22Ab	94,20±10,42Aa
Dia 14	61,90±9,72Aa	73,40±20,52Aa	44,00±7,04Ba
Dia 28	50,00±6,57Aa	70,40±23,82Aa	55,00±11,63Ba
Exploração vertical (Grupo: p=0,183; Momento: p=0,371; Grupo x momento: p=0,018)			
Dia 0	21,00±6,19Aa	14,70±2,52Aa	26,00±7,77Aa
Dia 14	5,60±2,48Ab	29,60±8,25Aa	15,30±4,51Aab
Dia 28	9,00±3,09Aa	24,80±8,86Aa	11,10±3,56Aa
Comportamentos de autolimpeza (Grupo: p=0,177; Momento: p=0,062; Grupo x momento: p=0,663)			
Dia 0	6,80±2,53Aa	4,70±1,91Aa	8,40±2,85Aa
Dia 14	5,50±1,95Aa	2,40±0,70Aa	2,90±0,85Aa
Dia 28	6,00±1,89Aa	2,70±0,78Aa	2,60±0,60Aa
Tempo de autolimpeza (Grupo: p=0,239; Momento: p=0,580; Grupo x momento: p=0,045)			
Dia 0	5,90±1,25Ab	13,30±2,02Aa	6,30±1,38Ab
Dia 14	6,30±1,59Aa	7,30±2,14Ba	8,10±1,34Aa
Dia 28	8,60±1,86Aa	8,70±2,65ABa	6,70±1,34Aa
Quantidades de bolos fecais (Grupo: p=0,937; Momento: p=0,395; Grupo x momento: p=0,653)			
Dia 0	3,10±0,81Aa	3,90±0,48Aa	2,90±0,78Aa
Dia 14	4,20±0,89Aa	3,60±1,19Aa	4,10±0,55Aa
Dia 28	3,90±0,53Aa	3,10±0,97Aa	3,30±0,60Aa

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão da média. Efeito do grupo, do momento e interação entre os fatores, no teste ANOVA de duas vias de medidas repetitivas. Letras maiúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa entre os momentos de análise (pós-teste de Tukey, p<0,05). Letras minúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (p<0,05).

4.1.1 Exploração central.

Os resultados referentes ao número de quadrantes percorridos em região central, nos diferentes grupos e momentos de análise, estão ilustrados na Figura 12.

Na avaliação dos dados referentes ao número de quadrantes percorridos na região central do campo aberto, não houve efeito significativo do grupo experimental ($p=0,457$), não havendo efeito significativo do momento de análise ($p=0,220$), havendo apenas interação entre estes fatores ($p=0,003$). Na avaliação de exploração central apenas os animais do Grupo 6OHDA apresentou uma menor média no momento de 14 dias na comparação entre momentos no mesmo grupo.

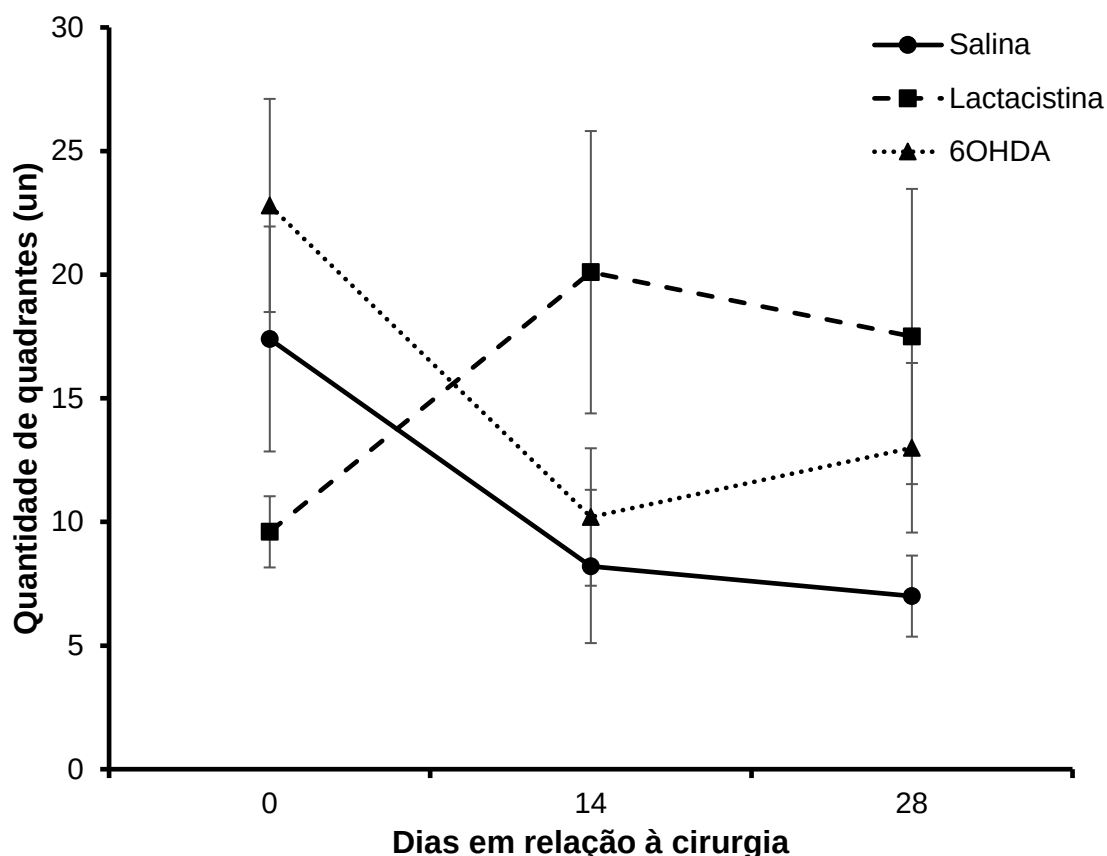


Figura 12 – Gráfico referente ao número de quadrantes percorridos na área central no teste de campo aberto. Onde os símbolos representam a média e as barras representam o erro padrão da média.

4.1.2 Exploração periférica.

Os resultados referentes ao número de quadrantes percorridos em região periférica, nos diferentes grupos e momentos de análise, estão ilustrados na Figura 13.

Na avaliação dos dados referentes ao número de quadrantes percorridos na periferia do campo aberto, não houve efeito significativo do grupo experimental ($p=0,827$), não havendo efeito significativo do momento de análise ($p=0,334$), havendo apenas interação entre estes fatores ($p=0,004$). Os animais do grupo 6OHDA apresentaram uma maior média apenas no momento de zero dias, e uma diminuição no momento de 14 dias mantendo até o momento de 28 dias. Não houve diferença nas médias no grupo Lactacistina apenas uma menor média entre grupos no momento de zero dias em comparação com o grupo 6OHDA.

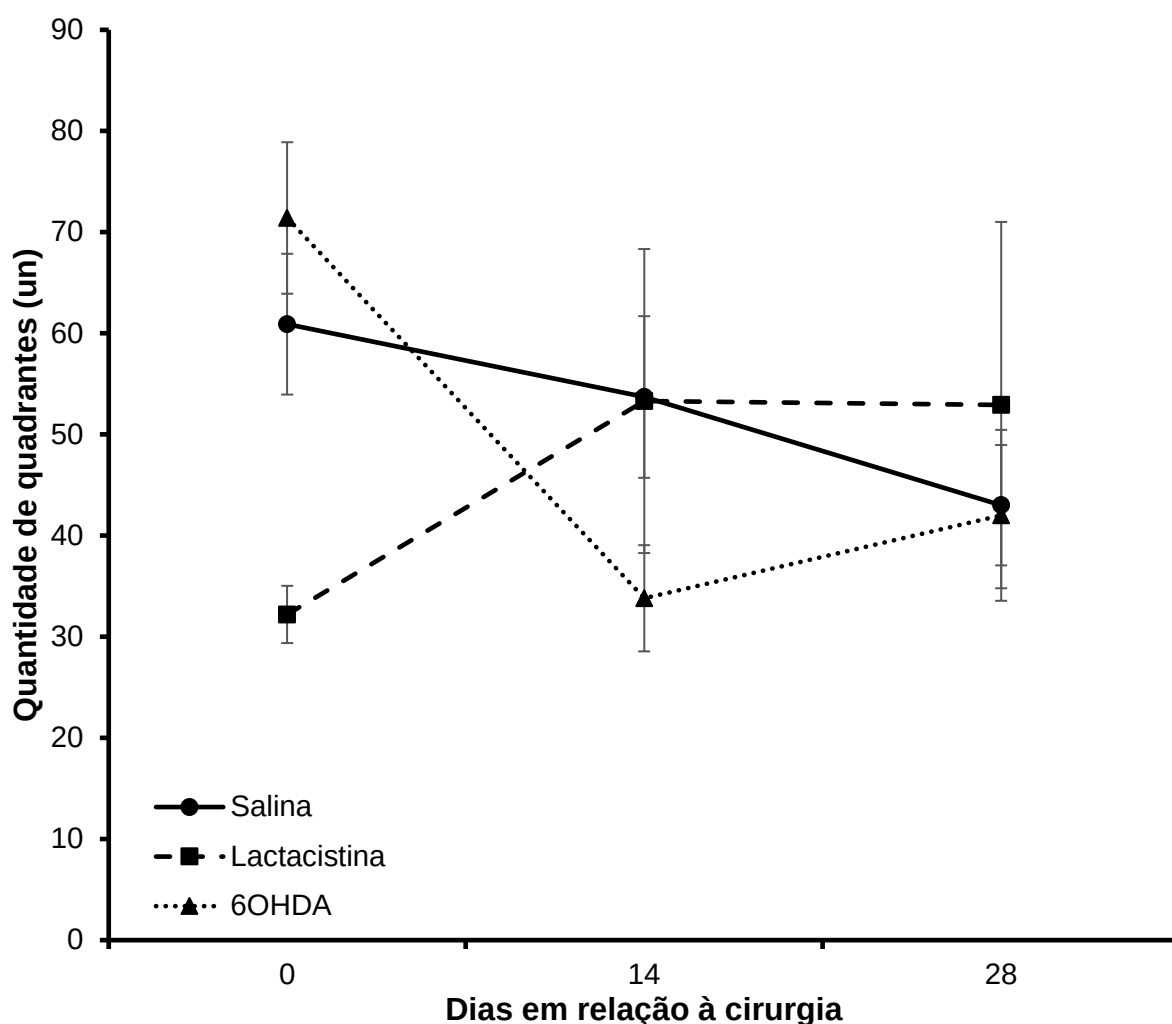


Figura 13 – Gráfico referente ao número de quadrantes percorridos na área periférica no teste de campo aberto. Onde os símbolos representam a média e as barras representam o erro padrão da média.

4.1.3 Quantidade de Quadrantes.

Os resultados referentes ao número de quadrantes percorridos durante o teste de campo aberto, nos diferentes grupos e momentos de análise, estão ilustrados na Figura 14.

Na avaliação dos dados referentes ao número de quadrantes percorridos não houve efeito significativo do grupo experimental ($p=0,980$), não havendo efeito significativo do momento de análise ($p=0,258$), havendo apenas interação entre estes fatores ($p=0,001$). Animais lesionados com 6-OHDA apresentaram diminuição na quantidade de quadrantes percorridos a partir do momento de 14 e 28 dias. Já a comparação entre grupos a média dos animais do grupo Lactacistina no momento zero dias é menor que a dos animais do grupo 6OHDA.

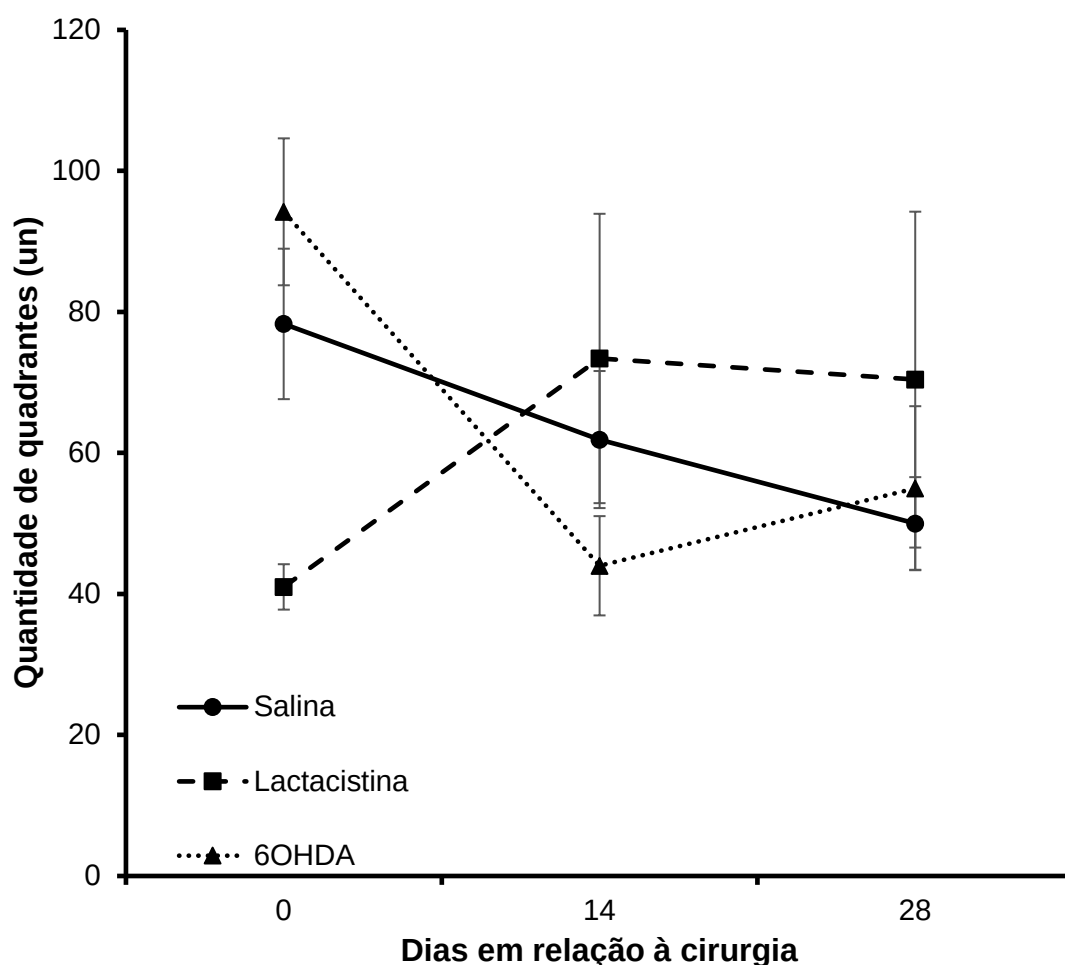


Figura 14 – Gráfico referente ao número de quadrantes percorridos no teste de campo aberto. Onde os símbolos representam a média e as barras representam o erro padrão da média.

4.1.4 Exploração Vertical.

Os resultados referentes ao número de comportamentos de exploração vertical, nos diferentes grupos e momentos de análise, estão ilustrados na Figura 15.

Na avaliação dos dados referentes ao número de comportamentos exploratório vertical, não houve efeito significativo do grupo experimental ($p=0,183$), não havendo efeito significativo do momento de análise ($p=0,371$), havendo apenas interação entre estes fatores ($p=0,018$). Os animais lesionados com Lactacistina apresentaram uma maior média no momento de 14 dias comparada com o grupo Salina.

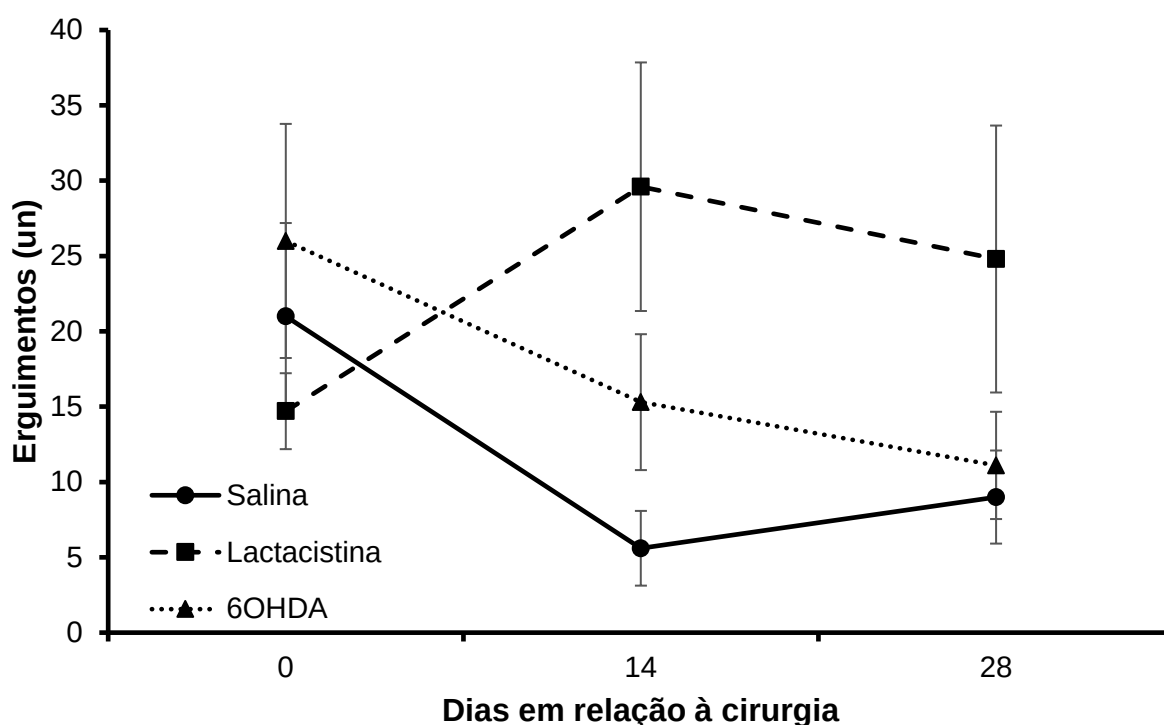


Figura 15 – Gráfico referente ao número de erguimentos realizados no teste de campo aberto. Onde os símbolos representam a média e as barras representam o erro padrão da média.

4.1.5 Comportamento de Autolimpeza.

Os resultados referentes ao número de comportamentos de autolimpeza, nos diferentes grupos e momentos de análise, estão ilustrados na Figura 16.

Na avaliação dos dados referentes ao número de momentos de autolimpeza, não houve efeito significativo do grupo experimental ($p=0,177$), não havendo efeito significativo do momento de análise ($p=0,062$), não há interação entre estes fatores

($p=0,663$). Não houve resultado estatisticamente significativo nas médias entre grupo e entre momentos ao comportamento estudado.

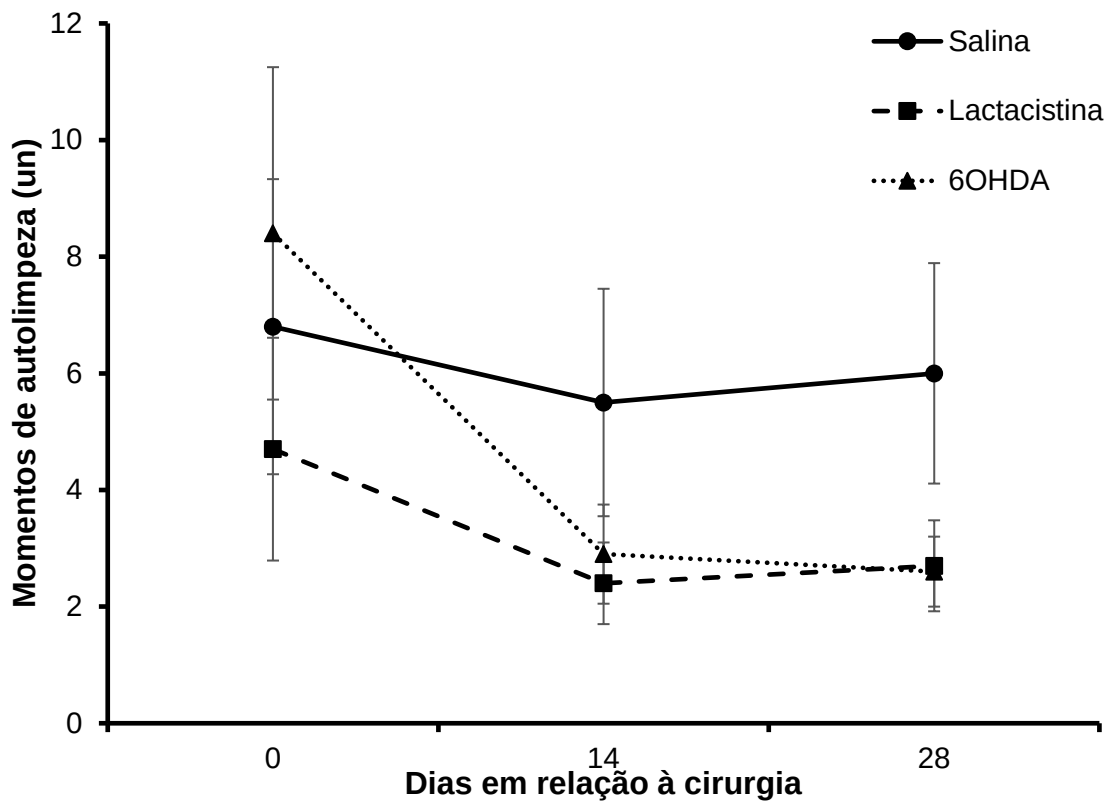


Figura 16 – Gráfico referente ao número de comportamentos de autolimpeza realizados no teste de campo aberto. Onde os símbolos representam a média e as barras representam o erro padrão da média.

4.1.6 Tempo de Autolimpeza.

Os resultados referentes ao tempo despendido durante comportamentos de autolimpeza, nos diferentes grupos e momentos de análise, estão ilustrados na Figura 17.

Na avaliação dos dados referentes ao tempo de autolimpeza, não houve efeito significativo do grupo experimental ($p=0,239$), não havendo efeito significativo do momento de análise ($p=0,580$), havendo apenas interação entre estes fatores ($p=0,045$). Os animais do grupo Lactacistina apresentaram uma menor média de tempo de autolimpeza no momento de 14 dias, e o mesmo grupo apresentou uma maior média no momento de zero dias na comparação entre grupos.

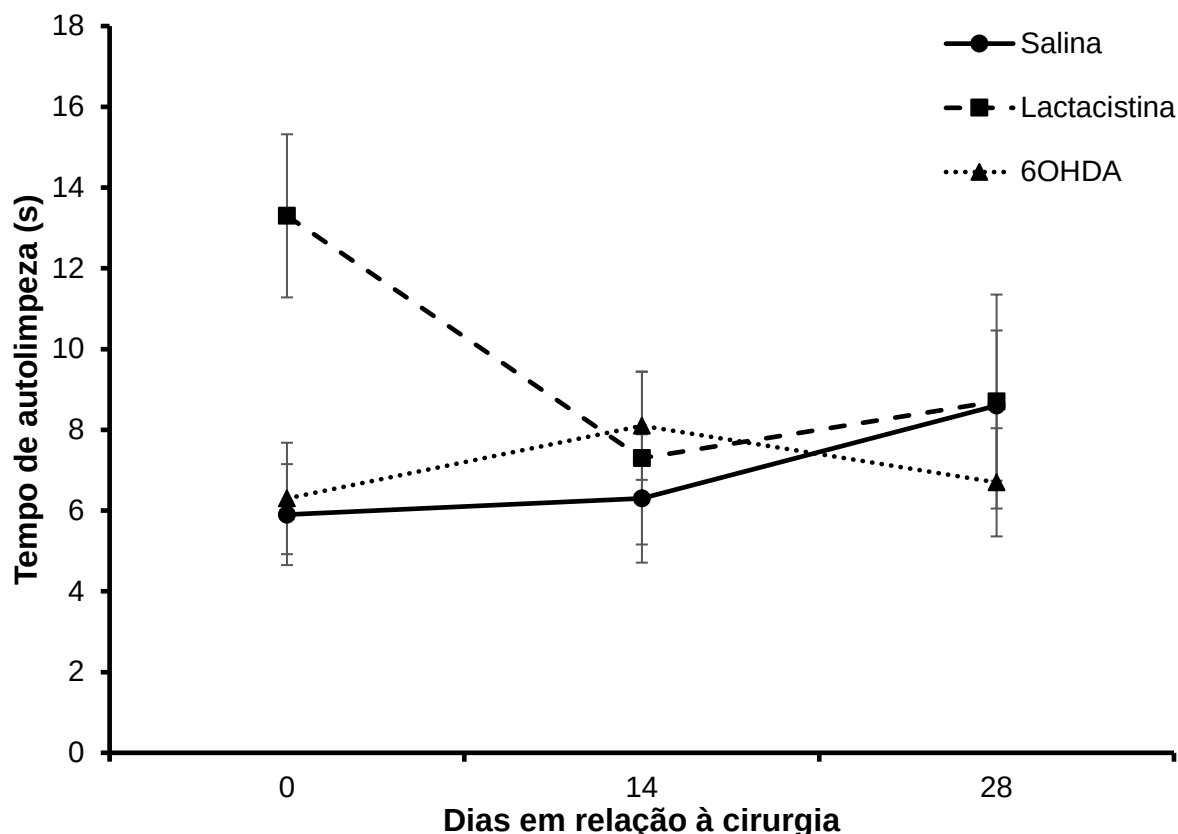


Figura 17 – Gráfico referente ao tempo despendido em segundos nos comportamentos de autolimpeza realizados no teste de campo aberto. Onde os símbolos representam a média e as barras representam o erro padrão da média.

4.1.7 Quantidade de Bolos Fecais.

Os resultados referentes ao número de bolos fecais, nos diferentes grupos e momentos de análise, estão ilustrados na Figura 18.

Na avaliação dos dados referentes ao número de bolos fecais, não houve efeito significativo do grupo experimental ($p=0,937$), não havendo efeito significativo do momento de análise ($p=0,395$), não houve interação entre estes fatores ($p=0,653$). Não houve alterações estatisticamente significativas para o comportamento estudado.

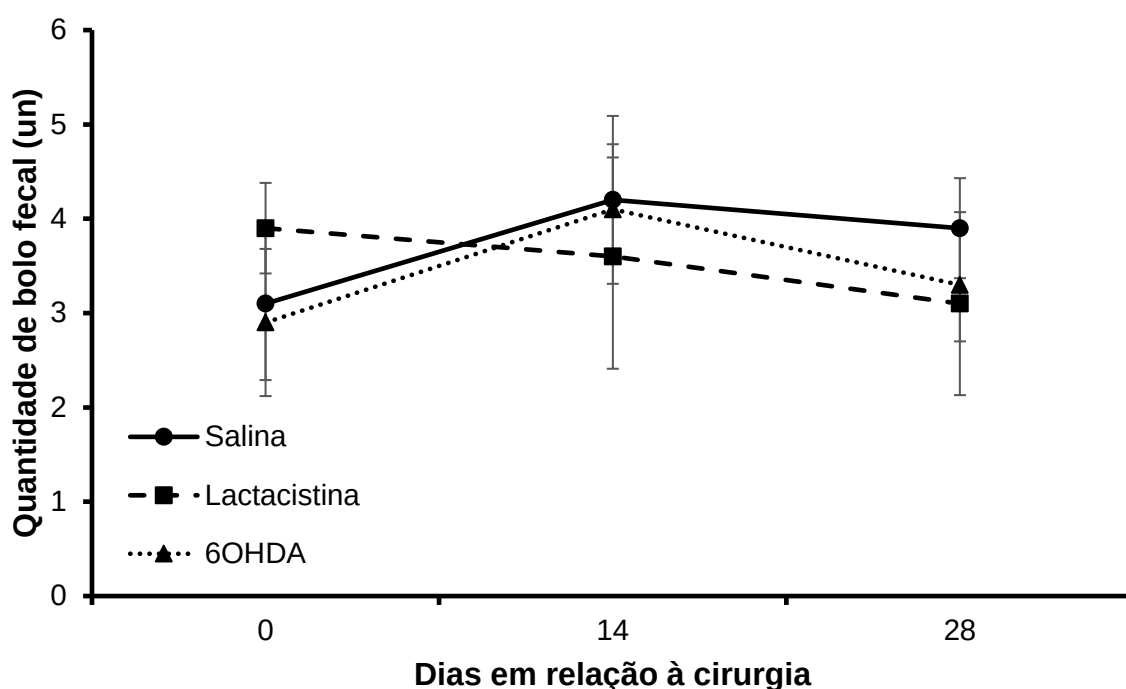


Figura 18 – Gráfico referente quantidade de bolos fecais encontrados durante a realização do teste de campo aberto. Onde os símbolos representam a média e as barras representam o erro padrão da média.

Na comparação entre momentos no teste de campo aberto, nos parâmetros de exploração central e periférica assim como na quantidade de quadrantes cruzados, os animais lesionados por 6-OHDA apresentaram uma maior alteração comparação com animais lesionados por lactacistina. Já nesse teste a lactacistina levou a uma diminuição no tempo de autolimpeza. Contudo na comparação entre grupos não foi obtido resultados significantes, onde apenas os animais do grupo Lactacistina apresentaram um maior comportamento de exploração vertical em comparação com outros grupos.

4.2 Suspensão pela Cauda.

Os resultados das análises estatísticas referentes aos dados coletados no teste de suspensão pela cauda: tempo em movimento, tempo em imobilidade, estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultados referentes aos parâmetros avaliados, no teste de suspensão pela cauda, em cada grupo experimental e em cada momento de análise.

Suspensão pela cauda	Grupo experimental		
	Salina	Lactacistina	6OHDA
Tempo em movimento (Grupo: $p=0,010$; Momento: $p<0,001$; Grupo x momento: $p<0,001$)			
Dia 0	298,20±15,68Aa	302,30±12,98Aa	302,30±12,98Aa
Dia 7	302,30±12,98Aa	169,70±47,08Bb	228,60±27,03Bab
Dia 14	211,00±15,51Ba	141,60±39,65BCa	200,30±27,45BCa
Dia 21	250,10±13,12ABa	127,50±35,68BCb	161,90±21,69CDb
Dia 28	281,80±16,11Aa	107,30±30,44Cb	118,10±16,40Db
Tempo em imobilidade (Grupo: $p=0,017$; Momento: $p<0,001$; Grupo x momento: $p<0,001$)			
Dia 0	61,80±15,68Ba	57,70±12,98Aa	57,70±12,98Ca
Dia 7	57,70±12,98Ba	46,30±15,56Aa	95,40±14,06Ca
Dia 14	149,00±15,51Aa	74,40±22,28Ab	123,70±21,15Bab
Dia 21	109,90±13,12ABab	88,50±25,48Ab	162,10±21,71ABa
Dia 28	78,20±16,11Bb	108,70±30,81Ab	205,90±24,90Aa

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão da média. Efeito do grupo, do momento e interação entre os fatores, no teste ANOVA de duas vias de medidas repetitivas. Letras maiúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa entre os momentos de análise (pós-teste de Tukey, $p<0,05$). Letras minúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p<0,05$).

4.2.1 Tempo em Movimento.

Os resultados referentes ao tempo em movimento, nos diferentes grupos e momentos de análise, estão ilustrados na Figura 19.

Na avaliação dos dados obtidos no teste de suspensão pela cauda no tempo de movimento, houve efeito significativo do grupo experimental ($p=0,010$), efeito do momento de análise ($p<0,001$) e interação entre estes fatores ($p<0,001$). De forma geral, apesar de nos animais do grupo controle a média tenha diminuído no momento de 14 dias apenas, nos animais do grupo Lactacistina houve uma diminuição da média no momento de 7 dias mantendo essa diminuição igual nos momentos de 14 e 21 dias e com sua menor média no momento de 28 dias. Já os animais do grupo 6OHDA também apresentaram uma menor média no momento de 7 dias, havendo ainda uma diminuição no momento e 21 dias, alcançando seu menor valor no momento de 28 dias. Na comparação entre grupos o grupo Lactacistina apresentou uma menor média no momento de 7, 21 e 28 dias comparados ao grupo Salina. O grupo 6OHDA a diminuição da média ocorreu no momento de 21 e 28 dias comparado ao grupo Salina, contudo, sem diferença significativa ao grupo Lactacistina em todos os momentos.

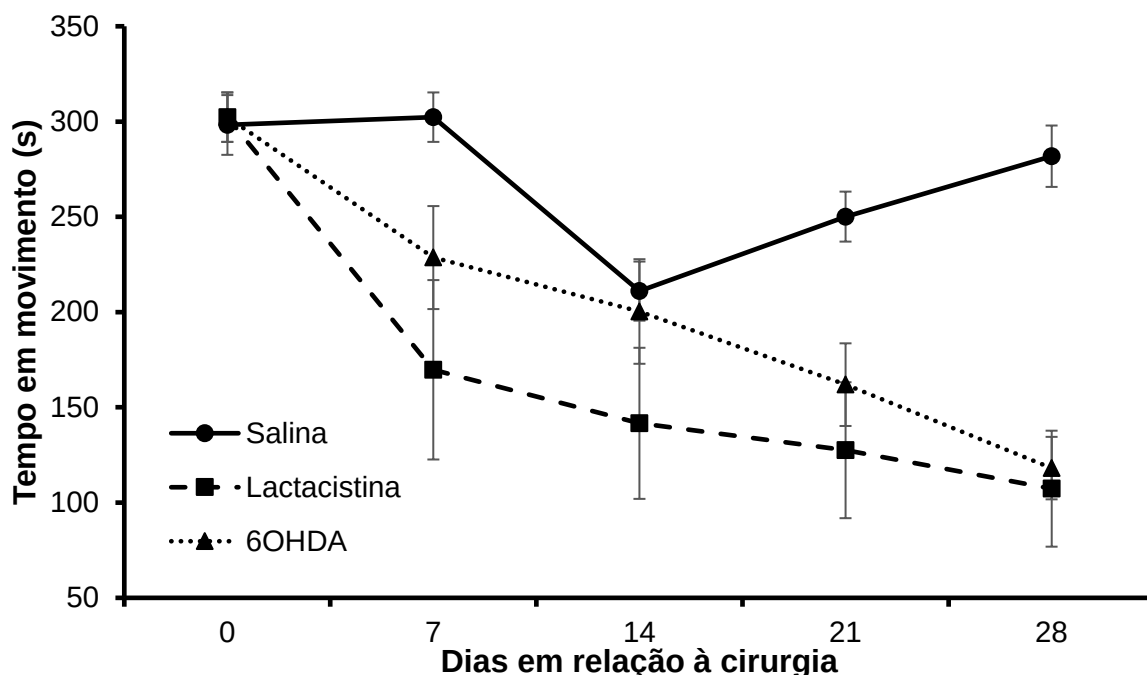


Figura 19 – Gráfico referente ao tempo em segundos de mobilidade no teste de suspensão pela cauda. Onde os símbolos representam a média e as barras representam o erro padrão da média.

4.2.2 Tempo em Imobilidade.

Os resultados referentes ao tempo em imobilidade, nos diferentes grupos e momentos de análise, estão ilustrados na Figura 20.

Na avaliação dos dados referentes ao teste de suspensão pela cauda com tempo em imobilidade, houve efeito significativo do grupo experimental ($p=0,017$), efeito do momento ($p<0,001$) e interação entre estes fatores ($p<0,001$). Na comparação entre momentos, os animais do grupo Salina apresentaram uma maior média no momento de 14 dias, não houve diferenças estatísticas no grupo Lactacistina, já no grupo 6OHDA as menores médias foram registradas no momento de zero e 7 dias, se elevando no momento de 14 dias e atingindo sua máxima no momento de 28 dias, não havendo diferença no momento de 21 dias em comparação com as médias de 14 e 28 dias. Com a comparação entre grupos, o grupo Salina apresentou uma maior média no momento de 14 dias em comparação ao grupo Lactacistina e uma menor média no momento de 28 dias em comparação com o grupo 6OHDA. O grupo Lactacistina a média foi menor comparada ao grupo Salina no momento de 14 dias e em comparação com o grupo 6OHDA no momento de 21 dias.

O grupo 6OHDA apresentou uma maior média no momento de 28 dias em comparação com os grupos Salina e Lactacistina.

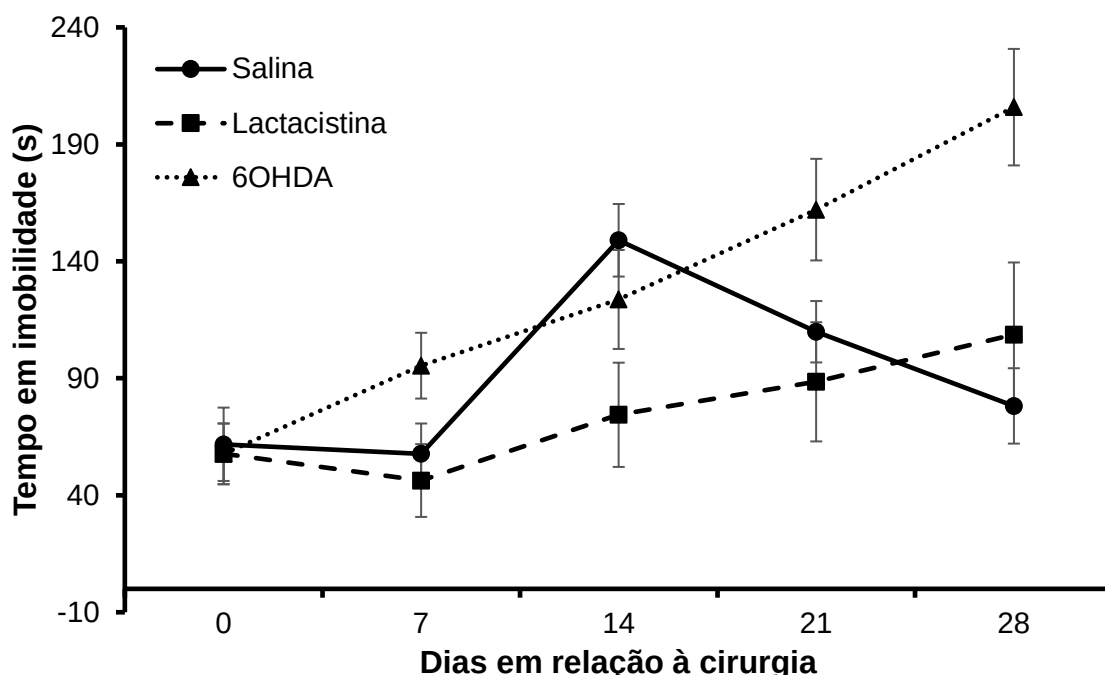


Figura 20 – Gráfico referente ao tempo em segundos de imobilidade no teste de suspensão pela cauda. Onde os símbolos representam a média e as barras representam o erro padrão da média.

Os animais do grupo Lactacistina em comparação com o grupo controle apresentaram um tempo em movimento menor nos momentos de 7, 21 e 28 dias, corroborando com o grupo 6-OHDA nos momentos de 21 e 28 dias, todavia o grupo Lactacistina não apresentou resultado significativo frente ao tempo em imobilidade onde apenas o grupo 6OHDA apresentou um valor maior entre os demais grupos. Sendo os animais lesionados por 6-OHDA apresentando melhores resultados no teste. Podendo esses achados, em ambos os grupos, serem um resultado motor como emocional do tipo depressivo.

4.3 Avaliação da marcha.

Os resultados das análises estatísticas referentes aos dados coletados no teste de avaliação da marcha: comprimento do passo, desvio anteroposterior, desvio látero-lateral e base de sustentação, estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultados referentes aos parâmetros avaliados, no teste de avaliação da marcha, em cada grupo experimental e em cada momento de análise.

Avaliação da Marcha	Grupo experimental		
	Salina	Lactacistina	6OHDA
Comprimento do passo (Grupo: $p=0,077$; Momento: $p=0,005$; Grupo x momento: $p=0,007$)			
Dia 0	27,99±0,76Aa	28,29±0,74Aa	27,56±1,12Aa
Dia 7	26,39±1,41Aa	18,16±5,00Ba	26,43±3,26Aa
Dia 14	27,15±0,88Aa	17,61±5,04Ba	27,20±3,39Aa
Dia 21	30,79±1,27Aa	16,78±4,75Bb	26,86±3,42Aab
Dia 28	26,39±1,41Aa	16,36±4,57Ba	25,61±3,02Aa
Desvio anteroposterior (Grupo: $p=0,068$; Momento: $p=0,065$; Grupo x momento: $p=0,049$)			
Dia 0	6,73±0,49Aa	7,75±0,68Aa	9,00±0,71Aa
Dia 7	8,25±0,92Aa	3,70±1,23Bb	5,07±1,11Bab
Dia 14	7,80±1,16Aa	4,41±1,33ABa	7,06±1,12ABa
Dia 21	9,00±0,71Aa	4,91±1,51ABb	6,58±1,12ABab
Dia 28	7,76±0,82Aa	5,44±1,65ABa	6,77±1,43ABa
Desvio látero-lateral (Grupo: $p=0,136$; Momento: $p=0,004$; Grupo x momento: $p=0,013$)			
Dia 0	4,80±0,62Aa	5,41±0,47Aa	5,07±0,32Aa
Dia 7	4,36±0,57Aa	3,35±0,95Ba	4,13±0,64Aa
Dia 14	5,41±0,47Aa	2,25±0,64Bb	3,75±0,58Aab
Dia 21	5,12±0,25Aa	3,44±1,11Ba	3,16±0,59Aa
Dia 28	6,00±0,69Aa	3,75±1,07ABa	4,18±0,65Aa
Base de sustentação (Grupo: $p=0,085$; Momento: $p<0,001$; Grupo x momento: $p=0,003$)			
Dia 0	26,12±1,14Aa	27,15±0,48Aa	27,55±0,97Aa
Dia 7	25,75±1,18Aa	16,41±4,51Ba	22,45±2,66Aa
Dia 14	26,96±0,96Aa	15,59±4,30Bb	22,80±2,72Aab
Dia 21	29,53±0,73Aa	18,78±5,19Bb	22,29±2,72Aab
Dia 28	28,25±1,11Aa	17,12±4,75Bb	23,85±2,86Aab

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão da média. Efeito do grupo, do momento e interação entre os fatores, no teste ANOVA de duas vias de medidas repetitivas. Letras maiúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa entre os momentos de análise (pós-teste de Tukey, $p<0,05$). Letras minúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p<0,05$).

4.3.1 Comprimento do passo.

Os resultados referentes ao comprimento do passo, nos diferentes grupos e momentos de análise, estão ilustrados na Figura 21.

Na avaliação dos dados referentes ao teste de comprimento do passo, houve efeito significativo do grupo experimental ($p=0,077$), efeito do momento de análise ($p<0,005$) e interação entre estes fatores ($p<0,007$). Pode-se observar que no grupo Lactacistina houve uma diminuição do comprimento do passo no período de 7 dias, todavia não havendo alterações nos demais períodos. Já em comparação entre grupos houve diferença significativa no período 21 dias onde o grupo Lactacistina a média foi maior que o grupo Salina.

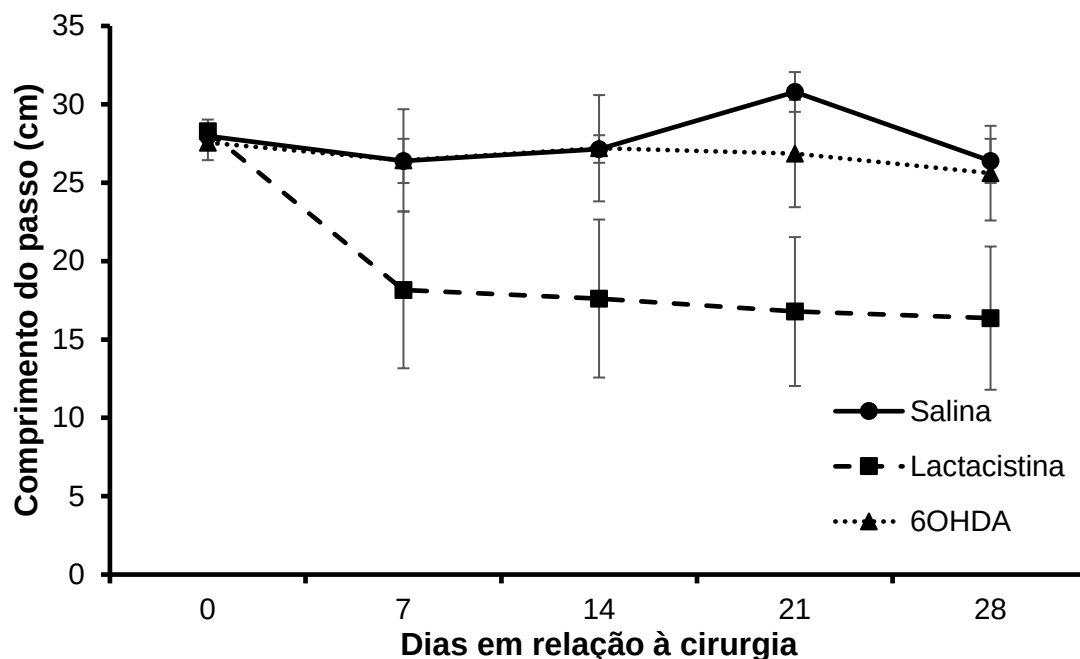


Figura 21 – Gráfico referente ao comprimento do passo em centímetros no teste de avaliação da marcha. Onde os símbolos representam a média e as barras representam o erro padrão da média.

4.3.2 Desvio anteroposterior.

Os resultados referentes ao desvio anteroposterior, nos diferentes grupos e momentos de análise, estão ilustrados na Figura 22.

Na análise dos dados obtidos do desvio anteroposterior do teste de avaliação da marcha, não houve efeito significativo do grupo experimental ($p=0,068$), não houve efeito significativo do momento de análise ($p=0,065$) e interação entre estes fatores ($p=0,049$). A comparação entre momentos tanto o grupo Lactacistina como 6OHDA as médias no momento de 7 dias foram menores comprado ao momento de zero dias, todavia sem diferença estatística nos demais períodos. Na comparação entre grupos nos momentos de 7 dias e 21 dias o grupo Lactacistina apresentou uma menor média em comparação com o grupo Salina.

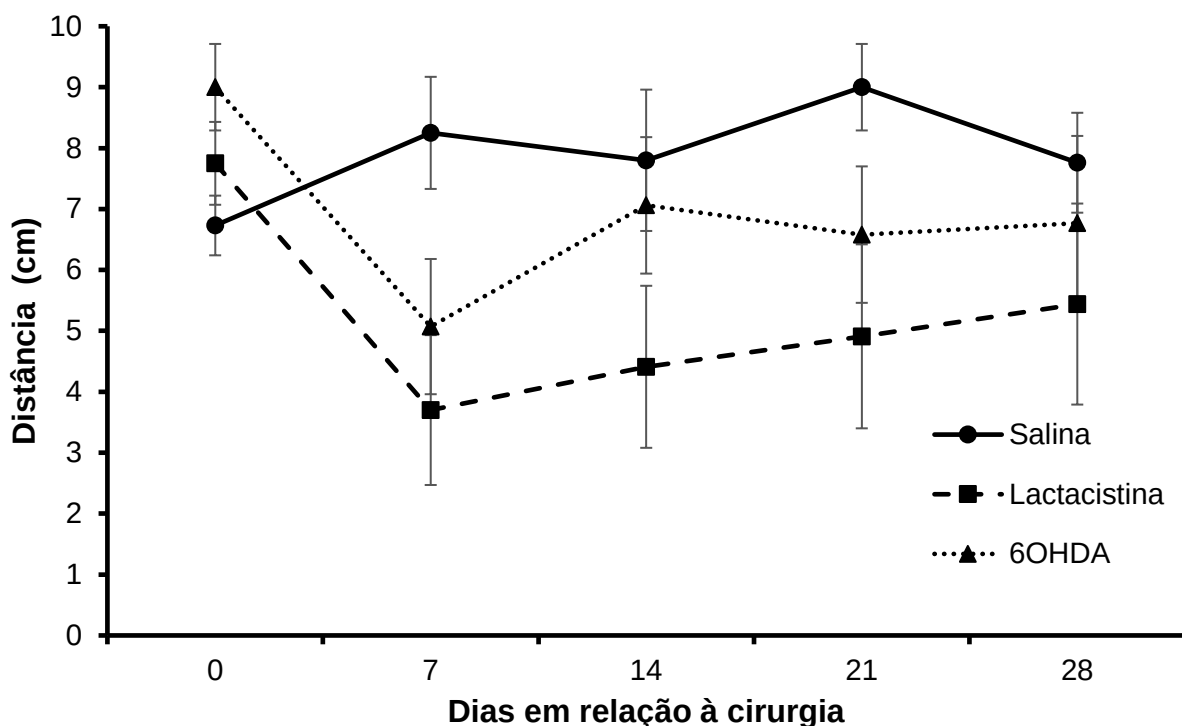


Figura 22 – Gráfico referente ao desvio anteroposterior do passo em centímetros no teste de avaliação da marcha. Onde os símbolos representam a média e as barras representam o erro padrão da média.

4.3.3 Desvio látero-lateral.

Os resultados referentes ao desvio látero-lateral, nos diferentes grupos e momentos de análise, estão ilustrados na Figura 23.

Na análise dos dados obtidos do desvio látero-lateral do teste de avaliação da marcha, não houve efeito significativo do grupo experimental ($p=0,136$), havendo efeito significativo do momento de análise ($p=0,004$) e interação entre estes fatores ($p=0,013$). A comparação entre momentos não houve diferença estatística nos grupos 6OHDA e Salina, todavia o grupo Lactacistina apresentou uma menor média comparada ao momento zero nos momentos de 7 dias à 21 dias. Na comparação entre grupos apenas o grupo Lactacistina apresentou uma menor média com o grupo Salina no momento de 14 dias.

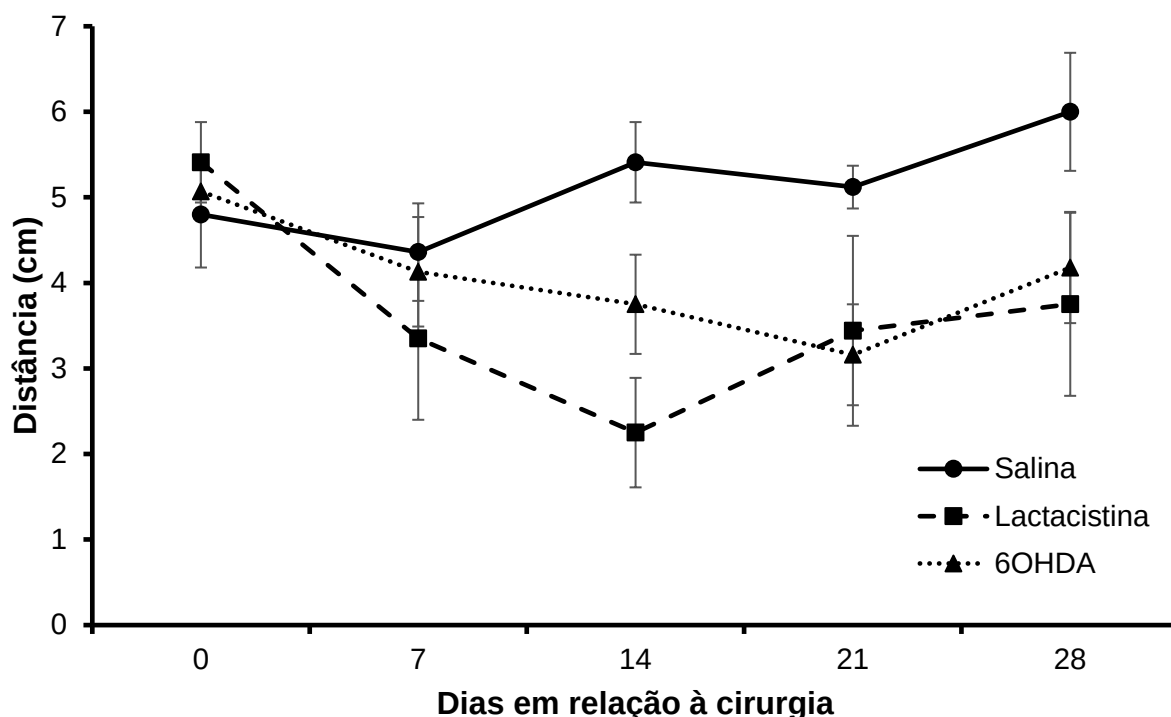


Figura 23 – Gráfico referente ao desvio látero-lateral do passo em centímetros no teste de avaliação da marcha. Onde os símbolos representam a média e as barras representam o erro padrão da média.

4.3.4 Base de sustentação.

Os resultados referentes à base de sustentação, nos diferentes grupos e momentos de análise, estão ilustrados na Figura 24.

Na análise dos dados obtidos da base de sustentação no teste de avaliação da marcha, houve efeito significativo do grupo experimental ($p=0,085$), havendo efeito significativo do momento de análise ($p<0,001$) e interação entre estes fatores ($p=0,003$). Apenas os animais lesionados com lactacistina apresentaram uma diminuição das médias obtidas no momento de 7 dias mantendo-as até o momento de 28 dias. Já na comparação entre grupos, somente as médias dos animais lesionados com lactacistina foram menores às do grupo Salina nos momentos de 14, 21 e 28 dias.

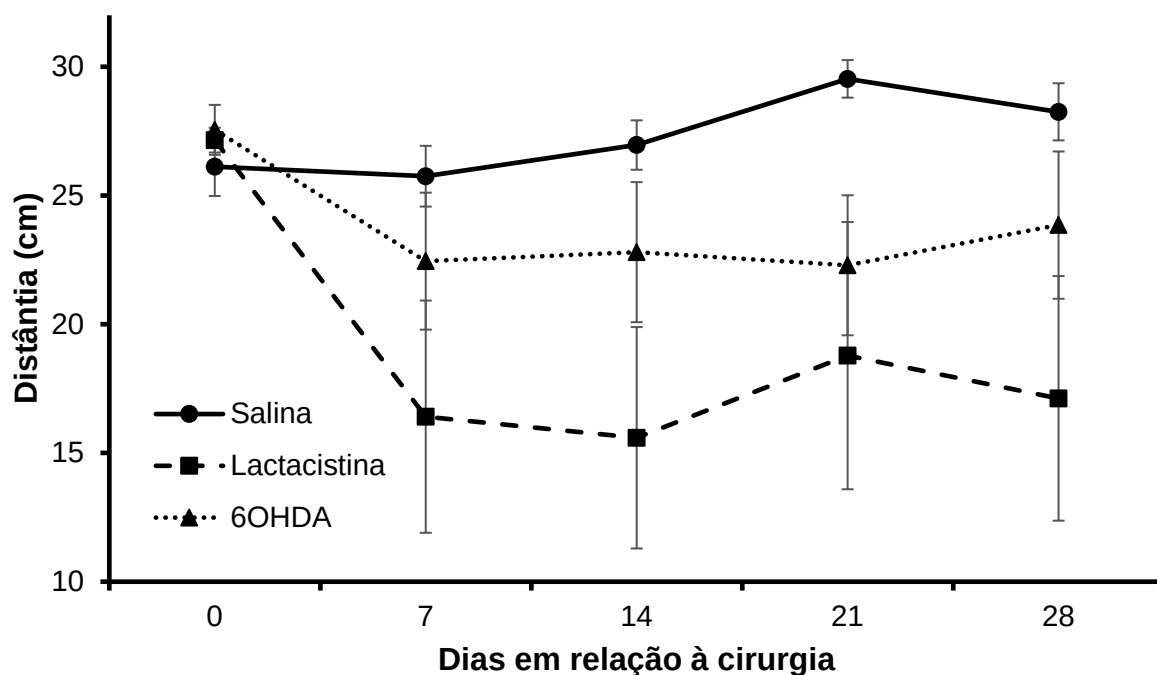


Figura 24 – Gráfico referente a base de sustentação do passo em centímetros no teste de avaliação da marcha. Onde os símbolos representam a média e as barras representam o erro padrão da média.

Houve alteração motora nos animais lesionados por lactacistina, pois apresentaram uma diminuição de parâmetros de marcha, desde na diminuição do comprimento do passo assim como nos desvios. Esperava-se que houvesse uma maior base de sustentação assim como maiores desvios, contudo os animais não apresentaram tal comportamento, levando à uma marcha de passadas menores com menores erros e/ou desvios.

4.4 Comportamento rotatório.

Os resultados das análises estatísticas referentes aos dados coletados no teste de avaliação da marcha: comprimento do passo, desvio anteroposterior, desvio látero-lateral e base de sustentação, estão dispostos na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultados referentes ao número de rotações realizadas, no teste de comportamento rotatório, em cada grupo experimental e em cada momento de análise.

Comportamento rotatório	Grupo experimental		
	Salina	Lactacistina	6OHDA
Rotação contralateral (Grupo: $p=0,012$; Momento: $p=0,342$; Grupo x momento: $p=0,045$)			
Dia 0	0,00±0,00Aa	4,20±1,59ABa	3,50±1,12ABa
Dia 7	0,10±0,10Ab	2,00±0,73Bab	5,90±1,56Aa
Dia 14	0,00±0,00Ab	5,40±2,38ABa	5,10±1,18ABa
Dia 21	0,10±0,10Ab	7,50±2,87Aa	3,90±1,01ABab
Dia 28	0,00±0,00Ab	6,50±2,56Aa	2,00±0,83Bab
Rotação ipsilateral (Grupo: $p=0,004$; Momento: $p=0,416$; Grupo x momento: $p=0,187$)			
Dia 0	0,00±0,00	1,50±0,48	0,90±0,50
Dia 7	0,00±0,00	0,70±0,42	0,90±0,35
Dia 14	0,10±0,10	1,90±0,89	0,40±0,22
Dia 21	0,00±0,00	0,60±0,27	0,40±0,31
Dia 28	0,00±0,00	0,40±0,22	1,00±0,56
Valor de p	C	B	A

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão da média. Efeito do grupo, do momento e interação entre os fatores, no teste ANOVA de duas vias de medidas repetitivas. Letras maiúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa entre os momentos de análise (pós-teste de Tukey, $p<0,05$). Letras minúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p<0,05$).

4.4.1 Rotação Ipsilateral.

Os resultados referentes ao comportamento rotatório ipsilateral, nos diferentes grupos e momentos de análise, estão ilustrados na Figura 25.

Na avaliação dos dados referentes ao comportamento rotatório ipsilateral, houve efeito significativo do grupo experimental ($p=0,004$), não havendo efeito significativo do momento de análise ($p=0,416$), houve interação entre estes fatores ($p=0,187$). Sendo os dados colhidos em momento prévio à aplicação de apomorfina. Não houve diferenças significativas nas médias nos momentos em cada grupo. Já na comparação entre grupos a média do grupo 6OHDA foi maior que a do grupo Lactacistina e esse por sua vez maior que o grupo controle.

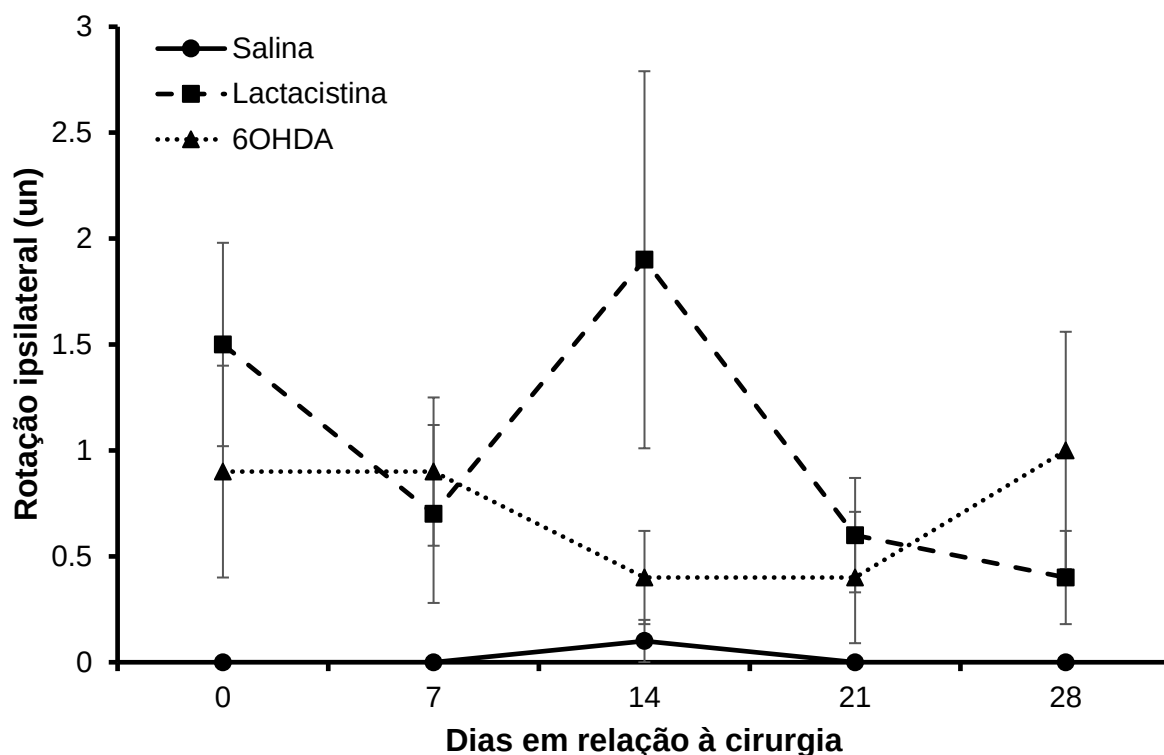


Figura 25 – Gráfico referente quantidade a quantidade de rotações ipsilaterais durante a realização do teste comportamento rotatório. Onde os símbolos representam a média e as barras representam o erro padrão da média.

4.4.2 Rotação contralateral.

Os resultados referentes ao comportamento rotatório contralateral, nos diferentes grupos e momentos de análise, estão ilustrados na Figura 26.

Na avaliação dos dados referentes ao comportamento rotatório contralateral, houve efeito significativo do grupo experimental ($p=0,012$), não havendo efeito significativo do momento de análise ($p=0,342$), houve interação entre estes fatores ($p=0,045$). Dados obtidos após administração de apomorfina. No comportamento avaliado, a comparação entre momentos, o grupo Lactacistina apresentou uma menor média no momento de 7 dias e uma maior média nos momentos de 21 e 28 dias comparadas entre os demais. No grupo 6OHDA no a maior média foi registrada no momento de 7 dias, contudo apresentou uma menor média no momento de 28 dias. Com a comparação entre momentos o grupo Lactacistina apresentou uma maior média no momento 14, 21 e 28 dias em comparação com grupo Salina. E os animais

do grupo 6OHDA nos momentos de 7 e 14 dias suas médias foram maiores em comparação com o grupo Salina.

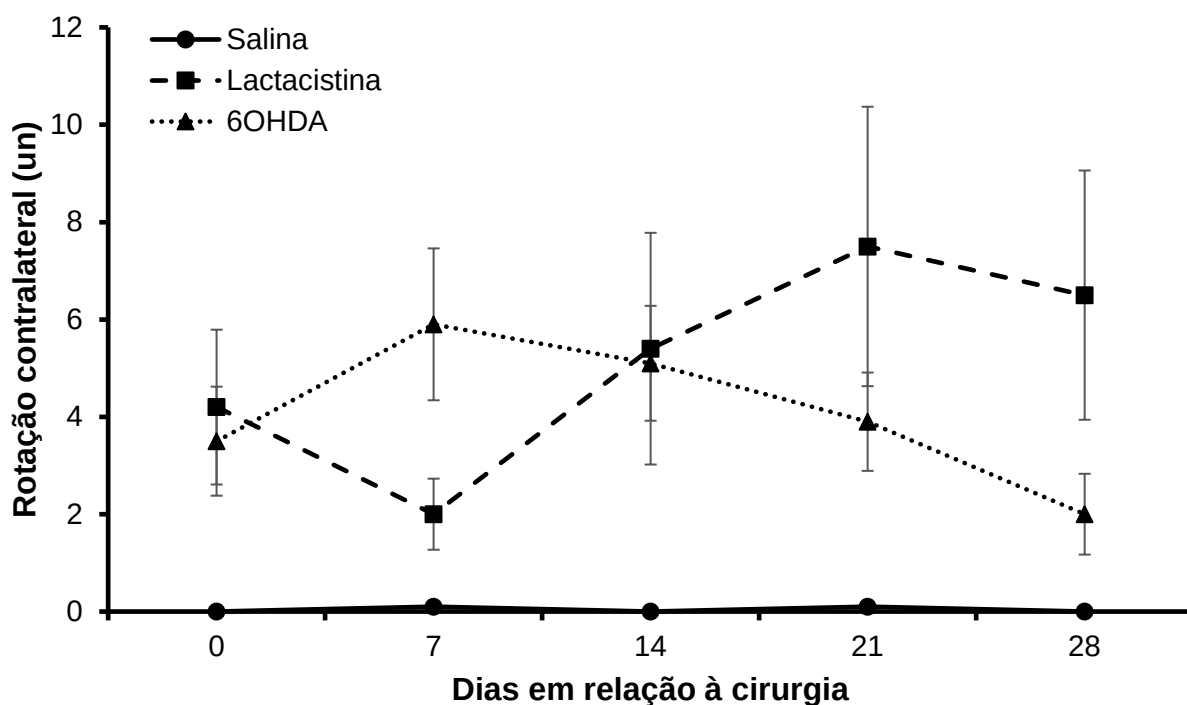


Figura 26 – Gráfico referente quantidade a quantidade de rotações contralaterais durante a realização do teste comportamento rotatório. Onde os símbolos representam a média e as barras representam o erro padrão da média.

No teste de comportamento rotatório os animais lesionados com lactacistina apresentaram mais rotações ipsilaterais, antes da aplicação de apomorfina, já no momento de 7 dias em comparação com o grupo controle, todavia os animais lesionados com 6-OHDA demonstraram maiores médias em comparação com o grupo Lactacistina e o grupo Salina. Nas rotações contralaterais o grupo Lactacistina foi coerente com o grupo 6OHDA no comportamento rotatório em comparação com o grupo Salina, contudo o grupo Lactacistina demonstrou um melhor resultado nos momentos de 14, 21 e 28 dias, onde os animais apresentaram mais rotações frente ao controle, sugerindo assim um melhor resultados a longo período.

No Quadro 1 e Quadro 2 estão representados resumidamente os resultados estatisticamente significantes das comparações entre momentos e entre grupos nos testes executados das análises motoras e não motoras.

COMPORTAMENTO	ENTRE MOMENTOS
Campo aberto	
Exp. central	6OHDA: 14d<0d
Exp. periférica	6OHDA: 14d/28d < 0d
Quant. quadrantes	6OHDA: 14d/28d < 0d
Exp. vertical	Sem ≠ entre momentos em todos os grupos
Autolimpeza	Sem ≠ entre momentos em todos os grupos
Tempo – Autolimpeza	Lactacistina: 14d<0d
Bolos fecais	Sem ≠ entre momentos em todos os grupos
Suspensão pela cauda	
Tempo – Movimento	Lactacistina: 0d>7d>28d 6OHDA: 0d>7d>21d 28d<0d e 7d e 14d
Tempo – Imobilidade	Salina: 14d>0d e 7d e 28d Lactacistina: sem ≠ 6OHDA: 28d>14d>0d e 7d
Avaliação da Marcha	
CP	Lactacistina: 0d>7d e 14d e 21d e 28d
DAP	Lactacistina: 7d<0d 6OHDA: 7d<0d
DLL	Lactacistina: 0d>7d e 14d e 21d
BS	Lactacistina: 0d>7d e 14d e 21d 28d
Comportamento Rotatório	
Contralateral	Lactacistina: 7d<21d e 28d 6OHDA: 7d>28d
Ipsilateral	Sem ≠ entre momentos em todos os grupos

Quadro 1 – Quadro com resultados das análises comparativas entre momentos.

COMPORTAMENTO	ENTRE GRUPOS		
	Salina x Lactacistina	Salina x 6OHDA	Lactacistina x 6OHDA
Campo Aberto			
Exploração vertical 14d	Lactacistina > Salina	-	-
Suspensão pela cauda			
Tempo em movimento 7d	Lactacistina < Salina	-	-
Tempo em movimento 21 e 28d	Lactacistina < Salina	6OHDA < Salina	-
Tempo em imobilidade 14d	Lactacistina < Salina	-	-
Tempo em imobilidade 21d	-	-	6OHDA > Lactacistina
Tempo em imobilidade 28d	-	6OHDA > Salina	6OHDA > Lactacistina
Avaliação da marcha			
Comprimento do passo 21d	Lactacistina < Salina	-	-
Desvio anteroposterior 7 e 21d	Lactacistina < Salina	-	-
Desvio laterolateral 14d	Lactacistina < Salina	-	-
Base de sustentação 14, 21 e 28d	Lactacistina < Salina	-	-
Comportamento rotatório			
Rotação contralateral 7d	-	6OHDA > Salina	-
Rotação contralateral 14d	Lactacistina > Salina	6OHDA > Salina	-
Rotação contralateral 21 e 28d	Lactacistina > Salina	-	-
Rotação ipsilateral	Lactacistina > Salina	6OHDA > Salina	6OHDA > Lactacistina

Quadro 2 – Quadro com resultados das análises comparativas entre grupos.

5. Discussão.

Neste estudo, pode-se observar que o modelo animal da doença de Parkinson com lesão de lactacistina alterou os padrões de comportamento assim como também fatores não motores nos animais quando comparados com o grupo controle.

A DP acarreta a uma perda progressiva de neurônios dopaminérgicos, localizados em sua maioria na SNc, levando a uma redução da neurotransmissão de dopamina no estriado e putâmen, levando a sinais e sintomas motores e não motores.

Descrito inicialmente por Calvin S. Hall na década de 1930, modificado por P.L. Broaderhurst na década de 1960, em estudos sobre medo e herança do comportamento. O comportamento de deambulação e impulso exploratório do animal estão diretamente associados, assim como a quantidade de bolos fecais expelidos durante o teste (exceto no primeiro dia de teste) onde este o seu aumento indica sinais fisiológicos de estresse (WHIMBEY, A.E.; DENENBERG, V. H., 1967; COSTA J.P. *et al.*, 2014). Há ainda outros mais parâmetros de avaliação associados ao teste, atualmente mais de 30 itens são listados (WALSH, R. CUMMINS, R.A., 1976).

A tigmotaxia (aversão à ambientes abertos, grandes, iluminados e desconhecidos e potencialmente perigosas), pode ser avaliada com o teste de campo aberto, sendo um bom meio de avaliação comportamental, comportamentos do tipo ansioso e/ou depressivo, relativos à atividade corporal, locomoção dos animais frente ao paradigma entre exploração e aversão (SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. 2015; SIMON, P.; DUPUIS, R.E.; CONSTENTIN, J., 1994; SACHS, D.B. *et al.*, 2013; BOURIN, M. 2015).

Segundo Fraga D.B. *et al.* (2018) o comportamento de autolimpeza, em direção cefalo-caudal onde o animal realiza a lambedura da pata e posteriormente o direcionamento à orelhas, face e nariz, além do objetivo principal de cuidado e higiene do animal é uma característica comportamental, na qual o aumento de sua frequência de atos está relacionado a comportamento do tipo ansioso, sendo um dos fenótipos relacionados ao estresse.

O comportamento de exploração vertical onde o animal permanece em suas patas posteriores com apoio de sua calda, onde a baixa frequência desse comportamento é associada como parâmetro semelhante aos comportamentos dos tipos ansioso e depressivo (ENNACEUR, A. 2014; STURMAN, O.; GERMAIN, P.; BOHACEK, J., 2017).

O teste de campo aberto é um teste simples no qual é possível avaliar tanto a atividade motora como não motora, desde da observação na quantidade de quadrantes percorridos como no desejo de exploração associado ao comportamento do tipo ansioso, sendo assim um aumento de cruzamentos indica uma redução do grau do comportamento do tipo ansioso, assim como uma diminuição dos comportamentos de autolimpeza e o tempo e execuções de estão associadas à sinais ansiolíticos (CHOLERIS, E. *et al* 2001; PEÑA, I.J.I. *et al.*, 2013; MIAO, Y.L. *et al.*, 2014).

Nesse estudo foi analisado, no decorrer do teste, a frequência de comportamentos de exploração horizontal, que é a quantidade de quadrantes percorridos durante o teste; a exploração vertical, como sendo a quantidade de erguimentos realizados pelo animal; além de também a análise de tempo de comportamentos de autolimpeza e número de bolos fecais.

Foi possível verificar que animais lesionados com 6-OHDA apresentaram menores médias estatísticas quando à quantidade de quadrantes percorridos frente ao grupo controle, tanto na exploração central como na exploração periférica, as médias foram menores a partir do momento de 14 dias mantendo-se até o momento final de 28 dias, fato também observado que há uma maior média de quadrantes cruzados na periferia em relação com região central, demonstrando assim um sinal do comportamento do tipo ansioso, conforme o proposto por Simon, P.; Dupuis, R.E.; Costentin, J., (1994); Sachs, D.B. *et al.*, (2013) e Bourin, M. (2015) na preferência do animal pela região periférica do campo.

Animais lesionados por LC em comparação com o grupo controle apresentaram uma menor média estatística no comportamento de autolimpeza já no momento de 7 dias, contudo a média do momento de 28 dias é igual estatisticamente aos momentos zero e 7 dias, demonstrando assim um menor grau do comportamento do tipo ansioso conforme sugerido por Fraga D.B. *et al.* (2018).

A maioria dos modelos de avaliação de depressão são baseados em exposição de um agente estressor de modo agudo ou crônico, com o intuito de desencadear sinais e sintomas do transtorno, sendo assim o teste de suspensão pela cauda conforme proposto por Stéru L. *et al* (1985) o teste de suspensão pela cauda é um modelo clássico no qual avalia parâmetros preditivos de depressão, ao expor o animal ao teste esse apresenta dois tipos de comportamentos, a mobilidade, decorrente na tentativa de escape, e a imobilidade como sendo a falta de motivação para escapar.

Sendo o animal suspenso pela cauda impedido de tocar a superfície do chão ou até mesmo de fugir o animal se depara em uma tentativa frustrante até mesmo estressora fisicamente frente ao seu fracasso (ABELAIRA, H. M.; RÉUS, G. Z.; QUEVEDO, J. 2013; YANKELEVITCH-YAHAV, R. *et al.*, 2015).

Nesse teste o animal passa por situações de estresse, a um estado de “desespero comportamental” e apresenta comportamentos distintos, desde a agitação na tentativa de escape como a imobilidade “desistência ou fracasso”. O impedir o animal de tocar o piso e de fugir, o conflito entre o estresse físico gerado pela tentativa de fuga sem sucesso e a motivação para continuar tentando, há um ponto onde provavelmente o estresse físico ultrapassa a motivação, e o animal assume postura imóvel (com o corpo e cabeça alongados, patas anteriores unidas e traseiras separada) e esse aspecto tanto a duração como frequência se eleva ao longo do tempo. O tempo de imobilidade (definido com o TMO em que o animal permanece pendurado passivamente e imóvel) é considerado um parâmetro indicativo de depressão (STÉRU L. *et. al* 1985). Esse comportamento de imobilidade frente à situação de estresse inescapável, resulta a um estado de desespero comportamental, sendo assim comparado e relacionado ao estado de depressivo em humanos (MACHADO, D.G. 2012).

De acordo com os dados analisados os animais lesionados com lactacistina apresentaram uma queda significativa do tempo em movimento, assim como os animais lesionados com 6-OHDA também apresentaram uma diminuição da motilidade, assim como esperado o seu inverso que o tempo em imobilidade, houve um aumento já no momento de 7 dias, sendo os animais lesionados com 6-OHDA que apresentaram diferenças estatísticas entre o grupo experimental, não obstante o aumento do tempo de imobilidade dos animais do grupo Lactacistina também se elevou durante os momentos.

Tais achados demonstram que animais lesionados com 6-OHDA e lactacistina apresentam indicações do comportamento do tipo depressivo fato não observado nos animais do grupo controle, os resultados obtidos nesse estudo corroboram com os encontrados por Machado, D.G. (2012), Abelaira, H. M.; Réus, G. Z.; Quevedo, J. (2013); Yankelevitch-Yahav, R. *et al.*, (2015), onde animais lesionados por 6-OHDA apresentaram os mesmos achados.

A avaliação funcional da marcha foi realizada de acordo com o método descrito por Hruska *et al.*(1979), modificado por Kunkel-Bagden, E.; Dai, H N.; Bregmann, B.

S. 1993) e Clarke e Still (2001). . Na maioria das aferições, as pegadas das patas posteriores são impressas atrás das pegadas das patas anteriores, contudo, com ainda uma grande sobreposição entre elas (MULLENIX; NORTON; CULVER, 1975)

Uma das avaliações funcionais motoras estudadas nessa pesquisa é verificar alterações da marcha e do equilíbrio dos animais lesionados com 6-OHDA e lactacistina comparados com um grupo controle, sendo possível verificar alterações no comportamento motor decorrentes da depressão de dopamina, assim a instabilidade postural e alterações na marcha um fato também observado na fase final da doença de Parkinson (DELFINO, M.A. *et al.*, 2004).

Como a diminuição do comprimento do passo, marcha festinante, o aumento da frequência de passos assim como a diminuição na uniformidade do padrão de marcha são exemplos das mudanças ocorridas pela diminuição de dopamina, presente e característica da DP, assim os animais lesionados com lactacistina assemelharam aos sinais e sintomas da DP em humanos conforme estudos de Pothakos, K.; KURZ, M.J.; Lau, Y. (2009), também como sugerido por Chen, L.; Yung, W. H. (2004), a diminuição do neurotransmissor dopamina leva a uma redução nos disparos de impulsos espontâneos do globo pálido, contribuindo assim com sintomas hipocinéticos da DP.

Há relato que animais lesionados por 6-OHDA com intuito de investigação na dinâmica de marcha, em comparação com grupo controle a 6-OHDA não foi eficaz em demonstrar diferença significativa no teste de avaliação da marcha, (comprimento do passo, base de sustentação, desvios láteros-laterais e ântero-posterior), assim como observado por Bonito-Oliva, A.; MASINI, D.; Fisone, G. (2014) fato qual foi similar em nosso estudo.

Nesse estudo a lactacistina se mostrou mais eficaz na assimilação dos sintomas da DP, observado no teste de avaliação da marcha. Pode-se observar que animais lesionados com lactacistina apresentaram uma diminuição do comprimento do passo, já no momento de 7 dias, fato não observado com significância estatística no grupo tratado com 6-OHDA, observado também uma redução das médias aferidas do desvio anteroposterior e do desvio látero-lateral, e base de sustentação.

O teste de comportamento rotatório já amplamente utilizado em modelos experimentais com o intuito de avaliar a perda neuronal dopaminérgica presente na DP, sendo um teste bem sensível para lesões no estriado. Sendo o comportamento rotacional visível em animais com diversos estágios de perda neuronal. Também

utilizado para avaliar assimetria funcional dos animais com que sofreram lesões unilaterais, pois esse modelo de lesão da DP permite que seja pesquisados meios de intervenção terapêutica tanto de agentes neuro protetores e também de recuperação comportamental (OLSSON, M. *et al.*, 1995).

Estudos sugerem que o comportamento rotatório apresenta um significado pato-fisiológico, onde as rotações contralaterais não somente representam uma atividade antiparkinsoniana, mas indicam a habilidade de induzir discinesias sendo usadas como estudo do potencial farmacológico antiparkinsonianos. As drogas para tratamento sintomático da DP foram primeiramente avaliadas nas suas capacidades de induzir rotações (SCHNEIDER, M.B. *et al.*, 1984; FUKUZAKI, K.; KAMENSONO, T.; NAGATA, R. 2000; PRIKHOJAN, A.; BRANNA, T.; YAHR, M.D. 2000; LANE, E.L.; CHEETHAM, S.C.; JENNER, P. 2006).

Ao animal ser estimulado com agonistas diretos dos receptores dopaminérgicos com apomorfina, o que estimula tanto receptores D1 quanto D2, os animais apresentam um comportamento de rotação contralateral ao lado no qual há maior atividade, ou seja, há um aumento de atividade motora no lado contralateral à lesão, pois ocorre a estimulação induzida por deservação dos receptores dopaminérgicos D2 hipersensibilizado no estriado lesado. Essa rotação contralateral induzida por apomorfina está relacionada com alterações funcionais dos receptores de dopamina, sendo também um indicador quantitativo da função da DA pós-sináptica, e o aumento de receptores D2 no estriado desnervado (WADDINGTON, A.J. *et al.*, 1979; SCHWARTING, R.K.W. e HUSTON, J.P. 1996).

Segundo Husson J.L. *et al.* (1993) o comportamento rotatório é presente com valores de 90% de perda neuronal; já Lee C.S., Sauer H. e Bjorklund A. (1996) esse valor é de 60 a 80%. Deumens R., Blokland A. e Prickaerts J. (2002) e HEFTI *et al.*, (1980) sugerem a perdas de aproximadamente 50% dos neurônios dopaminérgicos presentes da SN. Há também uma forte correlação entre as rotações induzidas por apomorfina e o percentual da lesão no tecido neuronal (CARMAN, L.S.; GAGE, F.H.; SHULTS, C.W. 1991).

Nesse teste tem-se a possibilidade de avaliar os resultados tanto de modo quantitativo como qualitativo, sendo utilizado para determinar os efeitos das lesões unilaterais, a função dopaminérgica pós-sináptica e a hipersensibilidade dos receptores no estriado e núcleos da base. O comportamento rotatório é utilizado com o intuito de descrever e determinar o grau das lesões unilaterais, sua utilização é viável

pois a obtenção de dados é realizada de modo simples, não despendendo maiores recursos financeiros e não é necessário um treinamento prévio do animal (SCHWARTING, R.K.W. e HUSTON, J.P. 1996).

Foi observado por Ungerstedt & Arbuthnott (1970) e Ungerstedt (1996), que animais com lesão unilateral provocada por 6-OHDA apresentavam rotação em direção ao mesmo lado lesado, assim como uma postura direcionada ao mesmo lado. Espera-se avaliar se o mesmo fato ocorre com animais do grupo LC.

No teste de comportamento rotatório realizado nesse estudo não foi possível verificar um aumento significativo quanto à quantidades de rotações espontâneas, ipsilaterais, tão pouco a rotações contralaterais após tratamento com apomorfina, frente à estudos anteriores. Entretanto não se pode somente através do teste de comportamento rotatório avaliar a severidade da depleção de dopamina, quanto à quantidade de comportamentos rotatórios observados nesse estudo, (média < 10 para n=10 nos grupos), durante o período avaliado, pois em outros estudos a quantidade de rotações sendo espontâneas e/ou induzidas possuem médias com três dígitos (HERRERA.M.; UNGERSTEDT, U. 1984; ISHIDA,Y.; *et.al.* 2005; GREGÓRIO. L.,M. 2007; NUNES. A.,C.,L.; 2015; VECCHIA D.D. *et al.*, 2015).

Esse estudo demonstrou que os animais lesionados com lactacistina apresentaram um maior comportamento rotatório já significativo na primeira semana após o tratamento, e a média de comportamentos rotatórios induzidos por apomorfina foi elevando com o passar dos momentos, fato não observado no grupo de animais lesionados com 6-OHDA, quais não apresentaram mudanças significativas no comportamento rotatório durante todo o período do teste, fato qual vem de encontro ao proposto em estudos anteriores quanto ao comportamento de animais lesionados por 6-OHDA.

Faz-se necessário a realização de novos estudos para determinar a posologia de lactacistina para que se possua um efeito significante no comportamento rotatório quando ao já conhecido de modelos experimentais de 6-OHDA. Nesse estudo utilizou-se a dose de 3µg de 6-OHDA, e de 5µg de lactacistina, contudo os animais lesionados com lactacistina apresentaram melhores resultados, demonstrando assim que houve a perda neuronal dopaminérgica, devido às rotações conforme demonstrado por Schwarting, R.K.W. e Huston, J.P. (1996).

Nesse estudo observamos que no teste de campo aberto animais lesionados por 6-OHDA apresentaram uma menor média de quadrantes percorridos quanto ao

grupo Lactacistina apenas o tempo de autolimpeza foi menor estatisticamente frente aos outros dados, e esses achados demonstram um maior nível de comportamento do tipo ansioso nos animais de ambos os grupos.

No teste de suspensão pela cauda os animais do grupo Lactacistina apresentaram com maior quadro característico do comportamento do tipo depressivo devido à diminuição significativa do tempo em movimento quando submetido ao estresse ocasionado pelo teste.

Os animais do grupo Lactacistina pode se observar que apresentaram uma maior dificuldade motora conforme o teste de avaliação da marcha em que as médias do comprimento do passo, desvios anteroposteriores e láterolateral e base de sustentação foram menores comparadas aos animais do grupo controle e 6-OHDA. A lactacistina se demonstrou mais eficaz em apresentar comportamento rotatório contralateral após indução por apomorfina, fato não observado no grupo 6-OHDA.

Sendo um modelo de pesquisa inovador a lesão por LC assemelha-se com a patogênese da DP, devido ao processo de falha do UPS, firmando a construção de conhecimentos de suma importância para futuros avanços na investigação dos mecanismos subjacentes da neurodegeneração, também para testes clínicos e farmacológicos para o tratamento ou prevenção dessa doença.

Assim é sugerido que sejam realizados novos estudos a fim de se esclarecer e estabelecer parâmetros para modelos experimentais de sinais e sintomas motores e não motores da doença de Parkinson, que sejam capazes de melhor mimetizar aos sinais e sintomas em seres humanos, favorecendo assim estudos e pesquisas para possíveis tratamentos ou procedimentos inibitórios.

6. Conclusão.

O modelo experimental por lactacistina apresentou um melhor resultado em dificuldades motoras, evidenciado pelos testes de avaliação da marcha e comportamento rotatório, em análises entre momentos.

Ambas as drogas apresentaram eficazes quanto aos efeitos não motores, a 6-OHDA mais evidente no teste de campo aberto e a lactacistina no teste de suspensão pela cauda.

A lactacistina se mostrou eficaz em demonstrar alterações motoras e não motoras nos testes de suspensão pela cauda, avaliação da marcha e comportamento rotatório em comparação com a 6-OHDA. Frente aos testes e seus resultados animais do grupo Lactacistina apresentaram um melhor desempenho em demonstrar efeitos de sinais e sintomas da doença de Parkinson, do que os animais do grupo 6-OHDA.

REFERÊNCIAS

ABELAIRA, H. M.; RÉUS, G. Z.; QUEVEDO, J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, n. 2, p. 112-120, 2013.

ABDELWAHAB, M.; SANKAR, T.; PREUL, M. Intracranial Implantation with Subsequent 3D In Vivo Bioluminescent Imaging of Murine Gliomas. **Journal of visualized experiments**, v.57, n.e3403, nov. 2011.

ANTONY, P.M.A. ; DIEDERICH, N.J. ; KRUGER, R. ; BALLING, R. The hallmarks of Parkinson's disease. **FEBS Journal** **280** p.5981-93, 2013.

BRAAK, H.; DEL TREDICI, K.; RUB, U.; DE VOS, R.A.; JANSEN STEUR, E.N.; BRAAK, E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology Aging**, v.24, p. 197–211, 2003.

BENSAID, M.; MICHEL, P.P.; CLARK, S.D.; HIRSCH, E.C.; FRANÇOIS, C. Role of pendunculo pontine cholinergic neurons in the vulnerability of nigral dopaminergic neurons in Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 275, n. 1, p. 209-19, jan. 2016.

BONITO-OLIVA, A.; MASINI, D.; FISONE, G. A mouse model of non-motor symptom on Parkinson's disease: focus on pharmacological interventions targeting affective dysfunctions. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 27, n. 8, p. 1-12, ago. 2014.

BOURIN, M. Animal models for screening anxiolytic-like drugs: a perspective. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 295-303, 2015.

BRASIL. RESOLUÇÃO CONAMA nº 358, de 29 de abril de 2005. **Gestão De Resíduos E Produtos Perigosos**. Brasília, DF. maio 2005 Disponível em: <

<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=462>>. Acesso em: 09 set. 2019.

_____. RESOLUÇÃO ANVISA RDC Nº 306, DE 7 DE DEZEMBRO DE 2004. **Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde.** Brasília, DF. dez. 2004. Disponível em: <
http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0306_07_12_2004.pdf/95eac678-d441-4033-a5ab-f0276d56aaa6>. Acesso em: 09 set. 2019.

BROEMER, M.; MEIER, P. Ubiquitin-mediated regulation of apoptosis. **Trends in cell biology**, v. 19, n.3, p. 130-40. mar. 2009.

BROWN, P.; OLIVIERO, A.; MAZZONE, P.; INSOLA, A.; TONALI, P.; DI LAZZARO, V. Dopamine dependency of oscillations between subthalamic nucleus and pallidum in Parkinson's disease. **Journal of Neuroscience**, v.21, n.3, p.1033-38, 2001.

CALDWELL, K.A. ; TUCCI, M.L. ; ARMAGOST, J. ; HODGES, T.W. ; CHEN, J. ; MEMON, S.B. ; BLALOCK, J.E. ; DELEON, S.M. ; FINDLAY, R.H. ; RUAN, Q. ; WEBBER, P.J. Investigating bacterial sources of toxicity as an environmental contributor to dopaminergic neurodegeneration. **PLoS One**, v. 4, n. 10, p.e7227. 2009.

CARMAN, L.S.; GAGE, F.H.; SHULTS, C.W. Partial lesion of the substantia nigra: relation between extent of lesion and rotational behavior. **Brain Research**, 553: 275-83, 1991.

CARVALHO, M.M. ; CAMPOS, F.L. ; COIMBRA, B.; PEGO, J.M. ; RODRIGUES, C. ; LIMA, R. ; RODRIGUES, A.J. ; SOUSA, N. ; SALGADO, A.J. Behavioral characterization of the 6-hydroxidopamine model of Parkinson's disease and pharmacological rescuing of non-motor deficits. **Molecular neurodegeneration**, v. 8, n. 1, p. 14, 2013.

CIECHANOVER, A. The ubiquitina-proteasome pathway: on protein death and cell life. **The EMBO Journal**, v. 17, p. 7151-60. dez. 1998.

CLARKE, K. A.; STILL, J. Development and consistency of gait in the mouse. **Physiology & Behavior**, v. 73, n. 1-2, p. 159-164, may 2001.

CHEN, L.; YUNG, W. H. GABAergic neurotransmission in globus pallidus and its involvement in neurologic disorders. **Acta Physiologica Sinica**, v. 56, n. 4, p. 427-35, ago. 2004.

CHOLERIS, E., THOMAS, A.W., KAVALIERS, M.; PRATO, F.S. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 25, n. 3, p. 235-60, maio 2001.

COSTA, J. P.; OLIVEIRA, G. A. L.; ALMEIDA, A. A. C.; ISLAM, M. T.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Anxiolytic effects of phytol: possible involvement of GABAergic transmission. **Brain Research**, v.14, n. 1547, p. 34-42, feb. 2014.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron Cell Press**, New York, New York, EUA, v.39, n.6, p.:889–909, set. 2003.

DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L. The role of parkin in familial and sporadic Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 25, n. S1, p. S32-S39. fev. 2010.

_____. Molecular Pathways of Neurodegeneration in Parkinson's Disease. **Science**, v. 302, n. 5646. p. 819-22. jan. 21, 2014.

DE LAU, L.M.; BRETELER, M.M. Epidemiology of Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**, v.5, n. 6; p. 525-35. jul. 2006.

DELFINO, M.A.; STEFANO, A.V.; FERRARIO, J.E.; TARAVINI, I.R.E.; MURER, M.G.; GERSHANIK, O.S. Behavioral sensitization to different dopamine agonists in a parkinsonian rodent model of drug-induced dyskinesias. **Behav. Brain Res**, v. 152, p.297-306, 2004.

DEUMENS, R.; BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Review. Exp Neuro.**, v.175, p.303-17, 2002.

DUBOIS, B. ; PILLON, B. Cognitive deficits in Parkinson's disease. **Journal of Neurology**, v.44, p.2-8, 1997.

EKMAN, L.L. **Neurociência Fundamentos para Reabilitação**. 11^a ed. Elsevier Editora Ltda. Brasil, 2011.

ELBA, Z.; MOISAN. F. ; Update in the epidemiology of Parkinson's disease. **Current opinion Neurology**, v.4, p. 454-60, 2008.

ELLENBROEK, B.; YOUN, J. Rodent models in neuroscience research: is it a rat race? **Disease Models & Mechanisms**, v. 9, n. 10, p. 1079-87. 2016.

EMBORG, M. E. Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 139, n. 2, p. 121-43. oct. 2004.

ENNACEUR, A. Tests of unconditioned anxiety – pitfalls and disappointments. **Physiology and Behavior**, v. 135, p. 55-71, 2014.

FLEURY.V.; BRINDEL.P.; NICASTRO.N.; BURKHARD.P,R. Descriptive epidemiology of parkinsonism in the Canton of Geneva,. **Parkinsonism & related disorders**, v.54, p.30-9, Switzerland, 2018

FRAGA, D.B.; OLESCOWICZ, G.; MORETTI, M.; SITENESKI, A.; TAVARES, M.K.; AZEVEDO, D.; COLLA, A.R.; RODRIGUES, A.L.S. Anxiolytic effects of ascorbic acid and ketamine in mice. **Journal of Psychiatric Research**, v. 100, p. 16-23, 2018.

FORNAGUERA, J.; SCHWARTING, R.K.W. Early behavioral changes after nigro-striatal system damage can serve as predictors of striatal dopamine depletion. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 23, p. 1353-68, nov. 1999.

FORNAI, F.; LENZI, P.; GESI, M.; FERRUCCI, M.; LAZZERI, G.; BUSCETI, C.L.; RUFFOLI, R.; SOLDANI, P.; RUGGIERI, S.; ALESSANDRÌ, M.G.; PAPARELLI, A. Fine structure and biochemical mechanisms underlying nigrostriatal inclusions and cell death after proteasome inhibition. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n.26, p. 8955–66, out. 2003.

FUKUZAKI, K.; KAMENSONO, T.; NAGATA, R. Effects of ropinirole on various parkinsonian models in mice, rats and cynomolgus monkeys. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 65, p. 503-8, 2000.

GAGE, G. J., KIPKE, D. R., SHAIN, W. Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. **Journal of Visualized Experiments**, v. 65, e3564, p.1-9, 2012.

GITTIS, A. H.; BERKE, J. D.; BEVAN, M. D.; CHAN, C S.; MALLET, N.; MORROW, M. M.; SCHMIDT, R. New roles for the external globus pallidus in basal ganglia circuits and behavior. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 46, p. 15178-15183, Nov. 2014.

GLICKMAN, M.H.; ADIR, N. The Proteasome and the Delicate Balance between Destruction and Rescue. **PLoS Biology**, v.2, n. 1, p. 25-7, jan. 2004.

GREGORIO, M.L. **Estudo do comportamento rotatório induzido por diferentes substancias em ratos com lesão induzida por 6-OHDA no feixe prosencefalico medial (FPM)**. Dissertação (dissertação em farmacologia) – UFPR. Curitiba, 2007.

HEFTI, F.; MELAMED, E.; SAHAKIAN, B.J.; WURTMAN, R.J. Circling behavior in rats with partial, unilateral nigrostriatal lesions: effect of amphetamine, apomorphine, and L-dopa. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 12, p. 185-188, 1980.

HERRERA-MARSCHITZ, M.; UNGERSTEDT, U. Evidence that apomorphine and pergolide induce contralateral rotation in rats by different actions on D and D2 receptor sites. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 98, p.165-176, 1984.

HOLDORFF, B.; SILVA, A.M. R.; DODEL, R. Centenary of Lewy bodies (1912–2012). **Journal of Neural Transmission**, v.120, n. 4, p. 509-16, abr. 2013.

HRUSKA, R. E.; KENNEDY, S.; SILBERGELD, E. K. Quantitative aspects of normal locomotion in rats. **Life Sciences**, v. 25, n. 2, p. 171-9, jul. 1979.

HUDSON, J.L.; van HORNE, C.G.; STROMBERG, I.; BROCK, S.; CLAYTON, J.; MASSERANO, J.; HOFFER, B.J.; GERHARDT, G.A. Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. **Brain Research**, v.626, p.167-74, 1993.

ISHIDA, Y.; KAWAI, K.; MAGATA, Y.; ABE, H.; YOSHIMOTO, M.; TAKEDA, R.; HASHIGUCHI, H.; MUKAI, T.; SAJI, H. Alteration of striatal [¹¹C]raclopride and 6-[¹⁸F]fluoro-L-3,4-dihydroxyphenylalanine uptake precedes development of methamphetamine-induced rotation following unilateral 6-hydroxydopamine lesions of medial forebrain bundle in rats. **Neuroscience Letters**, v. 389, p. 30-34, 2005.

JENNER, P.; Functional models of Parkinson's disease: a valuable tool in the development of novel therapies. **Annals Neurology**, v.64, n. s2, p.S16–S29, 2008.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. **Principles of Neural Science**. 5th ed., McGraw-Hill Medical, New York City, 2014.

KITADA, T. ; ASAKAWA, S. ; HATTORI, N. ; MATSUMINE, H. ; YAMAMURA, Y. ; MINOSHIMA, S. ; YOKOKI, M. ; MIZUNO, Y. ; SHIMIZU, N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. **Nature**, v.392, p.605–8, 1998.

KLEIN, C.; WESTERNBERGER, A. Genetics of Parkinson's Disease. **Cold Springs Harbour Laboratory Press**, v.2 p. 1-16, jan. 2012.

KONIECZNY, J.; CZARNECKA, T.L.A.; LENDA, T.; KINGA KAMIŃSKA, K.; LORENC-KOCI E. Chronic L-DOPA treatment attenuates behavioral and biochemical deficits induced by unilateral laccystin administration into the rat substantia nigra. **Behavioural Brain Research**, v. 261, p. 79-88, mar. 2014.

KONIECZNY, J.; CZARNECKA, T.L.A. Early increase in dopamine release in the ipsilateral striatum after unilateral intranigral administration of laccystin produces spontaneous contralateral rotations in rats. **Neuroscience**, v.324, n.2, p.92-106. jun. 2016.

KUNKEL-BAGDEN, E.; DAI, H N.; BREGMANN, B. S. Methods to assess the development and recovery of locomotor function after spinal cord injury in rats. **Experimental Neurology**, v. 119, n. 2, p. 153-164, fev. 1993.

LANE, E.L.; CHEETHAM, S.C.; JENNER, P. Does contraversive circling in the 6-OHDAlesioned rat indicate an ability to induce motor complications as well as therapeutic effects in Parkinson's disease? **Exp. Neurol.**, v.197, p.284-90, 2006.

LANGSTON, J. W.; LANGSTON, E. B.; IRWIN, I. MPTP-induced parkinsonism in human and non-human primates--clinical and experimental aspects. **Acta neurologica Scandinavica. Supplementum**, v. 100, p. 49–54, 1984.

LANGSTON, J. W. ; FORNO, L.S. ; TETRUD, J. ; REEVES, A.G. ; KAPLAN, J.AA ; ARLUK, D. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. **Annals of neurology**, v.46, p. 598-605, 1999.

LEE, C.S.; SAUER, H.; BJORKLUND, A. Dopaminergic neuronal degeneration and motor impairment following axon terminal lesion by intrastriatal 6- hydroxydopamine in the rat. **Neuroscience**, v.72, n.3, p.641-53, 1996.

LEES, J. HARDY, J. REVESZ, T. Parkinson's disease. **Lancet**, v. 373, p. 2055-66, 2009.

LEROY, E.; BOYER, R.; AUBURGER, G.; LEUBE, B.; ULM, G.; MEZEY, E.; HARTA, G.; BROWNSTEINÄÄ, M.J.; JONNALAGADA, S.; CHERNOVA, T.; DEHEJIA, A.; LAVEDAN, C.; GASSER, T.; STEINBACHI, P.J.; WILKINSON, Q.D.; POLYMEROPOULOS, M.H. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. **Nature**, v. 395, n.1, p. 451-2, out. 1998.

LEVY, O. A.; MALAGELADA, C.; GREENE, L. A. Cell death pathways in parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps. **Apoptosis**, v.14, n.4, p478–500, jan. 2009.

LI, X.; REDUS, L.; CHEN, C.; MARTINEZ, P.A.; STRONG, R.; LI, S.; O'CONNOR, J.C. Cognitive Dysfunction Precedes the Onset of Motor Symptoms in the MitoPark Mouse Model of Parkinson's Disease. **PLoS One**, v.8, n. 8, p. 1-11, ago. 2013.

LORENC-KOCI, E.; LENDA, T.; MICHALUK, L.A.; WARDAS, J.; DOMIN, H.; ŚMIAŁOWSKA, M.; KONIECZNY, J. Different effects of intranigral and intrastriatal administration of the proteasome inhibitor lactacystin on typical neurochemical and histological markers of Parkinson's disease in rats. **Neurochemistry International**, v. 58, p. 839-49, mar. 2011.

LOWDON, I.M.R.; SEABER, A.V.; URBANIAK, J.R. Na improved method of recording rats tracks for measurement of the sciatic functional index of de Meedinaceli. **Journal Neuroscience Methods**: Amsterdam, v.24, p.279-81, 1988.

MACHADO, D. G. **Investigação do potencial antidepressivo de *Rosmarinus officinalis***. 2012. 266 f. Tese (Doutorado em Neurociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

MACKEY, S.; JING, Y.; FLORES, J.; DINELLE, K.; DOUDET, D.J. Direct intranigral administration of an ubiquitin proteasome system inhibitor in rat: Behavior, positron

emission tomography, immunohistochemistry. **Experimental Neurology**, v.247, p. 19-24, mar. 2013.

MARK, M. Parkinson's disease Pathogenesis, diagnosis, and treatment. **Primary Psychiatry**, v.12, n. 7; p. 36-41, 2005.

MC'NAUGHT, K.S.P. ; KEVIN, S.T.P. ; ROGER, B. ; OLE I. ; JENNER, P. ; OLANOW, C.W. Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. **Experimental neurology**, v. 179, n. 1; p.38-46. 2003.

MCNAUGHT, K.S.P. ; JENNER, P. Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. **Neurosci Lett**, v.297; p.191–4, 2001.

MCNAUGHT, K.S.P. ; PERL, D.P. ; BROWNELL, A.L. ; OLANOW, C.W. Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. **Annals of neurology**, v. 56, n. 1, p. 149-62, 2004.

MEREDITH, G.E. ; SONSALLA, P.K. ; CHESSELET, M.F. Animal models of Parkinson's disease progression. **Acta Neuropathol**, v.115, p.385–98, 2008.

MIAO, Y. L.; GUO, W. Z.; SHI, W. Z.; FANG, W. W.; LIU, Y.; LIU, J.; LI, B. W.; WU, W.; LI, Y. F. Midazolam ameliorates the behavior deficits of a rat posttraumatic stress disorder model through dual 18 kDa translocator protein and central benzodiazepine receptor and neurosteroid genesis. **PlosOne**, v. 9, n. 7, p. 1-7, jul. 2014.

MULLENIX, P.; NORTON, S.; CULVER, B. Locomotor damages in rats after X-irradiation in utero. **Experimental Neurology**, v. 48, n. 2, p. 310-24, ago. 1975.

NELSON, A. B.; KREITZER, A. C. Reassessing models of basal ganglia function and dysfunction. **Annual Review of Neuroscience**, v. 37, p. 117-135, dez. 2014.

NORMAN, G.R. ; STREINER, D.L. **Biostatistics the bare essentials**. 3^a ed. London: Mosby; 1994.

NUNES, A.C.L. **Estudo do efeito neuroprotetor da berberina sobre o dano neuronal, comportamento motor e memória de ratos com degeneração nigro-estriatal por 6-OHDA**. Tese (Ciências Médicas) – UFCE, Fortaleza, 2015.

OLANOW, C.W. ; KORDOWER, J.H. Modeling Parkinson's disease. **Ann. Neurol**, v.66, p.432–6, 2009.

OLSSON, M.; NIKKHAH, G.; BENTLAGE, C.; BJORKLUND, A. Forelimb acinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. **Journal of Neuroscience**, v. 15, p. 3863-75, 1995.

OPARA, J.A.; BROLA, W.; LEONARDI, M.; BLASZCZY, B. Quality of life in Parkinson's Disease. **Journal of Medicine and Life**, v.5, n.4, p. 375-81, 2012.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. 5a ed. Academic Press, San Diego, 2005.

PEÑA, I. J. I.; LEE, H. L.; YOON, S. Y.; PEÑA, J. B. I.; KIM, K. H.; HONG, E. Y.; CHEONG, J. H. The ethanol of *Cirsium japonicum* increased chloride ion influx through stimulating GABA_A receptor in human neuroblastoma cells and exhibited anxiolytic-like effects in mice. **Drug Discoveries & Therapeutics**, v. 7, n. 1, p. 18-33, feb. 2013.

PONT-SUNYER, C. ; HOTTER. A. ; GAIG. C. ; SEPPI, K. ; COMPTA, Y. ; KATZENSCHLAGER, R.; MAS, N.; HOFENEDER, D.; BRÜCKE, T.; BAYÉS, A.; WENZEL, K. ; INFANTE, J.; ZACH, H.; PIRKER, W.; POSADA, I.J.; ÁLVAREZ, R.; ISPIERTO, L.; FÀBREGUES, O.; CALLÉN, A.; PALASÍ, A.; AGUILAR, A.; MARTÍ, M.J.; VALLDEORÍOLA, F.; SALAMERO, M.; POWEW, W.; TOLOSA, E. The onset of nonmotor symptoms in Parkinson's disease (the ONSET PD study). **Mov Disord**, v.30, p. 229–37, 2015.

POTHAKOS, K.; KURZ, M.J.; LAU, Y. Restorative effect of endurance exercise on behavioral deficits in the chronic mouse model of Parkinson's disease with severe neurodegeneration. **BMC Neurosci.** v.10, n.1, p.6, 2009.

PRIKHODJAN, A.; BRANNA, T.; YAHN, M.D. Comparative effects of repeated administration of dopamine agonists on circling behavior in rats. **J. Neural Transm.**, v. 107, p. 1159-1164, 2000.

PRIYADARSHI, A.; KHUDER, S.A. ; SCHAUB, E.A. ; PRIYADARSHI, S.S. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. **Environ Res**, v.86, n. 86, p.122–7, 2001.

REDGRAVE, P.; RODRIGUEZ, M.; SMITH, Y.; OROZ, M. C. R.; LEHERICY, S.; BERGMAN, H.; AGID, Y.; DeLONG, M. R.; OBESO, J. A. Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n.11, p. 760-772, Nov. 2010.

RIEDERER, P. ; REICHMANN, H. ; YODIM, M. B. ; GERLACH, M. **Parkinson's Disease and Related Disorders**. Springer Science & Business Media. 71º ed., nov. 2006.

SACHS, B.D., RODRIGUEZ, R.M., SIESSER, W.B., KENAN, A., ROYER, E.L., JACOBSEN, J.P., WETSEL, W.C. AND CARON, M.G. The effects of brain serotonin deficiency on behavioural disinhibition and anxiety-like behaviour following mild early life stress. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 9, p. 2081-2094, 2013.

SATHLER, M.F. Efeito agudo de cocaína no transporte de aminoácidos em córtex de camundongos,

SCHAPIRA, A. H. V.; CHAUDHURI, K. R.; JENNER, P. Non-motor features of Parkinson disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 7, p. 435-450, 8 jun. 2017.

SCHESTATSKY, P.; ZANATTO, V.C.; MARGIS,R.; CHACHAMOVICH, R.; RECHE, M.; BATISTA, R.G.; FRICKE, D.; RIEDER, C.R.M. Quality of life in a Brazilian sample of patients with Parkinson's disease and their caregivers. **Rev Bras Psiquiatria**, v.28, n. 3, p.209-11, 2006.

SCHNEIDER, M.B.; MURRIN, K.C.; PFEIFFER, R.F.; DEUPREE, J.D. Dopamine receptors: effect of chronic L-Dopa and bromocriptine treatment in an animal model of Parkinson's disease. **Clin. Neuropharmacol**, v. 7, p. 247-257, 1984.

SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. **Journal of Visualized Experiments**, v. 96, p. 52434-52457, 2015.

SELKOE. D,J, ; Cell biology of protein misfolding : The examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Nature cell biology**, v.6, n.11, p.1054-61, nov.2004.

SHOT, S. **Statistics for health professionals**. London: W.B. Saunders Company, 3^a ed., 1990.

SIMON, P. ; DUPUIS, R.E. ; CONSTENTIN, J. Thigmotaxi as na index of anxiety im mice. Influence of dopaminergic transmissions. **Behavioral Brain Research**, v.61; p. 59-64. 1994.

SPILLANTINI, M.G. ; CROWTHER, R.A. ; JAKES, R. ; HASEGAWA, M. ; GOEDERT, M. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95; p. 6469–73. 1998.

STÉRU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v.85, p.367-70, 1985.

STURMAN, O.; GERMAIN, P.; BOHACEK, J. Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. **The International Journal on the Biology of Stress**, v. 21, n. 5, p. 443-452, 2017.

TATENHORST, L. ; LARS T. ; KIM-ANN S. ; JAN C.K. ; ÉVA M.S. ; MATHIAS B. ; PAUL L. Rho kinase inhibition by fasudil in the striatal 6-hydroxydopamine lesion mouse model of Parkinson disease. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 73, n. 8, p. 770-9, ago. 2014.

TAURIELLO, D.V.F. ; MADELON, M. M. The various roles of ubiquitin in Wnt pathway regulation. **Cell Cycle**, v.9, n. 18; p. 3724-33. 2010.

TERZIOGLU, M. ; GALTER, D. Parkinson's disease: genetic versus toxin-induced rodent models. **FEBS Journal**, v. 275; n. 7; p.1384-91. 2008.

UNGERSTEDT, U.; ARBUTHNOTT, G.W. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. **Brain Research**, v. 24, p. 485-93, 1970.

VECCHIA, D. D. et al. Effects of Hypericum perforatum on turning behavior in an animal model of Parkinson's disease. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 1, p. 111–115, mar. 2015.

VERNON, A.C. ; JOHANSSON, S.M.; MODO, M.M. Non-invasive evaluation of nigrostriatal neuropathology in a proteasome inhibitor rodent model of Parkinson's disease. **BMC neuroscience**, v. 11, n. 1, p.1. 2010.

VOGES, D. ; ZWICKL, P. ; BAUMEISTER, W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. **Annual review of biochemistry**, v.68; n. 1 p. 1015-68. 1999.

WADDINGTON, A.J.; CROSS, A.; LONGDEN, F.; OWEN, F.; POULTER, M. Apomorphine induced rotation in the unilateral 6-OHDA-lesioned rat: relationship to changes in striatal adenylate cyclase activity and 3H-spiperone binding. **Neuropharmacology**, v. 18, p. 643-645, 1979.

WALSH, R.; CUMMINS, R. A. The open-field test: acritical review. **Psychological Bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482-504, maio 1976.

WIRDEFELDT, K. ; ADAMI, H,-O ; TRICHOPOULOS, D. ; MANDE, J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease : a review of the evidence. **European Journal of Epidemiology**, v.26, p.s1-s58, 2011.

WEINTRAUB, D.; COMELLA, C.L.; HORN, S. Parkinson's disease — Part 1: Pathophysiology, symptoms, burden, diagnosis, and assessment. **Am J Manag Care**, v.14, p. 40-8, 2008.

WHIMBEY, A. E.; DENENBERG, V. H. Two independent behavioral dimensions in open-field performance. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 63, n. 3, p. 500-4, jun. 1967.

YANKELEVITCH-YAHAV, R., FRANKO, M., HULY, A.; DORON, R. The Forced Swim Test as a Model of Depressive-like Behavior. **Journal of Visualized Experiments**, n. 97, p. 1-7, 2015.

XIAO, Q.; YANG, S; LE, W. G2019S LRRK2 and aging confer susceptibility to proteasome inhibitor-induced neurotoxicity in nigrostriatal dopaminergic system. **Journal of Neural Transmission**, v. 122, n. 12, p.1645-57, 2015.

XIE, W. ; LI, X. ; LI, C. ; ZHU, W. ; JANKOVIC, J. ; LE, W. Proteasome inhibition modeling nigral neuron degeneration in Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 115, n. 1, p.188-99, 2010.

ZENG, B.Y. ; BUKHATWA, S. ; HIKIMA, A. ; ROSE, S. ; JENNER, P. Reproducible nigral cell loss after systemic proteasomal inhibitor administration to rats. **American Neurological Association**, v.60, n.2, p.248-52, 2006.

ZHANG, Y.; CHANG, C. ; GEHLING, D. J. ; HEMMATI-BRIVANLOU, A. ; DERYNCK, R. Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n.3, p. 974-9, 2001.

ZHANG, Z. ; LI, X. ; XIE, W.J. ; TUO, H. ; HINTERMANN, S. ; JANKOVIC, J. ; LE, W. Anti-parkinsonian effects of Nurr1 activator in ubiquitin-proteasome system impairment induced animal model of Parkinson's disease. **CNS & Neurological Disorders-Drug Targets**, v.11, n.6, p.768-73, 2012.

APÊNDICE I – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada "O efeito da lactacistina como modelo animal da doença de Parkinson, avaliando o comportamento motor-e não motor, e alterações histológicas na substância nigra parte compacta", registrada com o nº 863/2017, sob a responsabilidade de **Albert Schiaveto de Souza** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 6ª reunião ordinária do dia 18/07/2017.

FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	17/03/2017 a 31/03/2019
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Mus musculus</i> / Suíço
Nº de animais	50
Peso/Idade	20-30g / Adulto
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central/INBIO/UFMS

Joice Stein

Vice-coordenadora da CEUA/UFMS
Campo Grande, 19 de julho de 2017.