

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA**

**DANIEL ARNAUD PEREIRA FERREIRA
HERICK MENINÉA CANAVIEIRA**

**ESTRESSE OXIDATIVO E EFEITOS COMPORTAMENTAIS
RESULTANTES DA INIBIÇÃO CRÔNICA DO COMPLEXO I
MITOCONDRIAL POR ROTENONA**

**Belém
2011**

DANIEL ARNAUD PEREIRA FERREIRA
HERICK MENINÉA CANAVIEIRA

**ESTRESSE OXIDATIVO E EFEITOS COMPORTAMENTAIS
RESULTANTES DA INIBIÇÃO CRÔNICA DO COMPLEXO I
MITOCONDRIAL POR ROTENONA**

**Monografia apresentada para
obtenção do grau em Medicina
pela Universidade Federal do
Pará.**

Orientador: Edmar Tavares Costa

**Co-orientadora: Kátia Simone
Kietzer**

**Belém
2011**

DANIEL ARNAUD PEREIRA FERREIRA
HERICK MENINÉA CANAVIEIRA

**ESTRESSE OXIDATIVO E EFEITOS COMPORTAMENTAIS
RESULTANTES DA INIBIÇÃO CRÔNICA DO COMPLEXO I
MITOCONDRIAL POR ROTENONA**

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do grau em
Medicina pela Universidade Federal do Pará.**

Banca examinadora:

Orientador

Nome / Instituição

Nome / Instituição

Aprovado em: ___ / ___ / _____

Conceito: _____

Aos meus pais que jamais
deixaram de incentivar a minha
carreira acadêmica.

Daniel Arnaud Pereira Ferreira

Às orações de minha mãe.

Herick Meninéa Canavieira

AGRADECIMENTOS

A Deus pela dádiva de estarmos presentes no palco da vida e por ser autor da obra de nossas vidas;

Ao Prof. Dr. Edmar Tavares Costa pelos ensinamentos e atenção que concedeu à realização deste estudo, o que foi de fundamental importância;

À Prof^a. Dra. Kátia Simone Kietzer pelas suas orientações acadêmicas e seu apoio que ajudaram na construção deste trabalho;

Aos nossos amigos Alex Heringer e Celídia Jacob pela contribuição fundamental na realização deste projeto.

Às nossas famílias e colegas que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento deste estudo.

“Como dizia meu velho avô: `Se quiser vir a ser alguma coisa, que devore os livros!`”.

Seu Madruga

RESUMO

A rotenona, princípio ativo extraído de plantas tropicais como o timbó, é uma substância amplamente utilizada na região amazônica como piscicida na pesca artesanal e pesticida nas lavouras. Sua ação neurotóxica reproduz alguns aspectos da doença de Parkinson (DP) em modelos animais *in vivo* e *in vitro*, incluindo a degeneração nigroestriatal dopaminérgica e formação de inclusões citoplasmáticas semelhantes aos corpos de Lewy. Uma das hipóteses é a de que a exposição a fatores ambientais, juntamente com o envelhecimento e com fatores genéticos aumentam o risco de desenvolvimento da doença. Por causar alterações no metabolismo oxidativo, já que é um inibidor do complexo I mitocondrial, a rotenona aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). O excesso de EROs provoca efeitos prejudiciais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas. As consequências desse estresse oxidativo nos neurônios da via nigroestriatal levam a alterações de movimento, balanço e alterações do controle motor fino. No presente trabalho, ratos *Wistar* machos foram divididos em grupos controle ($n=12$) e tratado ($n=13$) e submetidos a administração intraperitoneal de rotenona por 30 dias. Foi avaliada a ocorrência de peroxidação lipídica em regiões encefálicas diretamente envolvida na DP como a substância negra e o corpo estriado, bem como outras regiões como córtex cerebral, cerebelo, hipocampo e hipotálamo. Córtex, cerebelo estriado e substância negra foram as áreas onde houve diferença estatística nos resultados entre os grupos controle e tratado. Os testes comportamentais realizados no primeiro, décimo quinto e trigésimo dia, mostraram alterações motoras incluindo a diminuição na atividade locomotora e diminuição na capacidade de adotar a posição bípede com e sem apoio. Portanto, não é possível descartar a possibilidade de que tais alterações motoras sejam resultantes do comprometimento de múltiplas funções em diversas áreas do sistema nervoso, incluindo ou não a via nigroestriatal. Como ainda não são completamente entendidos os mecanismos de toxicidade induzidos pela rotenona, este trabalho teve como objetivo complementar investigar a indução de estresse oxidativo em tecidos periféricos. Foram analisados tecidos como porção proximal do duodeno, fígado e rim. Os resultados comprovaram algum grau de comprometimento peroxidativo principalmente nas áreas do fígado e rim.

Palavras-chave: Rotenona, estresse oxidativo, peroxidação lipídica, Doença de Parkinson, encéfalo, comportamental.

ABSTRACT

Rotenone, an active ingredient extracted from tropical plants such as timbo, is a substance widely used in the Amazon region as a pesticide in the regional fishing. This neurotoxic reproduces many aspects of Parkinson's Disease (PD) in animal models in vivo and in vitro, including nigrostriatal dopaminergic degeneration and formation of cytoplasmic inclusions similar to Lewy bodies. One hypothesis is that exposure to environmental factors, along with aging and genetic factors increase the risk of disease development. By causing changes in oxidative metabolism, since it is an inhibitor of mitochondrial complex I, rotenone increases the production of reactive oxygen species (ROS). The excess of ROS has detrimental effects such as peroxidation of membrane lipids and aggression to tissue proteins and membranes. The consequences of oxidative stress in neurons of the nigrostriatal pathway lead to changes of motion, balance and changes in fine motor control. In this study, male *Wistar* rats, divided into control groups (n = 12) and treated (n = 13) underwent intraperitoneal administration of rotenone for 30 days. We evaluated the occurrence of lipid peroxidation in brain regions directly involved in PD as the substantia nigra and the striatum as well as other regions such as cerebral cortex, cerebellum, hippocampus and hypothalamus. Cortex, cerebellum, striatum and substantia nigra were the areas where there was statistical difference in outcomes between treated and control groups. Behavioral tests performed in the first, fifteenth and thirtieth days, showed motor abnormalities including decreased locomotor activity and decreased ability to adopt a standing position with and without support. So it is not possible to rule out the possibility that such changes are a result of dysfunction in multiple functions in various areas of the nervous system, including or not the nigrostriatal pathway. As the mechanisms of toxicity induced by rotenone are still not fully understood, this study aimed to further investigate the induction of oxidative stress in peripheral tissues. Tissues analyzed included the proximal duodenum, liver and kidney. The results showed some degree of peroxidation mainly in liver and kidney.

Key-Words: Rotenone, oxidative stress, lipid peroxidation, Parkinson's disease, brain and behavior.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 01-** Representação esquemática da via nigroestriatal normal na Doença de Parkinson e imuno-histoquímica marcando inclusões intracelulares com corpúsculos de Lewy em neurônios dopaminérgicos na substância negra. p.15
- FIGURA 02-** Guilhotina utilizada na sacrifcação dos animais. p. 32
- FIGURA 03-** Dissecção da porção proximal do duodeno, secções do pulmão, fígado e rim. p. 33
- FIGURA 04-** Arena do teste de campo aberto. p. 36
- FIGURA 05-** Bipedestação sem apoio. p. 36
- FIGURA 06-** Bipedestação com apoio. p. 37
- FIGURA 07-** Efeitos na deambulação de ratos após 30 dias de injeção diária intraperitoneal de rotenona (1,5mg/kg). p. 38
- FIGURA 08-** Efeitos na deambulação de ratos no 1º, 14º e 30º dias de injeção diária intraperitoneal de rotenona (1,5mg/kg). p. 39
- FIGURA 9-** Efeitos no número de bipedestações sem apoio de ratos no 1º, 14º e 30º dias de injeção diária intraperitoneal de rotenona (1,5mg/kg). p. 40
- FIGURA 10-** Efeitos no número de bipedestações com apoio de ratos após 30 dias de injeção diária intraperitoneal de rotenona (1,5mg/kg). p.41
- FIGURA 11-** Efeitos no número de bipedestações com apoio de ratos no 1º, 14º e 30º dias de injeção diária intraperitoneal de rotenona (1,5mg/kg). p.42
- FIGURA 12-** Concentração de TBARs (nmol/g de peso seco de tecido) em áreas encefálicas de ratos tratados com rotenona (1,5 mg/kg) por 30 dias. p.43
- FIGURA 13-** Concentração de TBARs (nmol/g de peso seco de tecido) em vísceras de ratos tratados com rotenona (1,5 mg/kg). Os resultados são mostrados em média \pm EPM (n CT = X; n ROT=Y). Análise de variância com *Teste T de students*. (*) $P < 0,05$. p.44

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** Concentração de TBARs (nmol/g de peso seco de tecido) em áreas encefálicas de ratos tratados com rotenona (1,5 mg/kg) por 30 dias. p.43
- TABELA 2.** Concentração de TBARs (nmol/g de peso seco de tecido) em tecidos periféricos de ratos tratados com rotenona (1,5 mg/kg) por 30 dias. p.44

LISTA DE ABREVIATURAS

AGPI - Ácidos graxos polinsaturados

ATV - Área tegmental ventral

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

TBARs - Concentração das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico

DA - Dopamina

DP - Doença de Parkinson

ERNs - Espécies reativa de nitrogênio

EROs – Espécies reativas de oxigênio

LPO - Lipoperoxidação

MDA- Malondialdeído

MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina

NO - Oxido nítrico

SN - Sistema Nervoso

SNE – Sistema Nervoso Enterico

SNC - Sistema Nervoso Central

SNpc - Substância negra parte compacta

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	p.14
1.1. Alterações motoras da doença de Parkinson	p.14
1.2. Fisiopatologia da doença de Parkinson	p.16
1.3. Etiologia da doença de Parkinson	p.17
1.4. Estresse oxidativo e doença de Parkinson	p.20
1.5. Peroxidação lipídica	p.21
1.6. Rotenona e seus efeitos citotóxicos	p.22
1.7. Modelos experimentais da doença de Parkinson	p.23
1.8. Objetivo geral	p.23
1.9. Objetivos específicos	p.24
2. REVISÃO DE LITERATURA	p.31
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	p.31
3.1. Animais	p.31
3.2. Preparo e administração da solução	p.32
3.3. Obtenção dos tecidos para determinação da peroxidação lipídica	p.33
3.4. Dosagem de ácido tiobarbitúrico	p.34
3.5. Avaliação da concentração proteica	p.34
3.6. Estatística	p.35
3.7. Teste de campo aberto	p.37
3.8. Aspectos éticos	p.38
4.RESULTADOS	p.38
4.1. Teste comportamental de campo aberto	p.38
4.1.1. Deambulação	p.39

4.1.2. Bipedestação sem apoio	p.40
4.1.3. Bipedestação com apoio	p.42
4.2. Peroxidação lipídica em áreas encefálicas	p.44
4.3. Peroxidação lipídica em tecidos periféricos	p.45
5. DISCUSSÃO	p.45
5.1. Investigação dos efeitos comportamentais no modelo animal da DP induzido por administração crônica de rotenona.	p.47
5.2. Investigação dos efeitos estresse oxidativo em áreas encefálicas no modelo animal da DP induzido por administração crônica de rotenona.	p.50
5.3. Investigação do estresse oxidativo em áreas não-encefálicas no modelo animal da DP induzido por administração crônica de rotenona	p.52
6. CONCLUSÃO	p.52
7. REFERÊNCIAS	p.53
APÊNDICES	p.62

1. INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) consiste na segunda desordem neurodegenerativa mais prevalente depois da doença de Alzheimer. O início da doença manifesta-se em média aos 55 anos de idade e a sua incidência aumenta marcadamente com o envelhecimento. Apesar de considerar-se que 1 a 3% da população com idade maior que 65 anos seja afetada, há evidências de que atualmente esteja ocorrendo um aumento na prevalência da DP (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

A doença foi descrita pela primeira vez pelo médico inglês James Parkinson em 1817. Em seu clássico estudo intitulado “Ensaio sobre a paralisia agitante” (do original, *An essay on the shaking palsy*), foram descritos quatro casos clínicos de pacientes que apresentavam tremor de repouso nos membros superiores, mas permaneciam com forte rigidez muscular, lentidão de movimentos e instabilidade postural, o que proporcionava muitas quedas (MENEZES; TEIVE, 2003). Um fato marcante observado foi que os pacientes não sofriam perda de capacidade intelectual e cognitiva. Contudo, posteriormente foram descritas alterações em determinados tipos de memória e o aparecimento de sintomas afetivos, principalmente depressivos (MENEZES; TEIVE, 2003). Em 1920, Jean-Martin Charcot reconheceu o pioneirismo de James Parkinson na descrição da paralisia agitante denominando-a com o nome de seu descobridor (BURCH; SHEERIN, 2005).

1.1 ALTERAÇÕES MOTORAS DA DOENÇA DE PARKINSON

Segundo a literatura pertinente, o paciente parkinsoniano começa a apresentar os sinais motores da doença quando já ocorreu degeneração de cerca de 70% dos neurônios da substância negra mesencefálica que projetam para o neostriado, a chamada via nigroestriatal (FIGURA 1). Considerando-se que, à luz dos conhecimentos atuais, a reversão do quadro não é possível, a

maioria dos tratamentos, tanto cirúrgicos quanto farmacológicos, visa reduzir a sintomatologia (MENEZES; TEIVE, 2003).

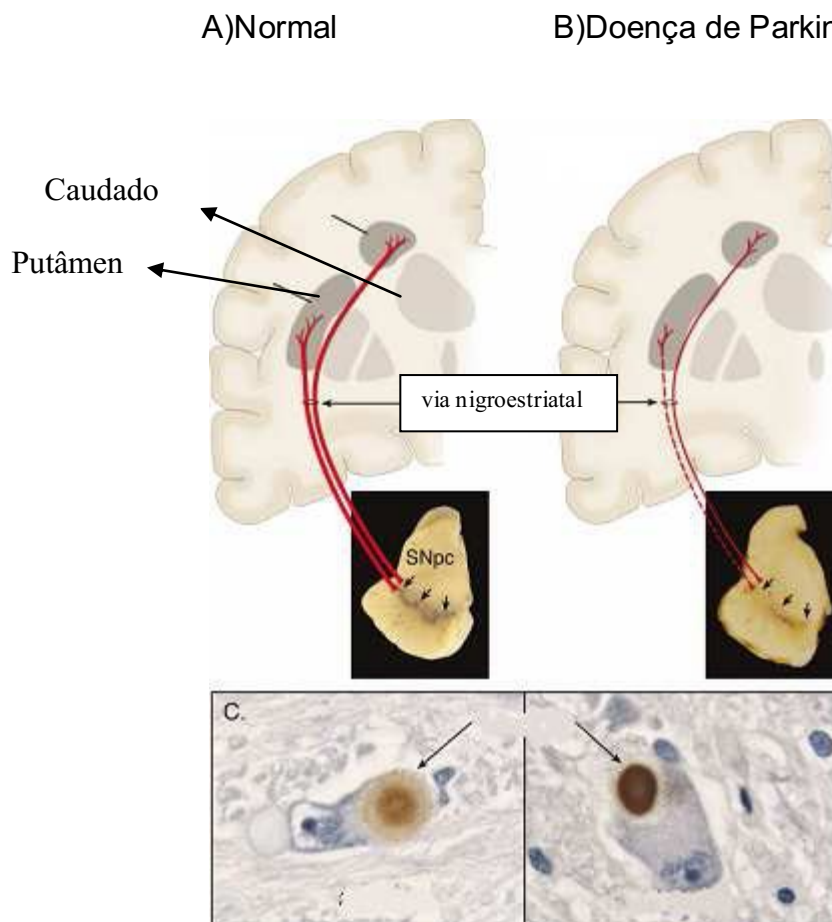


FIGURA-1. Representação esquemática da via nigroestriatal normal (A) e na DP (B). Em C imunohistoquímica marcando inclusões intracelulares, os chamados corpúsculos de Lewy, em neurônios dopaminérgicos na SNpc. Adaptado de: Dauer e Przedorski (2003).

A DP é caracterizada principalmente pela ocorrência de distúrbios de movimento, balanço e alterações do controle motor fino, todos com características incapacitantes. Os sinais clínicos mais evidentes são caracterizados por anormalidades motoras irreversíveis que incluem rigidez muscular, tremor em repouso, fraqueza muscular, instabilidade postural e escassez de movimentos voluntários (GOMES et al., 2008). Usualmente existe uma assimetria nos sinais e sintomas motores extrapiramidais. Esta assimetria pode ser explicada pela perda neuronal ocorrer de maneira não-homogênea nos hemisférios encefálicos (BEAL, 2001).

Paralelamente, os pacientes se tornam passivos ou retraídos, manifestando falta de iniciativa, respondem demoradamente a questões, e os processos cognitivos são vagarosos (“bradifrenia”) (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

Além das alterações motoras e autonômicas, já foi demonstrado que os pacientes com DP apresentam redução dos processos cognitivos. Ocorre a diminuição de iniciativa, do interesse pelos acontecimentos do cotidiano e das coisas pessoais ou familiares, representando o estágio depressivo da DP. A deficiência cognitiva é um sintoma comum em pacientes com DP e tem sido frequentemente descrita nos estágios iniciais da DP, fase pré-sintomática, quando as alterações motoras ainda não se mostram evidentes (CALNE, 2001).

1.2. FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON

A neuropatologia da doença de Parkinson caracteriza-se pela perda progressiva dos neurônios pigmentados da parte compacta da substância negra (SNpc), evidenciada macroscopicamente por uma despigmentação da porção ventrolateral desta estrutura. Esse evento de morte neuronal é desencadeado por inúmeros fatores que compõem um cenário ainda pouco compreendido. Porém, um dos achados fisiopatológicos mais frequentes na DP é a presença de inclusões citoplasmáticas eosinofílicas chamadas de corpúsculos de Lewy (TOGO et al., 2001), representadas principalmente por deposição de duas proteínas, a α -sinucleína e a ubiquitina (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

A via dopaminérgica nigroestriatal é composta por neurônios dopaminérgicos cujos corpos celulares se localizam na SNpc e projetam seus axônios para o caudado-putâmen, ou corpo estriado (TOGO et al., 2001).

Sob o aspecto neuroquímico, observa-se que a degeneração de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal leva a uma intensa redução dos níveis de dopamina (DA) no estriado, bem como em outros núcleos da base (GERLACH; RIEDERER, 1996). Esses núcleos da base compõem um grupo de núcleos subcorticais que possuem como função primordial o controle dos movimentos voluntários. São eles: estriado (caudado e putâmen), globo pálido (interno e externo), núcleo subtalâmico e SN (pars compacta e reticulata) (BURCH; SHEERIN, 2005).

Correlações entre análises clínicas e bioquímicas mostram que os sintomas característicos da DP começam a aparecer apenas quando aproximadamente 60% e 80% dos conteúdos de DA na SNpc e no putamen, respectivamente, são perdidos (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Segundo Sherer et al. (2003), isto acontece porque, em uma fase inicial do processo de degeneração neuronal, ocorre um fenômeno compensatório estriatal, em que há um aumento na atividade neuronal (os neurônios remanescentes passam a produzir e liberar mais dopamina) ou uma supersensibilidade dos receptores dopaminérgicos.

De acordo com Gerlach e Riederer (1996), além do decréscimo de DA na via nigroestriatal, existem outras alterações a nível central como degeneração de neurônios dopaminérgicos na área tegmental ventral (ATV), redução da noradrenalina nos neurônios do *locus coeruleus*, perda de serotonina no núcleo da rafe e redução de acetilcolina no núcleo basal de Meynert. O prejuízo imposto a importantes estruturas límbicas (amígdala, hipocampo, mesocórtex anteromedial temporal) está relacionado ao declínio intelectual (BRAAK et al., 2000), enquanto o comprometimento cognitivo está associado ao estágio final da doença de Parkinson (DUBOIS; PILLON, 1997).

1.3. ETIOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON

O parkinsonismo pode ser designado de quatro formas: parkinsonismo primário (DP idiopática); parkinsonismo secundário, causado por

drogas ou infecções; parkinsonismo associado a outras desordens neurológicas como, por exemplo, paralisia supraventricular progressiva e atrofia de múltiplos sistemas; desordens neurodegenerativas que apresentam o parkinsonismo como uma de suas características, por exemplo, doença de Huntington e doença de Wilson (VILA; PRZEDBORSKI, 2004).

Em 5 a 10% dos casos da DP observam-se ligações entre a ocorrência da doença e mutações em um pequeno número de genes (forma familiar) (VILA; PRZEDBORSKI, 2004). Paulien et al. (2005) observaram que mutações na α -sinucleína na forma familiar da DP são herdadas de maneira autossômica dominante, e as formas mutantes desta proteína apresentam uma função tóxica nas células dopaminérgicas. Contudo, uma depleção completa ou a diminuição dos níveis da proteína α -sinucleína não resulta no desenvolvimento do fenótipo da DP. Estes resultados indicaram que os neurônios dopaminérgicos nigrais são vulneráveis a altos níveis de α -sinucleína, evidenciando o papel desta proteína na patogênese da doença de Parkinson. Além da toxicidade por α -sinucleína, outras alterações de etiologia genética já foram descritas na DP, como o estresse proteolítico culminando com o acúmulo de proteínas agregadas e as alterações das proteínas sinfilina-1 (ENGELENDER et al., 1999), parkina e ubiquitina carboxil-terminal hidroxilase L1 - UCH-L1 (CHUNG; DAWSON; DAWSON, 2001).

Mesmo que alguns estudos genéticos relacionem a predisposição genética à doença de Parkinson, a maior parte dos casos da enfermidade são esporádicos, e sua etiologia permanece largamente indefinida. Além da causa genética, vários fatores têm sido propostos para o desenvolvimento da doença de Parkinson, incluindo a exposição ambiental, o estresse oxidativo e a excitotoxicidade induzida por glutamato.

Apesar das diferentes características clínicas e patológicas das formas de manifestação da DP familiar e idiopática, ambas apresentam semelhança nas anormalidades neuroquímicas, principalmente quanto à depleção do conteúdo de DA mesencefálica (PRZEDBORSKI, 2005).

Além de fatores genéticos, estudos epidemiológicos têm associado o desenvolvimento da doença de Parkinson a fatores de risco ambientais, tais como residência rural, agricultura e exposição a pesticidas (DI MONTE et al., 2002).

A literatura tem estabelecido uma associação entre risco aumentado para doença de Parkinson e exposição crônica a neurotoxinas dopaminérgicas, ou apenas por uma breve exposição, que de alguma maneira já seria capaz de levar ao início de uma cascata de eventos deletérios (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Há a hipótese de que toxinas ambientais, incluindo pesticidas possam contribuir para o desenvolvimento da DP (MOURADIAN, 2002).

De acordo com isso, experimentos têm demonstrado que neurotoxinas como rotenona, um pesticida natural, e MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidrofridina), um subproduto da síntese de heroína, podem levar ao desenvolvimento de características da doença em modelos experimentais animais *in vivo* e *in vitro* (ALAM; SCHMIDT, 2002; BETARBET et al., 2000; SHERER et al., 2003).

Além disso, outros estudos têm demonstrado que a exposição ocupacional a alguns metais como o cobre e o manganês, bem como uma exposição associada entre chumbo, cobre e ferro também oferecem risco de desenvolvimento da doença de Parkinson (GORELL et al., 1999).

1.4. ESTRESSE OXIDATIVO E DOENÇA DE PARKINSON.

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, como consequência desse processo ou por alguma disfunção biológica são liberados como subprodutos os radicais livres (RL) (VOLLES; LANSBURY, 2002). Um radical livre é qualquer espécie capaz de existência independente que contenha um ou mais elétrons desemparelhados centrado nos átomos de oxigênio, conhecidos como espécies reativas do oxigênio (EROs) ou nitrogênio (ERNs) (HALIWELL, 1987).

No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O organismo humano sofre ação constante de EROs e ERNs gerada em processos inflamatórios, por alguma disfunção biológica ou proveniente dos alimentos. As principais EROs distribuem-se em dois grupos, os radicais hidroxila ($\text{HO}\cdot$) e superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$). Enquanto alguns deles podem ser altamente reativos no organismo atacando lipídios, proteínas e DNA, outros são reativos apenas com os lipídios. Existem ainda alguns que são pouco reativos, mas apesar disso podem gerar espécies danosas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O exemplo mais comum do ataque de radicais hidroxila a lipídios é a ação deste nos lipídios de membrana. Os radicais livres centrados no oxigênio ($\text{HO}\cdot$) atacam a cadeia lipídica em sítios susceptíveis como o grupo metilênico alílico, convertendo-o em novo centro de radical livre (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

A reação destas espécies com os ácidos graxos polinsaturados (AGPI), presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, inicia um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO), que pode ser avaliado e utilizado como um indicador do estresse oxidativo celular (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

1.5. PEROXIDAÇÃO LIPIDICA (LPO)

A LPO pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos RL sobre os lipídios insaturados das membranas celulares, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de

troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular (BENZIE, 1996).

Basicamente, a LPO consiste na incorporação de oxigênio molecular a um AGPI para produzir um hidroperóxido lipídico como produto primário inicial. Nos sistemas biológicos a LPO pode ocorrer principalmente por duas vias, uma via enzimática envolvendo as ciclooxigenases e lipoxigenases na oxigenação dos AGPI e a peroxidação não enzimática, que envolve a participação de EROs e ERNs, metais de transição e outros radicais livres (PORTER; CALDWELL; MILLS, 1995).

As alterações nas membranas levam a transtornos da permeabilidade, alterando o fluxo iônico e o fluxo de outras substâncias, o que resulta na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações do DNA e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (BARBER; HARRIS, 1994).

A concentração das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARs) é usualmente considerada como reflexo da quantidade de malondialdeído, pois este tem-se mostrado como o principal elemento reagente ao ácido tiobarbitúrico na LPO (PURCHARD; KELLY, 1996). Assim, o ensaio de TBARs é um dos testes mais amplamente utilizados para identificar e quantificar a peroxidação lipídica (HALLIWELL, 1987).

1.6. ROTENONA E SEUS EFEITOS CITOTÓXICOS

A rotenona é uma substância derivada da família das leguminosas e encontrada principalmente nas espécies *Derris elliptica*, *Derris mallaccensis* e *Lonchocarpus utilis*, popularmente conhecidos no Brasil como timbós verdadeiros (RAY, 1991).

Devido a sua toxicidade, a rotenona atua como pesticida natural tanto em atividades domésticas como no controle de pragas em lavouras

(larvas de borboletas, coccídeos, cochonilhas e pulgões). É utilizada pelos índios da Amazônia nas pescarias para a erradicação de peixes, controle da proliferação de insetos e aracnídeos em fruticultura e horticultura e em residências para o controle de insetos e ectoparasitas de animais (CROMBIE; WHITING, 1998).

Poucos casos de intoxicação de humanos por rotenona têm sido relatados. Porém, não existem relatos de casos fatais pelo uso adequado da substância. Os sintomas não-letais apresentados por indivíduos submetidos à exposição ocupacional a rotenona incluem dor na garganta, dor de cabeça, irritação cutânea e sintomas característicos de um resfriado comum (LING, 2003).

1.7. MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE PARKINSON

Os modelos animais são de grande auxílio na medicina experimental, pois permitem o estudo dos mecanismos fisiológicos da evolução de patologias e dos seus princípios de tratamento. Por definição, eles refletem as características da doença presente no homem, simulando as mudanças patológicas, histológicas e bioquímicas da doença, bem como seus distúrbios funcionais. Esses modelos são válidos desde que reproduzam, com considerável fidelidade, o estado da doença quando esta acomete humanos (GERLACH; RIEDERER, 1996).

Desde os primeiros estudos neuroquímicos *post mortem* em pacientes de doença de Parkinson (DP), muitos modelos animais foram desenvolvidos com objetivo de reproduzir diferentes aspectos fisiopatológicos e sintomáticos da doença. Os modelos animais descritos na literatura são voltados principalmente para a fase tardia, buscando tratamentos que revertam os sinais motores. Poucos modelos visam estudar os fenômenos das fases iniciais, antes do aparecimento desses sinais (BEAL, 2001).

Dos modelos de DP encontrados na literatura, os mais citados são os que utilizam macacos, ratos ou camundongos (DA CUNHA et al., 2002). Hoje é possível produzir inúmeras alterações moleculares e celulares nos neurônios dopaminérgicos, culminando em modificações comportamentais muito similares às encontradas em pacientes com DP. Nos últimos anos, vários estudos têm procurado o desenvolvimento de um modelo animal que reproduza fielmente as características clínicas e fisiopatológicas da DP, podendo assim ampliar as formas de compreensão da doença a níveis muito detalhados, tornando-se possível sugerir novas formas de abordagem terapêutica a serem testadas na clínica (PRIYADARSHI et al., 2001).

Também é possível avaliar o estado depressivo de modo experimental observando-se a falta de cuidado do animal consigo. O quadro depressivo pode ser interpretado pela ausência do animal de fazer a higienização de sua pelagem (ALAM; SCHMIDT, 2002).

1.8. OBJETIVO GERAL.

Desse modo, este estudo experimental teve como objetivo investigar alterações comportamentais e estresse oxidativo em diversos órgãos de ratos expostos cronicamente à rotenona IP por 30 dias.

1.9. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1.9.1. Induzir o aparecimento de alterações comportamentais compatíveis com a doença de Parkinson.

1.9.2. Analisar estresse oxidativo das áreas responsáveis pela patogênese da doença.

1.9.3. Observar efeitos periféricos da ação da rotenona.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os modelos animais são de grande auxílio na medicina experimental, pois permitem o estudo dos mecanismos fisiológicos da evolução de patologias e dos seus princípios de tratamento. Uma vez que o mecanismo fisiológico que causa a patologia é compreendido, o modelo é útil para a determinação de estratégias terapêuticas. Esses modelos são válidos desde que reproduzam, com considerável fidelidade, o estado da doença quando esta acomete humanos (GERLACH; RIEDERER, 1996).

Um modelo animal pode ser definido como uma preparação experimental desenvolvida com o propósito de estudar uma condição patológica na mesma ou em diferentes espécies. São preparações que tentam reproduzir condições humanas, incluindo neuropatologias. Apesar de não seguirem o mesmo curso evolutivo da patologia de referência, os modelos permitem estudos invasivos, que são eticamente inviáveis em cérebros de pacientes humanos (RODRIGUEZ et al., 2001).

Pode-se tentar desenvolver um modelo que reproduza uma patologia em toda sua extensão, o que obviamente é uma tarefa muito complexa (GEYER; MARKOU, 1995). Conseguindo reproduzir alguma característica da patologia estudada, teremos a oportunidade de confirmar medicações ou métodos terapêuticos usados no tratamento da doença, assim como desenvolver novos tratamentos farmacológicos (DEUMENS; BLOKLAND; PRICKAERTS, 2002; GEYER; MARKOU, 1995).

Os fatores ambientais que atuam no desenvolvimento da doença de Parkinson, os quais podemos citar as substâncias neurotóxicas encontradas na natureza, como a rotenona, têm sido alvo de estudos para modelo experimental da doença (DI MONTE et al., 2002). Estudos epidemiológicos associaram o desenvolvimento da doença de Parkinson a fatores de risco ambientais tais como residência rural, agricultura e exposição a pesticidas (DI MONTE et al., 2002). As classes de pesticidas potencialmente associadas à degeneração

nigroestriatal não foram determinadas na maioria dos estudos epidemiológicos. Entretanto, Liou et al. (1997) identificaram o bupiridil (paraquat), os compostos organoclorados, os organofosforados, os rotenóides e os derivados dos carbamatos como agentes potencialmente tóxicos. Fleming et al. (1994) foram os primeiros a relatar os níveis de pesticidas em cérebros humanos, observando que níveis de compostos organoclorados (dieldrin) estavam presentes no cérebro de pacientes portadores da doença de Parkinson, enquanto Corrigan et al. (1998) também encontraram concentrações significativamente mais altas de dieldrin no núcleo caudado *post-mortem* de pacientes parkinsonianos.

A rotenona é amplamente utilizada em todo o mundo como inseticida e piscicida. Nos Estados Unidos, as áreas tratadas são restritas e as datas de tratamento são selecionadas fora dos períodos de irrigação de culturas. A rotenona é um composto que facilmente perde seu efeito de ação quando exposta à luz. Quase toda a toxicidade do composto é perdida em 5-6 dias de sol nascente ou 2-3 dias de sol de verão. A meia-vida em ambas as situações é entre 1 e 3 dias. Devido à sua meia-vida curta e também por ser uma substância que não é carregada durante lixiviação do solo, não é esperado que seja um poluente das águas subterrâneas (HISATA, 2002).

A ingestão é a maneira mais comum de exposição à rotenona para os seres humanos. No entanto, a absorção no estômago e intestinos é lenta e incompleta, e no fígado quebra o composto de forma eficaz. Estes fatos tornam improvável que quantidades significativas de rotenona poderiam entrar na circulação geral, a menos que enormes quantidades forem ingeridas. Coerentes com essa visão são os resultados de trabalhos que demonstraram que a exposição crônica, intragástrica de 5mg/kg de rotenona não produziu inibição da atividade mitocondrial no músculo ou cérebros de ratos, indicando que esta não ultrapassa o sistema porta-hepático (Greene, 2009; Pan-Montojo, 2010)

A partir do estudo de Betarbet et al. (2000), o uso de rotenona no estudo da DP despertou grande interesse devido esses autores defenderem

sua capacidade de produzir em ratos características de um modelo ideal para a DP. Estudos prévios demonstraram que a exposição crônica sistêmica à rotenona reproduzia em ratos adultos muitas características da DP, incluindo a degeneração dopaminérgica do estriado e a formação de inclusões citoplasmáticas positivas para a proteína α -sinucleína em neurônios nigrais (BETARBET et al., 2000).

Desde esta proposição inicial do uso de rotenona em um modelo experimental in vivo de DP, que se valia de implante de bombas osmóticas em linha com a circulação sistêmica do animal, várias controvérsias surgiram, principalmente no que se refere à sua suposta especificidade para produzir neurodegeneração dopaminérgica. Por exemplo, dados recentes demonstraram que o mesmo padrão de degeneração podia ser reproduzido pela exposição crônica sistêmica à rotenona, com o implante subcutâneo de bombas osmóticas que administrariam a neurotoxina em doses constantes por um determinado período (SHERER et al., 2003). Por outro lado, estudos como o de Lapointe et al. (2004) afirmam que a degeneração provocada por exposição à rotenona não se restringe a neurônios dopaminérgicos, além de por em cheque o conceito de que o modelo da rotenona consiga reproduzir de forma típica a fisiopatologia da DP.

Contudo, existem poucos trabalhos demonstrando o acometimento sistêmico decorrente do uso de pesticidas em modelos animais da DP. Lapointe et al. (2004) observaram que animais tratados cronicamente com rotenona não apresentavam alterações exclusivamente centrais. Segundo o autor, em 80% dos animais tratados com rotenona houve severos danos em órgão periféricos, como perda de fibras musculares, acloridria no estômago e necrose e degeneração celular no fígado.

O principal sítio de ação da rotenona faz parte da cadeia respiratória. A cadeia respiratória mitocondrial é o sítio receptor dos elétrons altamente carregados de energia provenientes do ciclo de Krebs e levados para cadeia respiratória pelos transportadores de elétrons NADH e FADH₂. Estes se associam aos complexos protéicos da cadeia respiratória, permitindo o

transporte de elétrons de forma segura através de consecutivas oxidações e reduções de elementos metálicos destes complexos. O NADH se associa ao complexo I mitocondrial e o FADH₂ ao complexo II. O aceptor final destes elétrons é o oxigênio, que os recebe sob os cuidados da enzima citocromo oxidase (complexo IV), que permite a adição dos quatro elétrons na molécula de oxigênio, formando água e impedindo o escape dos intermediários deste processo que são EROs. Uma possível consequência da ação inibitória da rotenona sobre o complexo I mitocondrial poderia ser a geração de EROs, através da interferência no fluxo normal dos elétrons, permitindo que os mesmos escapassem em grande proporção dos complexos protéicos mitocondriais e atingissem livremente as moléculas de oxigênio (JIN et al., 2007; KWEON, 2004).

A toxicidade da rotenona está relacionada ao comprometimento da respiração aeróbica celular. A morte dos animais ocorre pela inibição do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial. Desta forma, o aporte celular de oxigênio é bloqueado e a produção de energia sob a forma de ATP é bloqueada. Uma implicação adicional desta inibição seria a produção de EROs, através da interferência no fluxo normal de elétrons, permitindo que eles escapassem dos complexos protéicos mitocondriais e atingissem livremente as moléculas de oxigênio (COSTA et al., 1989).

A peroxidação dos ácidos graxos polinsaturados dá origem a vários compostos, como aldeídos, cetonas, hidroperóxidos, hidroxiácidos, hidroxiparóxidos, alcanos e alcenos. Os aldeídos são os produtos mais facilmente formados pela peroxidação lipídica. Os principais são o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal. A identificação e quantificação destes produtos fornecem uma medida indireta de danos oxidativos ocorrentes durante a peroxidação lipídica (PURCHARD; KELLY, 1996). Esta detecção tem sido viabilizada por meio da utilização de técnicas como a espectrofotometria e fluorometria.

O MDA, em muitos casos, é o produto final mais abundante originado da peroxidação lipídica. Este aldeído e os peróxidos lipídicos formados durante o processo reagem com o ácido tiobarbitúrico e geram uma substância de coloração rósea que é detectada no espectômetro (PURCHARD; KELLY, 1996).

Paulien et al. (2008), em um modelo de administração subcutânea de rotenona, demonstraram que houve toxicidade dose-dependente em órgãos periféricos como glândulas adrenais, estômago e coração, sem que tivesse havido, ao tempo do sacrifício dos animais, qualquer acometimento morfológicamente observável do SN ou mesmo perda de neurônios dopaminérgicos.

Usualmente, os modelos experimentais da DP avaliam, além dos achados fisiopatológicos, os aspectos comportamentais da enfermidade. As alterações motoras da doença são experimentalmente mensuradas através de testes comportamentais. O teste de campo aberto é amplamente utilizado para avaliar quantitativamente a atividade locomotora e exploratória do animal, além de alterações emocionais. Estas variáveis são representadas por elementos como a frequência de locomoção do animal, postura bípede adquirida e frequência de micções e defecações em um determinado intervalo de tempo e área (EILAM, 2003).

Sabe-se que há fortes evidências da ocorrência de alterações de enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica no SN em modelos crônicos de tratamento com o pesticida rotenona. Contudo, não existem trabalhos que avaliem quantitativamente e qualitativamente o estresse oxidativo sistêmico provocado pelo tratamento crônico de rotenona pela via intra-peritoneal (IP) (ALAM; SCHMIDT, 2002; PANOVA et al., 2005; PAULIEM et al., 2008; SHERER et al., 2003).

Muitos estudos estabelecem forte relação entre DP e um defeito mitocondrial, e que este provocaria danos oxidativos nos neurônios podendo desencadear a morte por apoptose da célula (EISENBERG et al., 2007). O aumento da fragmentação do DNA, que é considerado marcador de apoptose, depende da dose de rotenona administrada (WATABE; NAKAKI, 2007).

A partir do estudo de Betarbet et al. (2000), o uso da rotenona no estudo da DP despertou grande interesse devido esses autores defenderem sua capacidade de produzir em ratos características de um modelo ideal para a DP, como por exemplo, a ocorrência de lesão seletiva no sistema nigroestriatal a partir de uma exposição sistêmica, associada à disfunção mitocondrial também sistêmica e à formação de inclusões citoplasmáticas alfa-sinucleína positivas na substância negra semelhante aos corpos de Lewy encontrados nos neurônios nigrais remanescentes em pacientes com DP. Outros estudos posteriores defenderam a mesma posição (ALAM; SCHIMDT, 2002; PANOV et al., 2005; SHERER et al., 2003).

Algumas funções mitocondriais determinam o desempenho e o destino da célula, como a fosforilação oxidativa que produz ATP para quase todas as funções celulares e a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), um subproduto do metabolismo aeróbico normal (JENNER, 2003).

Entre os vários modelos animais da DP, o modelo rotenona recentemente chamou especial atenção por duas razões: 1) Diferentemente de outros modelos, este reproduz a maioria dos sintomas da desordem de movimento e as características histopatológicas da DP, incluindo corpos de Lewy; 2) Rotenona e outros agrotóxicos são potentes inibidores da respiração mitocondrial, e estudos epidemiológicos recentes sugerem o envolvimento destes compostos tóxicos em maior incidência de Parkinson esporádica entre a população das zonas rurais. Desde a primeira publicação de Betarbet et al. (2000), têm havido muitos trabalhos publicados sobre diversos aspectos da rotenona em modelo in vivo de parkinsonismo, em ratos, e os resultados têm sido discutidos em várias revisões recentes (BASHKATOVA et al., 2004). A maioria dos trabalhos in vivo com rotenona evidenciam vários aspectos de

intoxicação compatíveis com alterações comportamentais e morfológicas do parkinsonismo, mas não específicas funções mitocondriais, exceto para a produção de óxido nítrico (HOGLINGER; OERTEL; HIRSCH, 2003). Portanto, a imagem completa do que acontece com as mitocôndrias está ainda ausente.

Estudos anteriores demonstraram que a infusão subcutânea de rotenona para os dias 28 ou 56 reproduz muitas características da DP em ratos, incluindo a degeneração nigroestriatal dopaminérgico seletivo (BASHKATOVA et al., 2004). Apesar de inúmeras publicações recentes sobre a toxicidade da rotenona *in vitro* e *in vivo*, os mecanismos específicos de neurotoxicidade da rotenona permanecem obscuros (BASHKATOVA et al., 2004). Evidentemente, durante uma infusão sistêmica prolongada de rotenona há uma interação complexa dos efeitos deletérios da toxina e os mecanismos de defesa que em alguns neurônios possuem mas não conseguem efetivá-los, levando a morte celular. Sabe-se que os modelos de doenças neurodegenerativas tóxicas estão sujeitos a uma grande variabilidade entre diferentes espécies, bem como de uma mesma espécie (SHERER et al., 2003).

A infusão contínua de rotenona em ratos reduz a atividade do complexo I em torno de 75%. As baixas concentrações livres de rotenona no cérebro, cerca de 20-30 nmol / L, acompanham-se primeiramente de lesões nas terminações dopaminérgicas e posteriormente nos corpos celulares nigroestriatais (BETARBET et al., 2000). Ratos com essas lesões apresentavam inclusões citoplasmáticas contendo α -sinucleína nos neurônios nigrais, que se assemelham a precursores de corpos de Lewy no corpo pálido encontrados em humanos com DP. Animais tratados com rotenona também desenvolvem perdas motoras e posturais características da DP.

Betarbet et al. (2000) conseguiu mostrar em seus testes comportamentais que os animais tratados apresentaram um aumento dose-dependente em catalepsia e diminuição na locomoção. Os autores sugeriram que esta administração crônica intraperitoneal foi comparável à exposição ambiental crônica e, assim, comparável com uma situação da vida real.

3. MÉTODOS E CAUSUÍSTICA

3.1. ANIMAIS

Ratos Wistar machos (250-300g), oito semanas de idade, foram adquiridos do Instituto Evandro Chagas (Belém, Brasil). Os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará e todos os procedimentos relativos aos princípios de cuidado animal estavam de acordo com Manual para Técnicos em Bioterismo (COBEA/Brasil). Os animais foram previamente alojados (3 por gaiola) durante 2 semanas em ambiente à 23-25°C, umidade relativa do ar em 50 a 60% e mantidos em regime de fotoperíodo de 12h claro: 12h escuro. Durante o período experimental os animais apresentavam-se clinicamente saudáveis e receberam, ad libitum, água e dieta comercial NUVILAB CR1 (NUVITAL Nutrientes Lta., Curitiba, Brasil). Foram utilizados um total de 24 ratos e estes distribuídos em dois grupos experimentais: controle (n=12) e tratado com rotenona (n=13).

3.2. PREPARO E ADMINISTRAÇÃO DA SOLUÇÃO

Rotenona foi adquirida (Sigma, St. Louis, MO, USA) e conservada sem exposição à luz. Esta foi diariamente dissolvida em óleo de girassol (local de origem) (1,5 mg/ml) e a solução também mantida livre de exposição luminosa. O grupo controle recebeu apenas o solvente. Seringas descartáveis de 1 ml foram utilizadas para a injeção intraperitoneal (IP) da solução (1ml/kg) ao grupo tratado. O mesmo volume de solvente foi administrado ao grupo controle. O procedimento foi realizado sempre no mesmo horário durante 30 dias consecutivos.

3.3. OBTENÇÃO DOS TECIDOS PARA DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA:

Os animais foram sacrificados no 31º dia, por decapitação com guilhotina (FIGURA 2). Com o auxílio de um bisturi, foram dissecados a porção proximal do duodeno, secções do pulmão, fígado e rim (FIGURA 3). Rapidamente o córtex, o cerebelo, estriado, substância negra, hipotálamo e hipocampo foram dissecados com a utilização de bisturi, identificados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido.



FIGURA. 2: Guilhotina utilizada na sacrifcação dos animais

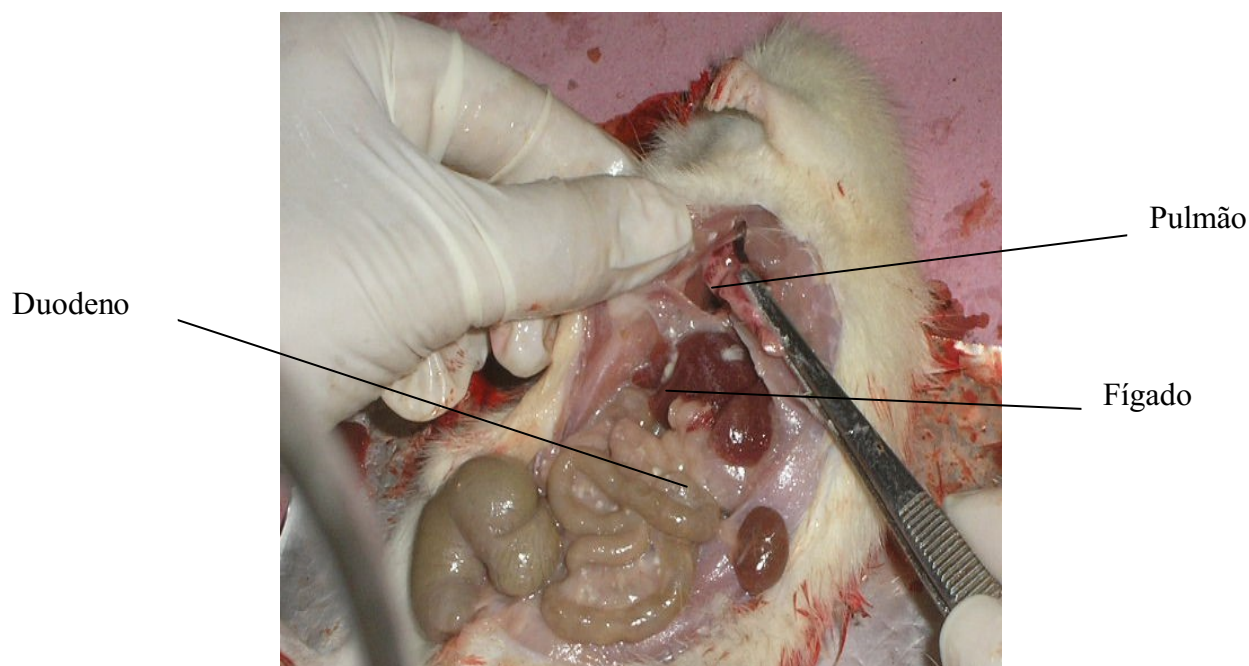


FIGURA. 3: Dissecção da porção proximal do duodeno, secções do pulmão, fígado e rim

3.4. DOSAGEM DE ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS):

A determinação dos produtos de peroxidação lipídica pelo método de TBARS para análise em espectrofotometria foi realizada segundo o método de Winterbourn; Gutteridge e Halliwell (1985) modificado. As amostras foram homogeneizadas, utilizando-se solução salina (0,9%). Logo após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 10.000x g durante 30 segundos.

O método baseia-se na alteração da coloração da amostra quando a mesma é colocada para reagir com o ácido tiobarbitúrico a 1 % na temperatura de 90 a 100 °C e em meio ácido. Em tubos Eppendorf de 2 ml, foram colocados 25 μ L de BHT (solução etanólica a 2 %), 250 μ L de HCl 25%, 250 μ L de solução de ácido tiobarbitúrico (1%) dissolvido em solução aquosa de NaOH a 0,05N e 250 μ L de amostra.

Foi feito também um branco com todas as soluções colocando-se, no lugar da amostra, solução salina 0,9%. Posteriormente, os tubos contendo a mistura foram incubados em banho fervente (100°C) durante 10 minutos e resfriados em banho de gelo. Em seguida, adicionou-se 750 µL de butanol em cada tubo e agitou-se em vórtex até que houvesse a transferência total da coloração rósea da camada inferior para a superior. Centrifugou-se as misturas por 5 minutos à 12000rpm até que a fase do butanol (sobrenadante) tornou-se límpida. Pipetou-se 200µl de sobrenadante e distribuiu-se as amostras em duplicata em uma placa de 96 poços. A placa foi introduzida em um espectrofotômetro, onde se mediu a absorbância ao comprimento de onda de 532 nm.

3.5. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA

A concentração de proteínas nos tecidos analisados foi comparada nos dois grupos (tratado e controle), através do método de Bradford (Anexo 1), o qual baseia-se na ligação do corante Coomassie blue G250 na sua forma aniônica à proteína, analisada por espectrometria.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Quanto à análise da concentração de TBARs, as diferenças entre os resultados do grupo controle e tratado com rotenona foram detectadas pelo teste *t de student*. O nível de significância foi fixado em 0,05. Na avaliação dos testes comportamentais, a estatística foi elaborada através de análise de variância com teste de Bonferroni (nível de significância menos que 0,05).

3.7. TESTE DE CAMPO ABERTO:

A atividade motora foi mensurada no teste do campo aberto (open Field). O aparelho usado consistiu numa arena circular de piso em fórmica branca, contendo uma circunferência interna com o mesmo centro (FIGURA 4). A circunferência interna possui raio igual a 11,5 *cm* e a circunferência da arena possui raio de 20 *cm*. O piso da arena foi dividido em 12 áreas de 104,7 cm^2 cada. A arena é circundada por um material em acrílico transparente de forma cilíndrica com 30 *cm* de altura. Os animais foram colocados individualmente no centro do campo aberto e seu comportamento foi avaliado por 5 minutos. Este teste foi realizado no primeiro dia, décimo quinto dia e trigésimo dia de experimento. Durante a observação, foram avaliados parâmetros como:

A) Frequência de locomoção: foi contabilizada a quantidade de vezes que o animal penetrou em uma das 12 unidades com as quatro patas.

B) Bipedestação sem apoio: comportamento descrito na literatura como "rearing". Refere-se ao apoio exclusivo do peso do animal sobre as patas traseiras, com o tronco perpendicular ao chão da arena (FIGURA 5).

C) Bipedestação com apoio: o animal se elevava sobre as patas traseiras apoiando-se na parede de acrílico que delimitava a área do teste (FIGURA 6).

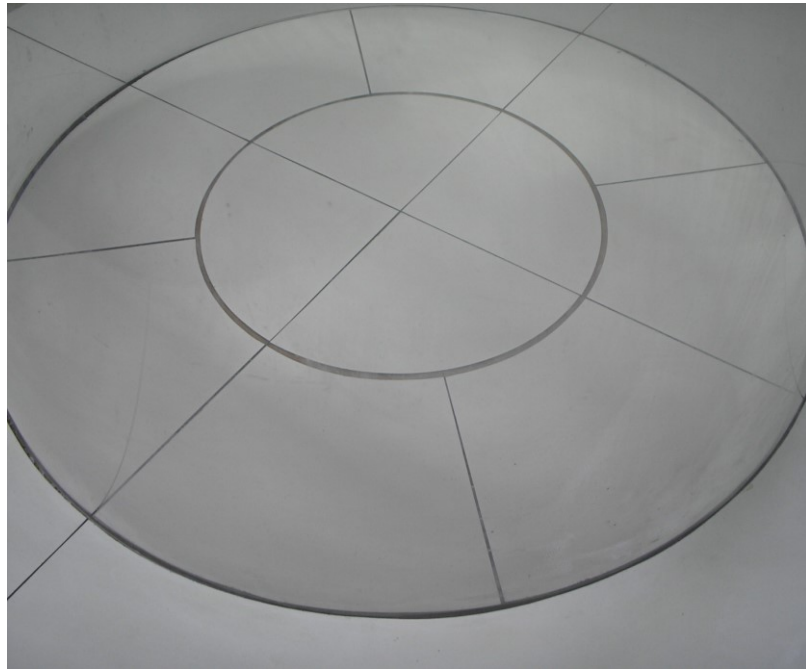


FIGURA 4: Teste de Campo Aberto



FIGURA 5: Bipedestação sem apoio



FIGURA 6: Bipedestação com apoio

A limpeza da arena após a saída de cada animal foi realizada com solução de álcool a 5%. Este procedimento foi similar aquele descrito por Broadhurst (1960) (BERNARDI; PALERMO-NETO, 1979; PALERMO-NETO, 1982).

3.8. ASPECTOS ÉTICOS:

Todos os animais da presente pesquisa foram cuidados segundo a legislação nacional para vivisseção animal em vigor (Lei Federal 6.638 de 08 de maio de 1979) e as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido o anteprojeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Pará, pela Universidade Federal do Pará (APÊNDICE 1).

4. RESULTADOS

4.1. TESTE COMPORTAMENTAL DE CAMPO ABERTO.

4.1.1. DEAMBULAÇÃO.

Em comparação com o grupo controle, observou-se diminuição na atividade motora espontânea dos ratos tratados com rotenona apenas no teste realizado no 30º dia (FIGURA 8). Pode-se observar que não houve diferença no número de vezes que os animais cruzavam as linhas do fundo da arena no 1º teste, entre os grupos tratado ($51,16 \pm 10,90$) e controle ($52,88 \pm 14,68$). No 2º teste, também não houve diferença significativa entre os animais do grupo tratado ($45,77 \pm 9,00$) e controle ($45,5 \pm 13,00$). No último teste, realizado no 30º dia de tratamento, o grupo tratado ($18,77778 \pm 3,99305$) e controle ($34,33 \pm 4,92$) se diferenciaram estatisticamente sendo que o grupo tratado cruzou as linhas um número menor de vezes que o grupo controle (FIGURA 7).

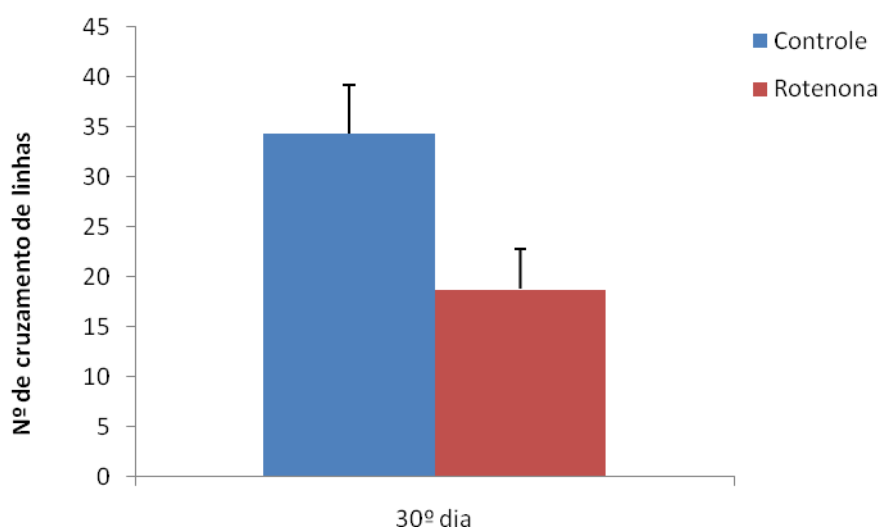


FIGURA. 7: Efeitos na deambulação de ratos após 30 dias de injeção diária intraperitoneal de rotenona (1,5mg/kg). Os resultados são mostrados em média \pm EPM (n CT = X; n ROT=Y). Análise de variância com *pós-teste* de *Bonferroni*. (*) $P < 0,01$.

Quando analisados de forma isolada, notou-se que houve diferença na deambulação entre o 2º (45,77 ±13,44) e o 3º (18,17 ±3,99; $p < 0,01$) e o 1º (52,88 ± 14,68) e o 3º testes no grupo tratado. O grupo controle não apresentou diferenças significativas (FIGURA 8).

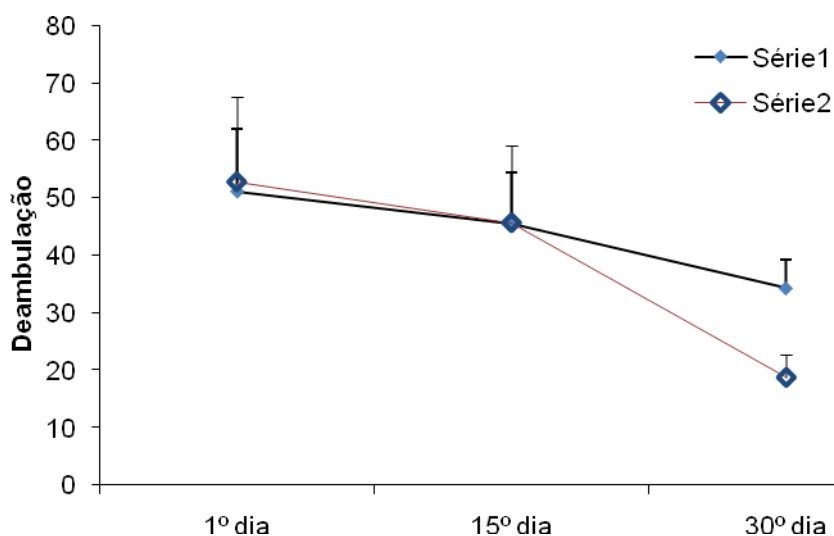


FIGURA 8: Efeitos na deambulação de ratos no 1º, 14º e 30º dias de injeção diária intraperitoneal de rotenona (1,5mg/kg). Os resultados são mostrados em média ± EPM (n CT = X; n ROT=Y). Análise de variância com pós-teste de Bonferroni. (*) $P < 0,01$; (**) $P < 0,001$.

4.1.2. BIPEDESTAÇÃO SEM APOIO.

Outro parâmetro avaliado foi o número de vezes em que os animais sustentaram-se apenas sobre as duas patas posteriores. Em cada um dos três testes realizados, não houve diferença significativa quando comparados os grupos controle e tratado. Entretanto, quando o grupo tratado foi observado de forma isolada, houve uma diminuição significativa no número de bipedestação sem apoio entre o 1º (8,33 ± 4,24) e o 3º (2,33 ± 1,73) testes e o 2º (9,88 ± 4,78) e 3º testes. No grupo controle, a diminuição no número de bipedestações sem apoio foi significativa apenas quando comparados o 2º (6,16 ± 3,86) e 3º (1,59 ± 1,04) testes (FIGURA 9).

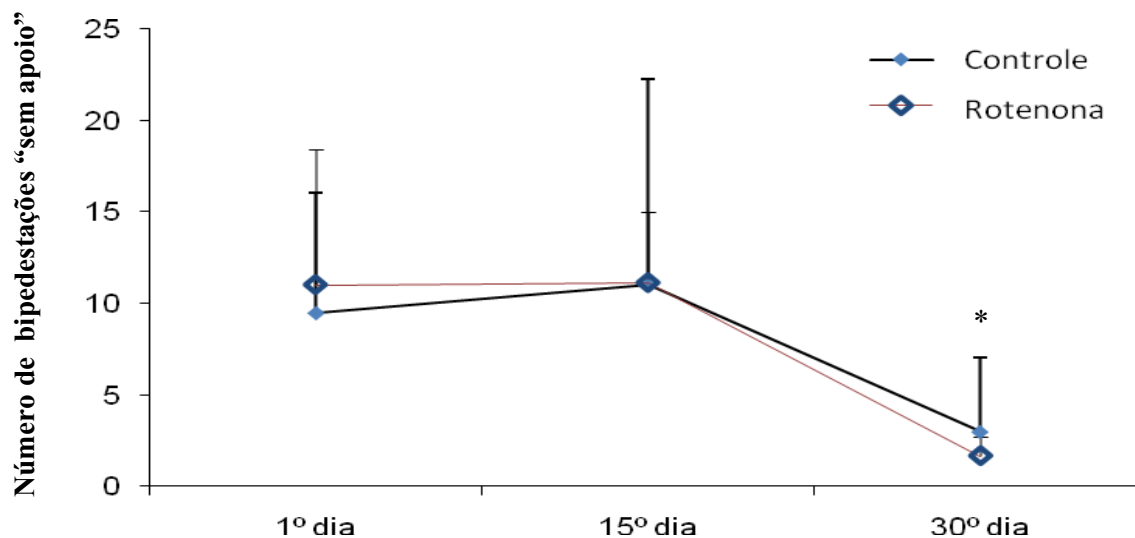


FIGURA 9: Efeitos no número de bipedestações sem apoio de ratos no 1º, 14º e 30º dias de injeção diária intraperitoneal de rotenona (1,5mg/kg). Os resultados são mostrados em média \pm EPM (n CT = X; n ROT=Y). Análise de variância com *pós-teste* de Bonferroni. (*) $P < 0,01$.

4.1.3. BIPEDESTAÇÃO COM APOIO

Quando comparado ao grupo controle, observou-se diminuição significativa no número de bipedestação com apoio nos ratos tratados com rotenona apenas no último teste, onde o grupo tratado ($15,33 \pm 3,46$) e controle ($26,33 \pm 3,93$; $p < 0,001$) se diferenciaram estatisticamente, sendo que o grupo tratado cruzou as linhas que delimitam o teste de campo aberto um número menor de vezes que o grupo controle (FIGURA. 10).

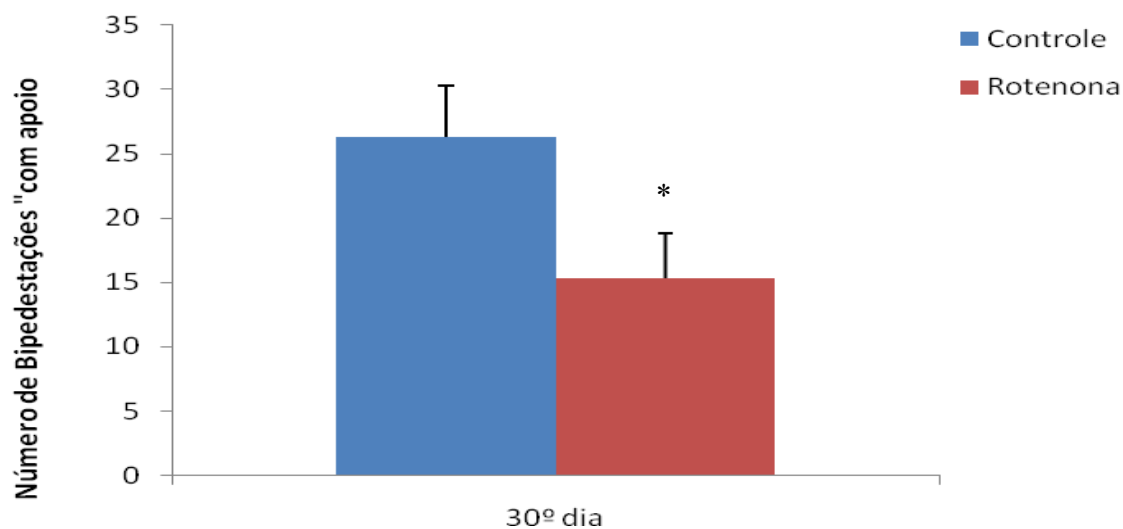


FIGURA 10: Efeitos no número de bipedestações com apoio de ratos após 30 dias de injeção diária intraperitoneal de rotenona (1,5mg/kg). Os resultados são mostrados em média \pm EPM (n CT = X; n ROT=Y). Análise de variância com *pós-teste* de *Bonferroni*. (*) $P < 0,01$.

Os resultados do 1º teste ($51,16 \pm 10,90$ e $52,88 \pm 14,68$) e do 2º teste ($45,77 \pm 9,00$ e $45,5 \pm 13,00$) foram semelhantes para os grupos tratado e controle respectivamente.

Se observados de forma independente, notou-se que houve diferença no número de bipedestações com apoio entre o 2º ($29,33 \pm 7,82$) e o 3º ($15,33 \pm 3,46$; $p < 0,01$) e o 1º ($51,16 \pm 10,90$) e o 3º testes no grupo tratado. O grupo controle não apresentou diferenças significativas (FIGURA. 11).

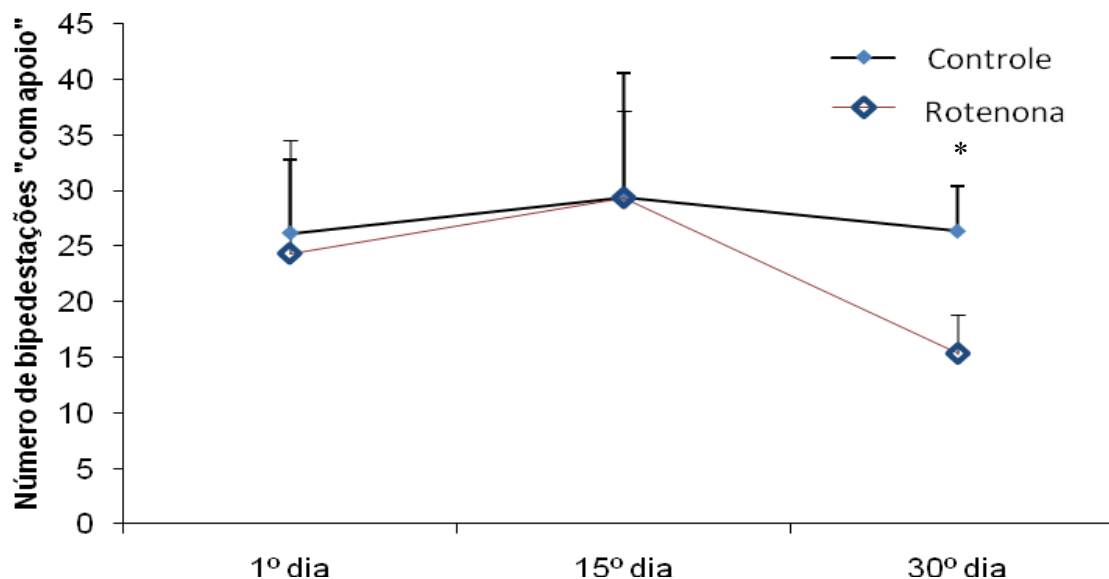


FIGURA 11: Efeitos no número de bipedestações com apoio de ratos no 1º, 14º e 30º dias de injeção diária intraperitoneal de rotenona (1,5mg/kg). Os resultados são mostrados em média \pm EPM (n CT = X; n ROT=Y). Análise de variância com *pós-teste* de *Bonferroni*. (*) $P < 0,01$; (**) $P < 0,001$.

4.2. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM ÁREAS ENCEFÁLICAS

A análise da concentração de TBARs em áreas encefálicas dos grupos controle e tratados revelou que a administração crônica intraperitoneal (1,5mg/kg) de rotenona resultou em alterações no metabolismo oxidativo de regiões do Sistema Nervoso Central (SNC) que se refletem pela acentuada peroxidação lipídica.

Quando comparada ao grupo controle, a peroxidação lipídica em áreas do SNC do grupo tratado foi estatisticamente mais acentuada nas amostras do córtex, cerebelo, substância negra e estriado (FIGURA 12 e TABELA 1).

TABELA 1 - Concentração de TBARs (nmol/g de peso seco de tecido) em áreas encefálicas de ratos tratados com rotenona (1,5 mg/kg) por 30 dias. Os resultados são mostrados em média \pm EPM (n CT = X; n ROT=Y). Análise de variância com *Teste T de students*. (*) $P < 0,05$. (**) Erro padrão médio.

	Controle		Tratado	
	Média	EPM**	Média	EPM**
Hipotálamo	5,62	$\pm 0,81$	5,39	$\pm 0,78$
Hipocampo	3,9	0,51	4,88	$\pm 0,6$
Córtex	37,5	$\pm 8,24$	76,34	$\pm 12,67$
Substância Negra	9,52	$\pm 1,36$	14,75	$\pm 1,02$
Estriado	15,15	$\pm 2,14$	35,98	$\pm 4,66$
Cerebelo	6,11	$\pm 0,94$	12,21	$\pm 2,84$

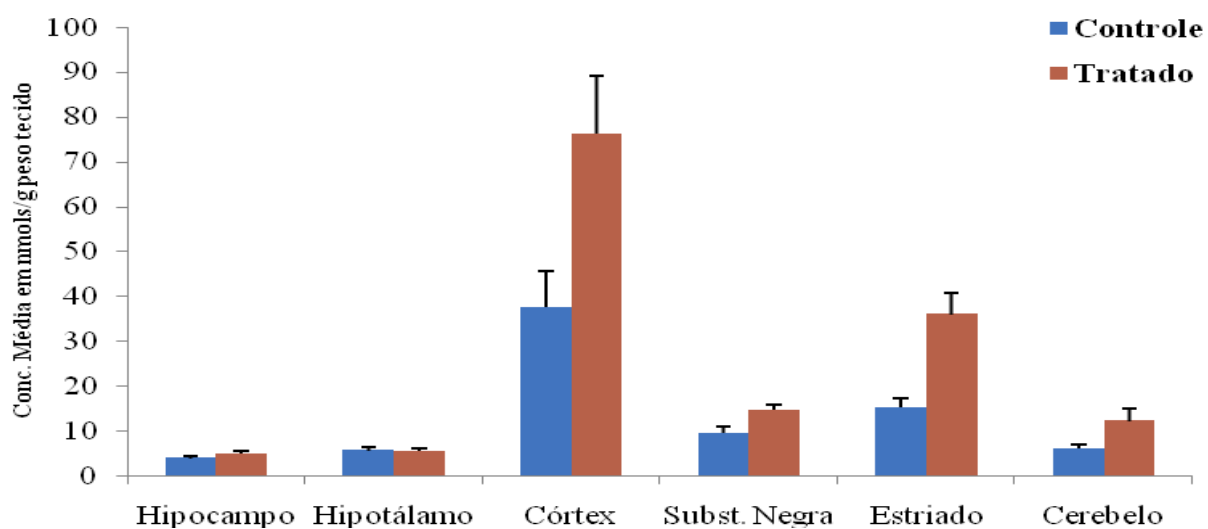


FIGURA 12 - Concentração de TBARs (nmol/g de peso seco de tecido) em áreas encefálicas de ratos tratados com rotenona (1,5 mg/kg) por 30 dias. Os resultados são mostrados em média \pm EPM (n CT = X; n ROT=Y). Análise de variância com *Teste T de students*. (*) $P < 0,05$.

4.3. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM TECIDOS PERIFÉRICOS.

A administração de rotenona por 30 dias também provocou acometimento sistêmico dos animais do grupo tratado. Apesar dos resultados demonstrarem agressão sistêmica no grupo controle, a peroxidação lipídica de amostras de vísceras do grupo tratado foi estatisticamente maior quando comparados porções do fígado e rim (FIGURA 13 e TABELA 2).

TABELA 2 - Concentração de TBARs (nmol/g de peso seco de tecido) em tecidos periféricos de ratos tratados com rotenona (1,5 mg/kg) por 30 dias. Os resultados são mostrados em média \pm EPM (n CT = X; n ROT=Y). Análise de variância com *Teste T de students*. (*) $P < 0,05$.

	Tratado		Controle	
	Média	EPM	Média	EPM
Fígado	4,03	$\pm 0,57$	1,33	$\pm 0,23$
Rim	18,81	$\pm 2,31$	5,47	$\pm 0,34$
Intestino	11,11	$\pm 1,2$	7,13	$\pm 2,63$

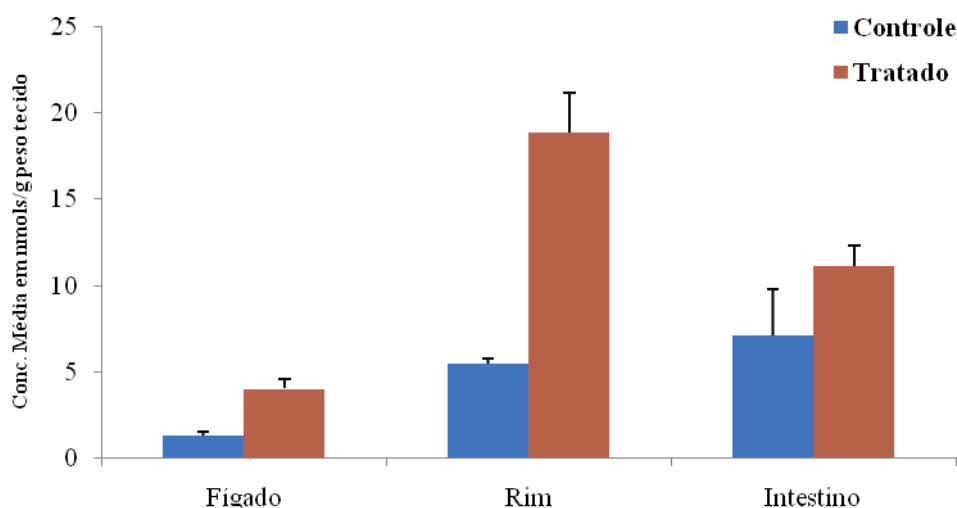


FIGURA 13 - Concentração de TBARs (nmol/g de peso seco de tecido) em vísceras de ratos tratados com rotenona (1,5 mg/kg). Os resultados são mostrados em média \pm EPM (n CT = X; n ROT=Y). Análise de variância com *Teste T de students*. (*) $P < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

5.1. INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS NO MODELO ANIMAL DE DP INDUZIDO POR ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE ROTENONA.

Nossos dados mostram que a infusão crônica intraperitoneal de rotenona causou prejuízo motor aos ratos. Os resultados de campo aberto gerados pelo modelo de parkinsonismo apontam que, os parâmetros relacionados mais diretamente ao comportamento exploratório dos animais, encontram-se significativamente reduzidos para o grupo tratado em comparação ao grupo controle no 30º dia de tratamento (FIGURA 8).

Algumas características da atividade geral dos animais tratados com rotenona, como redução na frequência de locomoção, aumento no tempo de imobilidade e na redução no número de bipedestções sobre duas patas, apresentam similaridade com alguns sinais da DP, tais como a bradicinesia e a redução dos movimentos voluntários em pacientes portadores da doença (KLOCKGETHER, 2004; PRZEDBORSKI, 2005) sugerindo a validade deste modelo para estudo da DP. Entretanto, não podemos descartar a possibilidade de que tais alterações comportamentais sejam consequência de toxicidade sistêmica não neural.

Outros dados de nosso estudo, mesmo não analisados estatisticamente, foram observados nos animais tratados com rotenona como uma postura fletida e uma marcha caracterizada por nós como “arrastada”, além disso, estas manifestações coincidiram com os animais que apresentaram menos locomoção e bipedestação. Estes parâmetros, apesar de não terem ainda sido estudados estatisticamente em outros trabalhos sobre a DP, já foram citados por alguns autores (SHERER et al., 2002) e podem estar

relacionados com a rigidez muscular que dificulta a extensão do tronco e movimentação ativa dos animais.

No presente estudo foi encontrada presença de estresse oxidativo em diversas regiões mesencefálicas como córtex, cerebelo, substância negra e núcleo estriado. Deste modo, deve ser incluída a possibilidade de que tais alterações motoras sejam resultantes do comprometimento de múltiplas funções em diversas regiões do sistema nervoso, e não do sistema nigroestriatal.

Sabe-se que a DP resulta em alteração na transmissão entre núcleos encefálicos que participam da modulação dos movimentos, que geram nos indivíduos dificuldades de iniciar os movimentos além de modificações de tônus muscular culminando em dificuldades de movimentação ativa. Desta forma, a produção de EROs e o desencadeamento de estresse oxidativo no SNC podem estar relacionados às alterações dos processos de neurotransmissão que influenciam amplas áreas do sistema nervoso.

Sabe-se que a perda da homeostase do sistema dopaminérgico no SNC está diretamente relacionada com a acinesia que é um dos principais sintomas clínicos da DP (PREDIGER et al., 2006). Além disso, estudos anteriores já demonstraram que a exposição crônica e sistêmica dose-dependente de rotenona causam depleção de DA estriatal relacionada com sintomas típicos de Doença de Parkinson.

Nehru e colaboradores (2008) descreveram a presença de alterações como catalepsia, diminuição na atividade locomotora e redução da atividade muscular em ratos após tratamento crônico com rotenona. Esses dados sugerem dano no sistema de controle motor e o desenvolvimento de sintomatologia compatível com DP em ratos tratados com rotenona.

Contudo, há controvérsias na literatura quando se procura quantificar o percentual de perda dopaminérgica para se iniciarem as alterações motoras observadas na Doença de Parkinson. Alam et al. (2004)

concluíram que somente após a perda de 50% dos neurônios dopaminérgicos na parte compacta da substância negra, pode ser observada diminuição na atividade locomotora dos animais. Por outro lado, no estudo de Sherer et al. (2003) muitos animais tratados com rotenona que manifestaram características clínicas compatíveis com a DP não apresentaram alterações neurodegenerativas. Di Monte et al. (2003) atribuíram este resultado ao fato de que as alterações do metabolismo dopaminérgico ocorram antes mesmo da franca neurodegeneração de áreas nigroestriatais.

5.2. INVESTIGAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO EM ÁREAS ENCEFÁLICAS NO MODELO ANIMAL DA DP INDUZIDO POR ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE ROTENONA.

A reação de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio com os ácidos graxos polinsaturados (AGPI), presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, inicia um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO), que pode ser avaliado e utilizado como um indicador do estresse oxidativo celular (BARREIROS; DAVID, 2006). Este culmina com a destruição da estrutura destas membranas, falência dos mecanismos de troca de metabólitos podendo em uma condição extrema levar à morte celular (BENZIE, 1996). Por sua vez, o sistema nervoso é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo, devido fundamentalmente ao seu intenso metabolismo aeróbico e grande conteúdo de ácidos graxos polinsaturados, que são alvos potenciais da peroxidação lipídica (RICHARD et al., 2008).

A peroxidação dos ácidos graxos polinsaturados da membrana neuronal dá origem a vários compostos, como aldeídos, cetonas, hidroperóxidos, hidroxíácidos, hidroxiperóxidos, alcanos e alcenos. Os aldeídos são os produtos mais facilmente formados pela peroxidação lipídica. Os principais compostos são o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal. A identificação e quantificação destes produtos fornece uma medida indireta de danos oxidativos ocorrentes durante a peroxidação lipídica (PURCHARD;

KELLY, 1996). Existem evidências de que o nível de malondialdeído e hidroperóxidos lipídicos é maior que o normal na substância negra de pacientes com DP (DANIELSON; ANDERSEN, 2008; GANDHI; WOOD, 2005).

A concentração das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARs) é usualmente considerada como reflexo da quantidade de malondialdeído, pois este tem se mostrado como o principal elemento reagente ao ácido tiobarbitúrico na PLO (PURCHARD; KELLY, 1996). Assim, o ensaio de TBARs é um dos testes mais amplamente utilizados para identificar e quantificar a peroxidação lipídica (HALLIWELL, 1987).

A toxicidade da rotenona está relacionada ao comprometimento da respiração aeróbica celular. Seu mecanismo fisiopatológico consiste na inibição do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial e despolimerização dos microtubulos dos axônios nigroestriatais (DANIELSON; ANDERSEN, 2008; GANDHI; WOOD, 2005). A principal implicação desta inibição seria a produção de EROs, que , por sua vez atacariam a membrana celular neuronal culminando com peroxidação lipídica (COSTA et al., 1989).

Em nosso estudo, a administração crônica de rotenona injetada intraperitonealmente ocasionou alterações do metabolismo oxidativo de áreas do Sistema Nervoso Central que se refletem pela peroxidação lipídica acentuada. Os valores de concentração de TBARs em nmol/g de peso de tecido no SNC estão ilustrados na Tabela 1 onde pode-se notar facilmente o aumento acentuado da peroxidação lipídica no córtex, cerebelo, estriado e substância negra do grupo tratado quando comparado ao respectivo grupo controle. Ao transformar-se essa diferença em valores percentuais, a quantidade de produtos de peroxidação lipídica no córtex e estriado dobrou quando comparado ao grupo controle, sendo que no córtex esse aumento foi de 103% e no estriado o aumento foi de 112%.

A peroxidação lipídica já foi avaliada anteriormente em modelos experimentais que utilizavam a rotenona como neurotoxina. Bashkatova et al. (2004) realizaram estudo onde a administração crônica intraperitoneal de

rotenona foi capaz de produzir concentrações de NO e TBARs estatisticamente significativas em córtex e estriado a partir de 20 dias de tratamento diário. Estes resultados coincidiram com sintomas motores observados no teste de catalepsia como acinesia e rigidez muscular. Nehru et al. (2008) também encontraram aumento na peroxidação lipídica no encéfalo de animais tratados com rotenona.

Apesar da via nigroestriatal ser a região mais acometida na DP, outras áreas encefálicas estudadas também mostraram alterações no nível de peroxidação lipídica e poderiam, desta forma, estar relacionada com outros sinais e sintomas da DP que foram descritos recentemente como depressão, ansiedade, distúrbio do sono e a marcante vagarosidade dos processos cognitivos (“bradifrenia”) (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

Isto reforça a ideia de que a rotenona não tem ação específica nos neurônios dopaminérgicos da substância negra. Outras toxinas como o MPTP e a 6-hidroxidopamina são utilizadas em modelos experimentais de DP e alcançam estes neurônios dopaminérgicos de forma específica. A explicação para este fato é que somente nestes tipos neuronais existem transportadores para eles. No caso da rotenona injetada sistemicamente, ela pode alcançar qualquer sistema ou região do corpo. Entretanto, não se pode ignorar o maior percentual de peroxidação lipídica no estriado, substância negra e córtex encontrados no nosso estudo. Corroborando assim os estudos que confirmam a hipótese de que a rotenona tem maior ação nestas áreas, porém não sendo específica para as mesmas (BETARBET et al., 2000; LAPOINTE et al., 2004; SHERER et al., 2003).

Além da presença de Da em outras vias que não motoras, sabe-se que a ação da rotenona causa neurodegeneração e formação de corpos de Lewy também em neurônios não dopaminérgicos (ONIANGO, 2008; SCHULZ, 2004). Recentes estudos demonstraram que animais tratados mesmo de forma aguda com rotenona já apresentaram neurodegeneração e formação de corpúsculos de Lewy no córtex, bulbo olfatório, sistemas noradrenérgicos (locus coeruleus), serotoninérgicos (núcleos da rafe) e colinérgicos (Núcleos

basais de Meynert e núcleo dorsal do vago). (ONIANGO, 2008; ZEEVALK, 2008).

Contudo, recentes estudos demonstram que não há acometimento de áreas encefálicas e surgimento de sintomas motores em ratos tratados com rotenona por vias naturais, como via oral e via aérea. Rojo et al. (2007) não observaram concentrações de TBARs e ON no estriado e substância negra em ratos tratados com administração nasal de rotenona por 30 dias. Isto sugere que pesticidas naturais reproduzam sintomas parkinsonianos centrais apenas quando administrado de forma não-natural, como a via intra-peritoneal e via intravenosa, ou naturais necessitem de um tempo ainda maior de experimento para que possam reproduzir, a partir de uma via natural de administração, tais características.

Porém, trabalhos como de Pan-Montojo (2010) e Greene (2009) concluíram que há acometimento do sistema nervoso entérico em ratos tratados com infusão crônica intra-gástrica de rotenona, apontando um efeito local do pesticida que simula as alterações neuroanômicas do SNE presentes em pacientes com DP.

5.3. INVESTIGAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM ÁREAS NÃO-ENCEFÁLICAS NO MODELO ANIMAL DA DP INDUZIDO POR ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE ROTENONA.

Há poucos trabalhos demonstrando a presença de acometimento sistêmico decorrente do uso de pesticidas em modelos animais da DP. Modelos de MTPT e 6-hidroxidopamina não citaram estatisticamente acometimento de vísceras não-centrais. Contudo, trabalhos como o de Greene et al. (2009) já demonstram a distribuição sistêmica extensa no organismo de ratos tratados de forma aguda e crônica com rotenona. A rotenona tem mostrado maior afinidade pelos tecidos onde a existência do metabolismo oxidativo é mais intensa, porém órgãos como o fígado, rim e coração tem apresentado maior

estresse oxidativo quando comparado a outras vísceras já estudadas como o pulmão e intestino (GINGERICH, 2002).

A ampla distribuição sistêmica da rotenona é atribuída por muitos autores à sua composição química. Sabe-se que a rotenona apresenta trofismo por membranas lipídicas fundamentalmente devido à sua alta lipossolubilidade, o que facilita a interação e reação desta com os elementos presentes na membrana e posterior inibição do complexo I mitocondrial. Trabalhos como de Lapointee et al. (2004) perceberam que animais tratados cronicamente com rotenona não apresentavam alterações exclusivamente centrais. Segundo o autor, em 80% dos animais tratados com o pesticida houve severos danos em órgão periféricos, como perda de fibras musculares, acloridria no estômago e necrose e degeneração celular no fígado.

Outros órgãos periféricos como glândulas adrenais, estômago e coração apresentaram toxicidade dose-dependente sem que tivesse havido, ao tempo do sacrifício dos animais, qualquer acometimento morfológicamente observável no SNC ou mesmo perda de neurônios dopaminérgicos (PAULIEN et al., 2008).

Os resultados obtidos com este experimento nos levam a sugerir que a exposição crônica à rotenona promoveu toxicidade sistêmica, avaliada através de alterações no metabolismo oxidativo de algumas vísceras, contrapondo aos trabalhos que sugerem a sua característica neurotóxica para áreas encefálicas específicas. Os animais do grupo tratado com rotenona apresentaram maior metabolismo oxidativo no rim e fígado (Figura 20). Este dado vem colaborar com a hipótese de que a rotenona não apresenta acometimento específico ao SNC. Contudo, torna-se importante a realização de estudos que utilizem técnicas mais específicas para verificação de degeneração celular e comprometimento estrutural de órgãos periféricos para melhor qualificação do dano que a rotenona causa a estas regiões.

6. CONCLUSÃO

Foram encontradas nos ratos tratados cronicamente com rotenona as seguintes alterações:

6.1. Após 30 dias de infusão intraperitoneal que rotenona foi capaz de promover alterações no comportamento motor observadas pela diminuição da deambulação e da adoção de postura bípede;

6.2. Houve aumento nos parâmetros indicativos de estresse oxidativo com presença de peroxidação lipídica em várias áreas encefálicas sem, contudo, haver especificidade para regiões nigroestriatais;

6.3. Houve acometimento sistêmico periférico após tratamento crônico com rotenona evidenciado pela presença de estresse oxidativo no fígado e rim dos ratos tratados.

7. REFERÊNCIAS

ALAM, M.; SCHMIDT, W. J. **Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats.** *Behav. Brain Res.* 136, 317–324, 2002.

ALAM, M.; MAYERHOFER, A.; SCHMIDT, W.J. **The neurobehavioral changes induced by bilateral rotenone lesion in medial forebrain bundle of rats are reversed by L-DOPA.** *Behavioural Brain Research*, 151,117-124, 2004.

ARBER, A.D.; HARRIS, S.R. **Oxygen free radicals and oxidants: a review.** *Amer. Pharm.*, v.34, n.9, p.26-35, 1994.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. **Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo.** *Quím. Nova*, São Paulo, v. 29, n. 1, Feb. 2006.

BASHKATOVA, V.; ALAM, M.; VANIN, A.; SCHMIDT, W.J. **Chronic administration of rotenone increases levels of nitric oxide and lipid peroxidation products in brain.** *Exp Neurol*, v. 186, p. 235-41, 2004

BEAL, F. **Experimental models of Parkinson's disease.** *Nat. Rev. Neurosci.*, v.2, p. 325 – 332, 2001.

BERNARDI, M.M.; PALERMO-NETO, J. **Effect of abrupt and gradual withdrawal from long-term haloperidol treatment on open field behavior of rats.** *Psychopharmacology*, v. 65, p. 247-250, 1979.

BROADHURST, P. L. **Experiments in psychogenetics.** In: EISENK, H. J. *Experiments in Personality.* London: Routledge and Kegan Paul, p. 31-71, 1960

BENZIE, I.F.F. **Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences.** *Int.J. Food Sci. Nut*, v.47, p.233-261, 1996.

BETARBET, R.; SHERER, T.B.; MACKENZIE, G.; GARCIA, M.; PANOV, A.V.; GREENAMYRE, J.T. **Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease.** *Nat Neurosci* 3: 1301–1306, 2000.

BURCH D.; SHEERIN F. **Parkinson's disease.** *Lancet*, 365, 622-627, 2005.

CORRIGAN, F.M.; MURRAY, L.; WYATT, C.L. SHORE, R.F. **Diorthosubstituted polychlorinated biphenyls in caudate nucleus in Parkinson's disease.** *Exp Neurol*, v. 150, p. 339-342, 1998.

COSTA C.N.B.; CARVALHO L.O.D.M.; DUTRA,S.; PIMENTEL E.S. **Uso do timbó Urucu (*Derris urucu*) no controle do piolho (*Haematopinus tuberculatus*) em bubalinos.** *Boletim de Pesquisa* 78, IBAMA, Brasília. 1989.

CALNE, D.B. **Parkinson's disease is not one disease.** *Parkinsonism and Related Disorders*, 7, 3-7. 2001.

CHUNG, K.K.; DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. **The role of the ubiquitinproteosomal pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders.** *TINS*, v. 24, p. S7-S14, 2001.

CROMBIE, L.; WHITING, D.A. **Review article number 135 biosynthesis in the rotenoid group of natural products: applications of isotope methodology.** *Phytochemistry*. 49, 1479-1507, 1998.

DAUER W.; PRZEDBORSKI S. **Parkinson's Disease: Mechanisms and Models.** *Neuron*, 39, 889-909, 2003.

DANIELSON, S.R.; ANDERSEN, J.K. **Oxidative and nitrative protein modifications in Parkinson's disease.** Free Radic Biol Med, 44, 1787-94, 2008

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

DI MONTE, D.A.; LAVASANI, M.; AMY, B. et al. **Environmental factors in Parkinson's disease.** Neurotoxicology, v. 23, p. 487-502, 2002.

DUBOIS, B.; PILLON, B. **Cognitive deficits in Parkinson's disease.** J Neurol, v. 244, p. 2-8, 1997.

EILAM, D. **Open-field behavior withstands drastic changes in arena size.** Behavioural Brain Research, 142:53–62. 2003.

EISEMBERG, T.; BUTTNER, S.; KROEMER, G.; MADEO, F.; **The mitochondrial pathway in yeast apoptosis.** Apoptosis, 12, 1011-1023, 2007.

ENGELENDER, S.; KAMINSKY, Z.; GUO, X. et al. **Synphilin-1 associates with alpha-synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions.** Nat. Genet., v. 22, p. 110-114, 1999.

FLEMING, S.M.; ZHU, C.; FERNAGUT, P.O.; MEHTA, A.; DICARLO, C.D.; SEAMAN, R.L.; CHESSELET, M.F.; **Behavioral and immunohistochemical effects of chronic intravenous and subcutaneous infusions of varying doses of rotenone.** Exp Neurol 187:418–429. 2004.

FLEMING, L.; MANN, J.B.; BEAN, J. et al. **Parkinson's disease and brain levels of organochlorine pesticides.** Ann Neurol, v. 36, p. 100-103, 1994.

GANDHI S.; WOOD, N. W. **Molecular Pathogenesis of Parkinson's disease.** Hum Mol Genet, 14, 2749-2755, 2005.

GERLACH, M.; RIEDERER, P. **Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man.** J Neural Transm, 103, 987-1041, 1996.

GEYER, M. A.; MARKOU, A. **Animal models of psychiatric disorders.** Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress. New York, Raven Press, 1995.

GINGERICH, W.H. **Tissue distribution and elimination of rotenone in rainbow trout.** Aquat. Toxicol, pp. 27-40. 2006.

GOMES, M.Z.; RAISMAN-VOZARI R.; BEL, E.A.A. **Nitric oxide synthase inhibitor decreases 6-hydroxydopamine effects on tyrosine hydroxylase and neuronal nitric oxide synthase in the rat nigrostriatal pathway.** Brain Res, 1203, 160-169, 2008.

GORELL, J.M.; JOHNSON, C.C.; RYBICKI, B.A. et al. **Occupational exposure to manganese, copper, lead, iron, mercury and zinc and the risk of Parkinson's disease.** Neurotoxicology, v. 20, p. 239-248, 1999.

GREENE, J.G.; NOORIAN, A.R.; SRINIVASAN, S. **Delayed gastric emptying and enteric nervous system dysfunction in the rotenone model of Parkinson's disease.** Exp Neurol 218(1):154-161.2009.

HOGLINGER, G.U.; OERTEL, W.H.; HIRSCH, E.C. **The rotenone model of parkinsonism: the five years inspection.** J. Neurochem, v. 84, p. 491-502, 2003.

HALLIWELL, B. **Oxidants and human disease: Some new concepts**. *Faseb. J.*, v.1, p.358-364, 1987.

HISATA, J. **Final supplemental environmental impact statement**. Lake and stream rehabilitation: rotenone use and health risks. Washington State Department of Fish and Wildlife, 2002.

JIN, J.; DAVIS, J.; ZHU, D.; KASHIMA, D. T.; LEROUEIL, M.; PAN, C.; MONTINE, K.S.; ZHANG, J. **Identification of novel proteins affected by rotenone in mitochondria of dopaminergic cells**. *BMC Neuroscience*, 8, 67, 2007.

KLOCKGETHER, T. **Parkinson's disease: Clinical aspects**. *Cell Tissue Res.* 318, 115-120. 2004

KWEON, G.R; MARKS, J.D.; KRENCIK, R.; LEUNG, E.H.; SCHUMACKER, P.T.; HYLAND, K.; KANG, U.J. **Distinct mechanisms of neurodegeneration induced by chronic complex I inhibition in dopaminergic and non-dopaminergic cells**. *J Biol Chem*, 279, 51783-92, 2004.

LAPOINTE, N.; ST-HILAIRE, M.; MARTINOLI, M.G.; BLANCHET, J.; GOULD, P.; ROUILLARD, C.; CICHETTI, F. **Rotenone induces non-specific central nervous system and systemic toxicity**. *FASEB J.* 18:717-719, 2004.

LING, N. **Rotenone: a review of its toxicity and use for fisheries management**. *Science for conservation*. 211.2003.

LIU, H.H.; TSAI, M.C.; CHEN, C.J. et al. **Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan**. *Neurology*, v. 48, p. 1583- 1588, 1997.

MENEZES, M.S.; TEIVE, H.A.G. **Doença de Parkinson**. Rio de Janeiro: ed. Guanabara Koogan, 2003.

MARKING, L. **Oral toxicity of rotenone to mammals**. Investig Fish Control, Issue No. 94, 1988.

MOURADIAN, M.M. **Recent advances in the genetics and pathogenesis of Parkinson disease**. Neurology 58, 179–185. 2002.

NEHRU, B.; VERNA, R.; KHANNA, P.; SHARMA, S.K. **Behavioral alterations in rotenone model of Parkinson's disease: attenuation by cotreatment of centrophenoxine**. Brain Res, 1201, 122-7, 2008

ONYANGO, I.G. **Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease**. Neurochem Res, 33,589-97, 2008.

PANOV, A.; DIKALOV, S.; SHALBUYEVA, N.; TAYLOR, G.; SHERER, T.; GREENAMYRE, J.T. **Rotenone model of Parkinson disease: multiple brain mitochondria dysfunctions after short term systemic rotenone intoxication**. J Biol Chem 280:42026–42035. 2005.

PAULIEN, G.M.; MARIO M.; MARJOLI, J.N.H. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. Pages 114-130. 2008.

PORTER, N.A.; CALDWELL, S.E.; MILLS, K.A. **Mechanism of free radical oxidation of unsaturated lipids**. Lipids, v.30, n.4, p.277-290, 1995.

PRZEDBORSKI, S. **Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease**. Parkinsonism. Relat Disord, 11, 3-7, 2005.

PRIYADARSHI, A.; KHUDER, S.A.; SCHAUB, E.A.; PRIYADARSHI, S.S. **Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis**. Environ. Res. 86, 122–127. 2001.

PURCHARD, N.A.; KELLY, F.J. **Free radicals**. New York: Oxford University Press, p. 119-31. 1996.

PRUT, L.; BELZUNG, C. **The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review.** *European Journal of Pharmacology*, p. 3–33, 2003.

PALERMO-NETO, J. **Supersensitivity, drug withdrawal, and open-field behavior.** *Psychopharmacology*, v. 18, p. 11-12, 1982.

PAN-MONTOJO, F; ANICHTCHIK, O; DENING, Y; KNELS, L; PURSCHE, S; JUNG, R. **Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice.** *PLoS One* 5(1):e8762. 2010

RAY, D.E. **Pesticides derived from plants and living organisms.** *Handbook of Pesticide Toxicology*, WJ Hayes, ER Laws. Academic Press, San Diego, CA; 585–636. 1991.

RICHARD, D; KEFI, K; BARBE, U. **Polyunsaturated fatty acids as antioxidants.** *Pharmacological Research*, 6, 451-455, 2008.

RODRÍGUEZ, M.; BARROSO-CHINEA, P.; ABDALA, P.; OBESO, J.; GONZÁLES-HERNÁNDEZ, T. **Dopamine cell degeneration induced by intraventricular administration of 6-hidroxydopamine in rat: similarities with cell loss in Parkinson's Disease.** *Exp. Neurol.*, v. 169, p. 163-181, 2001.

ROJO, A.I.; Cavada, C.; Sagarra, M.R.; Cuadrado, A. **Chronic inhalation of rotenone or paraquat does not induce Parkinson's disease symptoms in mice or rats.** *Experimental Neurology*, 208, 120-126, 2007.

RIEDER, C.R.M.; BIANCHIN, M.M.; SCHRÖDER, N. **Aspectos Neuropsiquiátricos da Doença de Parkinson.** In: KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, I. *Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos.* Artmed Editora S.A., São Paulo, 2004.

SCHULZ, B.; FALKENBURGER B.H.. **Neuronal pathology in Parkinson's disease.** Cell and Tissue Research,318, 135-147, 2004.

SHERER, T.B.; BETARBET, R.; TESTA, C.M.; SEO, B.B.; RICHARDSON, J.R.; KIM, J.H.; MILLER, G.W.; Et al. **Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease.** J Neurosci 26;23(34):10756-64. 2003.

SHERER, T.B.; BETARBET, R.; TESTA, C.M.; SEO, B.B.; RICHARDSON, J.R.; KIM, J.H.; MILLER, G.W.; Et al. **Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease.** J Neurosci 26;23(34):10756-64. 2003.

TOGO, T.; ISEKI, E.; MARUI, W.; AKIYAMA, H.; UEDA, K.; KOSAKA, K. **Glial involvement in the degeneration process of Lewy body-bearing neurons and the degradation process of Lewy bodies in brains of dementia with Lewy bodies.** J Neurol Sci, 184, 71-75, 2001.

VILA, M.; PRZEDBORSKI, S. **Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease.** Nat Med, 10, 58-62, 2004.

VOLLES, M.J.; LANSBURY, P.T. **Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein is sensitive to Parkinson's disease-linked mutations and occurs by a pore-like mechanism.** Biochemistry. 9, 4595-4602, 2002.

WATABE, M.; NAKAKI, T. **Mitochondrial complex I inhibitor rotenone-elicited dopaminergic SH-SY5Y cells.** J Pharmacol Exp Ther, 323, 499-507, 2007.

JENNER, P. **Ann. Neurol.** 53, Suppl. 3, S26-S38, 2003.

WINTERBOURN, C.; GUTTERDGE, J.M.C.; HALLIWELL, B. **Doxorubicin-dependent lipid peroxidation at low partial pressure of oxygen.** J. Free Rad. Biol. Med, v.1, p. 43-49, 1985.

ZEEVALK, G.D.; Sonsallaa, P.K.; Zeevalka G.D.; Germanb, D.C. **Chronic intraventricular administration of 1-methyl-4-phenylpyridinium as a progressive model of Parkinson's disease,** 14, 116-118, 2008.