

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Neurociências

Clara de Paula Gomes

ALTERAÇÕES DE MEMÓRIA E FLEXIBILIDADE COGNITIVA EM MODELO ANIMAL DE
SINTOMAS NÃO-MOTORES DE DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR 6-
HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA)

Belo Horizonte

2024

Clara de Paula Gomes

ALTERAÇÕES DE MEMÓRIA E FLEXIBILIDADE COGNITIVA EM MODELO ANIMAL DE
SINTOMAS NÃO-MOTORES DE DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR 6-
HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA)

Dissertação apresentada ao programa de pós
graduação em Neurociências da Universidade
Federal de Minas Gerais, como requisito parcial
para obtenção de título de Mestre em Neurociências.

Orientador Cleiton Lopes Aguiar

Belo Horizonte
2024

Gomes, Clara de Paula.

043 Alterações de memória e flexibilidade cognitiva em modelo animal de sintomas não motores de Doença de Parkinson induzido por 6-hidroxidopamina (6-OHDA) [manuscrito] / Clara de Paula Gomes. – 2024.

60 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Cleiton Lopes Aguiar.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

1. Neurociências. 2. Doença de Parkinson. 3. Oxidopamina. 4. Memória. 5. Função Executiva. 6. Ansiedade. I. Aguiar, Cleiton Lopes. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS INSTITUTO DE CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS ATA DE DEFESA DE
DISSERTAÇÃO DA ALUNA CLARA DE PAULA GOMES**

Realizou-se, no dia 26 de abril de 2024, às 13:30 horas, J222, da Universidade Federal de

Minas Gerais, a 237ª defesa de dissertação, intitulada *ALTERAÇÕES DE MEMÓRIA E FLEXIBILIDADE COGNITIVA EM MODELO ANIMAL DE SINTOMAS NÃO-MOTORES DE DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR 6-HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA)*,
apresentada

por CLARA DE PAULA GOMES, número de registro 2021711247, graduada no curso de PSICOLOGIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em NEUROCIÊNCIAS, à seguinte Comissão Examinadora: Prof. Cleiton Lopes Aguiar - Orientador (UFMG), Profa. Renata Cristina Mendes Ferreira (UFMG), Profa. Muiara Aparecida Moraes (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

(X) Aprovada () Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 26 de abril de 2024. Carlos Magno Machado Dias - Secretário

Assinatura dos membros da banca examinadora: Prof. Cleiton Lopes Aguiar (Doutor)

Profa. Renata Cristina Mendes Ferreira (Doutora)

Profa. Muiara Aparecida Moraes (Doutora)



Documento assinado eletronicamente por **Renata Cristina Mendes Ferreira, Professora Magistério Superior-Substituta**, em 26/04/2024, às 17:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Muiara Aparecida Moraes, Usuária Externa**, em 27/04/2024, às 13:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Cleiton Lopes Aguiar, Professor do Magistério Superior**, em 09/05/2024, às 17:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site
https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3175196** e o código CRC **38A3BB68**.

Referência: Processo nº 23072

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu orientador Dr. Cleiton Aguiar pela oportunidade desses dois anos de aprendizado e pela participação no projeto. Pela confiança de me aceitar sob sua orientação e paciência e incentivo em todo processo. Agradecer ao programa de pós-graduação em neurociências e a UFMG em neurociências e todos os responsáveis por tornar esse trabalho possível. Ao laboratório de neurociências e comportamento (LANEC) pelo espaço, ferramentas e conhecimento disponibilizado. Além da CAPES pelo suporte financeiro durante o período do projeto.

Aos professores que compartilharam tempo, espaço e conhecimento. Ao Dr. Fernando Padovan pelo auxílio e apoio em Ribeirão Preto e Dr. Vinicius Ribas por ceder o espaço às perfusões e auxiliar com o manejo da bomba de infusão. Agradeço a Dra. Juliana Tavares pela oportunidade de participar do projeto educando para epilepsia.

Obrigada a todos os colegas de laboratório pela troca de conhecimentos e de experiências únicas. Principalmente agradeço ao Mateus Prates e Beatriz Schweizer que realizaram o projeto com muita parceria, sem eles não seria possível a realização deste trabalho. Agradeço a paciência, risadas e aprendizado que tivemos nesses dois anos de trabalho.

Por fim gostaria de agradecer a minha família e amigos pelo apoio oferecido. Sem vocês a mudança de estado e início dessa jornada não seria possível.

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é classicamente caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos na Substância Negra (SN) e reconhecida pelos seus sintomas motores. Porém, um corpo significativo de evidências indica que a DP afeta diversos outros sistemas de neurotransmissão, causando sintomas não motores. Alterações cognitivas como demência da doença de Parkinson e diminuição das funções executivas fazem parte de um grupo de sintomas não motores que pode ser desenvolvido no curso da doença. O tratamento e conhecimento da evolução desses sintomas não motores pode melhorar a qualidade de vida desses pacientes. Neste estudo, avaliamos se a lesão parcial da via nigro-estriatal induzida pela neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em ratos seria suficiente para reproduzir alguns dos sintomas não motores da DP. Em particular, investigamos possíveis alterações de memória e de funções executivas do modelo animal em questão. Ratos Wistar adultos machos foram anestesiados e submetidos a cirurgia estereotáxica para infusão bilateral de 10µg de 6-OHDA diluído em 3µL de solução contendo ácido ascórbico no estriado. Animais do grupo controle receberam apenas o veículo da droga. Primeiramente, foram realizados testes motores para confirmar a ausência de sintomas motores graves que comprometessem as demais tarefas. Além disso, analisamos possíveis comportamentos do tipo ansioso pelo teste do campo aberto. Com a confirmação que os animais não apresentavam sintomas do tipo ansioso ou sintomas motores, realizamos testes para avaliação da memória, aprendizado e funções executivas. Ao avaliarmos os animais no Labirinto de Barnes, observamos um prejuízo significativo na memória espacial no grupo 6-OHDA, apresentando menor tempo no quadrante alvo no teste de evocação. Já no teste do aprendizado reverso, utilizado para analisar a flexibilidade cognitiva, os animais 6-OHDA precisaram de maior quantidade de tentativas para aprender a nova localização, porém sem aumentar o número de visitas ao quadrante alvo anterior. Em conclusão, a lesão parcial da via nigro-estriatal induzido por 6-OHDA foi suficiente para reproduzir alguns dos sintomas não motores observados na clínica, tais como prejuízos de memória e de flexibilidade comportamental. Esperamos que nossos achados fundamentem futuras investigações sobre os mecanismos subjacentes às alterações mnemônicas e de funções executivas observadas na DP.

Palavras chaves: doença de parkinson; 6-OHDA; memória; função executiva; ansiedade; loop córtico estriatal.

ABSTRACT

Parkinson's Disease (PD) is classically characterized by the loss of dopaminergic neurons in the Substantia Nigra (SN) and recognized by its motor symptoms. However, a significant body of evidence indicates that PD affects several other neurotransmitter systems, causing non-motor symptoms. Cognitive alterations such as Parkinson's disease dementia and decreased executive functions are part of a group of non-motor symptoms that can be developed throughout the disease. The treatment and knowledge of the evolution of these non-motor symptoms can improve the quality of life of these patients. In this study, we evaluated whether the partial lesion of the nigrostriatal pathway induced by the neurotoxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in rats would be sufficient to reproduce some of the non-motor symptoms of PD. In particular, we investigated possible alterations of memory and executive functions of the animal model in question. Adult male Wistar rats were anesthetized and underwent stereotaxic surgery for bilateral infusion of 10µg of 6-OHDA diluted in 3µL of solution containing ascorbic acid in the striatum. Animals in the control group received only the vehicle of the drug. First, motor tests were performed to confirm the absence of severe motor symptoms that would compromise the other tasks. In addition, we analyzed possible anxiety-like behaviors in the open field test. With the confirmation that the animals displayed neither anxiety-like alterations nor motor symptoms, we performed tests to examine memory, learning, and executive functions. When we evaluated the animals in the Barnes Maze, we observed a significant impairment in spatial memory in the 6-OHDA group, showing less time in the target quadrant in the retrieval test. In the reverse learning test, used to analyze cognitive flexibility, the 6-OHDA animals needed more trials to learn the new location, without increasing the number of visits to the previous target quadrant. In conclusion, the partial lesion of the nigrostriatal pathway induced by 6-OHDA was sufficient to reproduce some non-motor symptoms observed in the clinic, such as memory impairment and behavioral flexibility. We hope that our findings will support future investigations into the mechanisms underlying the mnemonic and executive function alterations observed in PD.

Keywords: parkinson's disease; 6-OHDA; non-motor symptoms; memory; executive functions; animal models

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sistema motor na doença de Parkinson.....	10
Figura 2. Desenvolvimento dos sintomas não motores na doença de Parkinson.....	12
Figura 3. Subtipos clínicos na doença de Parkinson	14
Figura 4. Relação do estriado com vias frontais.....	15
Figura 5. Cronograma experimental.....	20
Figura 6. Imagem ilustrativa da realização da cirurgia de infusão.....	22
Figura 7. Cronograma do teste de labirinto de Barnes (memória e aprendizado reverso).....	23
Figura 8. Realização do Barnes maze na fase da memória.....	24
Figura 9. Realização do Barnes maze na fase do aprendizado reverso	25
Figura 10. Correção e realização do teste campo aberto.....	27
Figura 11. Correção e realização do teste de impressão de patas.....	28
Figura 12. Realização da Imunohistoquímica na USP-Ribeirão preto.....	30
Figura 13. Resultados do teste de impressão de patas.....	32
Figura 14. Resultado da 3ª semana do teste do campo aberto.....	34
Figura 15. Resultado 4ª semana do teste do campo aberto.....	35
Figura 16. Resultado dos dias de aprendizado no labirinto de Barnes.....	37
Figura 17. Resultados dos dias de aprendizado no labirinto de Barnes continuação.....	38
Figura 18. Teste de evocação no labirinto de Barnes.....	39
Figura 19. Resultado dos dias de aprendizado reverso no labirinto de Barnes.....	40
Figura 20. Resultado dos dias de aprendizado reverso no labirinto de Barnes.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

NOR- Noradrenalina

DA - Dopamina

SN- Substância Negra

STR - Estriado

FE - Funções Executivas

6-OHDA - 6 hidroxidopamina

LB - labirinto de Barnes

DP - Doença de Parkinson

SUMÁRIO

1	Introdução.....	16
1.1	Doença de Parkinson.....	166
1.2	Sintomas não motores e evolução da doença de parkinson.....	18
1.3	Perfil neuropsicológico da doença de Parkinson.....	19
1.4	Funções executivas.....	21
1.4.1	Funções executivas na Doença de Parkinson	21
1.5	Memória	22
1.5.1	Memória na doença de Parkinson	23
1.6	Modelo animal de sintomas não motores	24
2.	Objetivo Geral	26
2.1	Objetivos específicos.....	26
3	Metodologia.....	27
3.1	Escolha do modelo experimental	27
3.2	Sujeitos experimentais.....	27
3.3	Cirurgia estereotóxica.....	28
3.4	Barnes Maze: Memória e Flexibilidade cognitiva.....	30
3.4.1	Teste de memória e teste de evocação.....	31
3.4.2	Aprendizado reverso	32
3.4.3	Parâmetros Avaliados.....	32
3.4.4	Correção Barnes Maze	33
3.5	Teste do campo aberto (Open field)	33
3.5.1	Análise campo aberto	34
		34
3.6	Teste de impressão de patas (FootPrint).....	34
3.7	Perfusão e Imunohistoquímica	35
3.7.1	Perfusão.....	36
3.7.2	Quantificação de Tirosina Hidroxilase.....	36
4	Resultados	38
4.1	Teste de impressão de patas (footprint test)	38
4.2	Teste do Campo Aberto.....	38
4.3	Barnes Maze	42
4.3.2	Teste de evocação.....	45
4.3.3	Aprendizado Reverso	46

5.0 Discussão.....	49
5.1 Sintomas motores com a injeção de 6-OHDA no estriado dorsolateral	49
5.2 Sintoma ansioso e Doença de Parkinson	50
5.3 Memória e aprendizado na Doença de Parkinson	52
5.4 Flexibilidade cognitiva na Doença de Parkinson	55
6.0 Conclusão	57
7.0 Próximos passos	57
8.0 Limitações	58
9.0 Referência Bibliográfica.....	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum atualmente, atrás apenas da doença de Alzheimer. A DP afeta cerca de 1% da população acima dos 60 anos. A patologia é diagnosticada clinicamente pelos sintomas motores como tremor em repouso, rigidez postural, dificuldade de iniciar e realizar movimentos entre outros (DEXTER; JENNER, 2013). Esses sintomas motores são causados pela degeneração dos neurônios dopaminérgicos na substância negra (SN). A SN tem papel importante na modulação do estriado (STR), sendo uma das áreas primeiramente afetadas pela doença. Com o déficit dopaminérgico na SN ocorre uma facilitação na via motora indireta e uma redução na via direta (**Figura 1**). Na via motora direta o estriado diminui sua inibição sobre o globo pálido interno (GPi) e SN reticular o que aumenta a inibição dessa área sobre o tálamo e diminui aferentes excitatórios e diminuição na atividade do córtex. Já na via indireta há um aumento na inibição do Globo Pálido externo (GPe) e diminuição da inibição sobre os núcleos subtalâmicos (STN) e aumento da atividade excitatória no GPi e SNR. A redução no output dos gânglios da base pelo GPi e SNR parecem ser os principais responsáveis pela acinesia na DP (OBESO et al., 2008; REDGRAVE et al., 2010).

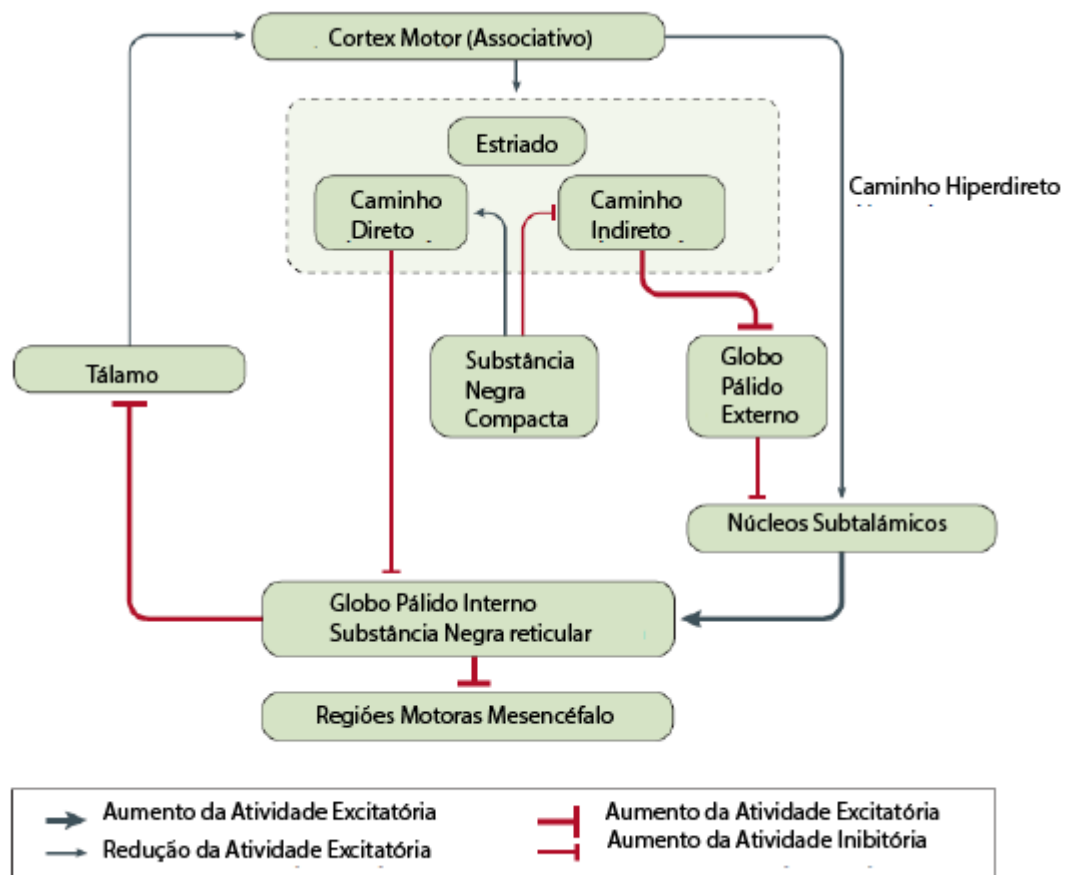


Figura 1. Traduzido do artigo Power, Werner et al 2017. Modelos da via indireta e direta do sistema motor. Substância negra com diminuição de dopamina D2 diminui o *output* gabaérgico para GPe e depois para STN o que aumenta *output* excitatório para GPI e SNr aumentando a inibição gabaérgica e há pouco retorno para o estriado. Já na via direta há diminuição da dopamina D1 aumenta a inibição gabaérgica e há pouco retorno para o estriado.

O acúmulo de alfa sinucleína é a causa mais conhecida para a morte neuronal, devido ao estresse oxidativo, disfunções mitocondriais entre outros fatores, há disfunção na agregação de proteínas, disfunção nos canais de cálcio e alteração no ferro na região que causam a neurodegeneração. A fonte inicial desse estresse oxidativo e da morte neuronal ainda permanece desconhecida (AARSLAND et al., 2021).

Muitos autores trabalham na tentativa de segmentar a doença de Parkinson por subtipos a depender dos sintomas não motores apresentados em paralelo com as regiões afetadas. A rota de desenvolvimento da doença é levada em consideração nessa forma de classificação. Sendo as rotas olfatória/límbica, tronco cerebral e cognitiva seus principais subtipos (MARRAS; CHAUDHURI, 2016; SCHRAG; SAUERBIER; CHAUDHURI, 2015). Já quanto aos subtipos motores, nós temos o tremor dominante, não tremor dominante, início precoce e rápida progressão sem demência (SELIKHOVA et al., 2009).

1.2 SINTOMAS NÃO MOTORES E EVOLUÇÃO DA DOENÇA DE PARKINSON

Apesar dos sintomas motores serem consequência da morte neuronal na SN, a DP é multissistêmica e não inicia nessa área. Já é consenso na literatura o acúmulo de alfa sinucleína em outras áreas como bulbo olfatório e no tronco cerebral antes da morte dos neurônios dopaminérgicos na SN (HAWKES; DEL TREDICI; BRAAK, 2010).

A **Figura 2**, adaptada do artigo Hawkes et al., 2010, mostra os estágios da DP e a influência da alfa sinucleína nos sintomas apresentados. Podemos notar que a fase prodrômica, fase antecedente aos sintomas motores e ao diagnóstico, pode chegar há 20 anos antes do diagnóstico com os sintomas motores. Segundo a classificação de Braak, o acúmulo de alfa sinucleína inicia no bulbo olfatório e no cólon dos pacientes. Os sintomas da primeira fase envolvem alteração olfatória e gastrointestinal. Já na segunda fase da doença, a alfa sinucleína se espalha para o locus coeruleus, porção magnocelular a formação reticular e núcleo da rafe posterior. Entre os sintomas encontrados nessa fase estão controle de ingestão de alimentos, ciclo sono-vigília alterados e resposta comportamental ao estímulo sensorial. Na terceira fase, o dano chega à substância negra, núcleo pedúnculo pontino e amígdala. O nível de perda na substância negra atinge cerca de 50% quando os sintomas motores começam a surgir. Esse dano causa perda dopaminérgica no estriado com hiperreatividade na via indireta. Com o núcleo pedúnculo pontino afetado há dificuldade em iniciar movimentos e realizar outros movimentos estereotipados. Os sintomas motores que surgem nessa fase da doença são causados devido a disfunção na via motora indireta. Com a depleção dopaminérgica na SN, os *inputs* glutamatérgicos dessa região não são inibidos como anteriormente o que causa principalmente o tremor basal, que se inicia de maneira unilateral e com o curso da doença afeta bilateralmente o paciente ((HAWKES; DEL TREDICI; BRAAK, 2010).

No estágio quatro o dano causado pela evolução da patologia já está espalhado em diversas áreas. Nessa fase, o paciente já está em tratamento com medicação dopaminérgica o que pode piorar ou acrescentar alguns sintomas. Os estágios 5 e 6 são os finais já que o dano já alcança regiões responsáveis por batimentos cardíacos, pressão sanguínea, respiração e motilidade intestinal (HAWKES; DEL TREDICI; BRAAK, 2010).

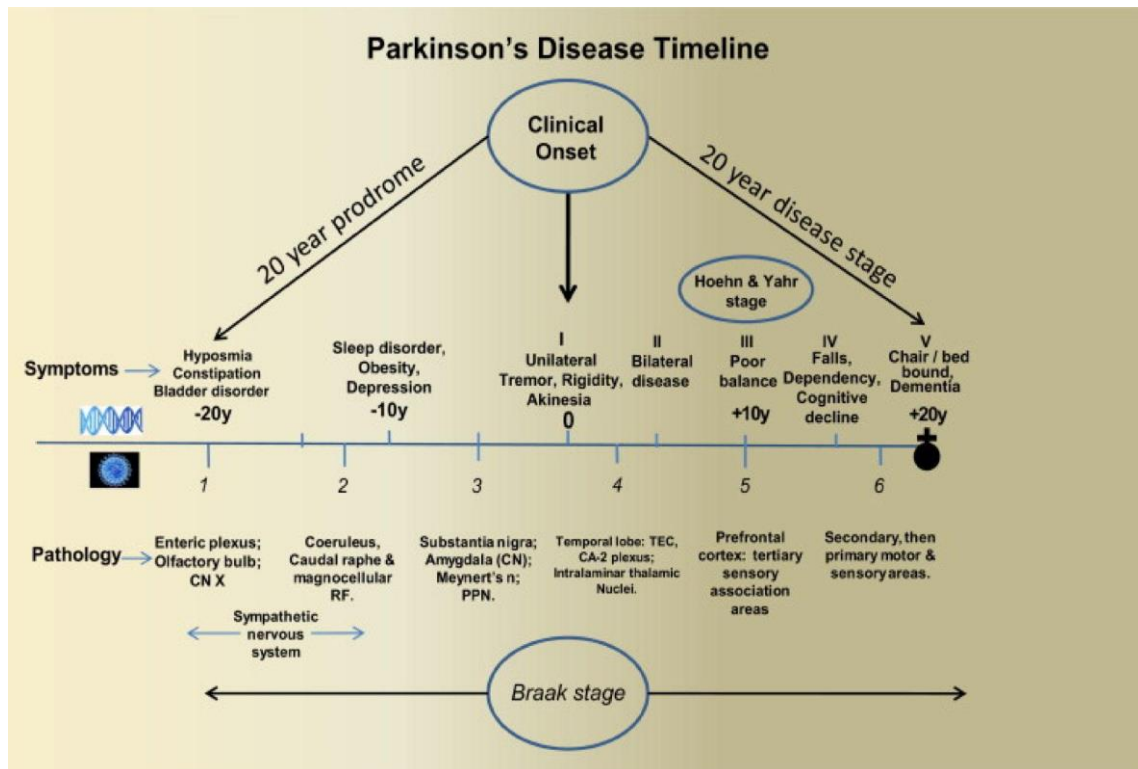


Figura 2. Imagem adaptada do artigo Hawkes, Del Tredici e Braak, 2010. Estágios da doença de Parkinson e a influência da alfa sinucleína nos sintomas apresentados. Hiposmia, constipação e sintomas autônomos costumam surgir como primeiros sintomas não motores na fase prodrômica, cerca de 20 anos antes do diagnóstico pelos sintomas motores. Desordem no sono, obesidade e depressão surgem também nessa fase. O diagnóstico ocorre com os primeiros sintomas motores, geralmente unilateral e desenvolvendo-se bilateralmente. Após o diagnóstico os sintomas motores e não motores tendem a piorar e sintomas cognitivos surgem. A apresentação da alfa sinucleína nos pacientes se inicia no bulbo olfatório e no cólon dispersando para o núcleo da rafe, amígdala, substância negra e chegando no córtex pré frontal nas formas mais graves da doença.

1.3 PERFIL NEUROPSICOLÓGICO DA DOENÇA DE PARKINSON

Entre 15 a 20% dos pacientes em estágios iniciais da DP demonstram algum nível de declínio cognitivo, o que aumenta para 75 a 90% com a progressão da doença (O'CALLAGHAN; BERTOUX; HORNBERGER, 2014). Em pesquisas comparando o resultado do minixame do estado mental, exame breve de estado mental, com a autópsia, verificando a progressão da doença, essa correlação é confirmada (HAWKES; DEL TREDICI; BRAAK, 2010).

Os sintomas cognitivos podem acompanhar ou até preceder o surgimento dos sintomas motores. Importante notar que existem diferenças entre demência da doença de Parkinson e declínio cognitivo. O declínio cognitivo é o déficit de alguma função cognitiva, porém, não o bastante para que exista o impacto na atividade de vida diária. Essas perdas cognitivas não são o bastante para afetar a atividade de vida diária desses pacientes, porém dificuldades visuo

espaciais, por exemplo, podem facilitar quedas desses pacientes. O quadro pode ou não evoluir para a demência, porém apresenta um risco aumentado em relação aos pacientes que não apresentam esse declínio inicial. Já a demência é uma queda global de funções cognitivas como atenção, memória, funções executivas, habilidade visual espacial entre outros. A presença de disfunção visual espacial é um grande preditor de desenvolvimento da demência (O'CALLAGHAN; BERTOUX; HORNBERGER, 2014).

A forma como a doença se desenvolve é preditivo para os sintomas não motores que podem surgir. A **Figura 3** resume os três fenótipos principais que se correlacionam com o prognóstico clínico (MARRAS; CHAUDHURI, 2016; SCHRAG; SAUERBIER; CHAUDHURI, 2015). Sintomas autonômicos e distúrbios no sono são causados com maior dano no tronco encefálico. Já sintomas como ansiedade, depressão, dor central e perda de peso ocorre com a degeneração que inicia no bulbo olfatório para o sistema límbico. E o subtipo cognitivo ocorre com a degeneração maior no córtex e é acompanhada de ansiedade, apatia e perda cognitiva. O último é mais presente no início tardio da DP. A ocorrência de mais de um subtipo é possível. O perfil de sintomas motores também são correlacionados com o surgimento dos sintomas cognitivos. Segundo SELIKHOVA et al., (2009), pacientes com perfil de não tremor dominante apresentam maior chance de desenvolverem demência com maior presença de corpos de Lewy, acúmulo anormal de sínucleínas, em áreas corticais. Como demonstrado por MARRAS; CHAUDHURI (2016) os sintomas não motores da DP podem ocorrer em perfis diferentes a depender da região com maior degeneração.

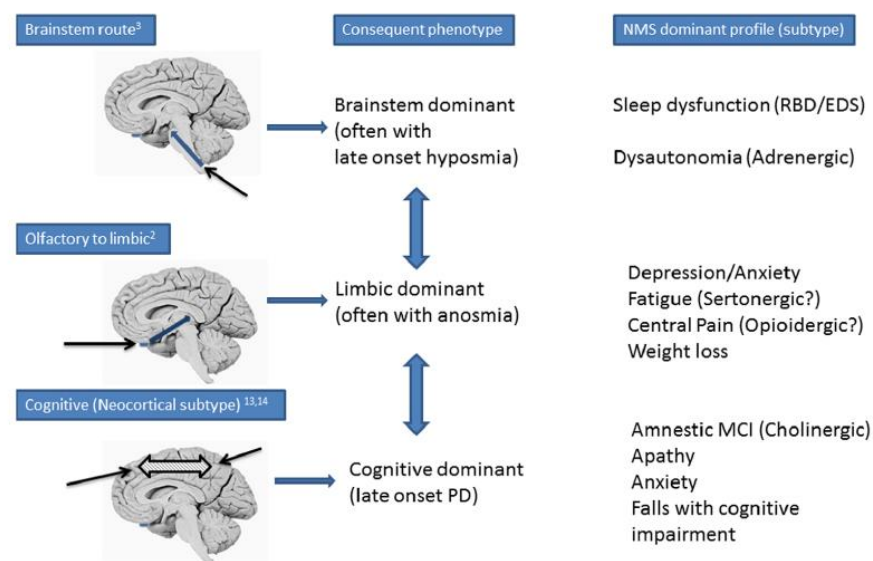


Figura 3. Imagem adaptada do artigo Marras e Chaudhuri, 2016. Três subtipos da doença de Parkinson de acordo com a rota de lesão e de corpos de Lewy e os sintomas predominantes. Com rotas a partir do tronco encefálico, olfatório e córtex.

1.4 FUNÇÕES EXECUTIVAS

As funções executivas têm papel importante no direcionamento do comportamento a um objetivo. Entre as funções importantes para esse direcionamento está o planejamento, flexibilidade cognitiva, regulação do comportamento baseado em regras, inibição de comportamento inadequado, entre outros (LEH; PETRIDES; STRAFELLA, 2010).

Há diferenças funcionais no córtex pré-frontal (CPF) importantes correlacionadas com essas funções específicas: o CPF dorsolateral processa aspectos importantes relacionados à motivação, resolução de problemas e perseverança, alterações no funcionamento do CPF medial/cingulado estão subjacentes à apatia, desmotivação consistente, mutismo (ausência de fala), incontinência urinária e fraqueza nas pernas. Já o córtex orbito frontal está envolvido principalmente na inibição de comportamento, estabilidade emocional, impulsividade, mudança de personalidade, tato social e discriminações de odor (BOGOUSSLAVSKY, BOLLER e IWATA, 2019).

Em humanos, as funções executivas são avaliadas muitas vezes por meio de testes neuropsicológicos como torre de Londres, cartas de Wisconsin, teste go/no go (LEH; PETRIDES; STRAFELLA, 2010). Em animais, há tarefas específicas para aprendizado reverso, atenção, memória de trabalho como a tarefa de tempo de reação em cinco escolhas (ASINOF; PAINE, 2014). O aprendizado de nova regra pode ser avaliado por meio do labirinto de Barnes. Nesse caso, o protocolo envolve a alteração do local de escape depois do animal ter aprendido a tarefa (BETANCOURT et al., 2017). Apesar de ser importante preditivo para o desenvolvimento de demência na DP, as funções executivas ainda não são um foco para pesquisas básicas em animais (MARSHALL; KING; KORTAGERE, 2019; SUN et al., 2015; ZHUO et al., 2022).

1.4.1 FUNÇÕES EXECUTIVAS NA DOENÇA DE PARKINSON

Entre os sintomas cognitivos presentes no declínio cognitivo da DP estão as alterações de funções executivas. As funções executivas são resultado de um complexo conjunto de funções como: inibição do comportamento, flexibilidade, planejamento, memória de trabalho, autorregulação, automonitoramento e iniciação (LEH; PETRIDES; STRAFELLA, 2010).

A disfunção executiva, conhecida anteriormente como síndrome frontal, causa sintomas graves no dia a dia de pacientes em diversas patologias. Apesar do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade ser muito conhecido por essa disfunção na região e nessas funções a disfunção executiva está afetada em muitas outras patologias incluindo a DP (ROBBINS; COOLS, 2014).

Ainda dentro do contexto das funções executivas, vale ressaltar que o estriado dorsal faz parte de diversas alças (loops) de processamento neural, juntamente como sub-regiões do córtex frontal, tais como córtex pré-frontal dorsolateral, córtex pré-frontal orbito frontal e cíngulo anterior. A região dorsal do estriado, mais afetada pela DP, mantém fortes conexões com a região dorsolateral do córtex pré-frontal (O'CALLAGHAN; BERTOUX; HORNBERGER, 2014; O'CALLAGHAN; LEWIS, 2017; ROBBINS; COOLS, 2014). Em conjunto, estas informações reforçam a ideia de que lesões localizadas na via nigro-estriatal podem resultar em alterações de funções executivas.

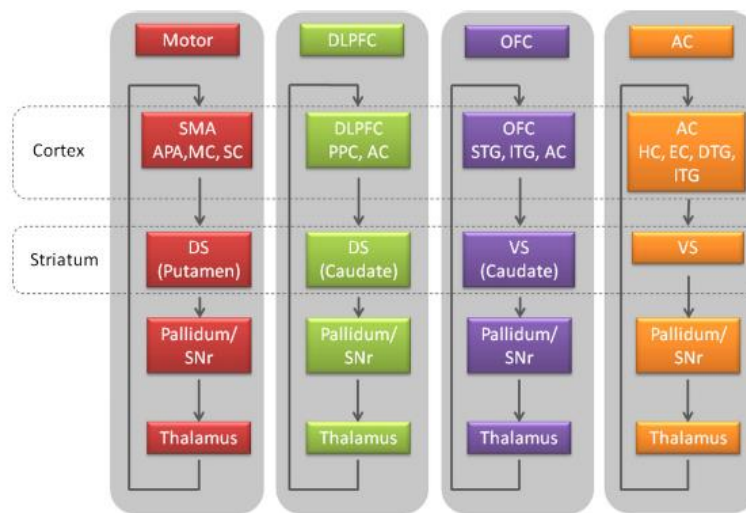


Figura 4. Imagem adaptada do artigo O'Callaghan; Bertoux e Hornberger, 2013 . Demonstrado acima as diferentes participações do estriado (núcleo caudado e putamen) nos loops com o córtex frontal. O loop afetado pela doença de Parkinson inicialmente é relacionado com o dorsolateral córtex pre frontal com a lesão dopaminérgica no estriado dorsal.

1.5 MEMÓRIA

A memória pode ser classificada de acordo com o conteúdo ou a duração. Memórias de curto e longo prazo são relativas ao tempo de armazenamento dessas informações. Elas ocorrem

em processos separados e são independentes. Já as memórias declarativas (ou explícitas), implícitas e de procedimento são classificadas de acordo com o conteúdo e envolvem áreas diferentes para seu armazenamento e manipulação (IZQUIERDO et al., 1999).

Importante diferenciar aqui a memória de curto prazo e a memória de trabalho. A memória de trabalho é reconhecida como uma das funções executivas e as informações se mantêm armazenadas por tempo suficiente para manipulação dessas informações e retorno de resposta. A memória de curto prazo é conhecida pela dependência do hipocampo, mais especificamente da região CA1. A consolidação dessa memória parece envolver alterações de eficácia sinápticas que se assemelham à potenciação de longa duração (PLD). Tais alterações perduram inicialmente de 3 a 6 horas, podendo se estabelecer, em seguida, por dias, meses ou até anos (IZQUIERDO; MEDINA, 1995).

As demências são as causas mais comuns de disfunções na memória. Sendo que o curso da DP pode apresentar o quadro de demência, além da possibilidade de desenvolvimento de quadro da doença de Alzheimer ou demência de corpos de Lewy em comorbidade (HANAGASI; TUFEKCIOGLU; EMRE, 2017).

1.5.1 MEMÓRIA NA DOENÇA DE PARKINSON

A memória é afetada de forma mais consistente na demência da DP. Além do perfil de evolução da doença com os sintomas não motores, os sintomas motores podem predizer e indicar possível demência na evolução da doença.(O'CALLAGHAN; LEWIS, 2017; SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017).

Além da memória, dificuldades visuais espaciais acompanham esse estágio da doença, sendo um forte preditor para seu desenvolvimento. A demência na DP ocorre pela dificuldade de codificação e recuperação da memória, sendo que quando apresentado pistas o paciente tende a se recordar das informações apresentadas anteriormente (O'CALLAGHAN; LEWIS, 2017). Além da lesão dopaminérgica, alterações de outros neurotransmissores parecem ser importantes para esses sintomas. Os níveis de noradrenalina e serotonina apresentam-se diminuídos na DP devido ao acúmulo da alfa-sinucleína no núcleo da rafe e locus coeruleus (HAWKES; DEL TREDICI; BRAAK, 2010; O'CALLAGHAN; LEWIS, 2017).

A alteração de memória na DP é um dos sintomas não motores mais pesquisados nos modelos animais. Além do comportamento, diversos estudos também realizam análises bioquímicas nas áreas relacionadas ao processamento de memória, tais como hipocampo e

córtex pré-frontal (BONITO-OLIVA; MASINI; FISONE, 2014; MARSHALL; KING; KORTAGERE, 2019; SUN et al., 2015; ZHUO et al., 2022). Existem diferentes estratégias experimentais para avaliação de processos relacionados à formação de memórias explícitas/declarativas em roedores. Especificamente, na literatura envolvendo modelos animais de DP podemos encontrar, por exemplo, testes comportamentais que demandam o reconhecimento de um novo objeto (BONITO-OLIVA; MASINI; FISONE, 2014) ou do local de um objeto (MARSHALL; KING; KORTAGERE, 2019). Também existem tarefas que avaliam se o animal é capaz de se recordar de uma regra específica (WANG et al., 2020) ou, ainda, se o sujeito experimental consegue se localizar no espaço para encontrar o local de escape, como é o caso do labirinto de Barnes (DEL FABBRO et al., 2019).

A demência na DP é causada pelo acúmulo de corpos de Lewy, porém há algumas diferenças entre DP e demência de corpos de Lewy. Na demência de corpos de Lewy há neurodegeneração em regiões mais caudais inicialmente, enquanto na demência da DP o acúmulo parece iniciar na região frontal. Além da região, há o tempo para diagnóstico utilizando a regra de “um ano” em que se o paciente desenvolve demência em menos de um ano do diagnóstico da DP o diagnóstico é de demência de corpos de Lewy concomitante com DP. Caso a demência ocorra após um ano do diagnóstico da DP é considerado demência decorrente do primeiro diagnóstico (HANAGASI; TUFEKCIOGLU; EMRE, 2017).

1.6 MODELO ANIMAL DE SINTOMAS NÃO MOTORES

O modelo da DP utilizando 6-OHDA é clássico e foi iniciado por Ungerstedt em 1968. A substância apresenta estrutura análoga a dopamina e noradrenalina sendo tóxica para o sistema nervoso central e periférico. Porém ela não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica havendo a necessidade de injeção no local que se busca a lesão. Após a recaptação pelos transportadores de dopamina e noradrenalina ocorre lesão neuronal devido a alteração da homeostase celular (SIMOLA; MORELLI; CARTA, 2007). Os modelos mais clássicos utilizam de protetores noradrenérgicos para proteger esses neurônios, mas recentemente estudos sem a utilização desse protetor têm sido realizado (SIMOLA; MORELLI; CARTA, 2007). Sendo a DP uma patologia multissistêmica não afetando apenas o sistema dopaminérgico podemos pensar na suspensão do protetor noradrenérgico como uma mimetização mais fiel ao que ocorre no desenvolvimento da doença.

Os modelos utilizados para estudo podem apresentar variações quanto ao local de infusão e pela dose utilizada. As três regiões mais clássicas para o estudo da DP são: substância negra (LIU et al., 2019), estriado (DEL FABBRO et al., 2019; ZHUO et al., 2022) e no feixe prosencefálico medial (MARSHALL; KING; KORTAGERE, 2019; SUN et al., 2015).

Sintomas afetivos como comportamento do tipo ansioso, apatia e anedonia já foram investigados pelo uso da 6-OHDA (LIU et al., 2019; MATHEUS et al., 2016; SUN et al., 2015, 2018). Sintomas cognitivos como perda da memória espacial, memória tipo declarativa, funções executivas como atenção, memória de trabalho, flexibilidade cognitiva, também foram avaliados (BONITO-OLIVA; MASINI; FISONE, 2014; HERRERA et al., 2020; WANG et al., 2020). Sintomas autonômicos como gastrointestinais, olfatórios, hipersensibilidade a dor, cardíacos também são pesquisados utilizando a infusão de 6-OHDA (ARIZA et al., 2015; BONITO-OLIVA; MASINI; FISONE, 2014; SUN et al., 2015; ZHENG et al., 2014). Além das funções executivas outros comportamentos tipicamente frontais como interação social também são pesquisados (MATHEUS et al., 2016).

Apesar do modelo já ser utilizado para essa investigação os resultados para infusão bilateral no estriado ainda se mostram divergentes. com estudos que encontram comportamento do tipo ansioso (XIE; PRASAD, 2020) e estudos que não encontram esse resultado (MATHEUS et al., 2016). A função executiva também se mostra divergente com resultados positivos (GROSPE; BAKER; RAGOZZINO, 2018; WANG et al., 2020) e negativos (BETANCOURT et al., 2017). Na investigação da memória podemos observar maior quantidade de estudos relatando o sintoma (BONITO-OLIVA; MASINI; FISONE, 2014; HERRERA et al., 2020; ZHUO et al., 2022).

Com o presente estudo buscamos a replicação do modelo de infusão bilateral de 6-OHDA com a análise de ansiedade, memória e aprendizado reverso (flexibilidade cognitiva). Os dados quanto a esses sintomas permanecem sem consenso na literatura com variação de dose e dos testes utilizados para acessar esses comportamentos. A replicação do modelo é importante para iniciar outros protocolos experimentais a partir de um modelo já existente, o que facilita a comparação de dados e o prosseguimento das pesquisas.

2. OBJETIVO GERAL

Testar se a lesão parcial da via nigro-estriatal induzida pela neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em ratos seria suficiente para produzir sintomas não motores observados na Doença de Parkinson.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar, com base em revisão da literatura, um modelo animal de sintomas não motores de doença de Parkinson utilizando 6-OHDA;
- Confirmar a ausência de sintomas motores no modelo por meio do teste de impressão das patas e campo aberto;
- Avaliar se o modelo em questão seria capaz de reproduzir o aumento de ansiedade pelo teste do campo aberto;
- Avaliar possíveis prejuízos no aprendizado, memória e flexibilidade cognitiva utilizando protocolos específicos no Labirinto de Barnes.

3 METODOLOGIA

3.1 ESCOLHA DO MODELO EXPERIMENTAL

Para a escolha do modelo experimental a ser reproduzido foi realizada uma revisão de literatura sistemática com as palavras chaves “*Parkinson ou PD, non motor symptoms ou non-motor symptoms, rodents ou rat or mouse, 6 OHDA ou 6-OHDA ou 6-hydroxydopamine*” nas bases de dados Scopus, Medline e Web of Science.

Os artigos foram filtrados pelos resumos por dois avaliadores duplo cego. Os trabalhos que cumpriam os pré-requisitos de trabalhar com modelo de roedor, com sintomas não motores da doença de Parkinson e utilizando 6-OHDA foram analisados minuciosamente. Após esse levantamento foi escolhido o modelo com infusão estriatal bilateral de 6-OHDA utilizado por (MATHEUS et al., 2016). Os dados levantados pela revisão estão sendo analisados para posterior publicação.

3.2 SUJEITOS EXPERIMENTAIS

Para realização da pesquisa foram utilizados 46 ratos machos Wistar adultos entre 250-330g e aproximadamente 8 semanas do centro de biotério do ICB-UFMG (CEBIO). Os testes foram realizados em duas coortes de animais como demonstrado na **Fig.5**, sendo o teste de impressão de patas e o teste do campo aberto na terceira semana sendo realizado em ambos. Já o labirinto de Barnes e o teste do campo aberto na quarta semana apenas na segunda coorte. Essa separação de coorte foi realizada para reprodução do modelo antes de iniciar novos testes. A primeira coorte ocorreu com 8 animais controle e 8 6-OHDA, já na segunda com 6 controles e 10 6-OHDA. Houve a perda de um animal entre o campo aberto da 3 semana e da 4 semana na segunda coorte. Finalizando com 18 animais 6-OHDA e 14 controles no total.

Os animais foram mantidos em caixa de polipropileno (41x34x18 cm; 2 animais por caixa) no biotério de experimentação do laboratório de neurociência e comportamento

(LANEC) na faculdade de Filosofia e Ciências Humanas (FAFICH). As caixas continham maravalha e tubo PVC para esconderijo, com acesso a água e ração *ad libitum*. A temperatura do local foi mantida a 22°C e o ciclo claro/escuro de 12h (7h e 17h). O protocolo 154/2022 foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais.

Durante a cirurgia e no período pós cirúrgico foram perdidos um total de 11 animais. Quatro animais foram retirados durante a análise de dados: 1 devido ao não aprendizado da tarefa (Labirinto de Barnes), apesar de encontrar o buraco não adentrar para finalizar o teste e 3 por doses de cetamina excedente após o período cirúrgico para reparação da sutura durante o período pós-operatório. O uso de cetamina afeta o comportamento do tipo ansioso nesses animais, dessa forma não houve a participação destes nas análises do teste do campo aberto (PITSIKAS et al., 2019).

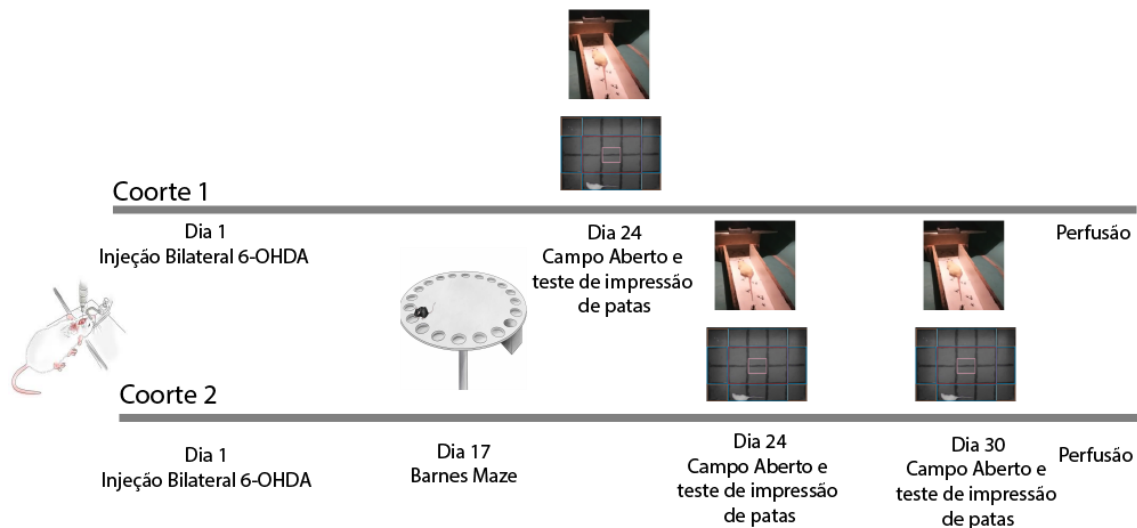


Figura 5. Cronograma da realização dos testes após a cirurgia de infusão considerada dia 1. Realizadas em duas coortes com a primeira coorte apenas o teste do campo aberto e teste da impressão das patas e a segunda repetindo os testes na mesma data pós cirúrgica e além do Barnes Maze e campo aberto e teste de impressão das patas com 30 dias após infusão.

3.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Para a cirurgia estereotáxica os animais foram anestesiados com cetamine hydrochloride (75 mg/Kg em NaCl 0,15 M) e xilazina (10 mg/Kg, i.p. em NaCl 0,15 M) antes de serem colocados no aparato estereotáxico para ratos. O nível de anestesia foi checado durante todo o procedimento cirúrgico pela frequência respiratória, reflexo de pinça nas patas e ausência de

reflexos pupilares. A temperatura corporal também foi acompanhada por meio de termômetro e mantida entre 37-38°C por meio de uma manta térmica.

Após o rato estar devidamente anestesiado no estereotáxico e com a temperatura dentro do esperado, lidocaína sem vasoconstritor foi aplicada no escalpo e uma incisão de, em média, 1,5 cm foi realizada para a exposição do crânio. A solução de salina estéril foi aplicada nos olhos sempre que necessário para evitar desidratação nas córneas. A limpeza do crânio foi realizada com peróxido de hidrogênio.

Após o crânio estar exposto e limpo foram demarcadas as regiões de aplicação da 6-OHDA no estriado dorsolateral descrita anteriormente (Matheus et. al., 2016). Com uma broca (1mm de diâmetro) o crânio é perfurado e foi injetado 3µL de 6-OHDA (10µg / 3µL dissolvido em salina com 0,1% de ácido ascórbico). A infusão é realizada por meio de capilares de vidro (4µL) acoplada em uma bomba de infusão (WPI nanoliter 2020 system injector) nas coordenadas: AP +0.2 mm ; ML $\pm$ 3.5 mm; DV -4.8 mm do bregma e dura. Nos animais controles apenas solução salina com ácido ascórbico em mesmo volume dos animais experimentais foi infundida nas mesmas coordenadas.

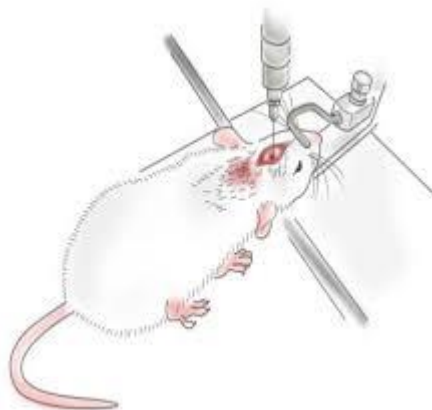


Figura 6. Imagem ilustrativa da cirurgia de infusão 6-OHDA para geração de modelo da doença de Parkinson. A infusão de 3µL de 6-OHDA (10µg / 3µL) foi realizada no estriado dorsolateral nas coordenadas AP +0.2 mm ; ML $\pm$ 3.5 mm; DV -4.8 mm do bregma e dura (adaptada de Prezzi. 2016).

Logo após a cirurgia a temperatura foi acompanhada até a recuperação da consciência e plena recuperação. O acompanhamento diário pós cirúrgicos foi por meio de aplicação de Banamine (0.5ml/Kg i.p. in 0.15 M NaCl) e Pentabiótico (1 ml/Kg i.m.) por três dias e verificação do peso e sinais de dor. Perdas maiores de 50g por dia foram interpretadas como sinal de dor e usado como critério para eutanásia. O tempo de recuperação foi de 7 dias com testes realizados após esse período.

3.4 BARNES MAZE: MEMÓRIA E FLEXIBILIDADE COGNITIVA

Labirinto de Barnes foi utilizado para avaliar a memória (REGO., 2014) e flexibilidade cognitiva (BETANCOURT et al., 2017). Em um aparelho com 105 cm de diâmetro com piso de borracha removível com 12 orifícios de 10cm cada um, sendo apenas um deles apresentando a caixa de escape e os demais com placa de MDF como cobertura. A caixa de escape contém 17 x 23 x 11 cm de madeira. A plataforma se encontra a 132 cm do chão com iluminação de 4 lâmpadas de 45W. No ambiente de experimentação houve quatro pistas visuais espalhadas pelo ambiente (Norte, sul, leste e oeste) que se mantiveram durante toda a experimentação. Entre uma tentativa e outra, o aparelho foi limpo minuciosamente com álcool 20% e o tapete emborrachado trocado para evitar a localização do escape por pista olfatória. Entre um animal e outro todo o aparato foi limpo minuciosamente com álcool 70% para melhor higienização. Todos os testes foram gravados por uma câmera suspensa por cima do aparelho conectado ao computador externo à sala do laboratório utilizando o software OBS Studio. Para análise o aparato foi dividido em quatro quadrantes sendo o quadrante alvo onde se encontrava o buraco do escape (**Fig. 7 A e B**).

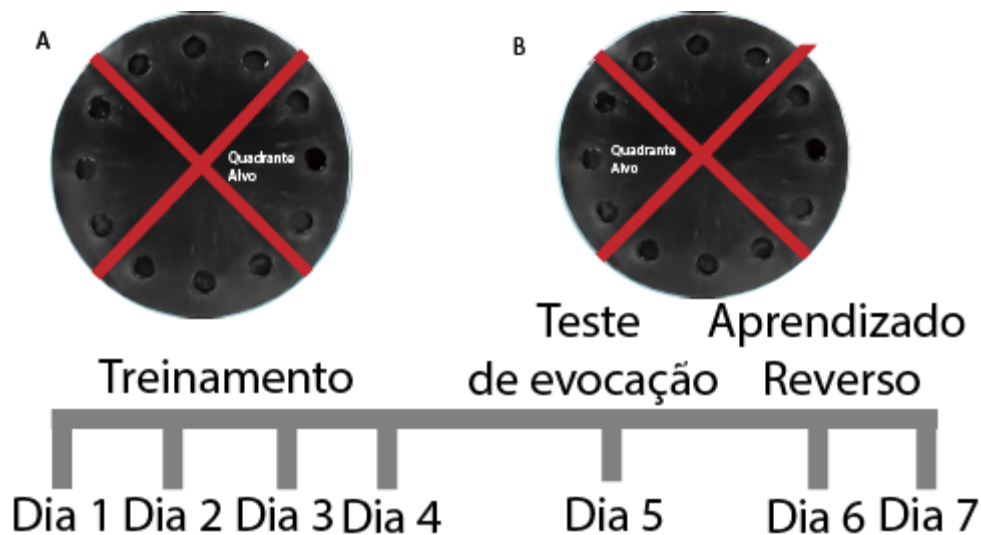


Figura 7. Cronograma de realização do labirinto de Barnes com quatro dias de treinamento, um dia de teste de evocação e dois dias de aprendizado reverso. (A) Divisão dos quatro quadrantes com a marcação do quadrante alvo onde se localiza o buraco de escape no treinamento. (B) Quadrante alvo a 180° do original para o aprendizado reverso.

3.4.1 TESTE DE MEMÓRIA E TESTE DE EVOCÇÃO

Os animais passaram por quatro dias em treinamento sendo cada dia com quatro tentativas de 3 minutos para encontrar o buraco de escape. Para isso, eles foram colocados na sala durante cinco minutos antes do início do teste para habituação. Após esse período, com o auxílio de uma caixa foram colocados no centro do aparelho com o focinho direcionados aleatoriamente entre os quatro quadrantes e permaneceram ali por mais 20s. Após a retirada da caixa eles tinham 180 segundos para encontrar o buraco de escape, caso não ocorresse foram direcionados gentilmente até lá e deixados um minuto lá dentro para habituação. Entre uma tentativa e outra, os animais eram realocados novamente em suas caixas durante 5 minutos para a limpeza do aparato e do tapete emborrachado. O experimentador permaneceu na sala durante todo o teste, sendo também uma pista visual.

Após os quatro dias de treinamento o buraco do escape foi retirado e adicionado uma placa de MDF assim como os demais buracos. O teste de evocção ocorreu no quinto dia em apenas uma tentativa com a duração de 2 minutos, sendo o animal retirado do local após o término do tempo.

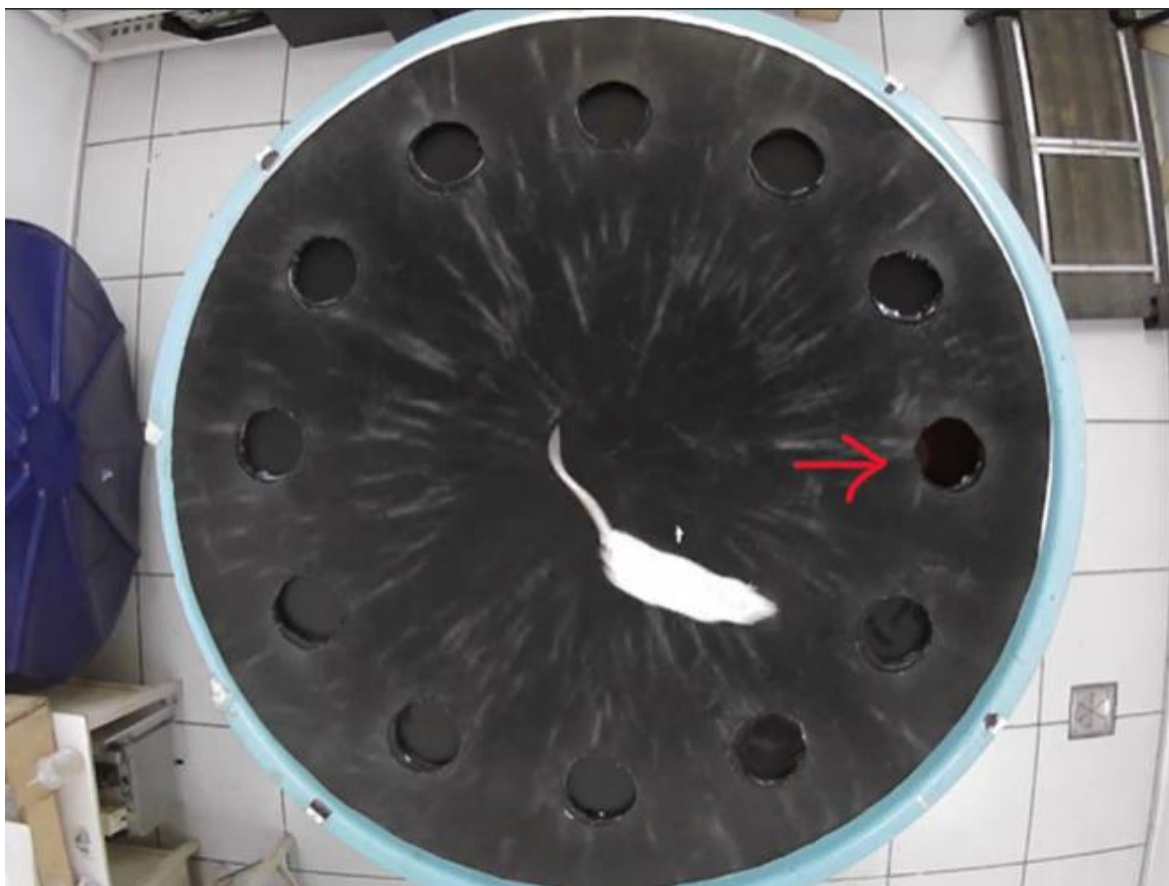


Figura 8. Realização de sessão de treinamento no Labirinto de Barnes após a retirada da caixa com localização da câmera acima do aparato. Buraco do escape à direita.

3.4.2 APRENDIZADO REVERSO

Após 24h do teste de evocação foram realizados dois dias de aprendizado reverso. Nessa etapa do teste o buraco do escape foi deslocado 180° no aparato a fim de avaliar a capacidade dos animais de encontrar o novo local. As tentativas do aprendizado reverso foram realizadas durante dois dias com quatro tentativas por dia. O procedimento entre cada tentativa foi realizado da mesma forma descrita acima na etapa da memória.



Figura 9. Realização de sessão de treinamento no Labirinto de Barnes após a retirada da caixa com localização da câmera acima do aparato. Buraco do escape à esquerda.

3.4.3 PARÂMETROS AVALIADOS

Nos vídeos das sessões de treinamento foram avaliados a latência (S), o tempo que o animal demora para entrar no escape. Distância percorrida para encontrar o escape e velocidade média. A latência e a distância percorrida até encontrar o escape foram consideradas medidas de aquisição. No teste de evocação foi analisado o tempo em segundos de permanência do animal no quadrante-alvo, em que o escape estaria localizado anteriormente, separando o primeiro e durante o segundo minutos.

As estratégias para encontrar e acessar o buraco de escape também foram analisadas. A estratégia espacial era considerada quando o animal comete menos de 3 erros e os buracos estavam a dois buracos do escape ou um único erro cometido seguindo de mudança de direção para o buraco de escape. Estratégia sequencial se houve pelo menos 3 erros cometidos e os buracos eram 75% sequencial ou semi-sequencial. E estratégia randômica quando houvesse pelo menos 3 erros e 50% dos buracos estava, em diferentes quadrantes ou mais de 2 mudanças de direções na busca.

As análises do aprendizado reverso foram realizadas da mesma forma que o período da aquisição no teste de memória. Além desses testes foram avaliado o tempo gasto em segundos no quadrante onde estava o escape nas sessões de aquisição.

3.4.4 CORREÇÃO BARNES MAZE

Os vídeos de cada dia do teste foram exportados no formato MKV pelo software OBS Studio e convertidos para o formato MP4. Para análise automatizada da tarefa empregamos o software de código aberto DeepLabCut v2.3.5 (Mathis et al., 2018), que utiliza redes neurais profundas para estimar a pose de animais a partir de registros de vídeo. Inicialmente, uma rede neural foi treinada a partir de 300 frames extraídos de 40 vídeos diferentes. Um total de 8 regiões do corpo dos animais foram rotuladas em cada um dos frames: base do rabo, orelha direita, orelha esquerda, centro da cabeça, focinho, centro do corpo, lateral direita e lateral esquerda do corpo. Além disso, cada um dos 12 buracos do Labirinto de Barnes foi rotulado. A rede neural foi treinada com um total de 1200000 iterações. Posteriormente, cada um das tentativas foi analisadas utilizando a rede neural treinada e a posição de cada região do animal foi rastreada frame-a-frame. Cerca de 400 vídeos foram analisados utilizando a rede neural e os resultados foram exportados em arquivos HDF5.

Com a localização de cada região do animal rotulada frame-a-frame, os arquivos foram analisados através de rotinas desenvolvidas em Python (<https://github.com/ikaro-beraldo>). A latência de escape, velocidade média, distância percorrida, erro primário e secundário, estratégia utilizada e tempo em cada quadrante foram extraídos.

3.5 TESTE DO CAMPO ABERTO (OPEN FIELD)

O teste de campo aberto foi realizado com o animal sendo colocado em uma arena de madeira (100 x 80cm) com baixa iluminação. O animal foi deixado livre para explorar o ambiente durante os 15 minutos do teste. Para análise do comportamento do tipo ansioso foram

avaliados o tempo gasto no centro e quantidade de entradas na área central foram calculadas. Para análise motora foram avaliados tempo em movimento, velocidade média, tempo em repouso e distância percorrida (MATHEUS et al., 2016). Além disso, foi realizada a análise de tempo gasto em cada região da arena separadas entre: centro periferia, bordas e cantos.

3.5.1 ANÁLISE CAMPO ABERTO

Para análise do teste do campo aberto primeiro os vídeos foram tratados pelo software Bonsai para rastrear os movimentos dos animais. Após o tratamento pelo software as métricas de tempo em movimento, tempo no centro, quantidade de vezes que os animais atravessam o centro e tempo na periferia foram exportados utilizando script no matlab (<https://github.com/fgmourao/>).

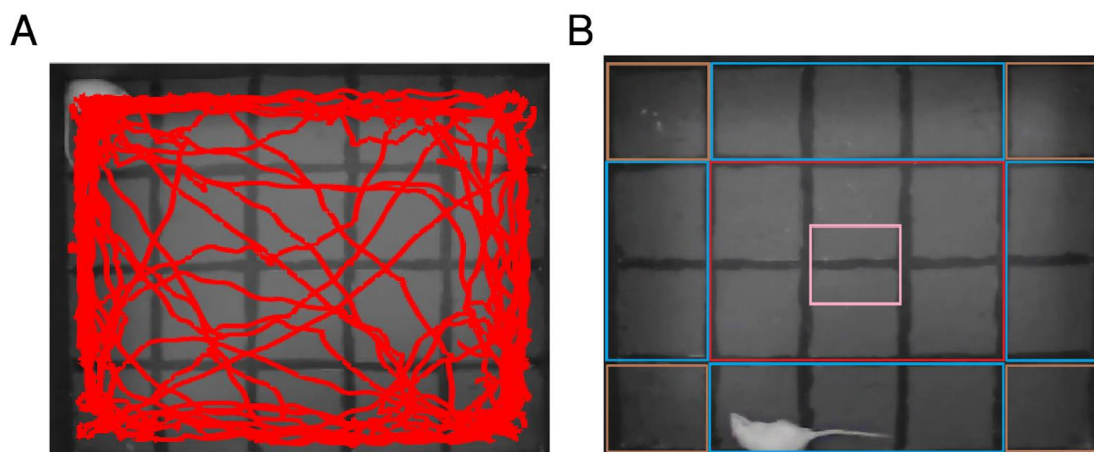


Figura 10. Realização do teste do campo aberto no aparato 100x80cm de madeira com baixa iluminação. (A) Rastreo do movimento dos animais realizado pelo Bonsai. (B) Divisão entre área central e periferia para análise do comportamento.

3.6 TESTE DE IMPRESSÃO DE PATAS (FOOTPRINT)

O teste da passada foi utilizado a fim de avaliar a marcha dos animais e verificar possíveis sintomas motores que poderiam alterar os resultados dos testes. Para isso foi utilizado um aparelho em formato de corredor, com alta iluminação, conectado com uma caixa escura. Foram realizadas sessões de teste com os animais para que eles caminhassem em direção a caixa escura quando colocados no aparato. Para o teste, o papel quadriculado foi colocado no aparato e as patas dos animais foram molhadas com tintas não tóxicas, vermelhas na dianteira e preta nas patas traseiras. Colocado no aparelho com o focinho direcionado para a caixa preta, o animal foi gentilmente direcionado a ir em direção a caixa escura quando não o fazia. O

processo é repetido de 1 a 3 vezes para a obtenção de 6 passadas completas. Passos com alteração na velocidade não foram incluídos nas análises.

Após a realização do teste o comprimento da passada anterior e posterior foi medida com o auxílio de uma régua. O comprimento da passada é a distância entre duas patas subsequentes, dianteiras ou traseiras. Já a largura foi medida pela distância entre a pata esquerda e direita, traseira ou dianteira, da mesma passada (FERNAGUT et al., 2002).

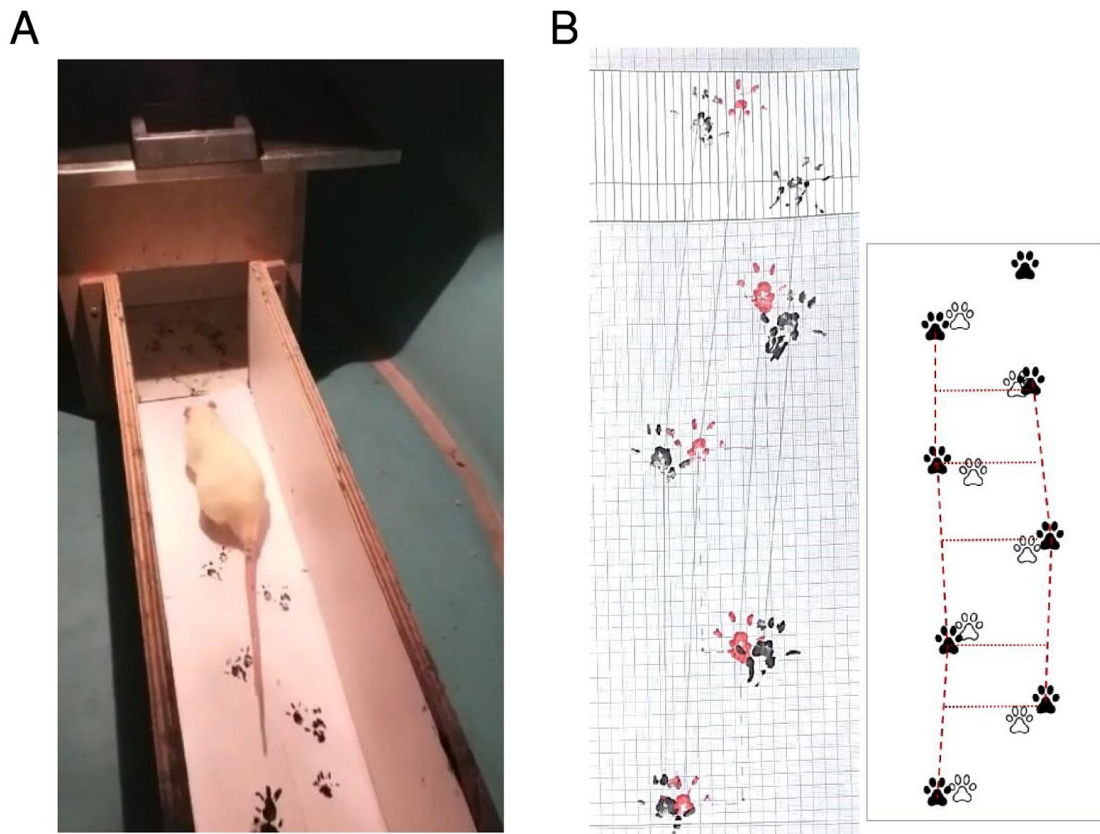


Figura 11. Aparato e medidas para avaliação da largura e comprimento da passada dos animais. Aparato é composto por um corredor com forte iluminação e uma caixa escura no final (imagem ilustrativa da realização da tarefa). Papel quadriculado com a impressão das patas com as marcas vermelhas sendo dianteiras e pretas traseiras. E por último a forma de realização da medida da largura e comprimento da passada.

3.7 PERFUSÃO E IMUNOHISTOQUÍMICA

Após a finalização dos testes, os animais foram eutanasiados e perfundidos. O procedimento foi realizado para coleta dos cérebros e análise de TH (tirosina hidroxilase). Esta etapa está sem realização no momento a fim de confirmar a extensão da lesão causada pela infusão do 6-OHDA no estriado

3.7.1 PERFUSÃO

Para a perfusão os animais foram anestesiados com cetamine hydrochloride (75 mg/Kg em NaCl 0,15 M) e xilazina (10 mg/Kg, i.p. em NaCl 0,15 M). Após o animal ser completamente sedado foi utilizado 3x a dose anestésica para a overdose. Após a parada respiratória (mas não cardíaca) os animais foram imobilizados dentro da capela para então iniciar o procedimento. Foi feito um corte abaixo do esterno e sendo aberto em direção ao peito do animal para exposição completa da região. Com a região do coração já exposta houve a inserção de uma agulha conectada ao suporte com PBS (solução salina com fosfato 0.01 M (250 mL/L) no ápice do coração em direção ao ventrículo esquerdo. Com o corte no átrio direito para liberação do PBS. Após a limpeza do tecido com o PBS iniciou a transfusão de 4% de paraformaldeído (PFA) diluído em PBS. Após a extração do encéfalo foram alocados em PFA 4% e 48h depois em solução de sacarose 10, 20 e 30% (um dia em cada concentração) para só então ser congelados a -80°C submerso em isopentano.

3.7.2 QUANTIFICAÇÃO DE TIROSINA HIDROXILASE

Após o congelamento, os encéfalos foram transportados em CO₂ para a Universidade de São Paulo (USP) em Ribeirão preto. Sob a orientação do professor Dr. Fernando Padovan e equipe utilizamos o criostato (Leica CM1850; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) para o fatiamento a 50 µm nas regiões: córtex, estriado e substância negra. Para identificação da lateralidade foi inserida uma agulha no hemisfério direito. A coleta foi iniciada e direcionada pelas coordenadas a partir do bregma (Paxinos; Watson, 2007). Após coletadas as fatias de cada região foi realizado análise teste para quantificação de tirosina hidroxilase (TH). As fatias foram enviadas novamente para Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) para finalização dos testes.

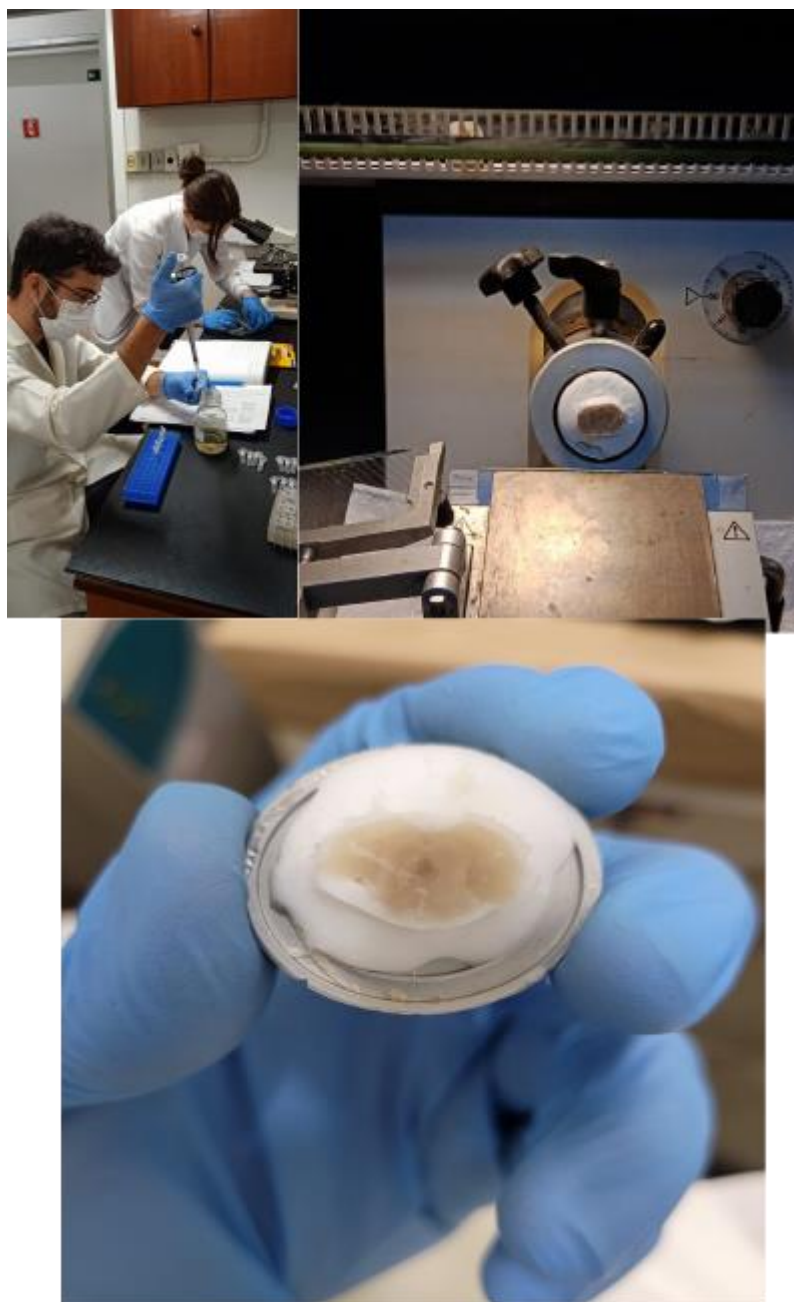


Figura 12. Fotos das atividades realizadas na Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto com sob a orientação do professor Dr. Fernando Padovan em companhia Mateus Prates e Beatriz Schweizer.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análises estatísticas foram realizadas pelo software Graphpad Prism versão 9.00 para Windows. A distribuição da amostra foi analisada por meio dos testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. A análise de variância de duas linhas foi utilizada para avaliar o efeito das variáveis no teste do campo aberto e a memória no labirinto de barnes. Para análise do campo aberto, teste da passada e aprendizado reverso no labirinto de barnes foi realizado teste

T student. O índice de significância aceito foi de ≤ 0.05 e os valores demonstrados são a média $\pm$ erro padrão.

4 RESULTADOS

4.1 TESTE DE IMPRESSÃO DE PATAS (FOOTPRINT TEST)

Inicialmente, investigamos se a lesão parcial bilateral produzida pela 6-OHDA seria suficiente para causar prejuízos motores. Para isso, animais controle e 6-OHDA, 21 e 29 dias após a cirurgia estereotáxica, foram submetidos ao teste de impressão de patas (*footprint test*) realizando a medida do comprimento e das larguras das passadas dianteiras e traseiras e comparando entre os grupos por meio do teste t. A análise estatística foi realizada com os dados de todos os grupos.

Nossos resultados mostram que não existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e 6-OHDA para o comprimento da passada das patas anteriores (t (29) =1.685, p= 0.0514) e posteriores (t (30) =0.007, p= 0.4972) (**fig. 13A e B**). Também não observamos diferenças entre largura entre as passadas das patas anteriores (t (30) =0.2689, p= 0.3949) e posteriores (t (30) =0.02094, p= 0.4917) (**fig. 13C e D**).

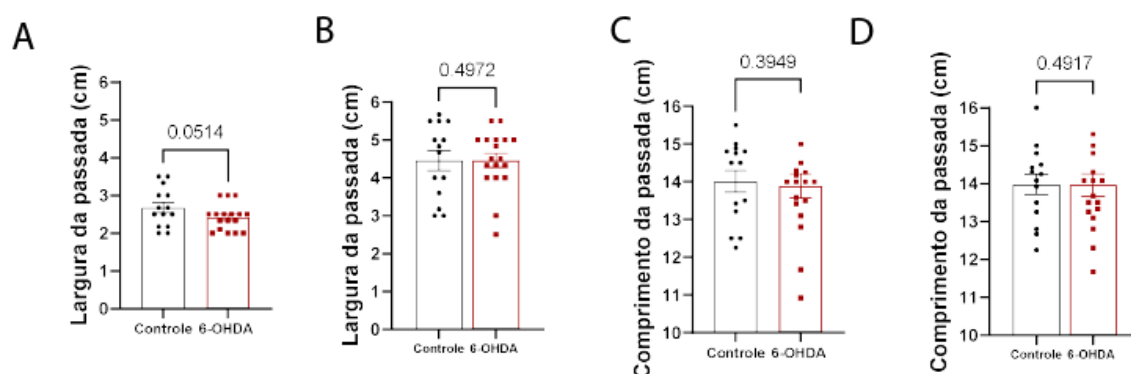


Figura 13. 6-OHDA não produz alterações significativas em nenhum parâmetro avaliado pelo teste da impressão de patas. A figura mostra as comparações das médias entre os grupos controle e 6-OHDA para os seguintes parâmetros: (A) Largura média da passada das patas anteriores. (B) Largura média da passada das patas anteriores. (C) Comprimento da passada das patas posteriores. (D) Comprimento da passada das patas posteriores. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Preto: Grupo controle (N = 14). Vermelho: Grupo 6-OHDA (N = 18). Comparações estatísticas entre os grupos foram realizadas utilizando o Teste t de student.

4.2 TESTE DO CAMPO ABERTO

Complementando o teste da impressão de patas para detecção de possíveis sintomas motores, foi realizado o teste do campo aberto na 3ª e 4ª semana após cirurgia para detecção de possíveis diferenças entre os grupos em relação à velocidade de exploração, distância

percorrida e tempo em movimento. Além dos sintomas motores foi analisado o comportamento do tipo ansioso pela exploração do espaço central do campo aberto.

Os resultados das análises do Teste do Campo aberto, três semanas pós-cirurgia, demonstram que não houve diferenças estatisticamente significativas no desempenho da tarefa entre os grupos controle e 6-OHDA na terceira semana pós lesão quanto à velocidade média ($t(28)=1.750$, $p=0,0911$) (**fig. 14A**), distância total ($t(28)=1.759$, $p=0,0894$) (**fig. 14B**) e tempo em movimento ($t(28)=1.703$, $p=0,0997$) (**fig. 14C**).

A lesão produzida pela 6-OHDA parece não afetar ou potencializar comportamentos do tipo ansioso, avaliados nesse caso pelo número de vezes que o animal atravessou o centro ($t(28)=0.9199$, $p=0.3655$) (**fig. 14D**). Também não observamos diferenças significativas no tempo despendido no centro do campo aberto ($t(28)=1.353$, $p=0,1869$) (**fig. 14E**) ou no tempo despendido na periferia ($t(28)=1.353$, $p=0,28571$) (**fig. 14F**).

Para avaliar se o grupo 6-OHDA apresentava alguma alteração na dinâmica de locomoção na tarefa de campo aberto, avaliamos, a partir do mesmo conjunto de dados descrito anteriormente, a distância percorrida dos animais minuto a minuto e comparamos os grupos utilizando ANOVA de duas vias medidas repetidas. Verificamos que não houve efeito significativo do tratamento ($F(1,30)=1,190$, $p=0,2841$), porém houve diferença do fator tempo ($F(14,420)=2,453$, $P<0,0001$). Ou seja, a locomoção média dos animais diminui ao longo do tempo, independente do grupo avaliado. Também não observamos diferenças significativas para a interação tratamento x tempo ($F(14,420)=1,235$, $p=0,2468$) (**fig. 14G**).

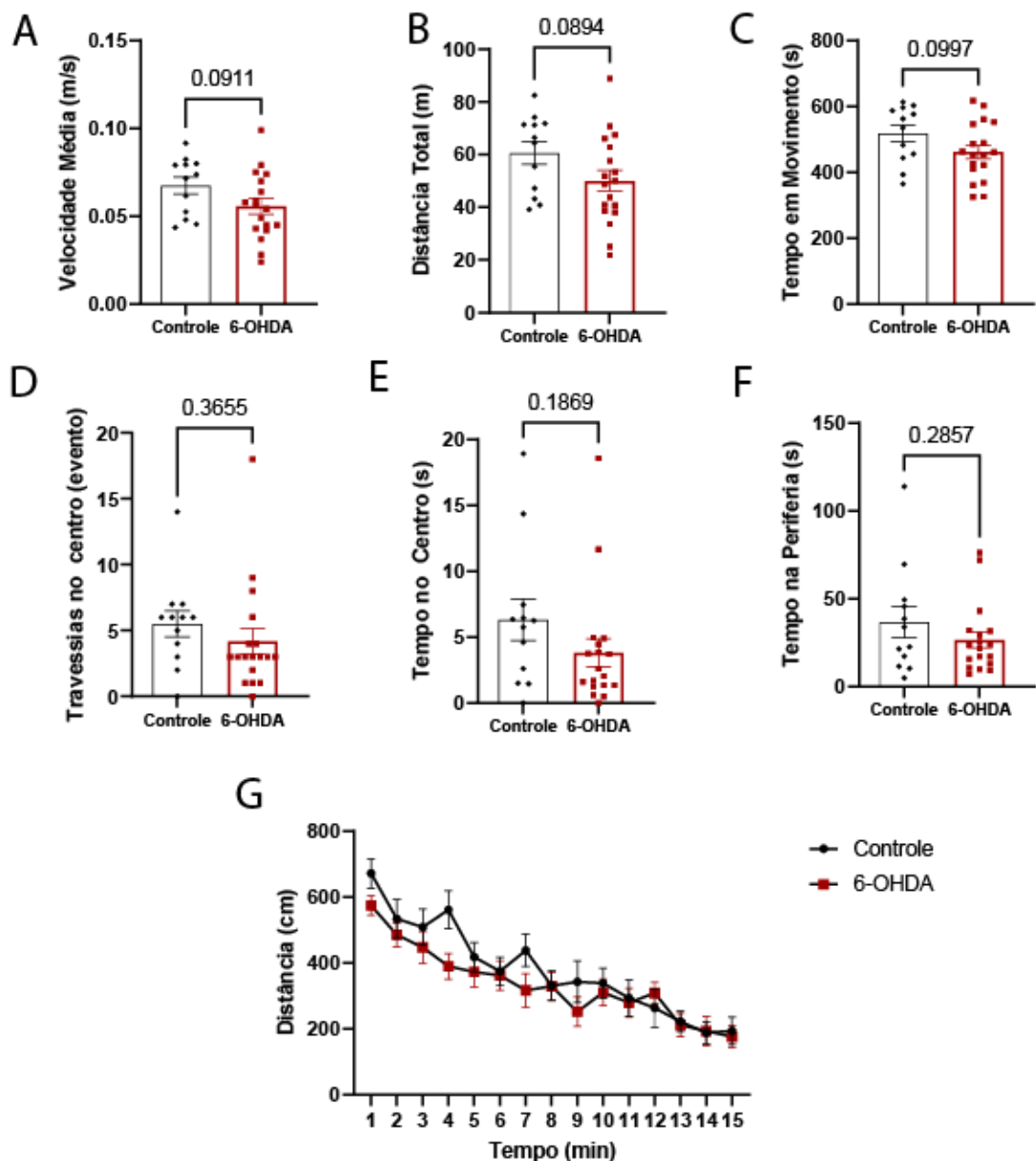


Figura 14. Após 4 semanas de cirurgia 6-OHDA não apresentou diferença em tempo de movimento, velocidade média ou distância percorrida nos 15 minutos do teste. Comportamentos do tipo ansioso pela exposição ao centro do aparato não foram observados também. (A) Velocidade média em metros por segundo. (B) Distância total em metros. (C) Tempo total em movimento em segundos. (D) Total de travessias no centro. (E) Tempo total gasto no centro. (F) Tempo total gasto na periferia. (G) Distância percorrida minuto a minuto. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Preto: Grupo controle (N = 18). Vermelho: Grupo 6-OHDA (N = 14). Comparações estatísticas entre os grupos foram realizadas utilizando o Teste t de student.

Para verificar se, de alguma forma, os efeitos da lesão produzida por 6-OHDA progrediram, realizamos novamente o teste de campo aberto na quarta semana após a infusão da toxina. Novamente, não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os

grupos controle e 6-OHDA em relação à velocidade média ($t(13) = 0.4687$, $p=0.6471$) (**fig. 15A**), distância total ($t(13) = 0.4874$, $p=0.6341$) (**fig. 15B**) e tempo em movimento ($t(13) = 0.04725$, $p=0.9630$) (**fig. 15C**). Em relação aos comportamentos do tipo ansiosos, novamente, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no número de vezes que o animal atravessou o centro ($t(13) = 0.04270$, $p=0.9666$) (**fig. 15D**), no tempo no centro ($t(13) = 0.5140$, $p=0.6158$) (**fig. 15E**) ou no tempo na periferia ($t(13) = 0.1933$, $p=0.8497$) (**fig. 15F**).

Assim como na avaliação anterior, testamos se existia algum efeito do tratamento na distância percorrida ao longo do tempo (em blocos de 1 min). A análise de duas vias medidas repetidas não revelou diferenças significativas para a interação tratamento x tempo ($F(14,182) = 0.7202$, $p=0.7524$). Também não observamos efeito de tratamento ($F(1,13) = 0.2376$, $p=0.6341$). Por outro lado, assim como no teste de 3 semanas, observamos efeito de tempo ($F(14,182) = 6.704$, $P<0,0001$), indicando que a locomoção dos animais diminuiu ao longo do tempo, como esperado (**fig. 15G**).

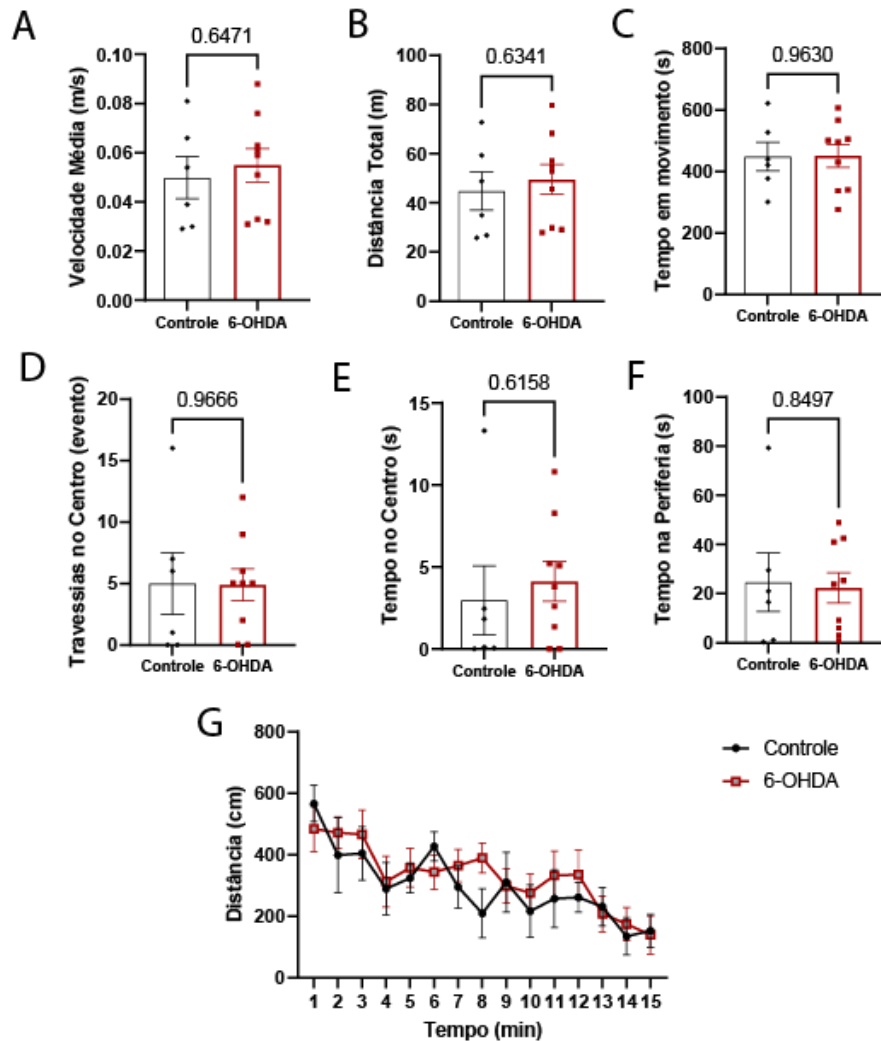


Figura 15 Após 3 semanas de cirurgia 6-OHDA não apresentou diferença em tempo de movimento, velocidade média ou distância percorrida nos 15 minutos do teste. Comportamentos do tipo ansioso pela exposição ao centro do aparato não foram observados também. (A) Velocidade média em metros por segundo. (B) Distância total em metros. (C) Tempo total em movimento em segundos. (D) Total de travessias no centro. (E) Tempo total gasto no centro. (F) Tempo total gasto na periferia. (G) Distância percorrida minuto a minuto. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Preto: Grupo controle (N = 6). Vermelho: Grupo 6-OHDA (N = 9). Comparações estatísticas entre os grupos foram realizadas utilizando o Teste t de student.

4.3 BARNES MAZE

Após confirmarmos com o teste da impressão de patas e campo aberto que os animais tratados com 6-OHDA não apresentavam sintomas motores graves, avaliamos a memória e a flexibilidade cognitiva dos animais por meio do Labirinto de Barnes. Foram realizados 4 dias de treinamento nos quais avaliamos a dinâmica de aprendizado dos animais ao longo dos dias e, no 5º dia, foi realizado o teste de evocação como descrito nos métodos. Após os 5 dias de teste de memória realocamos o buraco de escape a 180º e submetemos os animais a mais duas

sessões no labirinto para a verificação da flexibilidade cognitiva para aprendizagem do novo local de escape. Um animal foi excluído das análises dos testes devido ao não aprendizado da regra, ou seja, apesar de encontrar o buraco/escape o animal se mantinha na borda não finalizando a tarefa entrando no buraco.

4.3.1 APRENDIZADO

Para avaliarmos o desempenho dos grupos ao longo dos dias realizamos ANOVA de duas vias medidas repetidas. Em relação à latência para encontrar o escape, não observamos efeitos significativos em relação à interação tratamento x tempo ($F(3, 39) = 0,3900$, $P=0,7608$) e apenas tratamento ($F(1, 13) = 0,004172$, $P=0,9495$). Observamos, entretanto, efeito de tempo, ou seja, ambos os grupos reduziram significativamente a latência para encontrar o buraco de escape ao longo dos dias ($F(3, 39) = 18,34$, $P<0,0001$) (**fig. 16A**). A velocidade média também não apresentou interação entre grupos e dias ($F(3, 39) = 0,7935$, $P=0,5050$). Mantendo velocidade entre os dias ($F(3, 39) = 1,335$, $P=0,2769$) e os grupos ($F(1, 13) = 0,002371$, $P=0,9619$) (**fig. 16B**). A distância percorrida não apresentou diferença entre os dias e grupos ($F(3, 39) = 0,7059$, $P=0,5543$), entre os dias ($F(1,840, 23,92) = 27,72$, $P<0,0001$) e os grupos ($F(1, 13) = 0,2141$, $P=0,6512$) (**fig. 16C**).

Além da latência, os erros primários e secundários são uma forma de avaliar a memória e o aprendizado dos animais. Como é possível observar no gráfico **fig. 16D** não houve diferença e significativa entre tempo e tratamento ($F(3, 39) = 0,2292$, $P=0,8755$), nem efeito de tratamento ($F(1, 13) = 0,3158$, $P=0,5837$) nos erros primários. O número de erros primários cai ao longo do tempo para ambos os grupos ($F(3, 39) = 21,50$, $P<0,0001$). Já em relação aos erros secundários, contabilizados quando o animal revisita um alvo incorreto, também não encontramos interação significativa entre tratamento e tempo ($F(3, 39) = 2,022$, $P=0,1267$), nem efeito de tratamento ($F(1, 13) = 0,05110$, $P=0,8247$). Assim como no erro primário, os erros secundários diminuíram significativamente ao longo do tempo para ambos os grupos ($F(1,419, 18,44) = 33,41$, $P<0,0001$) (**fig. 16E**).

Considerando que os dados alcançados na fase de treinamento não apresentaram interferência de sintomas motores, sendo que os animais controle e 6-OHDA aprenderam a localização do escape nos 4 dias de treinamento.

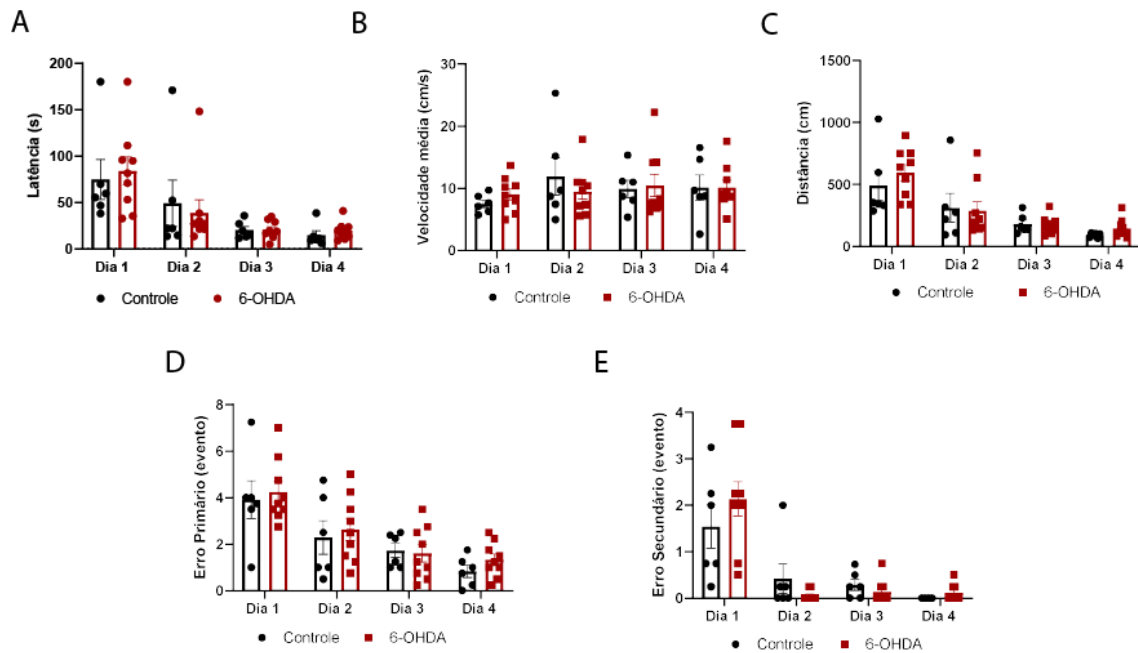


Figura 16 Grupo 6-OHDA não apresentou diferença na latência para encontrar o buraco, distância percorrida, velocidade média ou erros primários e secundários nos 4 dias de treinamento. (A) Distância percorrida em metros. (B) Velocidade média em metros por segundo. (C) Latência para entrar no buraco. (D) Erros primários. (E) Erros secundário. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Preto: Grupo controle (N = 6). Vermelho: Grupo 6-OHDA (N = 9). Comparações estatísticas entre os grupos foram realizadas utilizando a ANOVA de duas vias.

A estratégia utilizada para encontrar o buraco de escape foi avaliada junto dos erros primários, secundários e latência a fim de confirmar a aprendizagem espacial. A maior utilização da estratégia espacial confirma o aprendizado e a localização do buraco do escape por meio das pistas ambientais. Não foi encontrada diferenças estatisticamente significante na utilização da estratégia randômica ($t(6) = 1,277$, $p = 0,2489$) (**fig. 17A**), espacial ($t(6) = 0,9472$, $p = 0,3801$) (**fig. 17B**) ou estratégia serial ($t(6) = 1,116$, $p = 0,3070$) (**fig. 17C**). Pela **fig. 17D e E** é possível observar o aumento gradativo do uso da estratégia espacial por ambos os grupos com o passar dos dias.

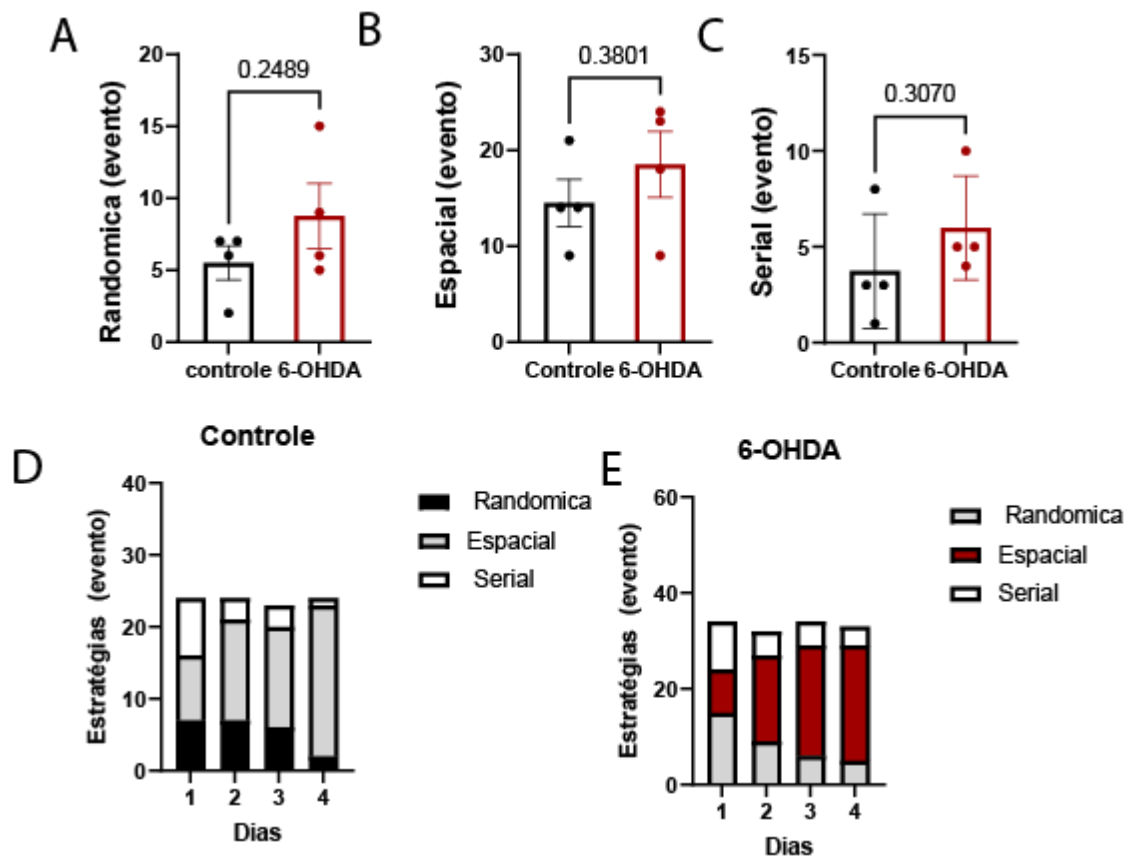


Figura 17 Não houve diferença entre os grupos nas estratégias utilizadas para encontrar o buraco (A) Utilização da estratégia espacial. (B) Utilização da estratégia randomizada. (C) Utilização da estratégia serial. (D-E) Estratégias utilizadas para encontrar o escape dia a dia. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Preto: Grupo controle (N = 6). Vermelho: Grupo 6-OHDA (N = 10). Comparações estatísticas entre os grupos foram realizadas utilizando o Teste t de student.

4.3.2 TESTE DE EVOCÇÃO

No quinto dia o escape é retirado e colocado uma placa de MDF assim como os demais buracos. Foi analisado o tempo gasto no quadrante alvo durante os dois minutos de teste e assim confirmar o aprendizado do local. O cálculo foi realizado com a porcentagem de tempo que cada animal despendeu no quadrante alvo.

No primeiro minuto não foi encontrado diferença significativa entre os grupos ($t(9,940) = 0,1230$, $p = 0,4523$) (**fig. 18A**). Já no segundo minuto o grupo controle despendeu maior porcentagem de tempo no quadrante alvo ($t(12,94) = 2,224$, $p = 0,0223$) (**fig. 18B**). O tempo de permanência no quadrante alvo foi separado em minutos para a verificação da velocidade de extinção do comportamento de acordo com as análises realizadas por Rego., 2014.

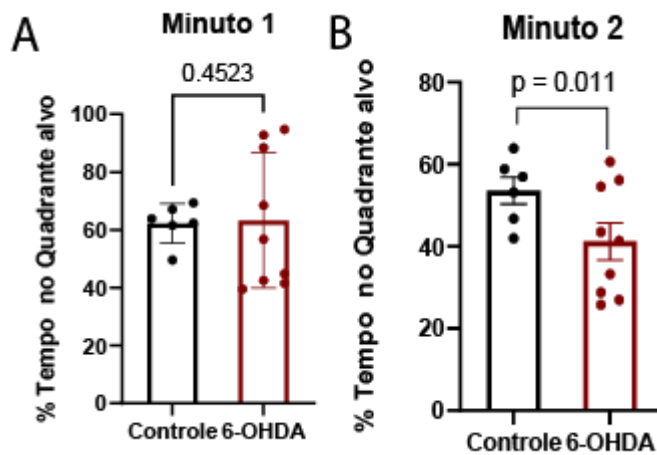


Figura 18 Não houve diferença na porcentagem do tempo gasto no quadrante alvo no primeiro minuto. Grupo controle permaneceu maior porcentagem de tempo no quadrante alvo no segundo minuto. (A) Porcentagem do tempo gasto no quadrante alvo durante o minuto 1. (B) Porcentagem do tempo gasto no quadrante alvo durante o minuto 2. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Preto: Grupo controle (N = 6). Vermelho: Grupo 6-OHDA (N = 10). Comparações estatísticas entre os grupos foram realizadas utilizando o Teste t de student.

4.3.3 APRENDIZADO REVERSO

No aprendizado reverso a latência para entrar no buraco de escape na nova localização não apresentou diferença estatisticamente significativa no dia 6 ($t(13) = 1,466$, $p = 0,1664$) e no dia 7 ($t(13) = 1,173$, $p = 0,2620$) (**fig 19A**). Para melhor avaliação foi analisado pelo Mann-Whitney múltiplo a latência a cada tentativa. Houve diferença estatisticamente significativa na latência nas tentativas 2 ($p = 0,04195$), na tentativa 5 ($p = 0,027972$) e 6 ($p = 0,017233$). A velocidade média não foi encontrada diferença estatisticamente significativa (dia 6 ($t(9,453) = 1,536$, $p = 0,1573$) e dia 7 ($t(9,937) = 0,4360$, $p = 0,6722$)) (**fig 19B**). A distância percorrida também não apresentou diferença em ambos os dias (dia 6 ($t(10,04) = 0,5123$, $p = 0,6195$) e dia 7 ($t(10,67) = 1,158$, $p = 0,2719$)) (**fig 19C**).

Também não foram encontradas diferença estatisticamente significativa no erro primário (dia 6 ($t(11,24) = 0,5923$, $p = 0,5654$; e dia 7 ($t(11,56) = 0,1569$, $p = 0,8781$)) (**fig 19D**) ou no erro secundário (dia 6 ($t(9,622) = 0,4323$, $p = 0,6750$; e dia 7 ($t(9,109) = 0,6817$, $p = 0,5124$)) (**fig 19E**).

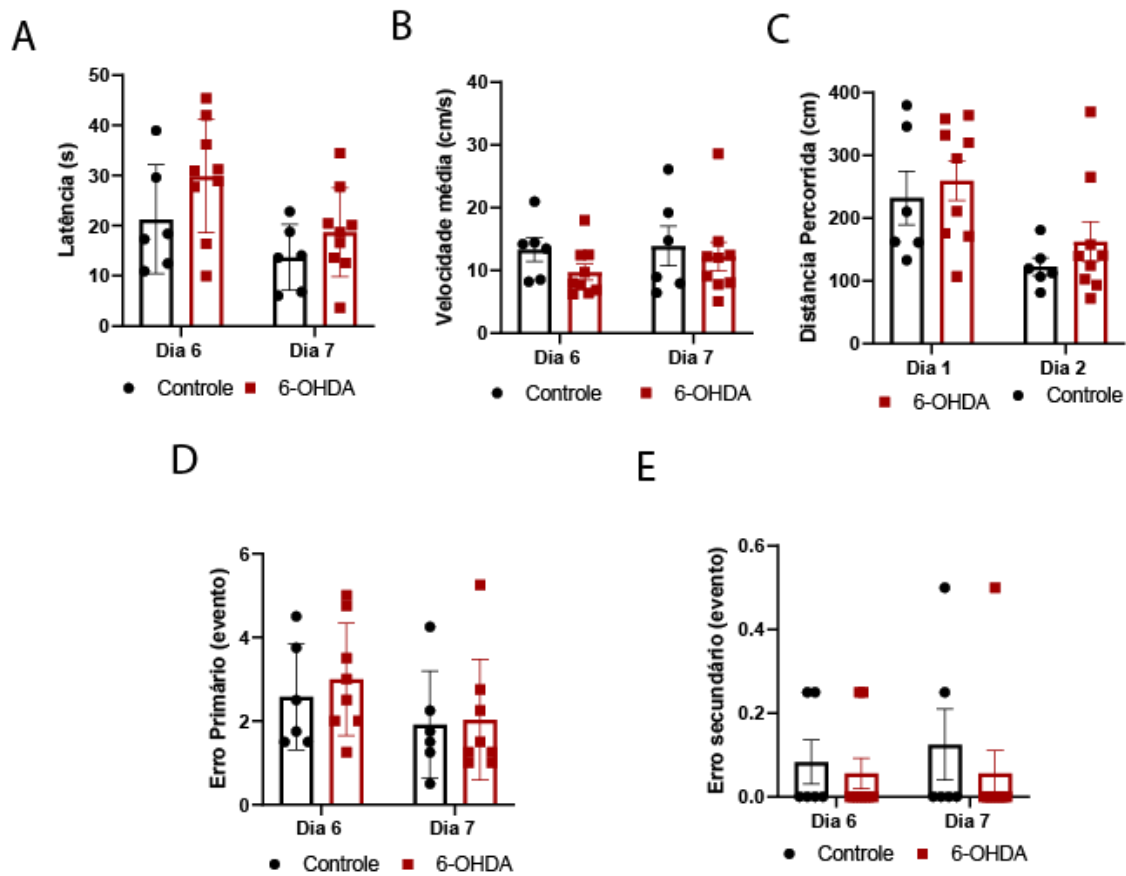


Figura 19 Grupo 6-OHDA não apresentou diferença na latência para encontrar o buraco, distância percorrida, velocidade média ou erros primários e secundários durante o aprendizado reverso. (A) Distância percorrida em cm. (B) Velocidade média em metros por segundo. (C) Erros secundários. (D) Latência para entrar no buraco. (E) Erros primários. (D,E) Tentativas de 1 a 4 equivale ao dia 6 e tentativas 5 a 8 equivalem ao dia 7. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Preto: Grupo controle (N = 6). Vermelho: Grupo 6-OHDA (N = 10). Comparações estatísticas entre os grupos foram realizadas utilizando o Teste t de student.

Para avaliar tempo gasto no quadrante onde se encontrava o buraco de escape durante a aprendizagem para memória foi calculado a porcentagem de tempo gasto nesse quadrante podemos observar na **figura 20A** que o grupo controle passou mais tempo quando comparado com o grupo 6-OHDA no dia 6 ($t(12,80) = 2.903$, $p = 0,0125$). A fim de avaliar melhor essa diferença no sexto dia foi analisado cada tentativa individualmente. Não foram encontradas diferenças significativas na tentativa 1 ($t(12) = 0,8165$, $p = 0,4301$), tentativa 2 ($t(12) = 1,377$, $p = 0,1935$), tentativa 3 ($t(12) = 1,618$, $p = 0,1316$) ou tentativa 4 ($t(12) = 1,127$, $p = 0,2819$) do sexto dia de teste (**fig. 20A**). No dia 7 não foram encontradas diferenças entre os grupos ($t(9,550) = 0,5655$, $p = 0,5848$) (**fig. 20A**).

Para confirmar o aprendizado do novo local do buraco de escape utilizamos as estratégias utilizadas e a porcentagem do tempo gasto no quadrante alvo anterior. Não houve diferenças estatisticamente significante na utilização das estratégias: randômica ($p= 0,6667$) (fig 20C), espacial ($p= >0,9999$) (fig 20D) e serial ($p= 0,3333$) (fig 20F). Assim como no teste de memória é possível observar um crescimento no uso da estratégia espacial no segundo dia do teste pela figura 20 F e G.

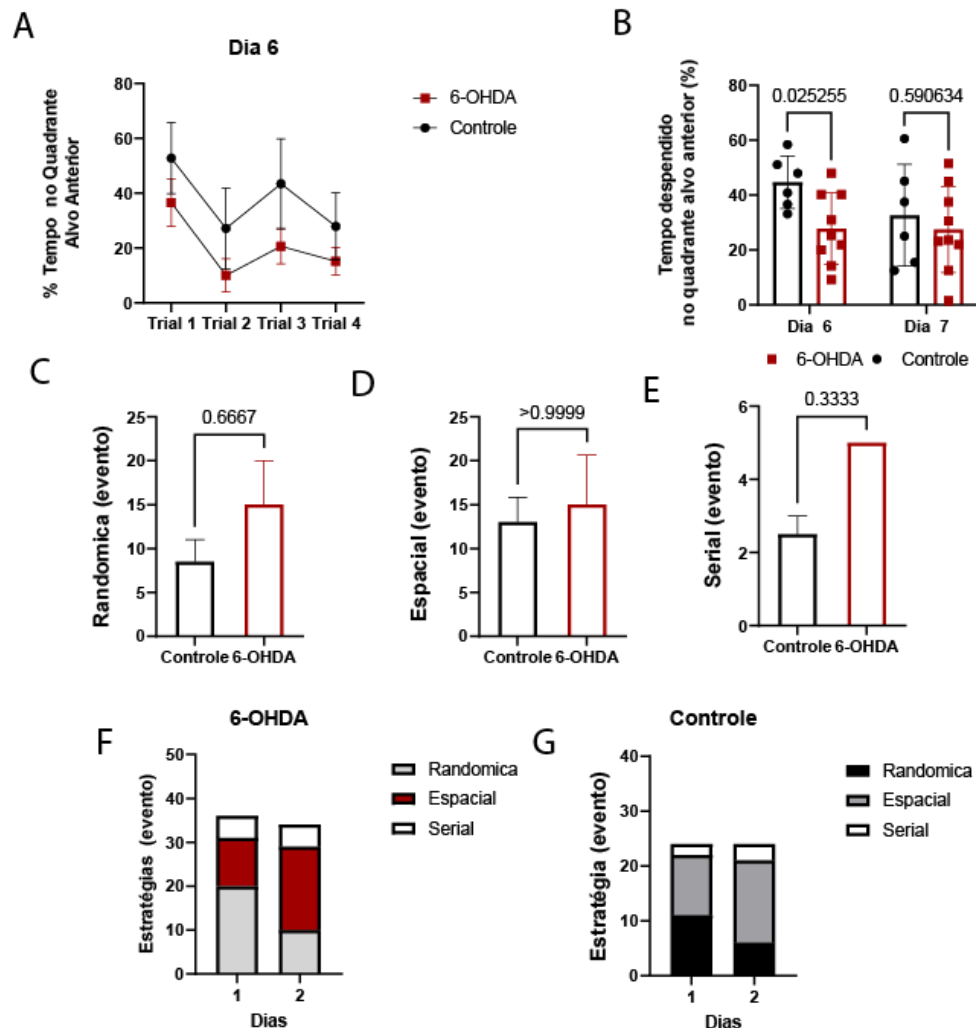


Figura 20 Não houve diferença entre os grupos nas estratégias utilizadas para encontrar o buraco. 6-OHDA passou menor porcentagem de tempo no quadrante alvo anterior no primeiro dia do aprendizado reverso (A) Porcentagem do tempo gasto no quadrante alvo anterior a cada tentativa do dia 6. (B) **Porcentagem do tempo gasto no quadrante alvo anterior.** (C) Utilização da estratégia espacial. (D) Utilização da estratégia serial. (E) Utilização da estratégia randômica. (F-G) Estratégias utilizadas para encontrar o escape dia a dia. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Preto: Grupo controle (N = 6). Vermelho: Grupo 6-OHDA (N = 10). Comparações estatísticas entre os grupos foram realizadas utilizando o Teste t de student.

5.0 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar sintomas de ansiedade, memória e flexibilidade cognitiva no modelo da DP utilizando a infusão bilateral de 6-OHDA no estriado dorsolateral.

Nossos resultados indicam que nosso protocolo de infusão de 6-OHDA não produziu sintomas motores. Isso foi evidenciado tanto pelo teste da impressão das patas quanto no campo aberto. Também não foram observados comportamentos do tipo ansioso. Entretanto, houve alteração na memória espacial, com o grupo 6-OHDA apresentando menor tempo no quadrante alvo durante o segundo minuto durante o teste de evocação. Já na avaliação da flexibilidade cognitiva, o grupo 6-OHDA demorou mais tempo para realizar o aprendizado do novo local. Constatou-se que o aprendizado da tarefa e da localização do buraco de escape foi realizado por ambos os grupos tanto no teste da memória como no aprendizado reverso, porém com necessidade maior de tentativas e menor persistência da memória para o grupo 6-OHDA.

A seguir discutiremos esses resultados de acordo com a literatura atual. Focaremos nos resultados observados nos testes de ansiedade, memória e aprendizado reverso de acordo com o modelo utilizado neste trabalho (infusão bilateral no estriado), fornecendo uma perspectiva sobre as variações de modelos que utilizam a 6-OHDA para a indução dos sintomas. Será discutido a forma como esses resultados colaboram para o modelo animal utilizado para o estudo da DP e para o entendimento da doença de uma forma geral.

5.1 SINTOMAS MOTORES COM A INJEÇÃO DE 6-OHDA NO ESTRIADO DORSOLATERAL

A SN tem papel principal de modular o estriado a partir dos aferentes dopaminérgicos para a região. Na via motora indireta, a degeneração na SN causa um aumento na inibição do GPe que diminui a sua ação inibitória sobre os núcleos subtalâmicos e este aumenta atividade excitatória no globo pálido interno e na substância negra. Já na via direta, a degeneração da SN causa uma diminuição de inibição do GPi, o que aumenta a inibição dessas áreas no tálamo fazendo com que diminua a atividade excitatória para o córtex (MATHEUS et al., 2016; POEWE et al., 2017). Essas alterações nos núcleos da base são os principais causadores dos sintomas motores clássicos da DP. Sendo assim, inicialmente, nosso foco inicial foi de testar se a lesão causada pela 6-OHDA seria capaz de produzir prejuízos motores em nosso modelo.

Estudos confirmam que o surgimento ou não dos sintomas motores apresenta associação direta com a concentração total de 6-OHDA utilizada para gerar o modelo. Por exemplo, diferenças significativas no tempo de queda no teste rotarod e na distância percorrida no teste do campo aberto foram observadas quando uma concentração total maior de 20 µg de 6-OHDA foi usada no estudo de MATHEUS et al., (2016). Porém os mesmos sintomas não foram confirmados quando a massa total utilizada na infusão foi de 10 µg (MATHEUS et al., 2016). Neste trabalho, além do teste do campo aberto, para avaliar a locomoção espontânea, os autores avaliaram alterações de equilíbrio e coordenação usando teste do Rotarod e em ambos não detectaram sintomas motores graves nos animais. Além da massa total, o local da injeção também apresenta importância para o surgimento dos sintomas motores. Após a injeção de 2 µg no feixe prosencefálico medial já foram identificados sintomas motores com a diminuição progressiva do comprimento e largura da passada a partir do 4º dia (HSIEH et al., 2011). Os resultados observados no presente estudo indicam que a infusão de 10µg de 6-OHDA no estriado dorsolateral não é suficiente para apresentar sintomas motores graves após 3 e 4 semanas da cirurgia. No teste de impressão de patas não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e 6-OHDA na largura e comprimento da passada. No teste do campo aberto da terceira semana há uma sutil diferença entre os grupos 6-OHDA e controle não sendo estatisticamente significativa. Já na quarta semana não houve diferença estatisticamente significativa na velocidade média, distância percorrida ou tempo em movimento dos animais lesionados e controle. Isso pode indicar que entre a terceira e a quarta há uma janela com maior incidência de sintomas motores. Após esse período, parece ocorrer uma estabilização dos efeitos da lesão por meio de mecanismos compensatórios. Entretanto, ainda é pouco compreendido como isso ocorreria, merecendo ser mais investigado em estudos futuros.

5.2 SINTOMA ANSIOSO E DOENÇA DE PARKINSON

A ansiedade em humanos pode ser considerada uma reação inadequada a um estímulo que não representa perigo ou uma reação exagerada a um estímulo que apresenta essa representação(CAREY et al., 2021). Nos animais essa análise pode ser realizada por meio da esQUIVA INIBITÓRIA, comportamento no qual se evita a exposição a locais ansiogênicos e a fuga de situações estressoras (GRAEFF; FERREIRA NETTO; ZANGROSSI JR, 1998).

Nesse estudo foi avaliado a tendência dos animais de evitarem a região mais exposta e iluminada (aversiva) da arena durante o teste do campo aberto. Não foi observado diferença entre os grupos nesse parâmetro, o que sugere que os animais que receberam a 6-OHDA não apresentaram um comportamento mais ansioso. Esses resultados corroboram com os achados de GÁLVEZ-MÁRQUEZ et al., (2022), que usaram do mesmo modelo de DP do presente estudo (mesma espécie, concentração de 6-OHDA e coordenadas de infusão). Duas semanas após a infusão eles também não observaram diferença no tempo despendido no centro da arena no teste do campo aberto entre os grupos experimental e controle. De forma semelhante, não foram detectados comportamentos do tipo ansioso em estudos nos quais os ratos com lesão bilateral no estriado dorsal foram avaliados no teste de cruz elevada (BRANCHI et al., 2008; MATHEUS et al., 2016). No entanto, é interessante observar que em estudos com modelos gerados pela infusão bilateral de 6-OHDA no estriado de camundongos foi observado comportamento ansioso no grupo com a lesão, caracterizado tanto por menor tempo e distância percorrida no centro do campo aberto, como por menor tempo despendido no braço aberto do teste em cruz elevado (BONITO-OLIVA et al., 2014; BONITO-OLIVA; MASINI; FISONE, 2014). Além disso, trabalhos que induziram a lesão em ratos através da infusão bilateral de 6-OHDA no estriado em diferentes coordenadas das usadas no presente estudo e com diferentes concentrações, e/ou usaram de diferentes parâmetros, identificaram comportamento do tipo ansioso nos animais (HUI et al., 2015; LIU et al., 2019; SUN et al., 2015, 2018; VIEIRA et al., 2019; XIE; PRASAD, 2020), enfatizando a importância de se considerar o método de geração do modelo como possíveis fontes de variabilidade.

Sintomas tipo ansiosos também já foram confirmados com o mesmo modelo de infusão bilateral no estriado com ratos Wistar (CHEN et al., 2014; SILVA et al., 2016; TADAIESKY et al., 2008) ou com variação na linhagem utilizando Sprague dawley (HSIEH et al., 2011). Porém a análise de sintomas ansiosos não se mostra muito comum com infusão no estriado, apresentando maior investigação na infusão no feixe prosencefálico medial. Sun et al., 2015 demonstraram que a atividade dos receptores de 5-HT_{1a} no núcleo central da amígdala tem relação com comportamentos do tipo ansioso. Eles observaram que a ação de agonista do receptor 5-HT_{1a} em animais lesionados no feixe prosencefálico medial com 6-OHDA melhora o comportamento do tipo ansioso e a alteração na atividade da amígdala resulta em aumento dos níveis de dopamina no córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo ventral. O mesmo grupo demonstrou também que atividade do receptor 5-HT₆ no núcleo basolateral da amígdala

apresenta ação ansiolítica em animais lesionados, associados também com aumento de dopamina e diminuição da noradrenalina no córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo ventral, sem alteração nos níveis de 5-HT nessas mesmas áreas, indicando que o subtipo 5-HT₆ age de forma a mediar outros neurotransmissores nessas áreas para ação ansiolítica (SUN et al., 2018).

O presente trabalho corrobora os achados de estudo anterior utilizando os mesmos parâmetros para produzir a lesão bilateral parcial da via nigro-estriatal (MATHEUS et al., 2016). Podemos concluir que a infusão de 10µg de 6-OHDA não foi suficiente para geração de comportamento do tipo ansioso em ratos Wistar. Porém, a presença ou ausência de comportamento do tipo ansioso ainda não apresenta consenso na literatura e precisa ser mais investigado.

5.3 MEMÓRIA E APRENDIZADO NA DOENÇA DE PARKINSON

As alterações cognitivas estão entre os possíveis sintomas não motores que podem ocorrer no início da DP. As deficiências nas funções executivas e visuoespaciais são as mais típicas e podem ser acompanhadas por deficiências de memória (AARSLAND et al., 2021). Dentro do contexto da Doença de Parkinson, DUES et al. (2023) demonstraram que a presença de alfa sinucleína na região CA1 e 2/3 está relacionada a prejuízos de memória dos animais submetidos a teste de labirinto de Barnes.

No presente trabalho utilizamos a mesma tarefa para avaliar a memória espacial e aprendizado após a indução do modelo. Ambos os grupos aprenderam a tarefa e a localização do buraco de escape nos quatro dias de treinamento. No dia do teste de evocação, em que o buraco de escape é retirado, os animais com infusão de 6-OHDA passaram menos tempo no quadrante alvo no segundo minuto, podendo indicar uma baixa persistência da memória espacial neste grupo. Resultados semelhantes foram encontrados por BUSTELLI et al. (2024) que realizaram a lesão no estriado bilateralmente com concentração total próxima da utilizada neste trabalho e com a mesma espécie de animais. Apesar de não encontrarem diferença estatisticamente significativa entre os grupos no processo de aprendizado do labirinto de Barnes, houve diferença utilizando o Labirinto Aquático de Morris. Na avaliação dos dias de treinamento foram encontradas maior dificuldade no aprendizado da regra inicialmente com a demora da diminuição da latência para encontrar o buraco do escape no Labirinto de Barnes ou

a plataforma no Labirinto Aquático de Morris (BUSTELLI et al., 2024; OLIVEIRA et al., 2020). Além disso, em trabalhos com apresentação única a contingência, ou seja, que não utilizaram sessões consecutivas de aquisição para avaliação da memória, o grupo com infusão de 6-OHDA bilateral no estriado também apresentou déficits na memória espacial. Neste caso, as tarefas de reconhecimento de nova localização de objetos ou de reconhecimento de novo objeto foram utilizadas (BONITO-OLIVA; MASINI; FISONE, 2014; BUSTELLI et al., 2024; HERRERA et al., 2020).

Para além da memória espacial, é possível investigar outros sintomas cognitivos discriminando por local de infusão ou a classificação da memória avaliada. MARSHALL; KING; KORTAGERE (2019) encontrou alterações de memória episódica (não espacial) e espacial em testes de exposição única após a infusão no feixe prosencefálico medial utilizando reconhecimento de nova localização e reconhecimento de novos objetos. Quando realizamos a diferenciação da memória podemos confirmar que a degradação dopaminérgica induzida pela lesão com 6-OHDA altera a memória de trabalho, memória de curto e longo prazo (BONITO-OLIVA; MASINI; FISONE, 2014; HERRERA et al., 2020; MATHEUS et al., 2016). BETANCOURT et al. (2017) encontram déficit na memória de trabalho espacial por meio da avaliação do erro secundário no labirinto de Barnes. Os erros secundários são contabilizados quando o animal investiga um buraco mais de uma vez durante a tentativa. Essa diferença entre os grupos não foi encontrada nos resultados dos nossos testes sem diferença estatisticamente significativa entre o grupo lesionado e controle. É importante pontuar a diferença de protocolo utilizado no labirinto de Barnes. BETANCOURT et al. (2017) não realizou o mesmo para a investigação da memória como foi realizado para esse trabalho. Portanto, a comparação de dados precisa ser feita de forma cautelosa.

A função do hipocampo para a memória de curto e longo prazo já é reconhecida pela literatura (IZQUIERDO et al., 1999). Além disso, a disfunção de neurotransmissores como dopamina, e 5-HT na região do hipocampo afeta processos relacionados à consolidação da memória (BIANCHIN et al., 1999; GÁLVEZ-MÁRQUEZ et al., 2022).

WEN et al. (2015) mostraram que após a infusão de 6-OHDA na região CA3 do hipocampo houve déficit na expressão do medo condicionado porém não no aprendizado. Apresentando resultados semelhantes em relação a memória aos achados de WEN et al. (2015), porém, agora na memória espacial. Com diferença estatisticamente significante na permanência

no quadrante alvo no segundo minuto no teste de evocação do Barnes podemos indicar a importância do sistema dopaminérgico na região hipocampal para a expressão da memória como expresso no menor tempo gasto pelo grupo 6-OHDA no segundo minuto do teste de evocação. O locus coeruleus é um importante eferente dopaminérgico para o hipocampo, já sendo confirmado que a disfunção dessa rede causa dificuldades na memória espacial e contextual (GÁLVEZ-MÁRQUEZ et al., 2022). BONITO-OLIVA; MASINI; FISONE 2014) confirmaram a diminuição na dopamina nesta região após a infusão de 6-OHDA no estriado. Além da diminuição na dopamina, outros neurotransmissores também podem sofrer alteração no modelo de infusão estriatal. Sem a injeção de desipramina, protetor noradrenérgico, como foi realizado em nossa pesquisa, o grupo descobriu uma importante perda na noradrenalina na região hipocampal também. Portanto, podemos concluir que a infusão de 6-OHDA no estriado altera o sistema dopaminérgico para além dos núcleos da base, com deterioração dessas catecolaminas como noradrenalina também no hipocampo. A baixa dessas catecolaminas pode estar associada com o déficit na memória encontrado no modelo 6-OHDA.

No presente trabalho, observamos diferença significativa entre os grupos 6-OHDA e seu respectivo controle no segundo minuto do teste de evocação. O grupo controle apresentou uma maior permanência no quadrante alvo em comparação ao grupo 6-OHDA. Essa diferença pode ser um indicativo de uma persistência menor da memória nos animais 6-OHDA. Os resultados indicam que os animais mantêm a capacidade de evocar a memória inicialmente diminuindo a permanência no segundo minuto, o que pode indicar uma diminuição na persistência da memória. Pode-se argumentar que quanto menor a persistência da memória, mais rápida a extinção da mesma. DUDAI, (2002) define a persistência da memória como a capacidade de reativar ou reestruturar a memória através da reconsolidação além da sua conexão com a potenciação de longa duração no córtex e no hipocampo. De fato, BONITO-OLIVA; MASINI; FISONE, (2014) confirma que, após estimulação de alta frequência, a potenciação de longa duração (LTP) é menor no grupo 6-OHDA em relação ao grupo controle no giro dentado porém não no CA1. Essa diferença na atividade pode explicar a baixa persistência da memória nos animais lesionados. Nossos resultados na avaliação da flexibilidade cognitiva demonstram que os animais controle permaneceram maior tempo no quadrante onde o buraco de escape estava anteriormente, o que corrobora com a hipótese da baixa persistência da memória.

Em suma, podemos indicar que houve sucesso na reprodução dos modelos de infusão bilateral com os achados corroborados pela literatura. Esses resultados podem estar relacionados à ação da 6-OHDA em áreas para além dos núcleos da base, como locus ceruleus e hipocampo. Regiões com importante função no sistema dopaminérgico e, para a memória no caso do hipocampo. A diferença estatística apenas no segundo minuto pode indicar uma baixa persistência da memória nos animais após a infusão da toxina.

5.4 FLEXIBILIDADE COGNITIVA NA DOENÇA DE PARKINSON

As funções executivas são geralmente atribuídas ao loop fronto estriatal e se mostram com importante função de direcionamento de comportamento a um objetivo. Para isso muitas funções são necessárias, entre elas o direcionamento de atenção sustentada a um estímulo, inibição de comportamento e flexibilidade, planejamento, autorregulação e automonitoramento. O comprometimento de algumas dessas funções podem ocorrer na DP devido a baixa regulação dopaminérgica no estriado e sua ligação com o loop cortico estriatal (O'CALLAGHAN; LEWIS, 2017).

Para avaliar as funções executivas foi realizada uma etapa a mais no Labirinto de Barnes no qual o buraco de escape foi transferido para a uma nova posição a 180° da inicial. A função avaliada foi de aprendizado reverso, o qual requer que o animal aprenda uma nova posição do buraco do escape e para isso realize a extinção da localização do buraco de escape anterior para o aprendizado da nova. Ambos os grupos aprenderam a localização do novo buraco de escape, porém, o grupo lesionado com 6-OHDA apresentou maior dificuldade no novo aprendizado. Esses dados concordam com a literatura, a qual define que o déficit da flexibilidade cognitiva não impede o conhecimento da nova regra, mas resulta em diferenças mais sutis no desempenho dos animais, como a demora para o aprendizado ao longo das tentativas. Essa dificuldade de aprendizado é perceptível no aprendizado de novas regras de reforço no comportamento operante e no em tarefas com memória espacial como labirinto de barnes e labirinto aquático de morris (BETANCOURT et al., 2017; GROSPE; BAKER; RAGOZZINO, 2018; HERRERA et al., 2020; MARSHALL; KING; KORTAGERE, 2019; WANG et al., 2020; ZHUO et al., 2022). Trabalhos que avaliam o platô de aprendizado para a nova regra na tarefa encontrou no máximo uma melhora de 50%, sendo que o grupo controle chegou a 75% (WANG et al., 2020; ZHUO et al., 2022).

O labirinto de barnes não é o único teste utilizado para a avaliação do aprendizado reverso. Tarefas de comportamento operante, tais como o tempo de reação em série de cinco

escolhas, são comumente escolhidos por avaliar não apenas a flexibilidade cognitiva, mas outras funções, como atenção (MARSHALL; KING; KORTAGERE, 2019; WANG et al., 2020; ZHUO et al., 2022). Essa tarefa consiste em realizar um treinamento com os animais para responder a um estímulo luminoso quando este ocorrer. Em uma câmara operante, existem 5 ou 3 aberturas direcionada ao rato inserir o focinho para ganhar recompensa. Nessa tarefa há apenas uma resposta certa, e apenas quando o animal aponta para a abertura correta ele recebe uma recompensa alimentar. Após a habituação na câmara operante, o animal é treinado a inserir o focinho na abertura alvo apenas quando ocorre o estímulo luminoso. Quando há omissão, o animal não aponta para nenhuma abertura ele recebe uma punição com as luzes sendo apagadas por 2s. O aprendizado reverso nessa tarefa ocorre quando há mudança da regra após aprendizado anterior, com a abertura correta mudando (WANG et al., 2020). ZHUO et al. (2022) utilizaram o tempo de reação porém com série de 3 escolhas a fim de confirmar que o aprendizado da tarefa inicialmente não está interferindo nos resultados de flexibilidade após a infusão de 6-OHDA para a geração do modelo da DP. No aprendizado reverso no comportamento operante, labirinto aquático de morris ou no labirinto de barnes, utilizado no presente trabalho, a flexibilidade é medida com o aprendizado da nova regra.

Além da flexibilidade cognitiva, outras funções executivas foram avaliadas pela literatura como a memória de trabalho utilizando a mesa em Y (BONITO-OLIVA; MASINI; FISONE, 2014) e quantificando os erros secundários no labirinto de Barnes (BETANCOURT et al., 2017). Outras funções tipicamente frontais como a interação social, também se mostram desreguladas no modelo utilizado (SCHWEISER, 2024). Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos 6-OHDA e controle nos erros secundários indicando que a memória de trabalho permanece preservada nesses animais.

A flexibilidade cognitiva é uma das funções executivas relacionadas com a atividade principalmente do córtex pré frontal. O loop cortico estriatal tem papel fundamental no pleno funcionamento dessas funções. A comunicação ocorre principalmente por neurônios dopaminérgicos da região do estriado em comunicação mútua com o córtex pré-frontal (O'CALLAGHAN; LEWIS, 2017). A infusão de 6-OHDA no estriado tem como efeito na diminuição de serotonina e noradrenalina na região (MATHEUS et al., 2016; TADAIESKY et al., 2008). Essa diminuição de dopamina, serotonina e noradrenalina na região, pode explicar as alterações no aprendizado reverso comportamentais encontradas no presente trabalho.

Como discutido acima na fase da avaliação da memória do labirinto de Barnes com indicativo de baixa persistência da memória com menor permanência do grupo 6-OHDA no quadrante alvo no segundo minuto do teste de evocação. Dado corroborado com a porcentagem do tempo gasto nesse quadrante no primeiro dia do aprendizado reverso. Podemos considerar a memória como um fator relevante para esses resultados para além do déficit na função executiva. Apesar desse apontamento, os resultados alcançados na avaliação do aprendizado reverso estão de acordo com a literatura com a infusão de 6-OHDA no estriado bilateralmente, sendo suficiente para causar déficit no aprendizado reverso.

6.0 CONCLUSÃO

Concluimos com esse estudo que a infusão bilateral de 6-OHDA (10µg / 3µL) no estriado dorsolateral é suficiente para a geração do modelo não motor da Doença de Parkinson em ratos Wistar. Não detectamos sintomas motores graves em nenhum dos testes analisados pela velocidade média de distância percorrida e pela largura e comprimento da passada. O comportamento do tipo ansioso também não foi detectado no modelo utilizado no teste do campo aberto.

Quanto à memória espacial, houve déficit na sua persistência pelo grupo 6-OHDA, porém, sem dificuldade no processo de aprendizado avaliado durante a aquisição da tarefa no labirinto de Barnes. Já a função executiva para aprendizado de uma nova regra, apresentou diferença discreta. Apesar de o grupo ser capaz de aprender a nova regra, foi necessário mais tentativas. A porcentagem do tempo despendido no quadrante onde se encontrava o buraco de escape anteriormente durante os dias com a nova localização, foi maior entre o grupo controle, indicando um déficit da persistência da memória por parte do grupo 6-OHDA.

7.0 PRÓXIMOS PASSOS

Para melhor levantamento das consequências da infusão bilateral no estriado é necessárias mais análises. O primeiro passo será a continuação dos testes para comportamento do tipo ansioso com a tarefa do labirinto em T. A utilização de outros testes para avaliação da memória como reconhecimento de objetos será importante para melhor investigação e replicação dos dados. Outros testes como teste de reação de 3 escolhas para aprofundar os dados no aprendizado reverso aqui encontrados. A aplicação do rotarod como teste motor será realizada em nova coorte de animais. Além da realização do modelo em fêmeas para avaliação da importância dos hormônios para os sintomas como já levantado por Betancourt et al. (2016).

8.0 LIMITAÇÕES

Entre as limitações está a ausência da histologia, processo que já está em andamento e será um passo importante para a confirmação não apenas da lesão mas para avaliar a presença ou ausência de outros neurotransmissores em regiões importantes como córtex pré-frontal. A utilização de apenas animais machos no trabalho também se mostra como uma limitação que será sanada nos próximos meses por meio de novos projetos que estão em andamento no laboratório.

9.0 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AARSLAND, Dag et al. Parkinson disease-associated cognitive impairment. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 7, n. 1, p. 1-21, 2021.

ARIZA, Deborah et al. Chemoreflex and baroreflex alterations in Parkinsonism induced by 6-OHDA in unanesthetized rats. **Neuroscience letters**, v. 607, p. 77-82, 2015.

ASINOF, Samuel K.; PAINE, Tracie A. The 5-choice serial reaction time task: a task of attention and impulse control for rodents. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 90, p. e51574, 2014.

BETANCOURT, Erika et al. The impact of biological sex and sex hormones on cognition in a rat model of early, pre-motor Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 345, p. 297-314, 2017.

BIANCHIN, Marino et al. The amygdala is involved in the modulation of long-term memory, but not in working or short-term memory. **Neurobiology of learning and memory**, v. 71, n. 2, p. 127-131, 1999.

BOGOUSSLAVSKY, Julien; BOLLER, François; IWATA, Makoto (Ed.). **A history of neuropsychology**. Karger Medical and Scientific Publishers, 2019.

BONITO-OLIVA, Alessandra et al. Cognitive impairment and dentate gyrus synaptic dysfunction in experimental parkinsonism. **Biological psychiatry**, v. 75, n. 9, p. 701-710, 2014.

BONITO-OLIVA, Alessandra; MASINI, Débora; FISONE, Gilberto. A mouse model of non-motor symptoms in Parkinson's disease: focus on pharmacological interventions targeting affective dysfunctions. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 8, p. 290, 2014.

BUSTELLI, Isabella B. et al. Behavioral effects of 6-hydroxydopamine-induced damage to nigro-striatal pathway and Locus coeruleus as a rodent model of Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 462, p. 114873, 2024

BRANCHI, Igor et al. Nonmotor symptoms in Parkinson's disease: Investigating early-phase onset of behavioral dysfunction in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model. **Journal of neuroscience research**, v. 86, n. 9, p. 2050-2061, 2008.

CAREY, Guillaume et al. Neuroimaging of anxiety in Parkinson's disease: a systematic review. **Movement Disorders**, v.36, n. 2, p. 327-339, 2021.

CHEN, Li et al. Alterations of emotion, cognition and firing activity of the basolateral nucleus of the amygdala after partial bilateral lesions of the nigrostriatal pathway in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 85, n. 6, p. 329-338, 2011.

CHEN, Lin et al. SK channel blockade reverses cognitive and motor deficits induced by nigrostriatal dopamine lesions in rats. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 8, p. 1295-1306, 2014.

DEL FABBRO, Lucian et al. Chrysin protects against behavioral, cognitive and neurochemical alterations in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Neuroscience Letters**, v. 706, p. 158-163, 2019.

DEXTER, David T.; JENNER, Peter. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 132-144, 2013.

DUES, Dylan J. et al. Hippocampal subfield vulnerability to α -synuclein pathology precedes neurodegeneration and cognitive dysfunction. **npj Parkinson's Disease**, v. 9, n. 1, p. 125, 2023.

GÁLVEZ-MÁRQUEZ, Donovan K. et al. Spatial contextual recognition memory updating is modulated by dopamine release in the dorsal hippocampus from the locus coeruleus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 119, n. 49, p. e2208254119, 2022.

GLINKA, Yelena; GASSEN, M.; YODIM, M. B. H. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. **Advances in Research on Neurodegeneration: Volume 5**, p. 55-66, 1997.

GOMPERTS, Stephen N. Lewy body dementias: dementia with Lewy bodies and Parkinson disease dementia. **Continuum: Lifelong Learning in Neurology**, v. 22, n. 2, p. 435-463, 2016.

GRAEFF, Frederico G.; NETTO, Cristina Ferreira; ZANGROSSI JR, Hélio. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 2, p. 237-246, 1998.

GROSPE, Gena M.; BAKER, Phillip M.; RAGOZZINO, Michael E. Cognitive flexibility deficits following 6-OHDA lesions of the rat dorsomedial striatum. **Neuroscience**, v. 374, p. 80-90, 2018.

HANAGASI, Hasmet A.; TUFEKCIOGLU, Zeynep; EMRE, Murat. Dementia in Parkinson's disease. **Journal of the neurological sciences**, v.374, p. 26-31, 2017.

HAWKES, Christopher H.; DEL TREDICI, Kelly; BRAAK, Heiko. A timeline for Parkinson's disease. **Parkinsonism & related disorders**, v. 16, n. 2, p. 79-84, 2010.

HERRERA, Macarena L. et al. Early cognitive impairment behind nigrostriatal circuit neurotoxicity: are astrocytes involved?. **ASN neuro**, v. 12, p. 1759091420925977, 2020.

HSIEH, Tsung-Hsun et al. Time-course gait analysis of hemiparkinsonian rats following 6-hydroxydopamine lesion. **Behavioural brain research**, v. 222, n. 1, p. 1-9, 2011.

HUI, Yan Ping et al. Anxiolytic effects of prelimbic 5-HT1A receptor activation in the hemiparkinsonian rat. **Behavioural Brain Research**, v. 277, p. 211-220, 2015.

Izquierdo I, Medina JH. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. **Neurobiol Learn Mem** 1995;63:19–32.

IZQUIERDO, Iván et al. Separate mechanisms for short-and long-term memory. **Behavioural brain research**, v. 103, n. 1, p. 1-11, 1999.

LEH, Sandra E.; PETRIDES, Michael; STRAFELLA, Antonio P. The neural circuitry of executive functions in healthy subjects and Parkinson's disease. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 70-85, 2010.

LIU, Kun Cheng et al. Activation and blockade of dorsal hippocampal Serotonin6 receptors regulate anxiety-like behaviors in a unilateral 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. **Neurological Research**, v. 41, n. 9, p. 791-801, 2019.

MARRAS, Connie; CHAUDHURI, K. Ray. Nonmotor features of Parkinson's disease subtypes. **Movement Disorders**, v. 31, n. 8, p. 1095-1102, 2016.

MARSHALL, Courtney A.; KING, Kirsten M.; KORTAGERE, Sandhya. Limitations of the rat medial forebrain lesion model to study prefrontal cortex mediated cognitive tasks in Parkinson's disease. **Brain research**, v. 1702, p. 105-113, 2019.

MASINI, Débora; BONITO-OLIVA, Alessandra; FISONE, Gilberto. Inhibition of mTORC1 signaling reverts cognitive and affective deficits in a mouse model of Parkinson's disease. **Frontiers in neurology**, v. 9, p. 336347, 2018.

MATHEUS, Filipe C. et al. Decreased synaptic plasticity in the medial prefrontal cortex underlies short-term memory deficits in 6-OHDA-lesioned rats. **Behavioural brain research**, v. 301, p. 43-54, 2016.

MATHEUS, Filipe C. et al. Temporal dissociation of striatum and prefrontal cortex uncouples anhedonia and defense behaviors relevant to depression in 6-OHDA-lesioned rats. **Molecular neurobiology**, v. 53, p. 3891-3899, 2016.

MILLAN, Mark J. The neurobiology and control of anxious states. **Progress in neurobiology**, v. 70, n. 2, p. 83-244, 2003.

OBESO, Jose A. et al. Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. **Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society**, v. 23, n. S3, p. S548-S559, 2008.

O'CALLAGHAN, Claire; BERTOUX, Maxime; HORNBERGER, Michael. Beyond and below the cortex: the contribution of striatal dysfunction to cognition and behaviour in neurodegeneration. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 85, n. 4, p. 371-378, 2014.

OLIVEIRA, Luiz M. et al. Depletion of hypothalamic hypocretin/orexin neurons correlates with impaired memory in a Parkinson's disease animal model. **Experimental Neurology**, v. 323, p. 113110, 2020.

PEZZE, Marie; BAST, Tobias. Dopaminergic modulation of hippocampus-dependent learning: blockade of hippocampal D1-class receptors during learning impairs 1-trial place memory at a 30-min retention delay. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 4, p. 710-718, 2012.

PITSIKAS, Nikolaos et al. Effects of anesthetic ketamine on anxiety-like behaviour in rats. **Neurochemical research**, v. 44, p. 829-838, 2019

REDGRAVE, Peter et al. Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 11, p. 760-772, 2010.

ROBBINS, Trevor W.; COOLS, Roshan. Cognitive deficits in Parkinson's disease: a cognitive neuroscience perspective. **Movement Disorders**, v. 29, n. 5, p. 597-607, 2014.

ROTH, Robert M.; SAYKIN, Andrew J. Executive dysfunction in attention-deficit/hyperactivity disorder: cognitive and neuroimaging findings. **Psychiatric Clinics**, v. 27, n. 1, p. 83-96, 2004.

SCHAPIRA, Anthony HV; CHAUDHURI, K. Ray; JENNER, Peter. Non-motor features of Parkinson disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 7, p. 435-450, 2017.

SCHRAG, Anette; SAUERBIER, Anna; CHAUDHURI, Kallol Ray. New clinical trials for nonmotor manifestations of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 30, n. 11, p. 1490-1504, 2015.

SELIKHOVA, Marianna et al. A clinico-pathological study of subtypes in Parkinson's disease. **Brain**, v. 132, n. 11, p. 2947-2957, 2009.

Silva et al., 2016. Time course study of microglial and behavioral alterations induced by 6-hydroxydopamine in rats. **Neuroscience letters**, 622, 83–87.

SIMOLA, Nicola; MORELLI, Micaela; CARTA, Anna R. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Neurotoxicity research**, v. 11, p. 151-167, 2007.

SUN, Yi-Na et al. Activation and blockade of basolateral amygdala 5-HT₆ receptor produce anxiolytic-like behaviors in an experimental model of Parkinson's disease. **Neuropharmacology**, v. 137, p. 275-285, 2018.

SUN, Yi-Na et al. Activation of 5-HT_{1A} receptors in the medial subdivision of the central nucleus of the amygdala produces anxiolytic effects in a rat model of Parkinson's disease. **Neuropharmacology**, v. 95, p. 181-191, 2015.

TADAIESKY, M. T. et al. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 156, n. 4, p. 830-840, 2008.

VIEIRA, Jeane Cristina F. et al. Anxiety-like behavior induced by 6-OHDA animal model of Parkinson's disease may be related to a dysregulation of neurotransmitter systems in brain areas related to anxiety. **Behavioural brain research**, v. 371, p. 111981, 2019.

WANG, Chen-Tao et al. Attenuation of hyperalgesia responses via the modulation of 5-hydroxytryptamine signalings in the rostral ventromedial medulla and spinal cord in a 6-hydroxydopamine-induced rat model of Parkinson's disease. **Molecular pain**, v. 13, p. 1744806917691525, 2017.

WANG, Zhuo et al. Cognitive flexibility deficits in rats with dorsomedial striatal 6-hydroxydopamine lesions tested using a three-choice serial reaction time task with reversal learning. **Neuroreport**, v. 31, n. 15, p. 1055-1064, 2020.

WEINTRAUB, Daniel et al. Effect of psychiatric and other nonmotor symptoms on disability in Parkinson's disease. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 52, n. 5, p. 784-788, 2004.

XIE, Caroline; PRASAD, Asheeta A. Probiotics treatment improves hippocampal dependent cognition in a rodent model of Parkinson's disease. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1661, 2020.

ZHANG, Wenfeng et al. Partial depletion of dopaminergic neurons in the substantia nigra impairs olfaction and alters neural activity in the olfactory bulb. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 254, 2019.

ZHENG, L.-F. et al. The role of the vagal pathway and gastric dopamine in the gastroparesis of rats after a 6-hydroxydopamine microinjection in the substantia nigra. **Acta Physiologica**, v. 211, n. 2, p. 434-446, 2014.

ZHUO, Wang et al. A mind in motion: Exercise improves cognitive flexibility, impulsivity and alters dopamine receptor gene expression in a Parkinsonian rat model. **Current Research in Neurobiology**, v. 3, p. 100039, 2022.