

Desenvolvimento temporal de prejuízos
comportamentais induzidos pela administração de
6-hidroxiopamina no *locus coeruleus*:
Envolvimento dos receptores β 3-adrenérgicos

Tuane Bazanella Sampaio

Tuane Bazanella Sampaio

**DESENVOLVIMENTO TEMPORAL DE PREJUÍZOS
COMPORTAMENTAIS INDUZIDOS PELA ADMINISTRAÇÃO
DE 6-HIDROXIDOPAMINA NO *LOCUS COERULEUS*:
ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES β 3-ADRENÉRGICOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-
graduação em Farmacologia da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Doutor em Farmacologia.
Orientador: Prof. Dr. Rui Daniel
Prediger
Coorientador: Prof. Dr. Reinaldo
Naoto Takahashi

Florianópolis
2018

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

Sampaio, Tuane Bazanella
Desenvolvimento temporal de prejuízos
comportamentais induzidos pela administração de 6
hidroxidopamina no locus coeruleus: envolvimento
dos receptores beta 3-adrenérgicos / Tuane
Bazanella Sampaio ; orientador, Rui Daniel
Prediger, coorientador, Reinaldo Naoto Takahashi,
2018.

129 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

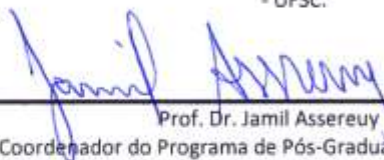
1. Farmacologia. 2. Locus coeruleus. 3.
Noradrenalina. 4. 6-Hidroxidopamina. 5.
Neurodegeneração. I. Prediger, Rui Daniel. II.
Takahashi, Reinaldo Naoto. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
em Farmacologia. IV. Título.

"Desenvolvimento temporal de prejuízos comportamentais induzidos pela administração de 6-hidroxidopamina no locus coeruleus: envolvimento dos receptores β 3-adrenérgicos"

Por

Tuane Bazanella Sampaio

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (27/PPGFMC/2017) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC.

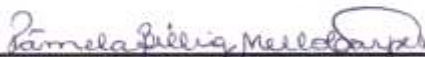


Prof. Dr. Jamil Assereuy Filho
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Banca examinadora:



Dr. Rui Daniel S. Prediger (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador



Dr.ª Pâmela Billig Mello Carpes (Universidade Federal do Pampa)



Dr. Lucas Gazarini (Universidade Federal de Mato Grosso do Sul)



Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr. Geison de Souza Jzídio (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 15 de fevereiro de 2018.

Dedico este trabalho ao professor,
cientista e amigo, Anicleto Poli.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida, por guiar e iluminar minha jornada e, principalmente, por ter me dado o dom de sonhar e acreditar nos meus sonhos, tornando possível a realização deste.

Aos meus pais e à minha irmã pelo apoio e amor incondicionais. À segunda família que a vida me deu – Camila, Joana, Luana e Marcel, obrigada por terem sido a luz e a terra firme desse caminho. Vocês deram muito mais que suporte, vocês sonharam todos os dias comigo! A vocês toda a minha gratidão e amor!

Ao Prof. Dr. Rui Prediger pela oportunidade de realizar o doutorado sob sua orientação, apoio, amizade e bom convívio durante esse período.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Takahashi pela coorientação e bom convívio.

Ao Prof. Dr. Anicleto Poli que me fascina com sua sabedoria, humildade e curiosidade científica: “...*conseguimos padronizar, agora perdeu a graça!*”. Serei eternamente grata pelos seus ensinamentos na bancada e na vida, pela confiança e lealdade a mim depositadas. Obrigada por tudo, sentirei muitas saudades!

À Profa. Dra. Cristina Nogueira por ter proporcionado a base sólida da minha formação científica, pelo exemplo, amizade, conselhos e preocupação constante ao longo desses anos. Sempre serás uma grande inspiração para mim!

À Profa. Dra. Carla Tasca pelas parcerias ao longo desses anos e portas sempre abertas de seu laboratório.

À Profa. Dra. Alexandra Latini pela disponibilidade do HPLC.

A todos que integraram o LEXDON desde 2014, obrigada pelos momentos de descontração, amizade e trocas de conhecimento. Torço pela felicidade e realização de todos vocês! Em especial, à Bruna, Katiane e Tayná pelo auxílio com os experimentos desta tese.

Aos amigos de Florianópolis – Eduardo, Flora, Isabela, Lucas, Luisa, Maristela, Naiani e Regina – pela amizade e momentos de alegria que tornaram os dias aqui mais leves e felizes.

Ao Pietro por – mesmo de longe – ser sempre presente e compartilhar as alegrias e angústias da vida acadêmica comigo. Tua amizade vale ouro, obrigada!

Aos órgãos de fomento, à UFSC, ao PPGFMC, seus professores e funcionários.

Enfim, agradeço a todos os demais que direta ou indiretamente contribuíram no desenvolvimento deste trabalho.

“I look to the diffusion of light and education as the resource most to be relied on for ameliorating the condition, promoting the virtue and advancing the happiness of man.”

(Thomas Jefferson, 1743 – 1826)

RESUMO

Em diversas doenças neurodegenerativas é encontrada uma degeneração precoce e extensa de neurônios noradrenérgicos do *locus coeruleus* (LC), a qual pode estar associada a alterações comportamentais observadas nestes pacientes. No presente estudo, investigou-se a ativação da sinalização apoptótica e o desenvolvimento temporal de prejuízos comportamentais em ratos após a lesão noradrenérgica seletiva do LC ser induzida por 6-hidroxidopamina (6-OHDA). O envolvimento dos receptores β_3 -adrenérgicos também foi avaliado frente ao efeito restaurador da noradrenalina (NA) sobre os prejuízos comportamentais induzidos pela administração de 6-OHDA no LC. Para tal, o inibidor do transportador de dopamina nomifensina foi administrado 1 h antes das injeções estereotáxicas bilaterais de 6-OHDA (5, 10 ou 20 $\mu\text{g}/\text{hem}$) no LC. No grupo SHAM foi administrado apenas o veículo. Todas as análises foram realizadas 7, 21 ou 42 dias após a cirurgia. Todas as doses testadas de 6-OHDA promoveram morte neuronal em todos os tempos analisados, mas somente a dose de 20 $\mu\text{g}/\text{hem}$ de 6-OHDA comprometeu a coordenação motora e o equilíbrio dos ratos. Com base nestes resultados, a menor dose de 6-OHDA (5 $\mu\text{g}/\text{hem}$) foi escolhida para os experimentos subsequentes. A injeção de 6-OHDA prejudicou a discriminação olfatória e a memória de longa duração 7 dias após a cirurgia. O prejuízo na memória de curta duração foi observado em todos os períodos e o comportamento tipo-depressivo aos 21 e aos 42 dias após a injeção. Além disso, a infusão de 6-OHDA aumentou a relação Bax/Bcl2 e os níveis proteicos de caspase 3 clivada, e diminuiu o imunoconteúdo de dopamina β -hidroxilase no LC. A disfunção na neurotransmissão da NA foi observada no LC, bulbo olfatório, córtex pré-frontal, hipocampo e estriado. Por fim, a infusão intranasal do antagonista do receptor β_3 -adrenérgico (SR59230A) e de NA foram conduzidas antes dos testes comportamentais. A administração de NA restaurou os prejuízos olfatórios, na memória de curta duração e o comportamento tipo-depressivo, sendo estas respostas bloqueadas pelo SR59230A. Estes resultados indicam que a ativação da sinalização apoptótica induzida pela 6-OHDA promove a degeneração de neurônios noradrenérgicos do LC seguida pela disfunção da neurotransmissão central da NA, podendo apresentar um papel crucial no desenvolvimento de alterações olfatórias, cognitivas e emocionais observadas em muitas doenças neurodegenerativas. Adicionalmente, a modulação dos receptores β_3 -adrenérgicos parece ser uma estratégia farmacológica útil para o tratamento desses prejuízos comportamentais.

Palavras-chave: 6-OHDA. *Locus coeruleus*. Receptor β_3 -adrenérgico.

ABSTRACT

In diverse neurodegenerative diseases is found an early and extensive degeneration of noradrenergic neurons of the *locus coeruleus* (LC), which may be associated to behavioral changes observed in these patients. In the present study, we investigated the apoptotic signaling activation and the temporal development of behavioral impairments in rats following a selective noradrenergic lesion of the LC induced by 6-hydroxydopamine (6-OHDA). The involvement of β_3 -adrenergic receptors also was evaluated in the restoring effect of noradrenaline (NA) on the behavioral impairments induced by 6-OHDA administration into the LC. For this, the inhibitor of dopamine transporter nomifensine was administered 1 hour before the stereotaxic bilateral injections of 6-OHDA (5, 10 or 20 $\mu\text{g}/\text{hem}$) into the LC. In the SHAM group was administered just vehicle. All analyses were performed at 7, 21 or 42 days after the surgery. All tested doses of 6-OHDA promoted neuronal death in all evaluated times, but only the dose of 20 $\mu\text{g}/\text{hem}$ of 6-OHDA disrupted the motor coordination and balance of rats. Based on these findings, the lowest 6-OHDA dose (5 $\mu\text{g}/\text{hem}$) was chosen for the subsequent experiments. 6-OHDA injection disrupted olfactory discrimination and long-term memory 7 days after the surgery. Short-term memory impairment was observed in all periods and depressive-like behavior at 21 and 42 days after the injection. Moreover, 6-OHDA infusion increased Bax/Bcl2 relation and cleaved caspase 3 protein levels, and decreased the dopamine β -hydroxylase immunocontent in the LC. NA neurotransmission dysfunction was observed in the LC, olfactory bulb, prefrontal cortex, hippocampus and striatum. Lastly, intranasal infusion of β_3 -adrenergic receptor antagonist (SR59230A) and NA were carried out before behavioral tests. NA administration restored the olfactory, short-term memory, and depressive-like behavior impairments, being these responses blocked by SR59230A. These results indicate that 6-OHDA-induced apoptotic signaling activation promotes noradrenergic neurons degeneration of LC followed by central neurotransmission dysfunction of NA may present a crucial role in the development of olfactory, cognitive and emotional changes observed in many neurodegenerative diseases. Additionally, the β_3 -adrenergic receptor modulation seems to be an useful pharmacological approach for treatment of these behavioral impairments.

Keywords: 6-OHDA. *Locus coeruleus*. β_3 -Adrenergic receptors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação de uma sinapse noradrenérgica	31
Figura 2 – Principais núcleos de corpos celulares noradrenérgicos e suas projeções no encéfalo de roedores	33
Figura 3 – Características morfológicas, moleculares e anatômicas podem ser promotoras da heterogeneidade funcional do LC	34
Figura 4 – Possíveis alterações funcionais e comportamentais provenientes da disfunção da transmissão noradrenérgica mediada pelo LC	39
Figura 5 – Mecanismo de ação neurotóxico da 6-OHDA	45
Figura 6 – Linhas do tempo ilustrando os dois protocolos utilizados neste capítulo para a avaliação temporal das funções motora, olfatória, cognitiva e emocional dos animais após a administração de 6-OHDA no LC	57
Figura 7 – Figura representativa das sessões de habituação, treino e testes da tarefa do reconhecimento do objeto	60
Figura 8 – Figura representativa das sessões de treino e teste da tarefa da esQUIVA passiva inibitória	61
Figura 9 – Figura representativa dos parâmetros avaliados no teste do nado forçado	62
Figura 10 – Latência para a queda dos ratos submetidos a lesão do LC por diferentes doses de 6-OHDA no teste do rotarod acelerado	68
Figura 11 – Imagens representativas da coloração por Fluoro-Jade B no LC de ratos submetidos a administração bilateral de diferentes doses de 6-OHDA	69
Figura 12 – Efeito da administração de 6-OHDA na dose de 5 µg/hem no LC sobre a discriminação olfatória de ratos avaliada 7, 21 ou 42 dias após a infusão da neurotoxina	70
Figura 13 – Efeito da infusão da dose de 5 µg/hem de 6-OHDA no LC de ratos sobre as memórias de curta e longa duração avaliadas no teste de reconhecimento do objeto 7, 21 ou 42 dias após a lesão	71
Figura 14 – Efeito da administração bilateral de 6-OHDA (5 µg/hem) no LC de ratos sobre as memórias de curta e longa duração avaliadas na tarefa da esQUIVA passiva inibitória 7, 21 ou 42 dias após a lesão	72
Figura 15 – Tempos de imobilidade, escalada e nado obtidos no teste do nado forçado de ratos infundidos bilateralmente com 6-OHDA na dose de 5 µg/hem ou veículo 7, 21 ou 42 dias após a cirurgia	73
Figura 16 – Efeito da administração bilateral de 6-OHDA (5 µg/hem) no LC de ratos sobre marcadores de degeneração noradrenérgica e da via de apoptose avaliados no LC	75

Figura 17 – Cascatas de sinalização moduladas pela interação da noradrenalina com os subtipos de receptores adrenérgicos pós-sinápticos α_1 , α_2 e β	90
Figura 18 – Linha do tempo ilustrando o protocolo utilizados neste capítulo para a avaliação do efeito da administração i.n. de noradrenalina, bem como da modulação dos receptores β_3 -adrenérgicos, frente aos prejuízos comportamentais induzidos pela administração de 6-OHDA no LC	96
Figura 19 – Representação do sistema utilizado para a administração i.n. do antagonista dos receptores β_3 -adrenérgicos SR59230A e noradrenalina em ratos	97
Figura 20 – Efeito da administração intranasal de noradrenalina e sua modulação sobre os receptores β_3 -adrenérgicos frente ao prejuízo na discriminação olfatória de ratos promovida pela lesão do LC por 6-OHDA	98
Figura 21 – Efeito da infusão intranasal de noradrenalina e sua modulação sobre os receptores β_3 -adrenérgicos frente aos prejuízos mnemônicos promovidos pela administração de 6-OHDA no LC de ratos no teste do reconhecimento do objeto	100
Figura 22 – Efeito da infusão intranasal de noradrenalina e sua modulação sobre os receptores β_3 -adrenérgicos frente aos déficits cognitivos observados na tarefa da esQUIVA passiva inibitória após a lesão do LC de ratos por 6-OHDA	101
Figura 23 – Efeito da administração intranasal de noradrenalina e sua modulação sobre os receptores β_3 -adrenérgicos frente ao comportamento tipo-depressivo induzido pela administração de 6-OHDA no LC de ratos.....	102

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Comportamentos avaliados em roedores após a administração de 6-OHDA em diferentes regiões mediadas pelas conexões noradrenérgicas provenientes do LC	50
Quadro 2 – Resumo dos resultados encontrados nas análises de monoaminas e seus metabólitos em diversas estruturas encefálicas	80
Quadro 3 – Expressão gênica semi-quantitativa dos subtipos dos receptores adrenérgicos α_1 , α_2 e β em diferentes áreas encefálicas de ratos machos adultos	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito temporal da curva dose-resposta de 6-OHDA no LC sobre a locomoção de ratos avaliada no teste do campo aberto	67
Tabela 2 – Efeito da administração bilateral de 6-OHDA (5 µg/hem) no LC frente aos parâmetros relacionados ao comportamento tipo-anedônico e tipo-ansioso 7, 21 ou 42 dias após cirurgia	74
Tabela 3 – Efeito da administração de 6-OHDA (5 µg/hem) no LC de ratos sobre os níveis de NA, DA, 5-HT e seus metabólitos no LC	76
Tabela 4 – Efeito da administração de 6-OHDA (5 µg/hem) no LC de ratos sobre os níveis de NA, DA, 5-HT e seus metabólitos no bulbo olfatório	77
Tabela 5 – Efeito da administração de 6-OHDA (5 µg/hem) no LC de ratos sobre os níveis de NA, DA, 5-HT e seus metabólitos no córtex pré-frontal	78
Tabela 6 – Efeito da administração de 6-OHDA (5 µg/hem) no LC de ratos sobre os níveis de NA, DA, 5-HT e seus metabólitos no hipocampo	78
Tabela 7 – Efeito da administração de 6-OHDA (5 µg/hem) no LC de ratos sobre os níveis de NA, DA, 5-HT e seus metabólitos na amígdala.....	79
Tabela 8 – Efeito da administração de 6-OHDA (5 µg/hem) no LC de ratos sobre os níveis de NA, DA, 5-HT e seus metabólitos no estriado.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HIAA: ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT: serotonina
6-OHDA: 6-hidroxi-dopamina
AMPC: monofosfato cíclico de adenosina (do inglês: *cyclic adenosine monophosphate*)
ANOVA: análise de variância
AP: antero-posterior
APAF-1: fator de ativação de protease associada a apoptose 1 (do inglês, *apoptotic protease activating factor 1*)
Arg: arginina
Asn: asparagina
Asp: aspartato
ATP: trifosfato de adenosina
Bax: do inglês, *Bcl2 associated protein X*
Bcl2: do inglês, *B-cell lymphoma protein 2*
BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês, *brain-derived neurotrophic factor*)
BHE: barreira hemato-encefálica
BSA: albumina proveniente do soro bovino (do inglês *bovine serum albumin*)
CEUA: Comissão de ética para o uso de animais
ChR2: canal de rodopsina 2
CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência
COMT: catecol-O-metil transferase
D.O.: densidade óptica relativa
DA: dopamina
DAG: diacilglicerol
DAT: transportador de dopamina
DBH: dopamina β-hidroxilase
DHBA: dihidroxibenzilamina
DOPAC: ácido 3,4-dihidroxifenilacético
DPX: distireno, plastificante e xileno
DSP4: *N*-(2-cloroetil)-*N*-etil-2-bromobenzilamina
DV: dorso-ventral
E.P.M.: erro padrão da média
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
eNOS/NOS-3: óxido nítrico sintase endotelial (do inglês: *endothelial nitric oxide synthase*)
EPI: esquia passiva inibitória

EROs: espécies reativas de oxigênio
FJB: Fluoro-Jade B
FND: feixe noradrenérgico dorsal
FNV: feixe noradrenérgico ventral
G_i: proteína G inibitória do tipo i
GLUT1: transportador de glicose 1 (do inglês, *glucose transporter 1*)
GMPc: monofosfato cíclico de guanosina (do inglês: *cyclic guanosine monophosphate*)
G_q: proteína G estimulatória do tipo q
G_s: proteína G estimulatória do tipo s
H₂O₂: peróxido de hidrogênio
i.n.: intranasal
i.p.: intraperitoneal
IP₃: trifosfato de inositol
LC: *locus coeruleus*
LCE: labirinto em cruz elevado
L-DOPA: dihidroxifenilalanina
LTD: depressão de longo prazo (do inglês: *long-term depression*)
LTP: potenciação de longo prazo (do inglês: *long-term potentiation*)
MAO: monoamina oxidase
MCD: memória de curta duração
MHPG: 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol
ML: médio-lateral
MLD: memória de longa duração
MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NA: noradrenalina
Na₃VO₄: ortovanadato de sódio
NaF: fluoreto de sódio
NET: transportador de noradrenalina (do inglês: *norepinephrine transporter*)
NGF: fator de crescimento do nervo (do inglês: *nerve growth factor*)
nNOS/NOS-1: óxido nítrico sintase neuronal (do inglês: *neuronal nitric oxide synthase*)
NO: óxido nítrico (do inglês: *nitric oxide*)
NPY: neuropeptídeo Y
O₂[•]: radical superóxido
OH[•]: radical hidroxil
PIP₂: fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil
PVDF: fluoreto de polivinilideno
REM: movimento rápido dos olhos (do inglês: *rapid eye movement*)

rpm: rotações por min
SDS: dodecil sulfato de sódio
Ser: serina
SNC: sistema nervoso central
SNS: sistema nervoso simpático
TDAH: transtorno do déficit de atenção e hiperatividade
TEPT: transtorno do estresse pós-traumático
TH: tirosina hidroxilase
TNF: teste do nado forçado
TrkB: receptor de tropomiosina quinase B
TRO: teste do reconhecimento do objeto
UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1 CAPÍTULO 1: A 6-HIDROXIDOPAMINA COMO UMA FERRAMENTA PARA O ESTUDO DO SISTEMA NORADRENÉRGICO MEDIADO PELO <i>LOCUS COERULEUS</i>.....	29
1.1 INTRODUÇÃO.....	29
1.1.1 Noradrenalina	29
1.1.2 A transmissão noradrenérgica mediada pelo <i>locus coeruleus</i> (LC)	32
1.1.2.1 Implicações funcionais da transmissão noradrenérgica mediada pelo LC	36
1.1.3 A Neurodegeneração do LC	38
1.1.4 Neurotoxinas	41
1.1.4.1 Neurotoxinas noradrenérgicas	42
1.1.4.1.1 <i>6-Hidroxi-dopamina (6-OHDA)</i>	44
2 CAPÍTULO 2: DISFUNÇÃO NORADRENÉRGICA E ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS PELA ADMINISTRAÇÃO DE 6-OHDA NO LC	49
2.1 INTRODUÇÃO	49
2.2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	55
2.3 OBJETIVOS	55
2.3.1 Objetivo geral	55
2.3.2 Objetivos específicos	55
2.4 MATERIAL E MÉTODOS	56
2.4.1 Animais	56
2.4.2 Protocolos experimentais	56
2.4.3 Cirurgia estereotáxica	58
2.4.4 Teste comportamentais	59
2.4.4.1 Campo aberto	59
2.4.4.2 Rotarod	59
2.4.4.3 Discriminação olfatória	59
2.4.4.4 Reconhecimento do objeto	60
2.4.4.5 Esquiva passiva inibitória	61
2.4.4.6 Nado forçado	62
2.4.4.7 Labirinto em cruz elevado	63
2.4.4.8 Preferência à sacarose	63
2.4.5 Análises neuroquímicas	64
2.4.5.1 Coloração por Fluoro-Jade B	64
2.4.5.2 <i>Western blotting</i>	64

2.4.5.3 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção eletroquímica	65
2.4.6 Análises estatísticas	66
2.5 RESULTADOS	67
2.5.1 A administração de 6-OHDA no LC induz neurodegeneração e déficit motor de maneira dose-dependente em ratos	67
2.5.2 A administração de 6-OHDA no LC provoca prejuízo olfatório, cognitivo e emocional em ratos	70
2.5.3 A administração de 6-OHDA no LC reduz o imunocontéudo de dopamina β-hidroxilase e ativa a via de morte por apoptose no LC de ratos	74
2.5.4 A administração de 6-OHDA no LC altera os níveis de monoaminas em diversas estruturas encefálicas	76
2.6 DISCUSSÃO	81
2.7 CONCLUSÕES	88
3 CAPÍTULO 3: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE NORADRENALINA FRENTE AOS PREJUÍZOS COMPORTAMENTAIS INDUZIDOS PELA ADMINISTRAÇÃO DE 6-OHDA NO LC: ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES β_3-ADRENÉRGICOS	89
3.1 INTRODUÇÃO	89
3.1.1 Receptores adrenérgicos	89
3.1.2 Receptores β_3-adrenérgicos	92
3.2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	94
3.3 OBJETIVOS	94
3.3.1 Objetivo geral	94
3.3.2 Objetivos específicos	94
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	94
3.4.1 Animais	95
3.4.2 Drogas	95
3.4.3 Protocolo experimental	95
3.4.4 Administração intranasal	96
3.4.5 Testes comportamentais	97
3.4.5.1 Discriminação olfatória	97
3.4.5.2 Reconhecimento do objeto	97
3.4.5.3 Esquiva passiva inibitória	97
3.4.5.4 Nado forçado	97
3.4.6 Análises estatísticas	97
3.5 RESULTADOS	98

3.5.1 A infusão intranasal de noradrenalina reverte os déficits olfatórios induzidos pela administração de 6-OHDA no LC através da modulação dos receptores β_3-adrenérgicos	98
3.5.2 A infusão intranasal de noradrenalina restaura os prejuízos de memória no teste de reconhecimento de objeto induzidos pela administração de 6-OHDA no LC: envolvimento dos receptores β_3-adrenérgicos	99
3.5.3 A infusão intranasal de noradrenalina não reverte o dano mnemônico causado pela administração de 6-OHDA no LC observado no teste da esquiva passiva inibitória	100
3.5.4 A infusão intranasal de noradrenalina reverte o comportamento tipo-depressivo induzido pela administração de 6-OHDA no LC: envolvimento dos receptores β_3-adrenérgicos	101
3.6 DISCUSSÃO	102
3.7 CONCLUSÕES	104
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

Esta tese está dividida em 3 capítulos. No capítulo 1 é apresentada um referencial teórico acerca da transmissão noradrenérgica mediada pelo *locus coeruleus* (LC) e das neurotoxinas capazes de interferir neste, com ênfase para a 6-hidroxidopamina (6-OHDA). O capítulo 2 versa sobre os efeitos comportamentais e neuroquímicos decorrentes da administração de 6-OHDA no LC de ratos. E por fim, no capítulo 3 é abordado o efeito restaurador da infusão intranasal (i.n.) de noradrenalina (NA) frente aos prejuízos comportamentais induzidos pela administração de 6-OHDA no LC através da modulação, ao menos em parte, dos receptores β_3 -adrenérgicos.

1 CAPÍTULO 1: A 6-HIDROXIDOPAMINA COMO UMA FERRAMENTA PARA O ESTUDO DO SISTEMA NORADRENÉRGICO MEDIADO PELO *LOCUS COERULEUS*

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Noradrenalina

A história da descoberta da NA está totalmente entrelaçada às descobertas referentes a adrenalina. Em 1894, Oliver e Schafer demonstraram, pela primeira vez, o efeito de aumento da pressão arterial de um extrato proveniente da glândula suprarrenal (OLIVER e SCHAFER, 1895). Anos mais tarde (1899), a substância presente neste extrato foi denominada “epinefrina” e, após (1901) patenteada pela indústria química, “adrenalina”. Através de suas experimentações, Thomas Elliott (1904) descreveu que existia uma semelhança impressionante entre a ação da adrenalina e a estimulação do nervo simpático, sugerindo que a adrenalina poderia ser liberada através de estímulos no sistema nervoso simpático (SNS). Esse documento ficou conhecido como a certidão de nascimento da transmissão química. Em 1910, Barger e Dale caracterizaram as ações de uma série de aminas, as quais foram denominadas de “aminas simpaticomiméticas”, devido as respostas fisiológicas similares àquelas obtidas pela estimulação do SNS. Entre estas aminas, estava a NA, a qual apresentou uma estimulação do SNS mais similar à fisiológica do que aquela obtida com a adrenalina (BARGER e DALE, 1910).

A comprovação da existência da transmissão química veio em 1921 através dos experimentos de Otto Loewi. Ele isolou dois corações de sapo e os perfundiu com uma solução fisiológica morna para que permanecessem batendo por algumas h. Então, ele estimulou os nervos

ganglionares de um dos corações e, dependendo do nervo estimulado, ele obteve uma inibição ou aceleração dos batimentos cardíacos. O segundo coração não era afetado, a não ser que ele o perfundisse com o líquido efluente do coração estimulado. Nesse caso, ele conseguia no segundo coração exatamente o mesmo efeito que no primeiro. A única explicação para este resultado é que havia alguma substância no primeiro coração, que ao ser liberada tinha o poder de agir sobre a sinapse neuromuscular do mesmo sistema no segundo coração. Loewi batizou o evento como "transmissão neuro-humoral" e a substância inibitória de *Vagusstoff* e a estimulante de *Acceleransstoff* (RUBIN, 2007).

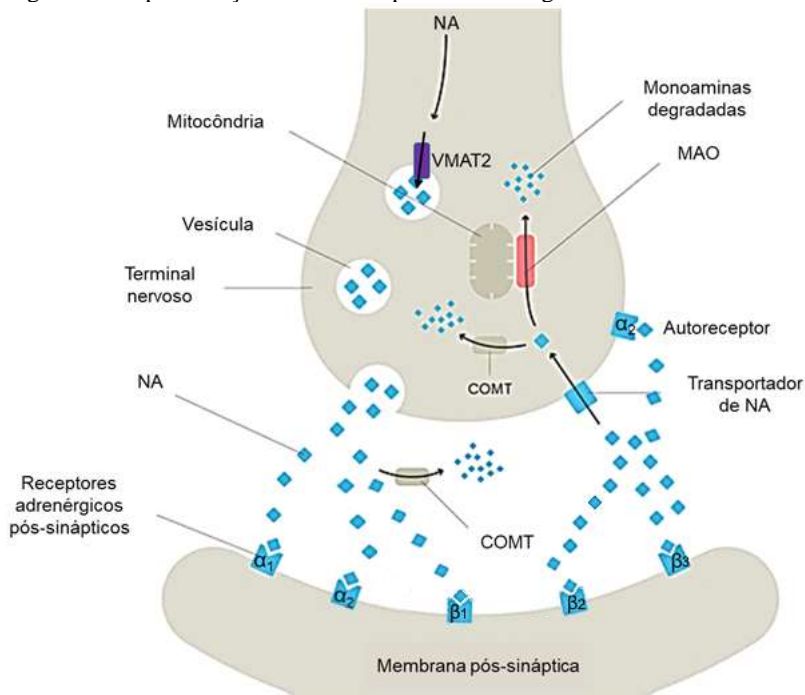
Durante a década de 1930, alguns cientistas mencionaram a possibilidade da NA ser o neurotransmissor liberado nos terminais do SNS. Entretanto, somente em 1945 que a NA foi caracterizada como tal neurotransmissor pelo pesquisador sueco Ulf von Euler (EULER, 1945). Para isso, ele utilizou ferramentas farmacológicas e químicas que permitiram identificar a NA em extratos de nervos adrenérgicos de diferentes espécies animais. Anos depois, Marthe Vogt demonstrou que a NA estava presente no sistema nervoso central (SNC) além do sistema vasomotor (VOGT, 1954).

Atualmente, a NA é reconhecida como um dos principais neurotransmissores do SNC. Essa monoamina é sintetizada a partir do aminoácido aromático L-tirosina, que é primeiramente hidroxilado a dihidroxifenilalanina (L-DOPA) pela catálise enzimática da tirosina hidroxilase (TH), que por sua vez é convertida em dopamina (DA) pela enzima DOPA descarboxilase. Pela ação da enzima dopamina β -hidroxilase (DBH), a DA é oxidada formando a NA. Ainda, em regiões contendo a enzima feniletanolamina-*N*-metiltransferase, a NA pode ser metilada levando a síntese de adrenalina (MCMILLAN *et al.*, 2011).

Uma vez sintetizada, a NA é armazenada em vesículas e liberada na fenda sináptica por exocitose, onde poderá interagir com os diferentes subtipos de receptores adrenérgicos localizados no neurônio pós-sináptico: α_1 (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}); α_2 (α_{2A} , α_{2B} , α_{2C}) ou β (β_1 , β_2 , β_3) (a descrição detalhada destes receptores é apresentada na seção 3.1). Nos terminais nervosos pré-sinápticos são encontrados, principalmente, os receptores adrenérgicos do subtipo α_2 , os quais atuam sobre a inibição da liberação de NA e da frequência de disparo neuronal. Uma vez na fenda sináptica, a NA pode ser recaptada para o neurônio pré-sináptico pelo transportador de NA (NET, do inglês *norepinephrine transporter*), ser degradada extracelularmente pela enzima catecol-O-metil transferase (COMT) e intracelularmente pela COMT e pela monoamina oxidase

(MAO), ou ser novamente vesiculada e estocada (SZABADI, 2013) (Fig. 1).

Figura 1 – Representação de uma sinapse noradrenérgica.



Legenda: Após ser sintetizada, vesiculada e liberada na fenda sináptica, a noradrenalina pode interagir com os receptores adrenérgicos pré- e pós-sinápticos, ser recaptada pelo transportador de noradrenalina ou ser degradada intra ou extracelularmente pelas enzimas catecol-O-metil transferase (COMT) e monoamina oxidase (MAO). NA = noradrenalina. VMAT2 = transportador vesicular de monoaminas 2.

Fonte: Adaptado de <http://institute.progress.im/en/content/normal-process-noradrenaline-synaptic-activity>.

Além de seu papel como neurotransmissor, a NA possui outras funções importantes no SNC. Esta monoamina reduz a neurotoxicidade induzida por estímulos inflamatórios e excitotóxicos (MADRIGAL, FEINSTEIN e DELLO RUSSO, 2005; MADRIGAL *et al.*, 2007), bem como o dano neuronal causado por espécies reativas de oxigênio (EROs) (TROADEC *et al.*, 2001). As ações anti-inflamatórias da NA parecem ser mediadas, principalmente, pela supressão do fator de

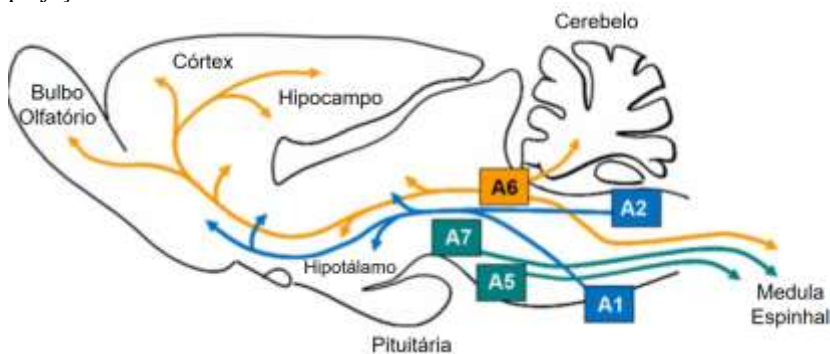
necrose tumoral κ (NF κ B) (FEINSTEIN, KALININ e BRAUN, 2016). A NA confere também suporte neurotrófico aos neurônios através da ativação do receptor de tropomiosina quinase B (TrkB), o receptor canônico para o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (LIU, YE e WEINSHENKER, 2015). Os efeitos neuromodulatórios da NA também facilitam a plasticidade sináptica, incluindo a potenciação de longo prazo (LTP) (BENARROCH, 2009). Em relação a homeostase energética, a NA é essencial para a regulação da glicólise aeróbica astrocitária, principalmente através da modulação dos β -receptores (DIENEL e CRUZ, 2016).

1.1.2 A transmissão noradrenérgica mediada pelo *locus coeruleus* (LC)

Anatomicamente, o sistema noradrenérgico central é constituído por sete grupos de corpos celulares noradrenérgicos esparsos (A1 a A7) localizados no tronco encefálico (MOORE, 1982). Entre eles, o grupo A6, denominado de LC, destaca-se por ser o maior núcleo noradrenérgico do cérebro e por possuir axônios que se projetam para quase todas as regiões encefálicas, com destaque para o bulbo olfatório, córtex cerebral, hipocampo e cerebelo que recebem projeções noradrenérgicas provenientes quase que exclusivamente do LC (ITOI, OHARA e KOBAYASHI, 2013) (Fig. 2). O LC constitui uma região muito pequena localizada nas faces laterais do IV ventrículo, no tegmento pontino dorsolateral, que contém aproximadamente quinze mil corpos neuronais noradrenérgicos por hemisfério em humanos. Em roedores, este número é estimado em 1500 neurônios em camundongos adultos e 3600 em ratos adultos (FEINSTEIN, KALININ e BRAUN, 2016).

O LC está presente em todos os mamíferos e representa a principal fonte de produção de NA no SNC (ASTON-JONES e COHEN, 2005). Sabe-se que, por meio de suas projeções, o LC modula o circuito cortical, subcortical e do tronco cerebral. Por outro lado, diversos sistemas possuem aferências projetadas para o LC influenciando na sua atividade neuronal (BENARROCH, 2009). Embora há décadas se busque compreender a anatomia e as funções do LC, permanece a questão de como um núcleo tão pequeno e aparentemente homogêneo responde a estímulos sensoriais diversos e modula a atividade neuronal de várias áreas encefálicas, gerando uma série de consequências comportamentais (SCHWARZ e LUO, 2015).

Figura 2 – Principais núcleos de corpos celulares noradrenérgicos e suas projeções no encéfalo de roedores.



Legenda: O núcleo A6 representa o *locus coeruleus* e envia axônios para quase todas as regiões cerebrais. Os núcleos medulares, A1 (localizado na formação reticular ventrolateral) e A2 (localizado no núcleo do trato solitário), compõem as principais fontes de noradrenalina para o hipotálamo, enquanto que os núcleos A5, A6 e A7 fazem a inervação da medula espinhal.

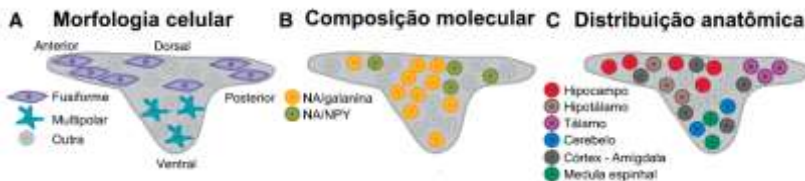
Fonte: Adaptado de Itoi, Ohara e Kobayashi, 2013

Classicamente, o LC é visto como uma população celular homogênea. Isto deve-se as imunomarcações dos neurônios DBH positivos realizados por Swanson e Hartman (1975), que permitiram detectar com precisão a localização destes e de suas extensivas projeções axonais, além de confirmar que, no geral, todos os neurônios do LC são capazes de sintetizar NA. Entretanto, diversos estudos têm sugerido que, embora todos os neurônios do LC possam conter NA (uma vez que possuem a enzima DBH), outras características promoveriam sua heterogeneidade funcional (LOUGHLIN, FOOTE e BLOOM, 1986; CHANDLER, GAO e WATERHOUSE, 2014; SCHWARZ *et al.*, 2015).

A administração de traçadores retrógrados em regiões encefálicas que recebem aferências do LC trouxe avanço importante para esta área, indicando que determinadas projeções do LC são topograficamente organizadas (Fig. 3) (SCHWARZ e LUO, 2015). Por exemplo, existem pelo menos dois tipos de células positivas para NA no LC, células grandes chamadas de multipolares ($\approx 35 \mu\text{m}$) e células menores denominadas fusiformes ($\approx 20 \mu\text{m}$) (GRZANNA e MOLLIVER, 1980). Como pode ser observado na Fig. 3A, essas células estão organizadas de forma topográfica, ou seja, as multipolares estão localizadas na porção ventral enquanto que as fusiformes se situam na região dorsal do LC

(LOUGHLIN, FOOTE e BLOOM, 1986). Além disso, através da administração de uma sonda retrógrada ligada a uma peroxidase, foi observado que certas regiões do LC são organizadas de acordo com a área encefálica que inervam (Fig. 3C). Neste sentido, encontrou-se que as projeções hipocampais estão localizadas na região dorsal do LC, enquanto que as cerebelares e espinais se encontram mais ventralmente, e o tálamo recebe axônios que partem da parte posterior do LC. Por outro lado, o córtex e a amígdala não apresentam projeções organizadas topograficamente (MASON e FIBIGER, 1979; SCHWARZ *et al.*, 2015).

Figura 3 – Características morfológicas, moleculares e anatômicas podem ser promotoras da heterogeneidade funcional do LC.



Legenda: Representação da organização topográfica do LC quanto a (A) morfologia de células noradrenalina positivas, (B) coexpressão e coliberação de substâncias, e (C) distribuição de suas projeções axonais. NA = noradrenalina; NPY = neuropeptídeo Y.

Fonte: Modificado de Schwarz e Luo (2015).

Além disso, as diferenças na funcionalidade de neurônios do LC também podem estar relacionadas às substâncias produzidas e liberadas por eles. Por exemplo, 80% das projeções neuronais do LC coexpressam o neuropeptídeo galanina junto com a NA, sendo estas preferencialmente localizadas nas sub-regiões dorsal e central; enquanto que a porção dorsal apresenta em torno de 20% de neurônios que produzem o neuropeptídeo Y (NPY), além da NA (HOLETS *et al.*, 1988) (Fig. 3B). Embora a relevância funcional dessa coexpressão e coliberação ainda não esteja clara, especula-se que estes neuropeptídeos poderiam modular a ação da NA em algumas regiões (TSUDA, YOKOO e GOLDSTEIN, 1989). A coliberação de DA e NA pelas projeções axonais do LC que inervam o córtex pré-frontal medial e o hipocampo dorsal também vem sendo demonstrada e estudada em relação a funções cognitivas (DEVOTO e FLORE, 2006; KEMPADOO *et al.*, 2016).

A relação entre a funcionalidade e a topografia das projeções do LC começaram a ser elucidadas recentemente a partir de um estudo utilizando agentes virais e a técnica da optogenética (HICKEY *et al.*, 2014). Buscando a ativação de populações neuronais do LC, ratos receberam a administração de um lentivírus expressando o canal de rodopsina 2 (ChR2) controlado por um promotor catecolaminérgico no LC. Respostas antinociceptivas e pró-nociceptivas frente a um estímulo térmico foram observadas quando estes neurônios eram opticamente ativados. Análises histológicas demonstraram que os animais que apresentaram respostas antinociceptivas possuíam maior número de neurônios ChR2 positivos localizados na região ventral do LC, enquanto que as respostas pró-nociceptivas foram relacionadas com um maior número de neurônios ChR2 positivos na parte dorsal do LC (HICKEY *et al.*, 2014). Em um estudo recente deste mesmo grupo de pesquisa, foi caracterizado um marcador retrógrado para o sistema noradrenérgico, manipulável por optogenética, que representa uma nova ferramenta útil para a investigação das conexões do sistema noradrenérgico mediado pelo LC (LI *et al.*, 2016).

Entretanto, os estudos topográficos são focados apenas no corpo celular do neurônio, sem esclarecerem como as porções axonais se comportam em relação as estruturas aferentes. Com a administração de dois diferentes traçadores retrógrados em duas regiões cerebrais distintas (ex: hipocampo e tálamo), encontrou-se ambos os traçadores em grande parte do LC, explicando a ideia de colateralização destes neurônios através do cérebro (ROOM, POSTEMA e KORF, 1981).

Por outro lado, alguns estudos anatômicos sugerem heterogeneidade anatômica e funcional de grupos neuronais do LC (UEMATSU, TAN e JOHANSEN, 2015). Chandler, Gao e Waterhouse (2014) demonstraram um perfil molecular discriminatório entre as projeções do LC direcionadas para diferentes áreas corticais. As projeções do LC direcionadas para sub-regiões do córtex pré-frontal – córtex orbitofrontal, córtex pré-frontal medial e córtex cingulado anterior – apresentam maior expressão de proteínas relacionadas à neurotransmissão glutamatérgica e excitabilidade do que aquelas projetadas para o córtex motor (CHANDLER, GAO e WATERHOUSE, 2014). Estes achados dão suporte para a hipótese de subpopulações neuronais. Com o uso de adenovírus canino tipo 2, conhecido por infectar neurônios via terminais axonais, Schwarz *et al.* (2015) encontraram que a densidade de axônios provenientes do LC não era completamente homogênea em determinadas regiões do cérebro, sugerindo que apesar de haver amplas colateralizações axonais, parece

que também há subpopulações de neurônios do LC inervando certos alvos de forma mais seletiva.

Além disso, diversos sistemas projetam-se para os neurônios do LC, modulando-os através de uma ampla variedade de receptores expressos para uma série de neuromoduladores, como trifosfato de adenosina (ATP), substância P, angiotensina-2, acetilcolina, a própria NA, influenciando na resposta individual de cada neurônio a estímulos similares (FEINSTEIN, KALININ e BRAUN, 2016). Atualmente, sabe-se que 111 regiões encefálicas estimulam diretamente o LC, sendo estimado que cada neurônio noradrenérgico do LC recebe de 9 a 15 aferências de áreas encefálicas diferentes, indicando que suas respostas aos estímulos são altamente integrativas (SCHWARZ *et al.*, 2015).

Por outro lado, evidências sugerem que o LC modula a função de diversas regiões encefálicas através da liberação de NA e, possivelmente, de outros neuromoduladores. Essa liberação ocorre através de suas projeções axonais, as quais parecem ser tanto provenientes de uma subpopulação específica como de colateralizações dessas fibras. Desta forma, embora seja uma estrutura pequena com um número reduzido de corpos neuronais, o LC modula uma variedade de funções, incluindo o estado de sono e vigília, a atenção e a memória, informações sensoriais e resposta ao estresse (FEINSTEIN, KALININ e BRAUN, 2016).

1.1.2.1 Implicações funcionais da transmissão noradrenérgica mediada pelo LC

Há décadas os neurocientistas buscam compreender as mais diversas funções desempenhadas pela NA no SNC. Sabe-se que as alterações na atividade do LC antecipam alterações comportamentais. Para isso, os neurônios provenientes do LC disparam de maneira tônica ou fásica (ASTON-JONES e COHEN, 2005; BENARROCH, 2009). A atividade tônica, caracterizada por uma taxa de disparo sustentada e altamente regular, predomina em respostas a estímulos ambientais que geram comportamento exploratório, bem como durante a vigília. Durante o sono de ondas lentas ocorre uma redução na atividade tônica, que cessa ao longo do sono REM. De forma similar, o processo atencional e a realização de tarefas de precisão reduzem a taxa de disparo dos neurônios do LC de tônica para moderada, induzindo respostas fásicas aos estímulos relevantes (ASTON-JONES e COHEN, 2005; ITOI, OHARA e KOBAYASHI, 2013).

Evidências demonstram que os efeitos da NA, além de complexos, são dependentes de sua concentração sináptica, viabilidade e afinidade aos subtipos de receptores na região inervada. Contudo, define-se que seu efeito primário é reduzir a atividade basal dos neurônios alvos, aumentando a responsividade destes a estímulos novos (BENARROCH, 2009). Com isso, a melhora da eficácia da transmissão de sinapses inibitórias e excitatórias se apresenta como uma das funções fisiológicas mais proeminentes da NA (ASTON-JONES e WATERHOUSE, 2016).

Uma função mais especializada dos neurônios do LC envolve a modulação de neurônios sensoriais (BORODOVITSYNA, FLAMINI e CHANDLER, 2017). Durante o despertar, os neurônios sensoriais primários disparam simultaneamente por um curto período em resposta a todos os estímulos recebidos, principalmente os novos ou mais proeminentes. Efeitos sutis da NA sobre a excitabilidade celular dos circuitos somatossensoriais, auditivos, olfatórios e visuais alteram drasticamente as respostas destes aos estímulos sensoriais. A NA ainda aumenta a precisão temporal entre o estímulo excitatório aferente e a resposta pós-sináptica, melhorando a sincronicidade desses circuitos (ASTON-JONES e COHEN, 2005).

A transmissão noradrenérgica mediada pelo LC também medeia o estado de vigília, excitação, sono REM, ritmo circadiano e dor através da inervação de estruturas subcorticais e do tronco cerebral (ASTON-JONES e WATERHOUSE, 2016). A liberação de NA para o circuito tálamo cortical regula o despertar e repassa a informação sensorial para o córtex cerebral (MCCORMICK, 1992). Por outro lado, o sono REM é inibido pela liberação de NA no tegmento pontino lateral e na substância cinzenta periaquedutal ventrolateral. Somado a isso, neurônios do LC são estimulados pela orexina proveniente de neurônios do hipotálamo lateral, evitando transições abruptas entre o estado de vigília e de sono (FULLER, SAPER e LU, 2007).

Aston-Jones e Cohen (2005) propuseram que estes estados de transição da atividade neuronal do LC são controlados por projeções dos córtices cingulado anterior e orbitofrontal para o LC. Por sua vez, o córtex pré-frontal medeia a formação da memória de trabalho, atenção e o aprendizado, e a habilidade de explorar e reconhecer uma novidade (VERMEIREN e DE DEYN, 2017). A redução rápida da atividade do LC – tônica para fásica – a partir de uma situação exploratória para uma tarefa direcionada facilita a atenção, o foco e a acurácia da performance (DAYAN e YU, 2006). Esta resposta a uma alteração no curso da ação e redirecionamento da atenção envolve as conexões entre as regiões

frontoparietal dorsal e ventral, que evidenciam o evento de potencial significância comportamental (CORBETTA, PATEL e SHULMAN, 2008).

Assim como no córtex pré-frontal, a NA liberada no hipocampo e amígdala é particularmente importante para a manutenção de funções cognitivas. A liberação de NA no hipocampo e na amígdala é requerida para a consolidação e evocação de memórias contextuais (BORODOVITSYNA, FLAMINI e CHANDLER, 2017). O armazenamento de memórias pelo hipocampo pode ser modificado pela ativação do LC e subsequente facilitação da sua plasticidade a longo prazo, na forma de depressão de longo prazo (LTD) e LTP (HANSEN, 2017). Além disso, uma região do hipocampo denominada giro denteado é fortemente modulada pela NA em situações que exigem a discriminação de padrões/experiências similares (STARK, YASSA e STARK, 2010), e, recentemente, tem sido demonstrado que a coliberação de DA e NA pelo LC no hipocampo dorsal está envolvida no aprendizado e formação de memórias (KEMPADOO *et al.*, 2016).

Já as memórias que envolvem contextos emocionais tendem a ser bem lembradas, provavelmente devido a modulação noradrenérgica na amígdala basolateral durante a fase de consolidação da memória (ITOI, OHARA e KOBAYASHI, 2013). Evidências também apontam o envolvimento da circuitaria LC-amígdala na evocação desse tipo de memória (STERPENICH *et al.*, 2006), sugerindo o envolvimento desta no processamento de informações emocionais e memórias de longa duração (MLD) (ITOI, OHARA e KOBAYASHI, 2013).

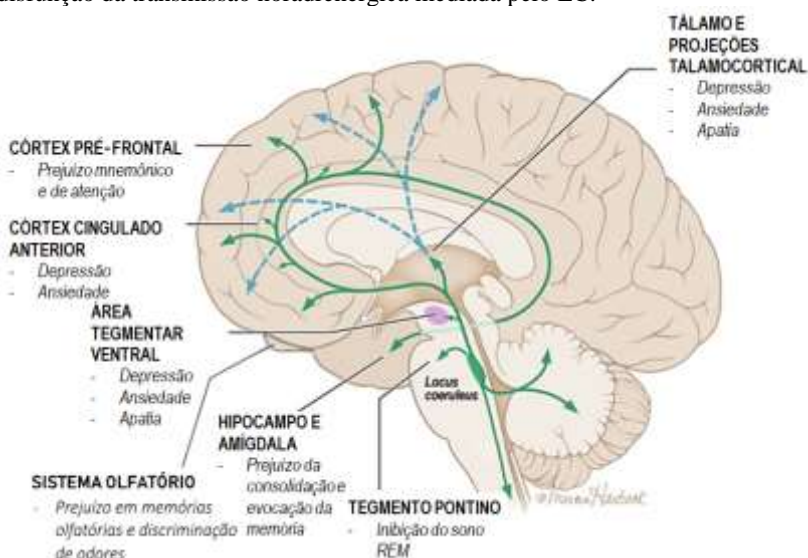
A transmissão noradrenérgica mediada pelo LC também modula diversas respostas comportamentais relacionadas ao medo, à ansiedade e à depressão através da liberação de NA na amígdala, no hipocampo e no córtex pré-frontal (ITOI, OHARA e KOBAYASHI, 2013; ESPAY, LEWITT e KAUFMANN, 2014). Somado a isso, a área tegmentar ventral e a substância *nigra* também respondem a estes comportamentos através da liberação de DA para o estriado, um processo responsivo a NA proveniente do LC (ESPAY, LEWITT e KAUFMANN, 2014).

A transmissão noradrenérgica mediada pelo LC, ainda, contribui para a modulação da dor (BENARROCH, 2009; VERMEIREN e DE DEYN, 2017). Juntamente com as projeções dos núcleos da rafe, o LC inibe as respostas nociceptivas e facilita a atividade pré-motora dos motoneurônios da medula espinhal, os quais recebem informações do neocórtex, estriado e circuitos cerebelares (BRAAK *et al.*, 2000).

1.1.3 A neurodegeneração do *locus coeruleus*

Como exposto na seção anterior, a liberação de NA pelo LC em diversas áreas encefálicas modula uma gama de funções, tais como o processamento sensorial, o estado de vigília e sono, cognição e componentes emocionais (BENARROCH, 2009). Portanto, uma redução e/ou disfunção na liberação de NA pelo LC nestas regiões poderiam estar associadas a alterações funcionais e comportamentais (ESPAY, LEWITT e KAUFMANN, 2014), como ilustrado na Fig. 4.

Figura 4 – Possíveis alterações funcionais e comportamentais provenientes da disfunção da transmissão noradrenérgica mediada pelo LC.



Fonte: Adaptado de Espay, Lewitt e Kaufmann (2014)

Corroborando com tal afirmação, muitas doenças e transtornos do SNC têm sido relacionados a disfunções da transmissão noradrenérgica mediada pelo LC, como a doença de Huntington, a síndrome de Down, alguns transtornos de ansiedade, transtorno de humor (depressão maior e transtorno bipolar), esquizofrenia, o transtorno do estresse pós-traumático (TEPT), o transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), a esclerose múltipla, bem como as disfunções do sono e do despertar (BENARROCH, 2009; FEINSTEIN, KALININ e BRAUN, 2016). Além disso, destaca-se as duas doenças neurodegenerativas de maior prevalência, a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson, que

apresentam a neurodegeneração do LC como característica neuropatológica em comum (ZAROW *et al.*, 2003; MCMILLAN *et al.*, 2011).

Neste sentido, observa-se que portadores da doença de Huntington apresentam um número reduzido de neurônios noradrenérgicos no LC, bem como um menor comprimento rostro-caudal (ZWEIG *et al.*, 1992). A síndrome de Down é caracterizada por degeneração precoce e dependente da idade dos neurônios do LC associada a conseqüente redução dos níveis de NA no hipocampo (DAS *et al.*, 2014). Na depressão maior, há evidências de uma atividade glutamatérgica elevada no LC (CHANDLEY *et al.*, 2013), enquanto que pacientes com transtorno bipolar apresentaram um menor número de neurônios positivos para a enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS/NOS-1) nesta estrutura (BIELAU *et al.*, 2012). Pacientes com TEPT e TDAH apresentam uma redução do NET no LC, que foram correlacionados com a severidade dos sintomas de ansiedade e aumento da idade, respectivamente (PIETRZAK *et al.*, 2013; VANICEK *et al.*, 2014). Polak, Kalinin e Feinstein (2011) reportaram a presença de dano neuronal no LC em portadores de esclerose múltipla, com a presença de ativação glial e redução dos níveis de NA no LC.

De especial importância, a presença de dano neuronal do LC nas doenças neurodegenerativas vem sendo reportada há mais de 50 anos, com diversas evidências que suportam a disfunção noradrenérgica desta estrutura como um evento desencadeante e/ou modulador da progressão do processo degenerativo (PAMPHLETT, 2014). Dentre elas, encontram-se: (i) regiões anatômicas, células e sistemas de neurotransmissão distintos que são acometidos por estas doenças podem ser afetados pela redução da inervação noradrenérgica proveniente do LC; (ii) sintomas comuns a uma série de doenças neurodegenerativas, como prejuízos cognitivos, olfatórios e distúrbios de emocionalidade, os quais são modulados pelo sistema noradrenérgico; (iii) a degeneração do LC na doença de Parkinson precede o aparecimento de marcadores neuropatológicos na substância *nigra pars compacta* (SNpc), região vastamente afetada nesta doença; (iv) a degeneração do LC é apontada como o gatilho para a doença de Alzheimer, apresentando degeneração precoce em relação a estruturas colinérgicas, como o núcleo basal de Meynert; (v) a redução e/ou disfunção da sinalização noradrenérgica nas células gliais reduz o suporte energético e trófico às células neuronais, podendo exacerbar o processo patológico (ZAROW *et al.*, 2003; DICKSON *et al.*, 2008; GUERIN *et al.*, 2008; PAMPHLETT, 2014;

UEMATSU, TAN e JOHANSEN, 2015; FEINSTEIN, KALININ e BRAUN, 2016).

Embora seja descrita a degeneração dos neurônios do LC em doenças neurodegenerativas, permanecem pouco investigadas as possíveis consequências neuropatológicas e manifestações clínicas provenientes dessa lesão. Diante do exposto, a transmissão noradrenérgica mediada pelo LC apresenta-se como um alvo importante tanto para o estudo da neurobiologia das doenças neurodegenerativas e seus sintomas, quanto para a investigação de novas abordagens terapêuticas. Na pesquisa básica, diversas neurotoxinas são utilizadas como ferramentas úteis para melhor compreensão dessas questões.

1.1.4 Neurotoxinas

As neurotoxinas são substâncias químicas utilizadas na pesquisa básica com o intuito de modelar doenças neurológicas, compreender circuitos neuronais e/ou elucidar processos intracelulares e extracelulares relacionados à apoptose ou à necrose neuronal. Estas substâncias apresentam como propriedade a indução de dano ou morte neuronal, *in vivo* ou *in vitro*, com certa especificidade para um determinado fenótipo ou alvo neuronal (receptor, canal, enzima) (SEGURA AGUILAR e KOSTRZEWA, 2004).

Em um contexto histórico, as neurotoxinas tornaram-se importantes a partir da década de 1940 para o estudo das conexões neurais no cérebro. Até aquele momento, as pesquisas que buscavam compreender as funções nervosas concentravam-se na destruição cirúrgica de nervos ou axônios localizados no sistema nervoso periférico, como descrito na monografia “*Autonomic and neuro-effector systems*” de autoria dos fisiologistas Walter Bradford Cannon e Arturo Rosenblueth (CANNON e ROSENBLUETH, 1937). No entanto, ao se tentar estudar os grupos neuronais específicos do encéfalo, as técnicas cirúrgicas e de lesão eletrolítica apresentaram-se insatisfatórias por serem pouco seletivas.

A descoberta da primeira neurotoxina seletiva ocorreu na década de 1950, sendo publicada em 1960 (LEVI-MONTALCINI e BOOKER, 1960), após uma série de estudos de Levi-Moltacini e colaboradores. Durante anos estes pesquisadores investigaram as razões das fibras nervosas sensoriais de embriões de galinhas apresentarem um crescimento extensivo após serem transplantadas com sarcoma de roedores, obtendo evidências do envolvimento do fator de crescimento do nervo (NGF, do inglês *nerve growth factor*). Para comprovar tal

hipótese, eles demonstraram que adicionando uma imunotoxina para o NGF, o crescimento e desenvolvimento de tais fibras eram suprimidos (para revisão ver Levi-Montalcini (1987)).

Em 1959, através do estudo da conversão enzimática da DA a NA, Senoh *et al.* (1959) descobriram e isolaram um metabólito da DA, a 6-OHDA. A fim de elucidar os efeitos da 6-OHDA, Porter, Totaro e Stone (1963) administraram intraperitonealmente (i.p.) 6-OHDA em camundongos, observando uma depleção de NA no coração destes animais. Poucos anos depois, Thoenen e Tranzer sintetizaram e testaram uma série de análogos da NA, incluindo a 6-OHDA, visando encontrar um falso neurotransmissor para visualização de neurônios noradrenérgicos em microscopia eletrônica. Através desta investigação, Thoenen e Tranzer descobriram ao acaso que a 6-OHDA provoca a morte de neurônios dos terminais simpáticos (noradrenérgicos) (THOENEN e TRANZER, 1968a; b), introduzindo na neurobiologia o conceito de degeneração química. A partir das descobertas de Thoenen e Tranzer, as investigações sobre as propriedades da 6-OHDA cresceram exponencialmente. Em 1968, Ungerstedt observou a neurodegeneração noradrenérgica e dopaminérgica após a injeção intracerebral de 6-OHDA em ratos (UNGERSTEDT, 1968), demonstrando que o efeito relativamente seletivo da 6-OHDA sobre neurônios noradrenérgicos era perdido quando esta neurotoxina era administrada diretamente no cérebro.

A década seguinte (1970) foi marcada pelas descobertas de Olney acerca das toxinas excitotóxicas – como os aminoácidos excitatórios glutamato e aspartato (OLNEY e SHARPE, 1969; OLNEY, HO e RHEE, 1971); seguida pela caracterização da 5,6- e 5,7-hidroxitriptamina como neurotoxinas seletivas para o sistema serotoninérgico (BAUMGARTEN *et al.*, 1971; BAUMGARTEN e LACHENMAYER, 1972); e do *N*-(2-cloroetil)-*N*-etil-2-bromobenzilamina (DSP4) para o sistema noradrenérgico (ROSS, 1976). No entanto, a descoberta de maior impacto na área de neurotoxinas veio no início da década de 1980, quando jovens apresentaram parkinsonismo irreversível após a administração acidental de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). Em seguida, caracterizou-se o MPTP como uma toxina seletiva para os neurônios dopaminérgicos, emergindo o debate sobre os possíveis fatores de risco ambientais relacionados às doenças neurodegenerativas (LANGSTON *et al.*, 1983).

1.1.4.1 Neurotoxinas noradrenérgicas

Como mencionado anteriormente, as neurotoxinas são utilizadas para modelar doenças neurológicas, compreender circuitos neuronais e/ou elucidar processos intracelulares e extracelulares que ocorrem durante a morte de uma determinada população neuronal (SEGURA AGUILAR e KOSTRZEWA, 2004). Neste sentido, as disfunções na transmissão noradrenérgica mediada pelo LC podem ser estudadas em roedores através da utilização de neurotoxinas, como o DSP4, a imunotoxina anti-DBH saporina e a 6-OHDA (FEINSTEIN, KALININ e BRAUN, 2016).

O DSP4 vem sendo amplamente utilizado devido a sua propriedade de ultrapassar a barreira hematoencefálica (BHE), podendo assim ser administrado sistemicamente, bem como pela sua neurotoxicidade preferencial pelas conexões noradrenérgicas provenientes do LC. Uma vez no cérebro, o DSP4 é rapidamente inativado a um derivado hidroxilado (DSP4OH) sendo transportado para dentro dos terminais nervosos pelo NET. Embora seja utilizado há muitos anos, os mecanismos neurotóxicos intracelulares do DSP4 permanecem desconhecidos, especulando-se apenas que ocorra uma redução dos níveis de ATP (ROSS e STENFORS, 2015).

O primeiro sinal de toxicidade desta neurotoxina está relacionado à redução dos níveis de NA nos terminais nervosos e axônios apenas horas após o tratamento com o DSP4. A diminuição do imunoconteúdo de DBH começa a ser detectada em torno de 4 dias após a sua administração, não sendo mais visualizados axônios noradrenérgicos, aproximadamente, após 2 semanas. Estudos utilizando o radioisótopo ^3H -noradrenalina demonstraram que o DSP4 bloqueia o transportador dessa monoamina (ROSS, 1976; ROSS e RENYL, 1976). No entanto, o DSP4 apresenta-se como uma neurotoxina útil somente para a lesão de axônios e terminais noradrenérgicos do LC, uma vez que os corpos celulares permanecem intactos por longos períodos após a sua administração (FRITSCHY e GRZANNA, 1991). Somado a isso, apesar de possuir efeitos relativamente curtos sobre o SNS, estes não podem ser negligenciados (JONSSON *et al.*, 1981).

Em contraste, a imunotoxina anti-DBH saporina – construída a partir de um anticorpo monoclonal contra a enzima DBH e de uma saporina, uma proteína inibidora de ribossomos, é capaz de induzir a morte de corpos neuronais noradrenérgicos (PICKLO *et al.*, 1994). Uma vez que a enzima DBH é expressa apenas por neurônios adrenérgicos e noradrenérgicos, esta imunotoxina pode ser captada por estes terminais axonais, sofrendo a seguir transporte retrógrado (WILEY e KLINE, 2000). Apesar de possuir uma ação preferencial sobre os neurônios do

LC, a administração de anti-DBH saporina induz diferentes graus de morte neuronal em diferentes núcleos noradrenérgicos, como o A1, A2, A5 e A7, sendo a extensão das lesões dependente da dose utilizada (WRENN *et al.*, 1996).

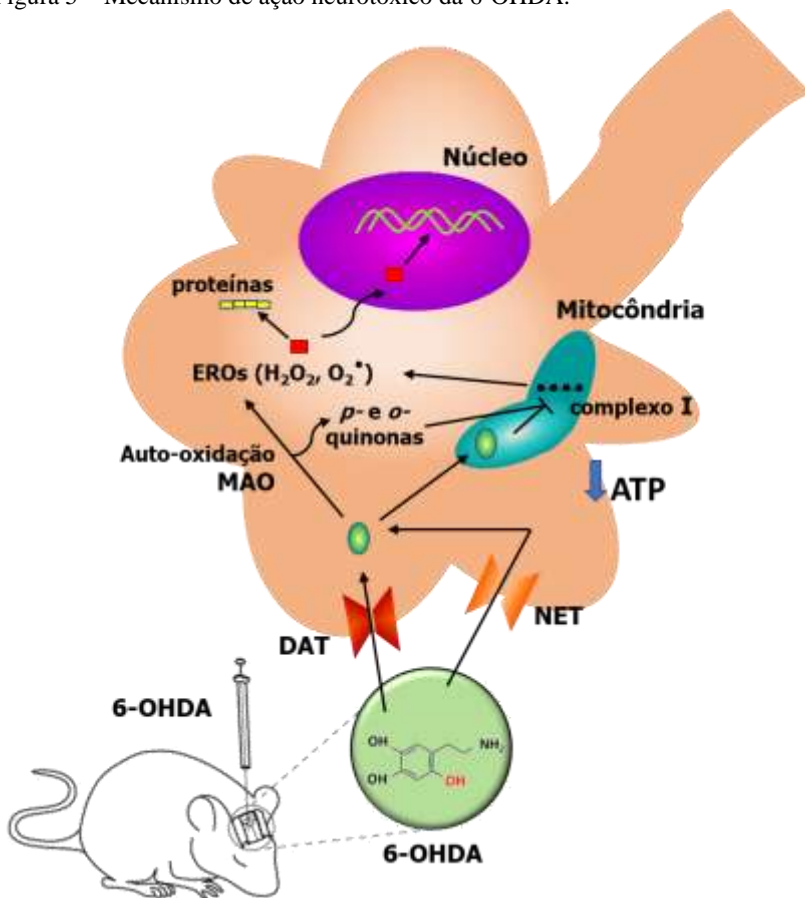
Outro modelo imunotóxico foi recentemente desenvolvido por Itoi *et al.* (2011), com o objetivo de lesionar de forma seletiva os neurônios noradrenérgicos do LC. Primeiramente, utiliza-se camundongos transgênicos para uma proteína de membrana, a subunidade α do receptor de interleucina-2 humana (Tac), sob o promotor DBH. Em seguida, é realizada a microinjeção no LC da imunotoxina recombinante anti-Tac(Fv)-PE38, que é uma proteína composta por um fragmento Fv do anticorpo monoclonal anti-Tac e uma forma da exotoxina de *Pseudomonas*. Os neurônios noradrenérgicos do LC são completamente lesionados, sem haver a possibilidade de regeneração (ITOI *et al.*, 2011).

1.1.4.1.1 6-Hidroxidopamina (6-OHDA)

O mecanismo de ação neurotóxico da 6-OHDA está intimamente associado à indução do estresse oxidativo (Fig. 5). Por ser análoga a DA e a NA, a 6-OHDA possui afinidade pelos transportadores catecolaminérgicos sendo captada por estes neurônios. Uma vez dentro da célula, a 6-OHDA produz espécies citotóxicas através de sua metabolização por mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos (SIMOLA, MORELLI e CARTA, 2007).

A 6-OHDA sofre auto-oxidação, formando EROs e *p*- e *o*-quinonas, estas últimas interagem com grupamentos nucleofílicos de macromoléculas (SH, NH₂-, OH-), desnaturando-as (SANER e THOENEN, 1971). A metabolização enzimática da 6-OHDA é catalisada pela MAO, formando peróxido de hidrogênio (H₂O₂) que, além de sua ação citotóxica *per se*, induz a formação de outras EROs, como o radical superóxido (O₂[•]) e hidroxil (OH[•]) (COHEN e HEIKKILA, 1974). Somado a esses eventos, tanto as quinonas quanto a 6-OHDA podem inibir a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, induzindo déficit energético celular (GLINKA e YODIM, 1995). Como consequência à perda do equilíbrio oxidativo, ocorre a liberação de mediadores pró-inflamatórios pelas células da glia, culminando no processo de morte neuronal (SHENG *et al.*, 1993).

Figura 5 – Mecanismo de ação neurotóxico da 6-OHDA.



Legenda: A 6-OHDA é captada do espaço extracelular pelos transportadores catecolaminérgicos (DAT e NET). Dentro do neurônio, a 6-OHDA é metabolizada, gerando espécies reativas que induzirão dano neuronal. Somado a isto, a 6-OHDA e as quinonas provenientes de sua metabolização podem inibir a atividade do complexo I mitocondrial, induzindo um déficit energético na célula. DAT = transportador de dopamina; EROs = espécies reativas de oxigênio; H₂O₂ = peróxido de hidrogênio; MAO = monoamina oxidase; NET = transportador de noradrenalina; O₂[•] = radical superóxido.

Fonte: Adaptado de Simola, Morelli e Carta (2007).

Embora os processos neurodegenerativos causados pela 6-OHDA compartilhem os mesmos mecanismos neurotóxicos intracelulares tanto na periferia como no SNC, seus efeitos diferem de acordo com o

protocolo utilizado (SIMOLA, MORELLI e CARTA, 2007). A administração sistêmica de 6-OHDA induz simpatectomia química sem afetar o SNC, uma vez que essa neurotoxina não atravessa a BHE (NICHOLS, WILSON e HILEY, 1985). Por outro lado, a administração de 6-OHDA no espaço intracisternal em ratos neonatos induz uma depleção abundante das catecolaminas, aumento dos níveis estriatais de serotonina (5-HT), alterações sensório-motoras, declínio cognitivo e hiperatividade, sendo útil como modelo experimental da doença de Lesch-Nyhan e de TDAH (BREESE *et al.*, 2005).

De fato, a versatilidade é uma das principais vantagens da 6-OHDA. Ou seja, de acordo com a área encefálica lesionada, assim como a dose de neurotoxina utilizada e a administração prévia de bloqueadores dos transportadores de DA ou NA pode-se obter uma lesão total ou parcial; anterógrada ou retrógrada; seletiva ou não; ou ainda, com indução de morte celular por via necrótica ou apoptótica dos neurônios catecolaminérgicos (BLANDINI, ARMENTERO e MARTIGNONI, 2008).

A morte celular por necrose é caracterizada por um processo patológico ativado em condições extremas, tais como hipóxia, isquemia e intoxicação. Devido ao dano da membrana plasmática, ocorre extravasamento do conteúdo intracelular para o meio extracelular, estimulando a ação do sistema imunológico e a morte em cadeia (CURTIN, DONOVAN e COTTER, 2002). Por sua vez, a apoptose é um fenômeno de morte celular programada que ocorre de forma fisiológica no organismo, mantendo a homeostase entre a proliferação e manutenção celular de cada tecido (DANIAL e KORSMEYER, 2004). No entanto, esta via de morte também pode ser induzida por agentes tóxicos através da ativação de receptores específicos de morte (via extrínseca) ou pelo estresse intracelular (via intrínseca ou mitocondrial) (DRAGOVICH, RUDIN e THOMPSON, 1998). Sendo que nesta última enquadra-se a indução de morte por apoptose induzida pela 6-OHDA.

Neste contexto, grandes contribuições foram obtidas através das lesões da via nigroestriatal dopaminérgica induzidas por 6-OHDA, a fim de modelar a doença de Parkinson. Com o intuito de tornar a lesão seletiva para os neurônios dopaminérgicos, tem sido usado com frequência a administração prévia de um inibidor do NET (ex.: desipramina) (WADDINGTON, 1980).

O primeiro modelo caracterizado, e até hoje muito utilizado, consiste na administração unilateral de uma alta dose de 6-OHDA diretamente na substância *nigra* de ratos, promovendo lesão anterógrada severa da via dopaminérgica, que frente a um agonista dopaminérgico

induz comportamento rotacional no sentido contralateral a lesão (UNGERSTEDT e ARBUTHNOTT, 1970). Evidências têm demonstrado que a infusão de 6-OHDA no estriado produz degeneração retrógrada dos neurônios dopaminérgicos, com presença de morfologia apoptótica, sendo necessário de uma a três semanas para a lesão ser completada (SAUER e OERTEL, 1994; PRZEDBORSKI *et al.*, 1995). Por outro lado, a degeneração induzida pela administração de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial e na substância *nigra* inicia em até 24 h e exibe uma morfologia não apoptótica (INGHAM *et al.*, 1993; JEON, JACKSON-LEWIS e BURKE, 1995). Por fim, nosso grupo de pesquisa recentemente caracterizou um modelo de lesões bilaterais do estriado dorsolateral induzido por uma dose baixa de 6-OHDA que promove alterações comportamentais similares às encontradas na fase pré-motora da doença de Parkinson, como comportamento tipo-anedônico e tipo-depressivo (MATHEUS *et al.*, 2016).

No que se refere as lesões noradrenérgicas promovidas pela 6-OHDA, os principais alvos de estudo são as conexões noradrenérgicas provenientes do LC. Assim como na indução de lesões dopaminérgicas, o dano noradrenérgico induzido pela 6-OHDA é direcionado para os neurônios do LC através do uso de uma estratégia farmacológica, um inibidor do DAT (ex: nomifensina) (TATSUMI *et al.*, 1997). Os achados destes estudos serão descritos no próximo capítulo.

2 CAPÍTULO 2: DISFUNÇÃO NORADRENÉRGICA E ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS PELA ADMINISTRAÇÃO DE 6-OHDA NO LC

2.1 INTRODUÇÃO

Os estudos em roedores que visaram lesionar as conexões noradrenérgicas mediadas pelo LC com a 6-OHDA geralmente a administraram no feixe noradrenérgico dorsal ou ventral (FND, FNV). Nestes trabalhos foi encontrada uma redução na imunoreatividade de neurônios positivos para a enzima chave na síntese da NA, a DBH, na região dos FND e FNV somado ao declínio nos níveis de NA em regiões como o córtex, o hipocampo e o cerebelo, sem afetar o sistema dopaminérgico (CLARK, 1980; LANGLAIS, CONNOR e THAL, 1993; KU *et al.*, 2012). Adicionalmente, Engelbrecht *et al.* (1994) realizaram uma curva dose-resposta (0,5 – 2,0 µg/hemisfério) da administração de 6-OHDA no LC de ratos, e encontraram que em baixas doses (0,5 – 1,0 µg/hemisfério) a 6-OHDA diminui os níveis de NA em diversas regiões encefálicas, inclusive dos núcleos noradrenérgicos A1 e A2, demonstrando assim perder a seletividade pelo LC. Entretanto, com a dose de 2 µg este efeito não é mais observado nos núcleos noradrenérgicos A1 e A2 e se torna mais proeminente no LC (ENGELBRECHT *et al.*, 1994).

Em uma série de estudos recentes, Szot e colaboradores caracterizaram a lesão induzida por 6-OHDA no LC de camundongos C57Bl/6. Eles encontraram uma neurodegeneração noradrenérgica do LC evidenciada pela redução na expressão dos genes das enzimas TH e DBH, essenciais para a síntese de NA. Ainda, foi demonstrada uma diminuição do número de neurônios positivos para a TH no LC 3 e 21 dias após a administração bilateral de 6-OHDA no LC (SZOT *et al.*, 2012a; SZOT *et al.*, 2016). Por outro lado, a lesão unilateral do LC induzida por esta neurotoxina causou uma redução dos níveis de NA e de seu transportador em diversas regiões cerebrais, incluindo aquelas do hemisfério contralateral, embora não tenha ocorrido alteração nos níveis de RNAm para TH e DBH no LC (SZOT *et al.*, 2012b). Além disso, através de estudos eletrofisiológicos, foi observado que uma redução de 30 a 40% no número de neurônios noradrenérgicos aumenta a frequência de disparo dos neurônios sobreviventes do LC e o número de neurônios que dispararam em *burst*, indicando uma atividade irregular destes neurônios remanescentes (SZOT *et al.*, 2016).

Algumas alterações comportamentais provenientes de lesões das conexões noradrenérgicas mediadas pelo LC induzidas por 6-OHDA também já foram descritas. O Quadro 1 sintetiza os trabalhos que investigaram alterações comportamentais após a infusão de 6-OHDA em ao menos uma das seguintes regiões: LC, FND ou FNV.

Quadro 1 – Comportamentos avaliados em roedores após a administração de 6-OHDA em diferentes regiões mediadas pelas conexões noradrenérgicas provenientes do LC.

Animal	Lesão	Estratégia farmacológica prévia	Principais alterações comportamentais	Referência
Camundongos C57Bl/6 machos	LC, bilateral, 5 µg/hem	Não utilizou	Comportamento tipo-depressivo e anedônico	SZOT <i>et al.</i> (2016)
Ratos Sprague-Dawley machos	LC, bilateral, 5 µg/hem	Nomifensina (10 mg/Kg, i.p.)	Reduziu o ganho de peso	GUIMARAES <i>et al.</i> (2013)
Ratos Sprague-Dawley machos	FNV, bilateral, 6 µg/hem	Não utilizou	Ausência de prejuízos motores e de comportamentos do tipo-depressivo	KU <i>et al.</i> (2012)
Ratos Sprague-Dawley machos	LC, bilateral, 6 µg/hem	Não utilizou	Bloqueou a nocicepção induzida pelo sopro de ar	TSURUOKA <i>et al.</i> (2011)
Ratos Wistar machos	LC, bilateral, 8 µg/hem	Não utilizou	Não alterou o controle cardiorrespiratório e a termorregulação em condições basais e de hipóxia	BIANCARDI <i>et al.</i> (2010)
Ratos Lister Hooded machos	FND, bilateral, 4 µg/hem	Pargilina (50 mg/Kg, i.p.)	Déficit de atenção à mudança de paradigma	TAIT <i>et al.</i> (2007)
Ratos Wistar machos	LC, unilateral, 4 µg/hem	Não utilizou	L-DOPA não induziu discinesia	FULCERI <i>et al.</i> (2007)
Ratos Sprague-Dawley machos	FNV, bilateral, 6 µg/hem	Não utilizou	Ausência de comportamentos do tipo-depressivo	CRYAN, PAGE e LUCKI (2002)
Ratos Lister Hooded machos	LC, bilateral, 4 µg/hem	Não utilizou	Reduz a resposta ao medo	NEOPHYTOU <i>et al.</i> (2001)

Ratos Sprague-Dawley fêmeas	LC, bilateral, 4 µg/hem	Não utilizou	Atenuou os efeitos anticonvulsivantes induzidos pela estimulação do nervo vago	KRAHL <i>et al.</i> (1998)
Ratos Sprague-Dawley machos	LC, bilateral, 6 µg/hem	Pargilina (50 mg/Kg, i.p.)	Ausência de prejuízos motores	GOLDSTEIN (1997)
Ratos Sprague-Dawley machos	LC, bilateral, 12 µg/hem	Não utilizou	Reduziu a locomoção	RUCKERT, BUBSER e SCHMIDT (1997)
Ratos Lister Hooded machos	LC, bilateral, 4 µg/hem	Não utilizou	Déficit na aquisição da memória de trabalho	VANDERWOLF e BAKER (1996)
Ratos Wistar neonatos	LC, bilateral, 4 µg/hem	Não utilizou	Prejuízo na aquisição da preferência ao odor	SULLIVAN <i>et al.</i> (1994)
Ratos Fisher machos	FND, bilateral, 4 µg/hem	Não utilizou	Não altera a memória de trabalho	LANGLAIS, CONNOR e THAL (1993)
Ratos Lister Hooded machos	FND, bilateral, 4 µg/hem	Pargilina (50 mg/Kg, i.p.)	Causou generalização da resposta de medo	SELDEN, EVERITT e ROBBINS (1991)
Ratos Wistar machos	LC	-	Reduziu a locomoção, atividade exploratória e alterou a repostas à novidade (7 dias). A partir de 21 dias, permaneceu o prejuízo exploratório e os animais não habituarão no campo aberto	OKNINA (1991)
Ratos Sprague-Dawley machos	LC, bilateral, 6 µg/hem	Pargilina (50 mg/Kg, i.p.)	Ausência de comportamentos do tipo-depressivo	CERVO <i>et al.</i> (1991)
Ratos Lister Hooded machos	FND, bilateral, 4 µg/hem	Pargilina (50 mg/Kg, i.p.)	Melhorou a aquisição da memória em situação estressante e prejudicou a discriminação de pistas visuais	SELDEN <i>et al.</i> (1990)

Ratos Sprague-Dawley machos	FND, bilateral, 2 µg/hem	Pargilina (20 mg/Kg, i.p.)	Não alterou a aquisição e evocação da memória em uma tarefa de discriminação tátil/palatável	JARBE <i>et al.</i> (1988)
Ratos Sprague-Dawley machos	LC, bilateral, 8 µg/hem	Não utilizou	Não alterou a nocicepção térmica, mas reduziu o limiar da analgesia induzida por choque	MINOR <i>et al.</i> (1988)
Ratos Wistar machos	FND, bilateral, 4 µg/hem	Não utilizou	Déficit da memória de trabalho	PISA, MARTIN-IVERSON e FIBIGER (1988)
Ratos Sprague-Dawley machos	LC, bilateral, 4 µg/hem	Não utilizou	Potencializou a analgesia ao calor e a pressão promovida pela morfina	SAWYNOK e REID (1987)
	FND, bilateral, 4 µg/hem	Não utilizou	Potencializou a analgesia térmica induzida pela morfina	
Ratos Lister Hooded machos	FND, bilateral, 4 µg/hem	Pargilina (50 mg/Kg, i.p.)	Prejudicou a aquisição e extinção de uma memória emocional	COLE e ROBBINS (1987)
	FNV, bilateral, 3 µg/hem	Pargilina (50 mg/Kg, i.p.)	Não afetou a aquisição, mas retardou a extinção de uma memória emocional	
Ratos Long-Evans Hooded	LC, bilateral, 4 µg/hem	Pargilina (50 mg/Kg, i.p.)	Não alterou a memória de trabalho	WENK <i>et al.</i> (1987)
Ratos Sprague-Dawley machos	FND, bilateral, 12 µg/hem	Não utilizou	Promoveu tolerância ao estresse	TSALTAS, GRAY e PRESTON (1987)
Ratos Sprague-Dawley machos	LC, bilateral, 8 µg/hem	Não utilizou	Atenuou o aumento da atividade locomotora e exploratória induzido por apomorfina	MOHAMMED <i>et al.</i> (1986)

Ratos Sprague-Dawley machos	LC, bilateral, 8 µg/hem	Pargilina (50 mg/Kg, i.p.)	Não afetou o aprendizado associado a um pré-condicionamento sensorial	ARCHER <i>et al.</i> (1986)
	FND, bilateral, 8 µg/hem	Pargilina (50 mg/Kg, i.p.)	Prejudicou o aprendizado associado a um pré-condicionamento sensorial	
Ratos Wistar machos	LC, bilateral, 5 µg/hem	Não utilizou	Indução de agressividade pela apomorfina	PUCILOWSKI, KOZAK e VALZELLI (1986)
Ratos Wistar machos	FND, bilateral, 8 µg/hem	Não utilizou	Reduziu a atividade locomotora e não alterou a habituação à novidade.	BRITTON <i>et al.</i> (1984)
Ratos Lister Hooded machos	FND, bilateral, 4 µg/hem	Pargilina (50 mg/Kg, i.p.)	Prejudicou a aquisição da discriminação auditiva e visual	EVERITT <i>et al.</i> (1983)
Ratos Wistar machos	FND, bilateral, 4 µg/hem	Não utilizou	Prejudicou a memória de trabalho	PISA e FIBIGER (1983)
Ratos	LC	-	Déficit de memória aversiva e facilitação de treinamento com recompensa alimentar	GROMOVA, SEMENOVA e GRISHCHENKO (1983)
Ratos Wistar machos	FND, bilateral, 8 µg/hem	Não utilizou	Ausência de efeitos sobre a atenção	DRAGUNOW e LAVERTY (1983)
Ratos Sprague-Dawley machos	FNV e FND, unilateral, 4 µg/hem	Não utilizou	Não induziu assimetria motora	PORCEDDU <i>et al.</i> (1983)
Ratos Sprague-Dawley machos	FND, unilateral, 8 µg/hem	Não utilizou	Reduziu a velocidade de corrida na ausência de pré-treino	OWEN <i>et al.</i> (1982)
Ratos Sprague-Dawley machos	FNV e FND, unilateral, 6 µg/hem	Não utilizou	Reduziu o comportamento de sobressalto	ADAMS e GEYER (1981)

-	FND, bilateral, 4 µg/hem	-	Potencializou a catalepsia induzida por morfina	MASON, ROBERTS e FIBIGER (1978)
Ratos Wistar machos	FND, bilateral, 4 µg/hem	Não utilizou	Aumentou a distração, sem alterar a locomção e a habituação a novidade	ROBERTS, PRICE e FIBIGER (1976)

FND = Feixe noradrenérgico dorsal; FNV = Feixe noradrenérgico ventral; LC = *locus coeruleus*.

Conforme a literatura apresentada, pode-se perceber a utilidade e versatilidade da 6-OHDA para o estudo das conexões e funções relacionadas ao sistema transmissão noradrenérgica mediada pelo LC. De fato, de acordo com a região lesionada e da dose utilizada no estudo diferentes modificações comportamentais foram induzidas, evidenciando, também, a complexidade dos efeitos que podem ser ocasionados devido a uma lesão deste sistema.

Especificamente, em relação a lesão do LC, destaca-se que a 6-OHDA foi capaz de modular respostas sensoriais, como a nocicepção (SAWYNOK e REID, 1987; MINOR *et al.*, 1988; TSURUOKA *et al.*, 2011); cognitivas – principalmente em relação ao aprendizado e aquisição de memórias (GROMOVA, SEMENOVA e GRISHCHENKO, 1983; SULLIVAN *et al.*, 1994; VANDERWOLF e BAKER, 1996); o comportamento tipo-depressivo e tipo-anedônico em camundongos (SZOT *et al.*, 2016); bem como a locomoção (OKNINA, 1991; RUCKERT, BUBSER e SCHMIDT, 1997). No entanto, destaca-se que a grande maioria dos trabalhos citados acima que lesionaram o LC com 6-OHDA não utilizaram qualquer estratégia farmacológica para proteger os terminais dopaminérgicos, sendo os efeitos observados passíveis também do envolvimento de uma lesão no sistema dopaminérgico (MOHAMMED *et al.*, 1986; PUCILOWSKI, KOZAK e VALZELLI, 1986; SAWYNOK e REID, 1987; MINOR *et al.*, 1988; CERVO *et al.*, 1991; SULLIVAN *et al.*, 1994; VANDERWOLF e BAKER, 1996; GOLDSTEIN, 1997; RUCKERT, BUBSER e SCHMIDT, 1997; KRAHL *et al.*, 1998; NEOPHYTOU *et al.*, 2001; BIANCARDI *et al.*, 2010; TSURUOKA *et al.*, 2011; SZOT *et al.*, 2016). Ainda, alguns estudos utilizaram a pargilina – um inibidor da isoforma A da enzima MAO – como estratégia farmacológica prévia com o intuito de reduzir a degradação enzimática da 6-OHDA.

2.2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Diante do exposto, é inquestionável a importância da integridade da transmissão noradrenérgica mediada pelo LC para a modulação de uma série de comportamentos através da liberação de NA em quase todas as áreas encefálicas. Da mesma forma, são muitas as evidências que demonstram alterações fisiopatológicas e/ou degeneração do LC em várias doenças e transtornos do SNC, incluindo as doenças neurodegenerativas. Entretanto, são necessários mais estudos visando esclarecer quais os sintomas observados nessas doenças podem ser decorrentes e/ou estarem relacionados com o dano noradrenérgico do LC. As neurotoxinas têm sido empregadas na pesquisa básica com esse intuito. Contudo, o uso da 6-OHDA como uma ferramenta útil para a lesão seletiva das conexões noradrenérgicas provenientes do LC tem sido negligenciado. Desta forma, os efeitos comportamentais a longo prazo da lesão seletiva do LC pela 6-OHDA ainda precisam ser caracterizados, sendo – de especial interesse – aqueles relacionados aos sintomas observados já nas fases iniciais de doenças neurodegenerativas, nas quais o dano do LC já é evidenciado.

Portanto, hipotizamos que a lesão noradrenérgica seletiva do LC induzida pela administração bilateral de 6-OHDA causa disfunção central da liberação de NA, bem como prejuízos olfatórios, cognitivos e emocionais.

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste capítulo foi avaliar, temporalmente, os efeitos comportamentais e neuroquímicos decorrentes da administração bilateral de 6-OHDA no LC de ratos.

2.3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar, temporalmente, o dano neuronal induzido pela administração de diferentes doses de 6-OHDA no LC de ratos;
- Avaliar a função motora de ratos lesionados bilateralmente pela infusão de diferentes doses de 6-OHDA no LC, visando determinar a dose mais adequada para a continuidade do estudo;

- Analisar, temporalmente, as alterações olfatórias, cognitivas e emocionais decorrentes da degeneração do LC induzida pela dose de 5 µg/hem de 6-OHDA;
- Investigar a ativação da via de morte neuronal por apoptose após a administração bilateral de 5 µg/hem de 6-OHDA no LC;
- Determinar as alterações nos níveis de NA, DA, 5-HT e seus metabólitos em diversas regiões encefálicas após a lesão bilateral do LC induzida pela dose de 5 µg/hem de 6-OHDA.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

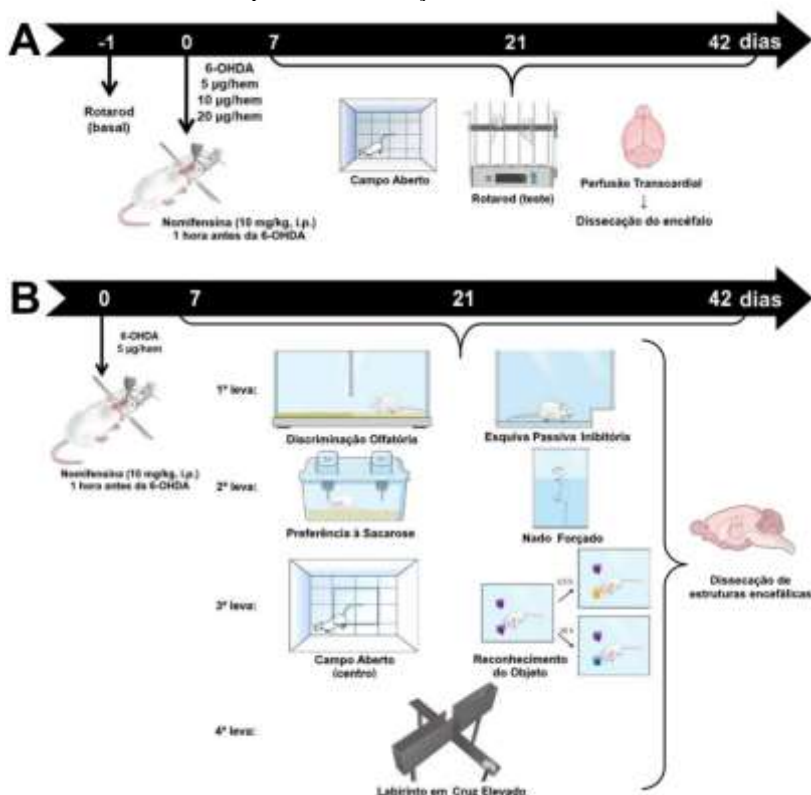
2.4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos (3-4 meses, 250-320 g) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os ratos ficaram alojados em grupos de quatro a cinco animais por gaiola plástica (50 × 30 × 15 cm), em ambiente com temperatura controlada em 22 ± 2 °C, ciclo claro-escuro de 12 h e livre acesso à água e ração. Os procedimentos experimentais realizados neste trabalho foram previamente aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da UFSC, sob protocolo nº 104/CEUA/PRPE/2012.

2.4.2 Protocolos experimentais

Os protocolos experimentais utilizados nesse capítulo estão ilustrados na Fig. 6. Inicialmente, foi realizada uma curva dose-resposta com o intuito de encontrar uma dose capaz de induzir neurodegeneração sem promover déficits motores. Para isso, a fim de corroborar a habilidade dos animais se locomoverem no rotarod, estes foram submetidos a um teste basal no aparato. No dia seguinte, os animais receberam a administração i.p. de maleato de nomifensina 1 h antes da realização da cirurgia estereotáxica, com o intuito de evitar a lesão dos terminais dopaminérgicos. Resumidamente, a cirurgia consistiu na administração bilateral de 6-OHDA nas doses de 5, 10 ou 20 µg/hem no LC dos ratos. O grupo SHAM recebeu apenas o veículo. Para avaliar a função motora, grupos independentes de animais foram submetidos ao teste do campo aberto e ao rotarod 7, 21 ou 42 dias após a cirurgia. Após os testes comportamentais, os animais foram submetidos a perfusão transcardial para dissecação dos encéfalos e avaliação posterior da presença de neurodegeneração (Fig. 6A).

Figura 6 – Linhas do tempo ilustrando os dois protocolos utilizados neste capítulo para a avaliação temporal das funções motora, olfatória, cognitiva e emocional dos animais após a administração de 6-OHDA no LC.



Legenda: (A) Curva dose-resposta para avaliação dos efeitos da administração de diferentes doses de 6-OHDA no LC frente a função motora de ratos. (B) Avaliação temporal das funções olfatória, cognitiva e emocional após a administração da dose de 5 µg/hem de 6-OHDA no LC de ratos. Conforme representado na figura acima, os animais de cada leva experimental foram submetidos a todos os testes comportamentais pertencentes a tal leva experimental em um dos períodos de avaliação. Desta forma, cada animal foi exposto somente uma vez a cada teste comportamental, sendo utilizados grupos independentes em cada tempo de avaliação.

Fonte: Figura criada pela autora através da plataforma www.mindthegraph.com.

Com base nos resultados obtidos na curva dose-resposta, a dose de 5 µg/hem de 6-OHDA foi escolhida para dar continuidade ao nosso

estudo. Neste protocolo (Fig. 6B), os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica, como descrito anteriormente, e após 7, 21 ou 42 dias desta, grupos independentes de animais tiveram suas funções olfatória, cognitiva e emocional avaliadas através dos testes comportamentais ilustrados na Fig. 6B. Após o término dos testes comportamentais, os animais foram eutanasiados por decapitação e as seguintes estruturas encefálicas – LC, bulbo olfatório, córtex pré-frontal, hipocampo, amígdala e estriado – foram dissecadas para a determinação dos níveis de monoaminas e seus metabólitos. Além disso, a ativação da via apoptótica e o imunoconteúdo de DBH no LC também foram avaliados.

2.4.3 Cirurgia estereotáxica

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados com técnica asséptica. A fim de induzir uma lesão seletiva dos neurônios noradrenérgicos, foi administrado o maleato de nomifensina (10 mg/kg; 1 mL/kg; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EUA), um bloqueador do DAT, pela via i.p. 1 h antes da indução da lesão pela 6-OHDA (TATSUMI *et al.*, 1997; CAILLE *et al.*, 1999; GUIMARAES *et al.*, 2013). Para a cirurgia, os animais foram anestesiados com cetamina (75 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg) pela via i.p., e posicionados no aparelho estereotáxico (Stoelting, Wood Dale, EUA). A seguir, a neurotoxina 6-OHDA (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi injetada bilateralmente no LC (5, 10 ou 20 µg/hemisfério (hem), volume de injeção de 2 µL, com taxa de infusão de 1 µL/min) com o auxílio de uma seringa Hamilton de 10 µL acoplada a uma bomba de infusão (Insight, Ribeirão Preto, Brasil), conectada a um tubo de polietileno com uma agulha de 26G em sua extremidade. Terminada a infusão, a agulha foi mantida imóvel por um tempo adicional de 3 min para evitar refluxo da droga e permitir a sua difusão completa. As coordenadas estereotáxicas definidas com base no atlas de neuroanatomia de rato de Paxinos e Watson (1986) foram: antero-posterior (AP): - 9,9 mm; médio-lateral (ML): ± 1,4 mm e dorso-ventral (DV): - 7,0 mm em relação ao bregma. O grupo SHAM foi submetido aos mesmos procedimentos cirúrgicos e tratamentos, entretanto foi administrado somente o veículo da neurotoxina (ácido ascórbico 0,2% em salina [cloreto de sódio 0,9%]). Este procedimento foi realizado para todas as avaliações descritas, sendo conduzidos os testes comportamentais e/ou a eutanásia dos animais 7, 21 ou 42 dias após a cirurgia.

2.4.4 Testes comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados 7, 21 ou 42 dias após a administração de 6-OHDA no LC. Todos os testes foram conduzidos durante o ciclo claro, em uma sala com isolamento acústico e baixa luminosidade (12 lx), na qual os animais haviam sido previamente habituados por pelo menos 1 h. O comportamento dos animais foi monitorado através de um sistema de câmeras posicionado acima dos aparatos e os vídeos foram analisados com o auxílio do programa computacional *ANY Maze*® (Stoelting Co., Wood Dale, EUA). Afim de evitar resíduo de odores, os aparatos foram limpos com uma solução de etanol 10% e secos com papel toalha após a retirada de cada animal.

2.4.4.1 Campo aberto

A atividade locomotora dos animais foi avaliada no teste do campo aberto. Os ratos foram colocados individualmente no centro da arena de madeira (100 × 100 cm, chão pintado na cor cinza), sendo permitido explorarem o campo aberto por um período de 15 min. A distância total percorrida e a velocidade média de cada animal foram utilizadas como parâmetros da atividade locomotora. O tempo gasto no centro do aparato foi usado para avaliar o comportamento tipo-ansiedade (WALSH e CUMMINS, 1976).

2.4.4.2 Rotarod

A coordenação motora e o equilíbrio dos animais foram avaliados no teste do rotarod (Insight, Ribeirão Preto, Brasil), utilizando um protocolo de avaliação basal (antes da cirurgia estereotáxica) no qual foram feitas 3 tentativas com velocidade constante de 5 rpm. Os animais que permaneceram no rotarod por 1 min foram incluídos no estudo e submetidos à cirurgia estereotáxica. No dia do teste realizado 7, 21 ou 42 dias após a cirurgia, os ratos foram colocados sobre o cilindro mantido a uma rotação constante de 5 rpm para sua habituação durante 1 min. Após o período de habituação, iniciou-se o período de teste no qual a rotação do cilindro acelerava progressivamente até o máximo de 40 rpm. A latência para queda foi aferida como indicador da função motora em um tempo máximo de 5 min de teste (THOMAS TAYRA *et al.*, 2013).

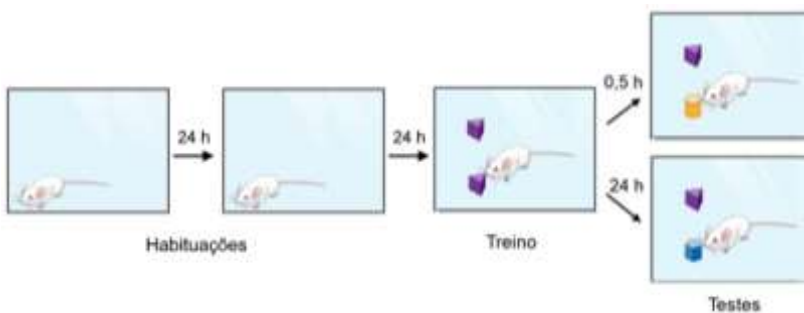
2.4.4.3 Discriminação olfatória

A discriminação olfatória dos animais foi avaliada através do teste de discriminação olfatória, previamente descrito por Prediger, Batista e Takahashi (2005). O teste consistiu em isolar os animais 48 h antes do início dos experimentos em gaiolas individuais, para que houvesse uma padronização da impregnação do odor nas serragens. O aparato utilizado para o teste consistiu em dois compartimentos idênticos (30 × 30 × 20 cm) separados por uma porta aberta que permite o acesso livre dos animais para os dois compartimentos. O chão de um dos compartimentos foi forrado com a serragem retirada da gaiola na qual o animal ficou isolado por 48 h, enquanto que o outro compartimento foi forrado com serragem limpa. O experimento consistiu em colocar o rato na caixa de discriminação olfatória e registrar, durante um período de 5 min, o tempo que o animal gastou investigando cada um dos compartimentos. A discriminação olfatória foi avaliada pela preferência do animal em ficar no compartimento impregnado com o seu cheiro (compartimento familiar) em relação ao compartimento inodoro (não-familiar).

2.4.4.4 Reconhecimento do objeto

As memórias de curta duração (MCD) e MLD foram avaliadas no teste do reconhecimento do objeto (TRO), conduzido conforme previamente descrito por Abe *et al.* (2004). Esta tarefa consistiu em três fases distintas: a habituação, o treino e o teste (Fig 7).

Figura 7 – Figura representativa das sessões de habituação, treino e testes da tarefa do reconhecimento do objeto.



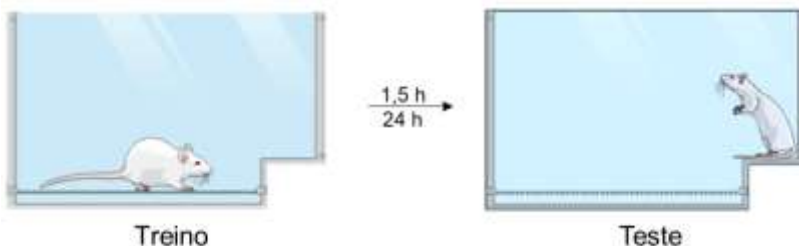
Fonte: Figura criada pela autora através da plataforma www.mindthegraph.com.

A fase de habituação foi composta por dois dias consecutivos nos quais os animais exploraram livremente o aparato do campo aberto por 15 min. Essa fase objetiva reduzir o estresse, ansiedade e exploração do meio no dia do teste. Após 24 h da última sessão de habituação, os animais realizaram a fase de treino. No treino os animais são expostos a dois objetos idênticos durante 3 min. As fases de teste para as MCD e MLD foram realizadas 30 min e 24 h após a sessão de treino, respectivamente. As sessões de teste tiveram uma duração de 3 min cada, sendo que nelas um dos objetos presentes na sessão de treino foi substituído por um novo objeto de tamanho similar, mas formato e coloração diferente (Fig. 7). A porcentagem de reconhecimento do objeto novo na fase de teste foi calculada de acordo com a seguinte equação: $\% \text{ reconhecimento} = (\text{tempo de exploração do objeto novo} \times 100) / \text{tempo total de exploração de ambos os objetos}$.

2.4.4.5 Esquiva passiva inibitória

As memórias de curta e de longa duração foram avaliadas na tarefa da esquiva passiva inibitória (EPI). Neste teste, o animal aprende a relacionar a descida de uma plataforma para um chão gradeado com um leve choque aplicado nas patas (treino). Com isso, ao retornar à caixa de esquiva, ele evita o comportamento inato de descer da plataforma para explorar a caixa (teste) (Fig. 8).

Figura 8 – Figura representativa das sessões de treino e teste da tarefa da esquiva passiva inibitória.



Fonte: Figura criada pela autora através da plataforma www.mindthegraph.com.

O aparato utilizado para tal tarefa consistiu em uma caixa de metal e acrílico medindo $50 \times 25 \times 25$ cm. Parte do chão do aparelho possui uma grade com barras de bronze com 1 mm de diâmetro, com espaçamento de 1 cm entre elas, e de uma plataforma metálica. O animal foi colocado sobre a plataforma e sua latência para descer sobre a grade

(com as quatro patas) foi cronometrado. Na sessão de treino, imediatamente após o animal descer sobre a grade, ele foi estimulado com um leve choque nas patas (0,4 mA) durante 1 segundo. Cada animal foi testado 1,5 h e 24 h após o treino para avaliação das memórias de curta e longa duração, respectivamente, realizando-se para isto o mesmo procedimento, mas omitindo-se o choque, sendo novamente cronometrado o tempo que o animal levou para descer da plataforma. Durante as sessões de teste, um tempo máximo de 180 segundos foi aguardado para que o animal descesse da plataforma ou fosse retirado da caixa (BARROS, RAMIREZ e IZQUIERDO, 2005).

2.4.4.6 Nado forçado

O procedimento utilizado no TNF foi previamente descrito por Porsolt, Bertin e Jalfre (1977) e posteriormente modificado por Cryan, Markou e Lucki (2002). Os ratos foram colocados individualmente em cilindros de cloreto de polivinila (PVC) individuais medindo 60 cm de altura e 30 cm de diâmetro preenchidos até 45 cm de altura com água em temperatura de 25 ± 1 °C. Foram realizadas duas sessões de natação: uma inicial de 15 min (chamada de pré-teste), seguida 24 h após por outra sessão de 5 min (teste). A duração total dos comportamentos de imobilidade, de escalada e de nado foi aferida manualmente e continuamente durante todo o período da sessão de teste.

Figura 9 – Figura representativa dos parâmetros avaliados no teste do nado forçado.



Fonte: Adaptado de Cryan, Markou e Lucki (2002).

O animal foi considerado imóvel quando flutuava ou fazia apenas os movimentos necessários para manter a sua cabeça acima do nível da água. O comportamento de escalada foi mensurado quando o animal realizava movimentos com as patas anteriores em direção ao topo das paredes do cilindro. O nado consistiu dos movimentos horizontais em todas as direções no cilindro. A água dos cilindros foi trocada após o final de cada sessão (Fig. 9).

2.4.4.7 Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE) consiste num aparato em forma de cruz formado por dois braços abertos (50×10 cm) e dois braços fechados ($50 \times 10 \times 40$ cm), dispostos de tal modo que dois pares de braços idênticos são opostos um ao outro. Os braços se iniciam a partir de uma plataforma central (10×10 cm), e todo o aparato está elevado a uma altura de 50 cm do chão. No início do teste, o rato foi colocado na plataforma central com a cabeça voltada para um braço fechado. Os comportamentos relacionados ao medo/ansiedade foram avaliados durante 5 min e foram quantificados os seguintes parâmetros comportamentais: porcentagem de entradas nos braços abertos ($\% \text{ entradas nos braços abertos} = \text{entradas nos braços abertos} \times 100 / \text{total de entradas}$) e porcentagem de tempo nos braços abertos ($\% \text{ tempo nos braços abertos} = \text{tempo nos braços abertos} \times 100 / \text{tempo nos braços abertos} + \text{tempo nos braços fechados}$). Ambas as medidas estão inversamente relacionadas com a expressão de comportamentos tipo-medo/ansiedade em roedores (PELLOW *et al.*, 1985). O critério considerado para a entrada em um braço foi o de o corpo inteiro do animal, incluindo as quatro patas dentro do braço. Ainda, determinou-se a distância total percorrida como parâmetro motor do teste.

2.4.4.8 Preferência à sacarose

O consumo de sacarose é frequentemente usado como uma medida de anedonia em roedores (TOWELL, MUSCAT e WILLNER, 1987; TADAIESKY *et al.*, 2008; MATHEUS *et al.*, 2016). Os animais foram alojados no biotério em gaiolas individuais com livre acesso à ração. No primeiro dia foram apresentadas duas garrafas de água nos lados opostos da gaiola para que o animal se adaptasse a beber em ambas garrafas. Após essa fase de treino, uma das garrafas de água foi substituída, de forma aleatória, por outra contendo solução de sacarose 0,8% (SLATTERY *et al.*, 2005). Vinte e quatro horas depois, as

garrafas foram invertidas de posição. Após novo intervalo de 24 h o consumo de água e da solução de sacarose foi aferido simultaneamente nos grupos SHAM e 6-OHDA.

2.4.5 Análises neuroquímicas

2.4.5.1 Coloração por Fluoro-Jade B

O Fluoro-Jade B (FJB) é um derivado aniônico da fluoresceína que é amplamente utilizado para a coloração histológica de neurônios em processo de degeneração (SCHMUED e HOPKINS, 2000). As fatias do encéfalo contendo a região do LC foram obtidas em criostato a 45 μm e fixadas em lâminas gelatinizadas. Os cortes foram reidratados por exposição sequencial a etanol 100% durante 3 min, seguido por 2 min em etanol 70% e 2 min em água destilada. Após estes banhos sucessivos, as fatias foram incubadas com permanganato de potássio 0,06% (Merck Millipore, Alemanha) em água destilada durante 15 min, seguido por 3 lavagens com água destilada durante 2 min cada. Após este período, as amostras foram protegidas da luz e incubadas com solução de FJB 0,001% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) em ácido acético a 0,1% durante 30 min no escuro. Após a lavagem com água destilada, as lâminas foram fixadas com um reagente a base de distireno, plastificante e xileno (DPX). As imagens foram obtidas com o digitalizador de lâminas Zeiss® Axio Scan.Z1 no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia II, UFSC.

2.4.5.2 Western blotting

A fim de investigar a sinalização apoptótica e o dano noradrenérgico, as amostras de LC (*pool* de 2 animais/amostra) foram mecanicamente homogeneizadas em 50 mM de Tris, 1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 100 mM de fluoreto de sódio (NaF), 0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), 2 mM de ortovanadato de sódio (Na_3VO_4), 1% de triton X-100, 10% de glicerol 100% e coquetel inibidor de proteases (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EUA). A seguir, os homogenatos foram centrifugados para eliminação dos resíduos celulares (3000 rpm por 10 min a 4°C). O conteúdo proteico do sobrenadante foi determinado pelo método de Lowry *et al.* (1951), sendo utilizada albumina proveniente de soro bovino (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) como padrão, para, então, este ser diluído a uma concentração final de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As amostras (80 μg de proteína) e

o padrão de peso molecular (GE Healthcare Life Sciences, EUA) foram separados em gel de eletroforese composto por 12% de poli(acrilamida-dodecil sulfato de sódio) (SDS). Após a transferência para a membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF), esta foi bloqueada com uma solução de BSA a 3%. Após as devidas lavagens, as membranas foram incubadas a 4°C durante a noite com os seguintes anticorpos primários: anti-Bax (do inglês, *Bcl2 associated protein X*) (1:1000, Abcam, Cambridge, EUA), ou anti-Bcl2 (do inglês, *B-cell lymphoma protein 2*) (1:1000, Upstate Cell Signaling, SP, Brasil), ou anti-caspase 3 clivada (1:1000, Upstate Cell Signaling, SP, Brasil), ou anti-DBH (1:1000, Biomol, Hamburg, Alemanha). A seguir, as membranas foram lavadas e incubadas com os seus respectivos anticorpos secundários conjugados à peroxidase (Upstate Cell Signaling, SP, Brasil) por 1 h a temperatura ambiente. Para controle de carregamento, utilizou-se a detecção da proteína β -actina, através da incubação das membranas com anticorpo primário anti- β -actina conjugado à peroxidase (1:30000, Upstate Cell Signaling, SP, Brasil). A revelação foi realizada com solução quimioluminescente (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), seguida da detecção em aparelho fotodocumentador (ChemiDoc MP, Bio-Rad, La Jolla, EUA). A densidade óptica relativa (D.O.) das bandas detectadas foi obtida através do programa computacional ImageJ (NIH, Bethesda, EUA). Cada valor é derivado da divisão da D.O. da banda da proteína de interesse pela respectiva D.O. da banda de β -actina. Os resultados estão expressos como % do controle.

2.4.5.3 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção eletroquímica

Os níveis teciduais de NA, DA e 5-HT e, respectivamente, de seus metabólitos, 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) foram determinados através de um sistema modular de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Waters, Milford, EUA; modelo Alliance e2695), composto por uma bomba quaternária, desgaseificador, injetor automático refrigerado e um aquecedor de coluna, acoplado a um detector eletroquímico amperométrico modelo Waters 2465 (Waters, Milford, EUA). A célula analítica de fluxo é composta por um eletrodo de trabalho de carbono vítreo (GC-WE) com 2 mm de diâmetro, que é operado em corrente contínua de +700 mV, versus um eletrodo de referência de Ag/AgCl *in situ* (ISAAC) e um eletrodo auxiliar de aço inoxidável. Para a extração dos analitos, as estruturas cerebrais foram

homogeneizadas em uma solução de 0,1 M de ácido perclórico contendo 0,02% de metabissulfito de sódio e uma concentração conhecida de dihidroxibenzilamina (DHBA), como padrão interno (TADAIESKY *et al.*, 2010). Após, as amostras foram submetidas a um banho de ultrassom de 40 kHz por 20 min seguidos de centrifugação a 14.000 rpm durante 20 min, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para microtubos do autoinjeter (4°C) e uma alíquota de 20 µL de cada amostra foi injetada no cromatógrafo a cada 10 min. As amostras foram carregadas pela fase móvel composta por 60 mM de fosfato de sódio dibásico, 50 mM de ácido cítrico, 1,2 mM de 1-octanosulfonato de sódio, 0,5 mM de 1-heptanosulfonato de sódio, 2 mM de cloreto de sódio, 50 µM de EDTA dissódico, 10% de acetonitrila e água ultrapura (Milli-Q, Millipore), pH = 4,2, filtrada através de uma membrana de acetato de celulose (0,45 µM, Millipore) e desgaseificada a vácuo em banho de ultrassom de 40 kHz por 10 min. Utilizou-se um fluxo gradiente (0 – 6 min = 0,20 mL/min; 6 – 10 min = 0,35 mL/min) através de uma pré-coluna (C18) com 20 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro interno (Alltech, Deerfield, EUA) e coluna de fase reversa (C18) modelo Synergi Hydro-RP, 150 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro interno, empacotada com 19 partículas de 4 µM de diâmetro (Phenomenex, Torrance, EUA), ambas a temperatura de 30°C. O programa computacional Empower 2 ® (Waters Co.) foi utilizado para controle, aquisição e processamento dos dados, os quais foram mensurados de acordo com as curvas de calibração de cada analito (10 – 1000 ng/mL) e expressos em ng de analito por mg de tecido úmido.

2.4.6 Análises estatísticas

A distribuição dos dados foi verificada pelo teste de normalidade de D'Agostino - Pearson. A análise estatística dos dados referentes à curva dose-resposta foi realizada utilizando a (ANOVA) de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey. Para as comparações realizadas entre o grupo SHAM e 6-OHDA 5 µg/hem utilizou-se o teste *t* de Student não pareado. Além disso, foi utilizado o teste *t* de Student para uma amostra para comparar a porcentagem de tempo e a porcentagem de reconhecimento frente ao valor teórico de 50% no teste de discriminação olfatória e TRO, respectivamente. Por fim, os dados provenientes da EPI foram analisados pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Os resultados estão apresentados como média ± o erro padrão da média (E.P.M.), exceto os dados da EPI que estão expressos como

mediana com intervalos interquartis. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Todas as análises foram realizadas utilizando os programas computacionais GraphPad Prism 6.0 (GraphPad, San Diego, EUA) e Statistica 13.0 (StatSoft Inc., La Jolla, EUA).

2.5 RESULTADOS

2.5.1 A administração de 6-OHDA no LC induz neurodegeneração e déficit motor de maneira dose-dependente em ratos

Com o intuito de caracterizar uma dose de 6-OHDA capaz de causar neurodegeneração do LC de ratos sem afetar o seu desempenho motor, uma curva dose-resposta de 6-OHDA foi realizada e o dano neuronal do LC avaliado através da coloração por FJB 7, 21 ou 42 dias após a administração da neurotoxina. Para tal, a integridade da função motora dos animais foi verificada através dos testes do campo aberto e do rotarod.

A locomoção dos animais foi avaliada no teste do campo aberto (Tabela 1). A ANOVA de uma via indicou ausência de alterações significantes entre os grupos experimentais nos parâmetros avaliados: distância total percorrida e velocidade média.

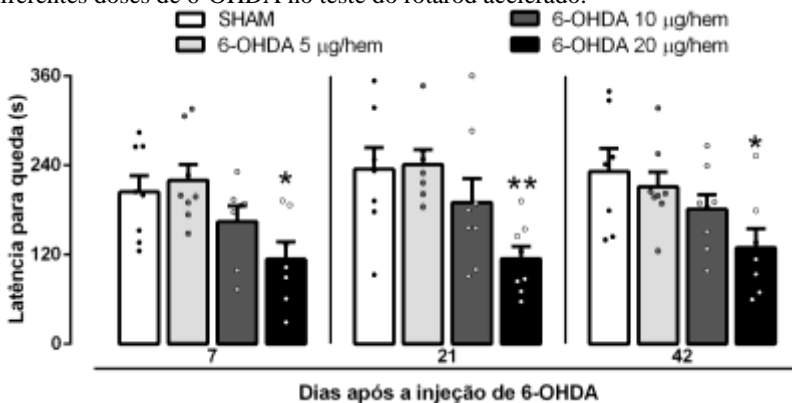
Tabela 1 – Efeito temporal da curva dose-resposta de 6-OHDA no LC sobre a locomoção de ratos avaliada no teste do campo aberto.

		SHAM	6-OHDA 5 µg/hem	6-OHDA 10 µg/hem	6-OHDA 20 µg/hem
7 dias	Distância total (m)	34,27 ± 2,52	32,74 ± 4,61	24,82 ± 4,11	32,55 ± 3,77
	Velocidade média (m/s)	0,038 ± 0,003	0,036 ± 0,005	0,027 ± 0,004	0,036 ± 0,004
	21 dias	Distância total (m)	36,09 ± 4,12	35,53 ± 3,36	32,28 ± 2,94
Velocidade média (m/s)		0,040 ± 0,004	0,039 ± 0,004	0,035 ± 0,003	0,038 ± 0,004
42 dias		Distância total (m)	32,60 ± 4,55	35,82 ± 4,08	38,02 ± 3,92
	Velocidade média (m/s)	0,036 ± 0,005	0,040 ± 0,004	0,042 ± 0,004	0,038 ± 0,003

Os dados estão expressos como média ± E.P.M. de 7 – 9 animais por grupo (ANOVA de uma via).

Por outro lado, o equilíbrio e a coordenação motora dos ratos lesionados bilateralmente com 6-OHDA no LC na dose de 20 µg/hem foi prejudicada no teste do rotarod acelerado (Fig. 10). A ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey indicou um efeito significativo da administração bilateral de 20 µg/hem de 6-OHDA no LC em reduzir a latência para a queda do rotarod acelerado quando comparada aquela dos grupos SHAM em 7 [F_(3,26) = 4,535; *p* = 0,011], 21 [F_(3,27) = 5,181; *p* = 0,006] e 42 dias após a cirurgia [F_(3,26) = 3,310; *p* = 0,036]. As doses de 5 e 10 µg/hem de 6-OHDA no LC não alteraram o desempenho motor dos animais neste teste.

Figura 10 – Latência para a queda dos ratos submetidos a lesão do LC por diferentes doses de 6-OHDA no teste do rotarod acelerado.

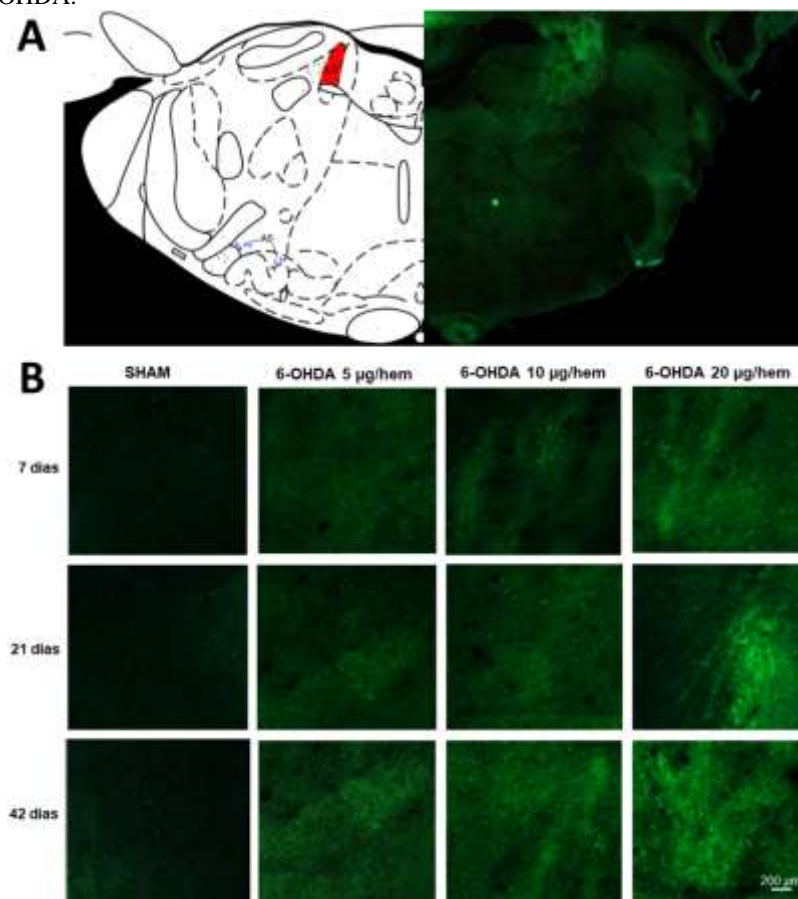


Legenda: Os dados são expressos como média + E.P.M. de 7 – 8 animais/grupo. **p* < 0,05 comparado ao grupo SHAM do mesmo período; ***p* < 0,01 comparado ao grupo SHAM do mesmo período (ANOVA de uma via, seguida do teste *post hoc* de Tukey).

A fim de verificar se as doses de 6-OHDA injetadas no LC causaram neurodegeneração dessa estrutura, foi realizada a coloração das fatias encefálicas contendo o LC pelo corante aniônico FJB. A Fig. 11A ilustra a localização do LC segundo o atlas de Paxinos e Watson (1986), o qual foi utilizado como guia para a obtenção das imagens representativas encontradas na Fig. 11B. Ainda, é possível observar na Fig. 11A que os corpos neuronais difusos pertencentes a região noradrenérgica A5 (pontos azuis) não foram afetados pela administração bilateral de 6-OHDA no LC dos ratos. A análise da região A5 foi utilizada como controle da extensão da lesão do LC. Já na Fig. 11B evidencia-se a presença das inclusões verdes nas imagens

representativas provenientes dos grupos lesionados, bem como a ausência destas nos grupos SHAM. Portanto, conclui-se que a administração bilateral de 6-OHDA induziu dano neuronal no LC de ratos em todas as doses e em todos os tempos avaliados.

Figura 11 – Imagens representativa da coloração por Fluoro-Jade B no LC de ratos 7, 21 e 42 dias após a administração bilateral de diferentes doses de 6-OHDA.



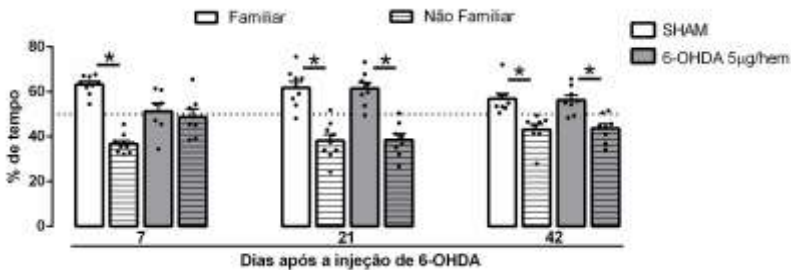
Legenda: (A) Comparação da representação de Paxinos e Watson (1986) com a fatia encefálica corada com Fluoro-Jade B expondo a ausência de marcações verdes na região noradrenérgica A5 (marcada por pontos azuis) e a área do LC (vermelho) utilizada para obtenção das (B) imagens representativas do LC de ratos 7, 21 e 42 dias após estes terem sido submetidos a administração bilateral de diferentes doses de 6-OHDA.

2.5.2 A administração de 6-OHDA no LC provoca prejuízo olfatório, cognitivo e emocional em ratos

Uma vez que a dose de 5 $\mu\text{g}/\text{hem}$ da neurotoxina não alterou os parâmetros motores avaliados nos animais, esta dose foi selecionada para prosseguir com a avaliação temporal dos efeitos da administração bilateral de 6-OHDA no LC de ratos sobre as funções olfatória, cognitiva e emocional.

O teste da discriminação olfatória foi utilizado no presente estudo com o objetivo de avaliar se a lesão noradrenérgica seletiva do LC induzida pela 6-OHDA alteraria a capacidade de discriminação olfatória dos animais. Como ilustrado na Fig. 12, a infusão bilateral de 6-OHDA na dose de 5 $\mu\text{g}/\text{hemisfério}$ no LC de ratos promoveu prejuízo olfatório 7 dias após a cirurgia. O teste *t* de Student mostrou que os animais do grupo SHAM foram capazes de discriminar os dois compartimentos em todos os períodos avaliados, permanecendo uma porcentagem de tempo significativamente maior no compartimento familiar quando comparado ao valor teórico de 50 % [7 dias: $t_{(8)} = 9,285$; $p < 0,0001$ / 21 dias: $t_{(8)} = 4,320$; $p = 0,0025$ / 42 dias: $t_{(7)} = 2,850$; $p = 0,0247$]. Entretanto, os ratos lesionados por 6-OHDA no LC não demonstraram esse mesmo perfil 7 dias após a administração, possuindo porcentagens de tempo equivalentes em ambos os compartimentos [$t_{(6)} = 0,357$; $p = 0,733$]. Esse déficit olfatório induzido pela 6-OHDA não foi observado 21 [7 dias: $t_{(7)} = 4,246$; $p = 0,0038$] e 42 dias após a lesão [7 dias: $t_{(7)} = 2,984$; $p = 0,0204$].

Figura 12 – Efeito da administração de 6-OHDA na dose de 5 $\mu\text{g}/\text{hem}$ no LC sobre a discriminação olfatória de ratos avaliada 7, 21 ou 42 dias após a infusão da neurotoxina.

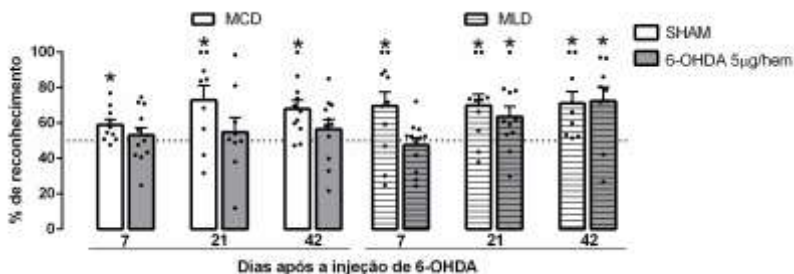


Legenda: Os dados estão expressos em porcentagem de tempo que o animal permaneceu em cada compartimento (médica + E.P.M. de 7 – 9 animais/grupo). * $p < 0,05$ comparado ao valor teórico de 50% (Teste *t* de Student).

A fim de investigar um possível comprometimento da função cognitiva causado pela administração bilateral de 6-OHDA no LC de ratos, a MCD e MLD foram avaliadas neste trabalho através do uso de duas tarefas distintas: o TRO e o EPI.

A memória de reconhecimento, analisada no TRO, indicou um déficit mnemônico na MCD em todos os períodos avaliados após a lesão bilateral do LC pela dose de 5 µg/hem de 6-OHDA. Entretanto a MLD só apresentou comprometimento 7 dias após a cirurgia (Fig. 13). O teste *t* de Student não evidenciou diferenças estatísticas significativas entre o tempo de exploração dos objetos idênticos na fase de treino, demonstrando que os animais não possuíram preferência por quaisquer deles (dados não mostrados). Contudo, nas seções de teste, a porcentagem de reconhecimento exibida pelos animais do grupo SHAM foi diferente do valor teórico de 50% em todos os tempos avaliados após a lesão [7 dias: $t_{(9)} = 2,987$; $p = 0,0153$ / 21 dias: $t_{(8)} = 2,773$; $p = 0,0242$ / 42 dias: $t_{(10)} = 3,717$; $p = 0,0040$], indicando que os mesmos reconheceram e, conseqüentemente, exploraram mais o objeto novo. Em contraste, os ratos lesionados com 6-OHDA exploraram igualmente ambos os objetos 30 min após o treino em todos os períodos analisados [7 dias: $t_{(11)} = 0,716$; $p = 0,4887$ / 21 dias: $t_{(8)} = 0,588$; $p = 0,5726$ / 42 dias: $t_{(10)} = 1,154$; $p = 0,2753$], indicando a existência de um prejuízo da MCD nesta tarefa. Por sua vez, a MLD no TRO foi prejudicada apenas 7 dias após a cirurgia [$t_{(11)} = 0,609$; $p = 0,5545$].

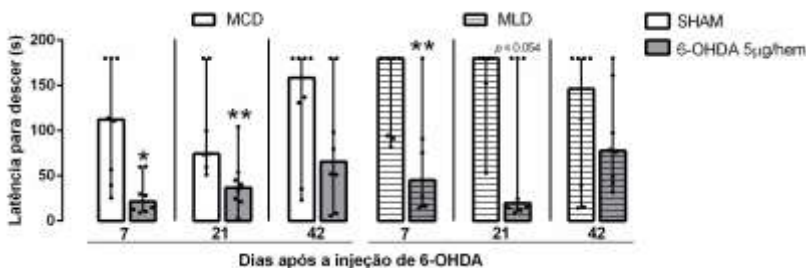
Figura 13 – Efeito da infusão da dose de 5 µg/hem de 6-OHDA no LC de ratos sobre as memórias de curta e longa duração avaliadas no teste de reconhecimento do objeto 7, 21 ou 42 dias após a lesão.



Legenda: Os dados estão expressos em porcentagem de reconhecimento do objeto novo (média + E.P.M.) de 9 – 12 animais/grupo. * $p < 0,05$ comparado ao valor teórico de 50% (Teste *t* de Student). MCD = memória de curta duração; MLD = memória de longa duração.

Na EPI, onde a memória aversiva é avaliada, também foi observado um prejuízo cognitivo em ambos os tipos de memória, MCD e MLD (Fig. 14). Nenhuma diferença estatística foi encontrada na latência para descer a plataforma na sessão de treino (dados não mostrados). O teste não paramétrico de Mann-Whitney revelou uma redução na latência para descer da plataforma nos grupos 6-OHDA avaliados 1,5 h após a sessão de treino nos dias 7 [U = 8,0; $p = 0,0103$] e 21 [U = 6,0; $p = 0,0092$] quando comparados ao grupo SHAM do mesmo período, indicando um comprometimento na MCD nestes períodos. Por outro lado, assim como no TRO, a MLD só apresentou um déficit 7 dias [U = 7,0; $p = 0,0064$] após a indução da lesão, demonstrando uma tendência em 21 dias [U = 15,0; $p = 0,0536$].

Figura 14 – Efeito da administração bilateral de 6-OHDA (5 $\mu\text{g}/\text{hem}$) no LC de ratos sobre as memórias de curta e longa duração avaliadas na tarefa da esquiwa passiva inibitória 7, 21 ou 42 dias após a lesão.

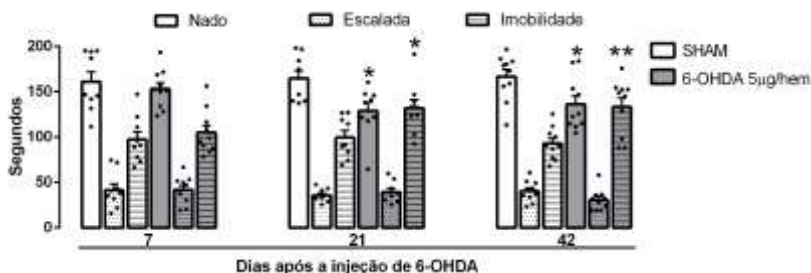


Legenda: A latência em segundos para descer da plataforma está representada como mediana com intervalo interquartil de 7 – 8 animais/grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SHAM do mesmo período; ** $p < 0,01$ comparado ao grupo SHAM do mesmo período (Teste de Mann-Whitney). MCD = memória de curta duração; MLD = memória de longa duração.

Os efeitos da administração bilateral de 6-OHDA na dose de 5 $\mu\text{g}/\text{hem}$ no LC frente comportamentos de emocionalidade também foram investigados. A avaliação do comportamento tipo-depressivo dos ratos foi realizada no TNF. O teste t de Student revelou que esta dose de 6-OHDA induziu, 21 e 42 dias após a lesão, uma redução no tempo de nado [21 dias: $t_{(16)} = 2,885$; $p = 0,0108$ / 42 dias: $t_{(18)} = 2,498$; $p = 0,0224$] e um aumento no tempo de imobilidade [21 dias: $t_{(16)} = 2,677$; $p = 0,0165$ / 42 dias: $t_{(18)} = 3,552$; $p = 0,0023$] quando comparado aqueles do grupo SHAM do mesmo período, sugerindo a indução de um

comportamento tipo-depressivo pela administração da neurotoxina no LC. Não foram encontradas diferenças significantes estaticamente entre os grupos no tempo de escalada (Fig. 15).

Figura 15 – Tempos de imobilidade, escalada e nado obtidos no teste do nado forçado de ratos infundidos bilateralmente com 6-OHDA na dose de 5 µg/hem ou veículo 7, 21 ou 42 dias após a cirurgia.



Legenda: Os dados estão expressos em média + E.P.M. de 9 – 10 animais/grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SHAM do mesmo período; ** $p < 0,01$ comparado ao grupo SHAM do mesmo período (Teste t de Student).

Por fim, parâmetros relacionados ao comportamento tipo-anedônico e tipo-ansioso também foram investigados nos animais que receberam a administração bilateral de 6-OHDA na dose de 5 µg/hem no LC, respectivamente, através dos testes de preferência à sacarose, e LCE e campo aberto (Tabela 2). No teste de preferência a sacarose, o teste t de Student mostrou que, independente do tratamento e do tempo de avaliação, todos os grupos apresentaram um maior consumo da solução de sacarose 0,8% em relação a ingestão de água. Portanto, a administração de 6-OHDA no LC não induziu um comportamento do tipo-anedônico. De forma similar, a lesão induzida pela neurotoxina no LC não promoveu nenhuma alteração nos parâmetros comportamentais tipo-ansioso mensurados (tempo e % de entradas nos braços abertos no LCE, e tempo no quadrante central do campo aberto) (Tabela 2).

Tabela 2 – Efeito da administração bilateral de 6-OHDA (5 µg/hem) no LC frente aos parâmetros relacionados ao comportamento tipo-anedônico e tipo-ansioso 7, 21 ou 42 dias após cirurgia.

		Preferência à Sacarose		Labirinto em Cruz Elevado		Campo Aberto
		Consumo de água (mL)	Consumo de sacarose (mL)	Tempo nos braços abertos (s)	Entradas braços abertos (%)	Tempo no centro (s)
7 dias	SHAM	22,56 ± 5,18	56,33 ± 13,10*	81,31 ± 11,86	47,16, ± 1,30	18,38 ± 5,99
	6-OHDA 5 µg/hem	29,44 ± 5,07	63,22 ± 10,06*	79,21 ± 11,99	47,65 ± 2,12	14,57 ± 3,28
21 dias	SHAM	22,00 ± 3,75	60,38 ± 10,38*	56,00 ± 13,60	45,88 ± 2,45	21,38 ± 7,00
	6-OHDA 5 µg/hem	19,00 ± 4,95	51,50 ± 8,56*	55,47 ± 17,49	43,82 ± 1,93	20,34 ± 4,70
42 dias	SHAM	30,00 ± 2,61	56,00 ± 7,61*	62,10 ± 11,47	48,63 ± 0,72	35,71 ± 10,36
	6-OHDA 5 µg/hem	29,90 ± 3,80	58,40 ± 5,51*	83,47 ± 19,94	46,92 ± 1,04	38,61 ± 6,35

Os dados estão expressos como média ± E.P.M. de 8 – 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparada ao consumo de água do mesmo grupo.

2.5.3 A administração de 6-OHDA no LC reduz o imunocontéudo de dopamina β-hidroxilase e ativa a via de morte por apoptose no LC de ratos

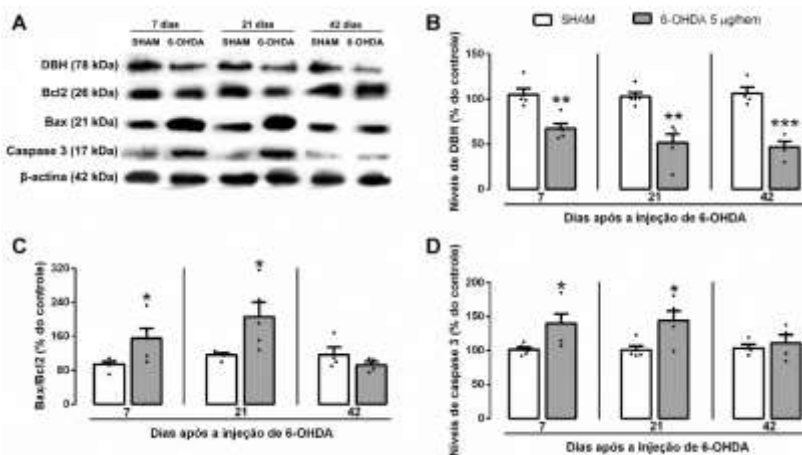
A fim de compreender melhor o dano neuronal induzido no LC pela dose de 5 µg/hem de 6-OHDA, avaliou-se, através da técnica de *Western blotting* o imunocontéudo de DBH e ativação da via apoptótica através da relação entre o imunocontéudo da proteína pró-apoptótica Bax e da proteína antiapoptótica Bcl2 (do inglês, *B-cell lymphoma protein 2*), bem como pelos níveis proteicos de caspase 3 clivada no LC dos ratos lesionados com 6-OHDA (Fig. 16).

A degeneração noradrenérgica foi determinada através da mensuração dos níveis da proteína DBH no LC dos ratos (Fig. 16B). Segundo o teste *t* de Student, a administração bilateral de 6-OHDA no LC causou uma redução do imunocontéudo de DBH em todos os

períodos avaliados [7 dias: $t_{(8)} = 4,450$; $p = 0,0021$ / 21 dias: $t_{(8)} = 4,794$; $p = 0,0014$ / 42 dias: $t_{(6)} = 6,161$; $p = 0,0008$].

Já em relação a ativação da via de apoptose, o teste t de Student indicou que a lesão induzida pela administração bilateral de $5 \mu\text{g}/\text{hem}$ de 6-OHDA no LC de ratos provocou um aumento na relação do imunoconteúdo de Bax/Bcl2 aos 7 [$t_{(8)} = 2,468$; $p = 0,0388$] e 21 dias [$t_{(8)} = 2,635$; $p = 0,0300$] após a infusão da neurotoxina, sendo que este efeito não é mais observado após 42 dias da indução da lesão [$t_{(6)} = 1,257$; $p = 0,2554$] (Fig. 16C). O imunoconteúdo de caspase 3 clivada também aumentou nos animais lesionados com a neurotoxina. Como ilustrado na Fig. 16D, o teste t de Student demonstrou um aumento significativo nos níveis proteicos de caspase 3 clivada 7 [$t_{(8)} = 2,662$; $p = 0,0287$] e 21 dias [$t_{(8)} = 2,933$; $p = 0,0189$] após os animais receberem a administração de 6-OHDA no LC. Aos 42 dias após a lesão, o imunoconteúdo de caspase 3 clivada não difere daquele do grupo SHAM [$t_{(6)} = 0,043$; $p = 0,9670$].

Figura 16 – Efeito da administração bilateral de 6-OHDA ($5 \mu\text{g}/\text{hem}$) no LC de ratos sobre marcadores de degeneração noradrenérgica e da via de apoptose avaliados no LC.



Legenda: (A) Bandas representativas da imunodeteção de proteínas. Imunoconteúdo de (B) DBH, (C) Bax/Bcl2, e (D) caspase 3 clivada. Os dados estão expressos em porcentagem do controle e todos os valores foram corrigidos pelo imunoconteúdo de β -actina (média + E.P.M.) de 4 – 5 animais por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado ao grupo SHAM do mesmo período (Teste t de Student).

2.5.4 A administração de 6-OHDA no LC altera os níveis de monoaminas em diversas estruturas encefálicas

Alterações nos níveis de monoaminas em diferentes estruturas encefálicas também foram observadas após a infusão bilateral de 6-OHDA no LC de ratos. O teste *t* de Student mostrou que os animais lesionados com 6-OHDA no LC apresentaram redução significativa nos níveis de NA no LC em todos os períodos avaliados: 7 dias: $t_{(7)} = 2,882$; $p = 0,0280$ / 21 dias: $t_{(5)} = 2,574$; $p = 0,0498$ / 42 dias: $t_{(6)} = 5,495$; $p = 0,0015$. Os níveis de MHPG não foram alterados, assim como a relação MHPG/NA. Além disso, nenhuma modificação foi encontrada nos níveis ou taxas entre a DA, 5-HT e os seus metabólitos (Tabela 3).

Tabela 3 - Efeito da administração bilateral de 6-OHDA (5 µg/hem) no LC de ratos sobre os níveis de NA, DA, 5-HT e seus metabólitos no LC.

	NA	MHPG	MHPG/ NA	DA	DOPAC	DOPAC /DA	5-HT	5-HIAA	5-HIAA /5-HT	
7	SHAM	24,14 ± 3,43	1,61 ± 0,55	0,11 ± 0,05	2,53 ± 0,67	0,51 ± 0,16	0,27 ± 0,08	3,27 ± 0,61	1,89 ± 0,13	0,65 ± 0,10
	6- OHDA	13,47 ±1,38*	6,19 ± 3,17	0,49 ± 0,25	1,86 ± 0,94	0,43 ± 0,14	0,32 ± 0,09	2,62 ± 0,47	2,04 ± 0,19	0,84 ± 0,11
2	SHAM	22,20 ± 3,22	2,20 ± 0,51	0,13 ± 0,05	1,89 ± 0,65	0,33 ± 0,09	0,25 ± 0,13	2,97 ± 0,36	1,63 ± 0,44	0,54 ± 0,14
	6- OHDA	12,13 ± 1,06*	9,80 ± 4,57	0,89 ± 0,49	1,59 ± 0,62	0,46 ± 0,14	0,40 ± 0,22	2,36 ± 0,41	1,63 ± 0,57	0,82 ± 0,43
4	SHAM	20,68 ± 1,60	1,86 ± 0,97	0,09 ± 0,05	2,46 ± 0,60	0,51 ± 0,13	0,20 ± 0,01	2,78 ± 0,88	1,78 ± 0,21	0,88 ± 0,27
	6- OHDA	7,39 ± 1,81**	2,52 ± 0,63	0,68 ± 0,47	1,84 ± 0,81	0,46 ± 0,12	0,44 ± 0,21	2,76 ± 0,69	1,16 ± 0,41	0,66 ± 0,40

Legenda: Os valores estão expressos como ng de analito/mg de tecido úmido e os dados estão demonstrados como média ± E.P.M de 3 – 5 animais/grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparado ao grupo SHAM do mesmo período. NA = noradrenalina; MHPG = 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol; DA = dopamina; DOPAC = ácido 3,4-dihidroxifenilacético; 5-HT = serotonina; 5-HIAA = ácido 5-hidroxiindolacético.

Similar ao observado no LC, os níveis de NA apresentaram-se reduzidos no bulbo olfatório dos animais que receberam a administração bilateral de 6-OHDA no LC em todos os períodos avaliados (7 dias: $t_{(7)} = 4,368$; $p = 0,0033$ / 21 dias: $t_{(5)} = 4,611$; $p = 0,0058$ / 42 dias: $t_{(6)} = 2,468$; $p = 0,0486$), sem alterar os níveis de MHPG e a relação entre eles (teste *t* de Student). Adicionalmente, o teste *t* de Student não encontrou diferenças significativas nos níveis de DA, DOPAC, 5-HT e 5-HIAA

em quaisquer dos períodos avaliados. A taxa DOPAC/DA também não foi alterada, enquanto que, aos 42 dias após a cirurgia, a relação 5-HIAA/5-HT apresentou-se elevada [$t_{(6)} = 3,223$; $p = 0,0181$] (Tabela 4).

Tabela 4 – Efeito da administração bilateral de 6-OHDA (5 µg/hem) no LC de ratos sobre os níveis de NA, DA, 5-HT e seus metabólitos no bulbo olfatório.

		NA	MHPG	MHPG/ NA	DA	DOPAC	DOPAC /DA	5-HT	5-HIAA	5-HIAA /5-HT
7	SHAM	7,82 ± 0,31	2,16 ± 0,40	0,28 ± 0,05	36,21 ± 5,47	23,37 ± 2,56	0,73 ± 0,16	5,97 ± 0,63	9,85 ± 1,07	1,72 ± 0,24
	6-OHDA	6,02 ± 0,24**	1,95 ± 0,42	0,33 ± 0,07	39,03 ± 6,87	25,51 ± 2,86	0,68 ± 0,05	6,70 ± 0,43	11,57 ± 0,95	1,74 ± 0,14
21	SHAM	7,91 ± 0,42	1,98 ± 0,14	0,24 ± 0,02	38,37 ± 9,50	28,94 ± 6,66	0,85 ± 0,23	5,80 ± 0,25	12,58 ± 1,66	2,17 ± 0,28
	6-OHDA	4,45 ± 0,68**	2,15 ± 0,48	0,51 ± 0,13	40,23 ±15,07	27,06 ±11,27	0,70 ± 0,10	3,90 ± 1,48	9,13 ± 0,65	2,89 ± 0,75
42	SHAM	6,83 ± 0,81	2,63 ± 0,29	0,38 ± 0,04	42,22 ± 2,27	31,35 ± 3,68	0,76 ± 0,14	6,23 ± 0,79	12,09 ± 0,67	2,00 ± 0,20
	6-OHDA	4,30 ± 0,63*	3,43 ± 0,76	0,80 ± 0,15	33,10 ± 2,21	28,44 ± 2,32	0,87 ± 0,09	4,10 ± 0,47	11,71 ± 0,84	2,91 ± 0,19*

Legenda: Os valores estão expressos como ng de analito/mg de tecido úmido e os dados estão demonstrados como média ± E.P.M de 3 – 5 animais/grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparado ao grupo SHAM do mesmo período. NA = noradrenalina; MHPG = 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol; DA = dopamina; DOPAC = ácido 3,4-dihidroxifenilacético; 5-HT = serotonina; 5-HIAA = ácido 5-hidroxiindolacético.

Por sua vez, a infusão de 6-OHDA no LC de ratos modificou os níveis do metabólito da NA, MHPG, e da relação entre eles no córtex pré-frontal (Tabela 5). O teste t de Student revelou um aumento nos níveis de MHPG [$t_{(7)} = 2,546$; $p = 0,0383$] e da taxa MHPG/NA 7 dias após a cirurgia [$t_{(7)} = 2,470$; $p = 0,0428$]. De maneira interessante, esses valores normalizaram aos 21 dias, e aos 42 dias após a lesão do LC a relação MHPG/NA apresentou-se reduzida no córtex-pré-frontal [$t_{(6)} = 2,628$; $p = 0,0391$]. Os sistemas dopaminérgico e serotoninérgico não apresentaram alterações nos períodos avaliados (Tabela 5).

Conforme exposto na Tabela 6, os níveis de MHPG e a taxa MHPG/NA estavam elevados no hipocampo 7 [MHPG: $t_{(7)} = 2,513$; $p = 0,0402$ / MHPG/NA: $t_{(7)} = 2,510$; $p = 0,0459$] e 21 [MHPG: $t_{(5)} = 2,699$; $p = 0,0428$ / MHPG/NA: $t_{(5)} = 2,837$; $p = 0,0364$] dias após a lesão do LC pela administração de 6-OHDA (teste t de Student). No hipocampo, também não foram encontradas diferenças significativas nos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico (Tabela 6).

Tabela 5 – Efeito da administração de 6-OHDA (5 µg/hem) no LC de ratos sobre os níveis de NA, DA, 5-HT e seus metabólitos no córtex pré-frontal.

		NA	MHPG	MHPG/ NA	DA	DOPAC	DOPAC /DA	5-HT	5-HIAA	5-HIAA /5-HT
7	SHAM	5,52 ± 0,34	1,55 ± 0,24	0,28 ± 0,04	4,79 ± 0,92	1,01 ± 0,38	0,24 ± 0,07	8,88 ± 1,20	13,75 ± 1,40	1,67 ± 0,27
	6- OHDA	5,19 ± 0,44	2,74 ± 0,43*	0,57 ± 0,12*	4,86 ± 0,94	1,56 ± 0,44	0,42 ± 0,17	9,94 ± 0,22	12,82 ± 0,59	1,30 ± 0,08
2	SHAM	5,57 ± 0,32	1,64 ± 0,39	0,30 ± 0,08	4,82 ± 0,72	1,40 ± 0,21	0,32 ± 0,07	9,66 ± 1,52	13,21 ± 1,45	1,41 ± 0,15
	6- OHDA	6,66 ± 0,99	2,04 ± 0,21	0,33 ± 0,08	5,37 ± 0,50	2,27 ± 0,67	0,44 ± 0,16	9,21 ± 1,35	13,50 ± 1,40	1,57 ± 0,39
4	SHAM	5,28 ± 1,02	1,76 ± 0,38	0,33 ± 0,04	4,71 ± 0,50	1,00 ± 0,25	0,22 ± 0,05	9,58 ± 0,51	12,97 ± 0,87	1,38 ± 0,16
	6- OHDA	7,72 ± 0,39	1,20 ± 0,37	0,15 ± 0,05*	4,55 ± 0,20	1,18 ± 0,10	0,26 ± 0,03	9,18 ± 0,56	12,84 ± 0,43	1,42 ± 0,13

Legenda: Os valores estão expressos como ng de analito/mg de tecido úmido e os dados estão demonstrados como média ± E.P.M de 3 – 5 animais/grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SHAM do mesmo período. NA = noradrenalina; MHPG = 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol; DA = dopamina; DOPAC = ácido 3,4-dihidroxifenilacético; 5-HT = serotonina; 5-HIAA = ácido 5-hidroxiindolacético.

Tabela 6 – Efeito da administração de 6-OHDA (5 µg/hem) no LC de ratos sobre os níveis de NA, DA, 5-HT e seus metabólitos no hipocampo.

		NA	MHPG	MHPG/ NA	DA	DOPAC	DOPAC /DA	5-HT	5-HIAA	5-HIAA /5-HT
7	SHAM	12,59 ± 0,55	0,96 ± 0,18	0,08 ± 0,02	2,78 ± 0,35	1,14 ± 0,29	0,42 ± 0,08	12,88 ± 0,84	11,59 ± 1,30	0,94 ± 0,15
	6- OHDA	11,95 ± 1,63	1,67 ± 0,22*	0,18 ± 0,04*	2,25 ± 0,33	0,77 ± 0,19	0,34 ± 0,06	13,62 ± 2,00	12,57 ± 1,08	0,98 ± 0,15
2	SHAM	12,79 ± 0,95	1,01 ± 0,17	0,08 ± 0,02	2,61 ± 0,42	1,07 ± 0,33	0,38 ± 0,09	14,07 ± 1,10	12,19 ± 1,05	0,89 ± 0,11
	6- OHDA	11,76 ± 1,48	1,73 ± 0,20*	0,15 ± 0,01*	1,63 ± 0,50	0,85 ± 0,25	0,52 ± 0,01	15,92 ± 2,52	11,29 ± 1,11	0,72 ± 0,05
4	SHAM	11,27 ± 0,71	1,19 ± 0,17	0,11 ± 0,02	2,78 ± 0,17	1,08 ± 0,36	0,38 ± 0,11	15,26 ± 0,70	12,55 ± 0,49	0,82 ± 0,01
	6- OHDA	11,62 ± 1,03	1,05 ± 0,21	0,09 ± 0,02	2,07 ± 0,26	0,38 ± 0,19	0,17 ± 0,07	15,07 ± 1,15	13,39 ± 0,43	0,91 ± 0,09

Legenda: Os valores estão expressos como ng de analito/mg de tecido úmido e os dados estão demonstrados como média ± E.P.M de 3 – 5 animais/grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SHAM do mesmo período. NA = noradrenalina; MHPG = 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol; DA = dopamina; DOPAC = ácido 3,4-dihidroxifenilacético; 5-HT = serotonina; 5-HIAA = ácido 5-hidroxiindolacético.

Por outro lado, a amígdala não apresentou alterações da neurotransmissão noradrenérgica após a infusão da 6-OHDA no LC (Tabela 7). Curiosamente, o teste *t* de Student indicou uma redução nos níveis de DA 7 [$t_{(7)} = 3,129$; $p = 0,0166$] e 21 dias [$t_{(5)} = 3,092$; $p = 0,0271$], e um aumento da taxa DOPAC/DA na amígdala 21 dias após a indução da lesão do LC [$t_{(5)} = 2,946$; $p = 0,0320$]. O sistema serotoninérgico não foi afetado nesta estrutura (Tabela 7).

Tabela 7 – Efeito da administração de 6-OHDA (5 µg/hem) no LC de ratos sobre os níveis de NA, DA, 5-HT e seus metabólitos na amígdala.

		NA	MHPG	MHPG/ NA	DA	DOPAC	DOPAC /DA	5-HT	5-HIAA	5-HIAA /5-HT
7	SHAM	4,11 ± 0,81	2,98 ± 0,68	0,83 ± 0,18	14,80 ± 1,38	5,75 ± 1,20	0,44 ± 0,03	3,84 ± 0,63	8,14 ± 1,39	2,23 ± 0,36
	6- OHDA	4,42 ± 0,60	2,61 ± 0,80	0,57 ± 0,17	8,99 ± 1,14*	4,21 ± 0,68	0,53 ± 0,17	4,94 ± 0,34	9,39 ± 0,97	1,93 ± 0,24
2	SHAM	4,00 ± 0,51	2,96 ± 0,35	0,83 ± 0,24	16,12 ± 2,17	5,89 ± 0,72	0,38 ± 0,06	3,70 ± 0,51	10,08 ± 0,92	2,78 ± 0,19
	6- OHDA	4,59 ± 0,75	2,90 ± 0,26	0,67 ± 0,15	7,10 ± 1,66*	4,40 ± 0,58	0,65 ± 0,07*	3,54 ± 0,39	8,38 ± 0,92	2,37 ± 0,10
4	SHAM	4,41 ± 0,72	3,61 ± 0,82	0,83 ± 0,15	15,61 ± 2,35	6,61 ± 0,98	0,45 ± 0,09	4,01 ± 0,40	9,41 ± 0,86	2,38 ± 0,17
	6- OHDA	4,03 ± 0,37	2,52 ± 0,59	0,67 ± 0,20	13,68 ± 0,84	9,71 ± 2,17	0,74 ± 0,20	3,98 ± 0,41	8,95 ± 0,69	2,33 ± 0,32

Legenda: Os valores estão expressos como ng de analito/mg de tecido úmido e os dados estão demonstrados como média ± E.P.M de 3 – 5 animais/grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SHAM do mesmo período. NA = noradrenalina; MHPG = 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol; DA = dopamina; DOPAC = ácido 3,4-dihidroxifenilacético; 5-HT = serotonina; 5-HIAA = ácido 5-hidroxiindolacético.

Por fim, alteração na neurotransmissão noradrenérgica foi observada no estriado somente 21 dias após a lesão do LC pela 6-OHDA. O teste *t* de Student evidenciou uma redução dos níveis de NA nos animais lesionados neste período [$t_{(5)} = 2,628$; $p = 0,0467$]. Além disso, um aumento na relação DOPAC/DA 7 dias após a lesão do LC [$t_{(7)} = 2,835$; $p = 0,0252$], e uma redução da relação 5-HIAA/5-HT 42 dias após a cirurgia [$t_{(6)} = 3,019$; $p = 0,0234$] foram encontradas. Os demais parâmetros estriatais analisados não foram alterados (Tabela 8).

Tabela 8 – Efeito da administração de 6-OHDA (5 µg/hem) no LC de ratos sobre os níveis de NA, DA, 5-HT e seus metabólitos no estriado.

	NA	MHPG	MHPG/ NA	DA	DOPAC	DOPAC /DA	5-HT	5-HIAA	5-HIAA /5-HT	
7	SHAM	5,93 ± 0,67	4,32 ± 0,42	0,76 ± 0,11	357,7 ± 24,44	86,25 ± 8,20	0,24 ± 0,02	6,27 ± 0,30	12,44 ± 0,90	2,02 ± 0,22
	6- OHDA	5,14 ± 1,05	4,65 ± 0,27	1,05 ± 0,25	300,0 ± 40,12	97,63 ± 8,13	0,33 ± 0,03*	5,60 ± 0,88	10,72 ± 0,70	2,00 ± 0,20
2	SHAM	5,87 ± 0,36	4,00 ± 0,63	0,67 ± 0,07	325,6 ± 40,98	76,75 ± 6,00	0,25 ± 0,03	5,40 ± 0,35	11,96 ± 0,51	2,24 ± 0,17
	6- OHDA	4,41 ± 0,42*	4,28 ± 0,39	1,01 ± 0,20	252,8 ± 32,80	75,20 ± 23,38	0,27 ± 0,07	5,70 ± 0,62	12,72 ± 0,53	2,31 ± 0,37
4	SHAM	5,54 ± 0,56	4,08 ± 1,06	0,73 ± 0,18	368,0 ± 52,25	77,88 ± 10,88	0,23 ± 0,05	5,22 ± 0,31	11,81 ± 0,71	2,27 ± 0,07
	6- OHDA	6,38 ± 1,91	3,00 ± 0,39	0,66 ± 0,14	425,0 ± 63,99	87,39 ± 28,22	0,18 ± 0,05	7,50 ± 0,84*	11,05 ± 1,69	1,51 ± 0,24*

Legenda: Os valores estão expressos como ng de analito/mg de tecido úmido e os dados estão demonstrados como média ± E.P.M de 3 – 5 animais/grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SHAM do mesmo período. NA = noradrenalina; MHPG = 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol; DA = dopamina; DOPAC = ácido 3,4-dihidroxifenilacético; 5-HT = serotonina; 5-HIAA = ácido 5-hidroxiindolacético.

Portanto, após a lesão do LC induzida por 6-OHDA foram encontradas alterações nos níveis de todas as monoaminas, as quais variaram de acordo com a estrutura encefálica analisada. Estes resultados estão apresentados de forma resumida no Quadro 2.

Quadro 2 - Resumo dos resultados encontrados nas análises de monoaminas e seus metabólitos em diversas estruturas encefálicas.

	7 dias	21 dias	42 dias
NA	↓ LC ↓↓ Bulbo Olfatório	↓ LC ↓↓ Bulbo Olfatório ↓ Estriado	↓↓ LC ↓ Bulbo Olfatório
MHPG	↑ Córtex Pré-frontal ↑ Hipocampo	-	-
MHPG/NA	↑ Córtex Pré-frontal ↑ Hipocampo	↑ Hipocampo	↓ Córtex Pré-frontal
DA	↓ Amígdala	↓ Amígdala	-
DOPAC	-	-	-
DOPAC/DA	↑ Estriado	↑ Amígdala	-
5-HT	-	-	↑ Estriado
5-HIAA	-	-	-
5-HIAA /5-HT	-	-	↑ Bulbo Olfatório ↓ Estriado

- Significa níveis não alterados do analito nas áreas encefálicas investigadas; ↓ ou ↑ significa $p < 0,05$; ↓↓ significa $p < 0,01$.

2.6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente capítulo mostraram que a administração bilateral de 6-OHDA no LC é capaz de induzir morte neuronal apoptótica dos neurônios noradrenérgicos presente nesta estrutura, acompanhada de níveis reduzidos de NA no LC. Ainda, evidenciou-se disfunção da neurotransmissão noradrenérgica no bulbo olfatório, córtex pré-frontal, hipocampo e estriado. De maneira interessante, foram observadas alterações da neurotransmissão dopaminérgica na amígdala e estriado, enquanto que o sistema serotoninérgico foi discretamente afetado no bulbo olfatório e estriado. De especial atenção, a lesão do LC induzida pela 6-OHDA em ratos promoveu prejuízo da discriminação olfatória, MCD, MLC e causou comportamento tipo-depressivo em ratos.

O mecanismo de ação neurotóxico da 6-OHDA está relacionado com a indução de estresse oxidativo. Devido a sua alta hidrofiliabilidade, esta substância não atravessa a BHE, precisando ser administrada diretamente na região encefálica onde se deseja causar a lesão. Uma vez no cérebro, a 6-OHDA é captada por neurônios catecolaminérgicos através dos transportadores NET e DAT, culminando com a formação de EROs, disfunção mitocondrial e, por fim, morte neuronal (BLUM *et al.*, 2001; BLANDINI, ARMENTERO e MARTIGNONI, 2008). Destaca-se aqui o uso de ferramentas farmacológicas, como bloqueadores dos NET e DAT, para o direcionamento e seletividade da lesão causada pela neurotoxina para os sistemas dopaminérgico ou noradrenérgico, respectivamente. A utilização dessa estratégia para obtenção de lesões seletivas do sistema dopaminérgico é frequente, sendo utilizado principalmente a administração prévia de desipramina (WADDINGTON, 1980; JACKSON-LEWIS *et al.*, 1995; PRZEDBORSKI *et al.*, 1995; MATHEUS *et al.*, 2016). Contudo, no que versa sobre o sistema noradrenérgico, o uso de bloqueadores do DAT, como a nomifensina (TATSUMI *et al.*, 1997; CAILLE *et al.*, 1999; GUIMARAES *et al.*, 2013), tem sido negligenciado, tornando a maioria dos resultados encontrados na literatura passíveis de questionamentos acerca do envolvimento de danos no sistema dopaminérgico (SULLIVAN *et al.*, 1994; VANDERWOLF e BAKER, 1996; TSURUOKA *et al.*, 2011; SZOT *et al.*, 2016).

Somada a seletividade da lesão, a 6-OHDA apresenta como vantagem – em relação as outras neurotoxinas noradrenérgicas, a viabilidade econômica aliada à possibilidade de lesionar, inicialmente, apenas o núcleo noradrenérgico do LC, sem efeitos periféricos

decorrentes da lesão (JONSSON *et al.*, 1981; FRITSCHY e GRZANNA, 1991; BLANDINI, ARMENTERO e MARTIGNONI, 2008). Uma vez que as projeções do LC são largamente distribuídas por todo o encéfalo, a lesão primária do LC é desejável quando se busca compreender o impacto de alterações precoces nesse núcleo, a exemplo do que ocorre em doenças neurodegenerativas (MCMILLAN *et al.*, 2011).

Neste sentido, grandes contribuições foram obtidas a partir dos estagiamentos das doenças de Alzheimer e de Parkinson, realizados por Braak e colaboradores (BRAAK e BRAAK, 1991; BRAAK *et al.*, 2004). Através do aparecimento de marcadores neuropatológicos, proteína Tau hiperfosforilada para doença de Alzheimer e corpos de Lewy para a doença de Parkinson, eles conseguiram estagiar – temporalmente – as regiões acometidas nestas doenças, evidenciando o comprometimento precoce do LC (respectivamente, estágios 1 e 2 nas doenças de Alzheimer e de Parkinson) (BRAAK e BRAAK, 1991; BRAAK *et al.*, 2004).

Portanto, a administração bilateral de 6-OHDA no LC de ratos com proteção prévia dos terminais dopaminérgicos parece uma estratégia útil para indução dessa lesão precoce do LC. De fato, em nosso estudo nós caracterizamos temporalmente este dano neuronal através da infusão de diferentes doses de 6-OHDA no LC de ratos, mostrando que todas as doses foram capazes de promover o processo de degeneração neuronal a partir de, ao menos, 7 dias o qual se manteve por pelo menos até os 42 dias pós-cirúrgicos. Como a via de morte neuronal induzida por esta neurotoxina depende da idade do animal e da estrutura alvo lesionada (BLUM *et al.*, 2001), a ativação da via apoptótica também foi demonstrada em uma baixa dose de 6-OHDA. De especial importância, essa é a primeira vez na literatura que é reportada a indução de apoptose causada pela administração de 6-OHDA no LC.

Sabe-se que o processo de apoptose é dependente da ativação de proteases, denominadas caspases. Por sua vez, as caspases são reguladas pela família Bcl2, que é dividida em moléculas pró-apoptóticas e antiapoptóticas. As proteínas antiapoptóticas da família Bcl2, como Bcl2 e Bcl-XL, inibem a apoptose por prevenirem a liberação do citocromo *c*, enquanto que os membros pró-apoptóticos, como a Bax, Bid e Bak, favorecem a sua liberação. Além disso, a expressão de Bcl2 é capaz de inibir a geração de EROs, a acidificação intracelular, bem como estabilizar o potencial de membrana mitocondrial. A homeostasia é mantida pelo controle dos níveis de proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas. Quando essa relação favorece à Bax, esta é translocada do

citoplasma para a membrana mitocondrial externa, onde agrupa-se na forma de oligômero e adentra a mitocôndria, possibilitando a rápida liberação do citocromo *c*. Quando no citosol, o citocromo *c* forma um complexo com a APAF1 e a caspase-9, o chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9, que ativará a caspase-3 que promoverá a apoptose (HENGARTNER, 2000; KROEMER, GALLUZZI e BRENNER, 2007).

Os resultados do presente estudo demonstram, pela primeira vez, que a degeneração causada pela dose de 5 µg/hem de 6-OHDA no LC foi acompanhada de um aumento na relação entre as proteínas Bax/Bcl2, resultando no aumento dos níveis de caspase 3 clivada. Evidências prévias obtidas em estudos *in vitro* e *in vivo* corroboram com nossos achados (JEON, JACKSON-LEWIS e BURKE, 1995; BLUM *et al.*, 1997; OCHU, ROTHWELL e WATERS, 1998; CUTILLAS *et al.*, 1999). Em células da linhagem PC12 foi encontrado uma elevação dos níveis de Bax 4 e 6 h após o tratamento com 6-OHDA (BLUM *et al.*, 1997), assim como a ativação das caspases 2, 3 e 7 após exposição à neurotoxina (OCHU, ROTHWELL e WATERS, 1998). Em ratos lesionados com 6-OHDA no estriado também foi observada a ativação da via de apoptose culminando em aumento dos níveis de caspase 3 no LC (JEON, JACKSON-LEWIS e BURKE, 1995; CUTILLAS *et al.*, 1999).

Como resultado da ativação da apoptose, foi encontrada uma diminuição do imunoconteúdo da proteína DBH no LC dos ratos lesionados com 6-OHDA, associada à redução dos níveis de NA no LC. A mensuração da proteína DBH é utilizada como um marcador seletivo de dano noradrenérgico, uma vez que esta é uma enzima chave para a síntese de NA, sendo expressa somente por neurônios noradrenérgicos. Nossos dados estão de acordo com os descritos por Szot *et al.* em camundongos C57Bl/6, onde a expressão de DBH e o número de neurônios TH positivos foram reduzidos nos animais tratados com 6-OHDA (SZOT *et al.*, 2012a; 2016). Ainda, estes autores observaram redução nos níveis de NA no córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala 3 dias após a indução do dano noradrenérgico do LC por 10 µg/hem (SZOT *et al.*, 2012b). Embora tenhamos conseguido reproduzir a indução de disfunção noradrenérgica no bulbo olfatório, córtex pré-frontal, hipocampo e estriado, a administração bilateral de 5 µg/hem de 6-OHDA no LC de ratos não causou qualquer alteração na neurotransmissão noradrenérgica na amígdala, sugerindo diferenças dos efeitos desta neurotoxina quanto as espécies, dose e período de avaliação.

De maneira importante, no presente estudo foi possível observar alterações comportamentais decorrentes, ao menos em parte, das modificações neuroquímicas induzidas pela lesão do LC. A infusão bilateral de 6-OHDA no LC promoveu prejuízos motores, olfatório, e nas MCD e MLD, bem como a indução de comportamentos do tipo-depressivo em ratos. De especial relevância, este trabalho mostrou pela primeira vez que a lesão noradrenérgica do LC induzida por 6-OHDA promove distúrbios olfatórios e tipo-depressivo em ratos.

Contudo, para a investigação das funções olfatória, cognitiva e emocional, é importante excluir possíveis efeitos deletérios da administração de 6-OHDA no LC sobre a performance motora dos animais, uma vez que alterações motoras induzem vieses na interpretação dos resultados obtidos nos demais testes comportamentais. A curva dose-resposta de 6-OHDA frente a locomoção, equilíbrio e coordenação motora dos animais demonstrou que apenas a maior dose de 6-OHDA testada (20 µg/hem) causou comprometimento motor, corroborando resultados prévios de outros trabalhos que demonstraram que doses baixas de 6-OHDA (6 µg/hem) não alteram a habilidade motora de ratos (GOLDSTEIN, 1997), sendo este prejuízo motor observado somente em doses mais elevadas (12 µg/hem) (RUCKERT, BUBSER e SCHMIDT, 1997).

Assim sendo, as alterações olfatórias, cognitivas e emocionais decorrentes da degeneração do LC foram avaliadas após a degeneração do LC ser induzida pela dose de 5 µg/hem de 6-OHDA.

A percepção e o aprendizado olfatório podem ser mensurados em roedores por uma variedade de paradigmas, tais como a habituação, o aprendizado perceptual e a discriminação de odores (LINDER e CLELAND, 2016). Na pesquisa básica, o teste de discriminação olfatória proposto por Prediger, Batista e Takahashi (2005) tem sido utilizado com o objetivo de verificar possíveis déficits olfatórios em modelos animais da doença de Parkinson (PREDIGER *et al.*, 2006; TADAIESKY *et al.*, 2008), da doença de Alzheimer (SANTOS *et al.*, 2017) e decorrentes do envelhecimento (PREDIGER, BATISTA e TAKAHASHI, 2005).

Uma vez que aproximadamente 40% dos neurônios do LC são projetados para o bulbo olfatório, inervando quase todas as suas camadas (com exceção das mais superficiais) (SHIPLEY, HALLORAN e DE LA TORRE, 1985), é esperado que a lesão deste sistema influencie nas funções olfatórias. De fato, nosso trabalho mostrou que 7 dias após a lesão do LC pela 6-OHDA os animais apresentaram um déficit olfatório no teste de discriminação olfatória. Corroborando com o

envolvimento da disfunção da transmissão noradrenérgica no prejuízo olfatório encontrado em nosso trabalho, camundongos tratados com a neurotoxina noradrenérgica DSP4 não habituaram à apresentação repetida de odores, normalizando o comportamento após a administração de NA no bulbo olfatório (GUERIN *et al.*, 2008). A infusão de 6-OHDA no bulbo olfatório de roedores, tanto ratos quanto camundongos, também causou modificações na função olfatória, como prejuízo da especificidade de uma memória olfatória (ROYET, GERVAIS e ARANEDA, 1983; GUAN, BLANK e DLUZEN, 1993). Somado a isso, camundongos transgênicos utilizados como modelo da doença de Alzheimer apresentaram prejuízos na memória e discriminação olfatória associados à neurodegeneração do LC ou envelhecimento (GUERIN *et al.*, 2009; REY *et al.*, 2012).

Concomitantemente, nossos dados demonstram uma correlação e uma limitação em relação as alterações olfatórias observadas na clínica em portadores de doenças neurodegenerativas, as quais tem sido relacionadas com disfunções da transmissão noradrenérgica mediada pelo LC (DOTY, 2015). Por um lado, a lesão do LC após a infusão de 6-OHDA causou um comprometimento precoce da função olfatória (7 dias), estando de acordo com os dados que apontam a anosmia e hiposmia como potenciais biomarcadores para o diagnóstico precoce dessas doenças (ATTEMS, WALKER e JELLINGER, 2014). Por outro lado, nosso modelo falhou em produzir um déficit olfatório irreversível. Este mesmo perfil de reversibilidade do prejuízo olfatório foi observado no modelo de doença de Parkinson induzido pela administração i.n. de MPTP em ratos (PREDIGER *et al.*, 2006).

Por conseguinte, o déficit da discriminação olfatória não pode ser correlacionado com a redução dos níveis de NA no bulbo olfatório, o qual se manteve, pelo menos, até 42 dias após a indução da lesão com 6-OHDA. Entretanto, é conhecido que as disfunções do sistema olfatório podem envolver desde o seu epitélio até estruturas corticais (DOTY, 2015). Recentemente, Pellegrino *et al.* (PELLEGRINO *et al.*, 2016) demonstraram através de estudos de ressonância magnética que pacientes com hiposmia possuem uma menor ativação da amígdala, córtex cingulado anterior e córtex orbitofrontal em relação ao grupo controle. Portanto, o prejuízo olfatório causado pela administração de 6-OHDA no LC pode estar relacionado com a disfunção noradrenérgica observada no córtex pré-frontal medial e no bulbo olfatório em 7 dias, com a redução de DA na região da amígdala neste período, ou ainda, com o conjunto dessas alterações. Adicionalmente, WOO *et al.* (1996) encontraram uma maior densidade dos receptores adrenérgicos β_1 e β_2

no bulbo olfatório após a indução de uma lesão unilateral do LC pela 6-OHDA em ratos neonatos, sugerindo que alterações plásticas no bulbo olfatório também possam explicar a normalização da função olfatória observada em nosso estudo.

Os déficits cognitivos nas MCD e MLD observados em nosso estudo após a lesão do LC com a 6-OHDA também possuem suporte na literatura. Estudos prévios demonstraram que a administração de 6-OHDA no LC ou no FND de ratos provocou diversos prejuízos cognitivos, como déficit de atenção e aprendizagem e prejuízo na aquisição e evocação em diversas tarefas, tais como o labirinto em T, discriminação tátil/palatável, condicionamento aversivo e labirinto aquático (PISA e FIBIGER, 1983; COLE e ROBBINS, 1987; JARBE *et al.*, 1988; PISA, MARTIN-IVERSON e FIBIGER, 1988; SELDEN *et al.*, 1990; VANDERWOLF e BAKER, 1996; TAIT *et al.*, 2007). Ainda, Khakpour-Taleghani *et al.* (2008) descreveram que a inativação bilateral do LC por lidocaína não afetou a aquisição, mas afeta a consolidação da MLD na tarefa da EPI.

A MCD consiste de uma versão temporária acessível segundos até horas após uma memória ser recentemente adquirida, enquanto que a formação e a consolidação de uma MLD se referem as etapas necessárias para a evocação de memórias após longos períodos de tempos (IZQUIERDO *et al.*, 1999). Ainda, sabe-se que, para uma memória ser adquirida, armazenada e posteriormente lembrada ocorre interações complexas entre várias estruturas cerebrais, como hipocampo, amígdala e áreas corticais (SQUIRE e DEDE, 2015). Neste sentido, ambos os prejuízos mnemônicos induzidos pela administração de 6-OHDA no LC podem estar associados à disfunção noradrenérgica no córtex pré-frontal e no hipocampo, bem como a dopaminérgica na amígdala. Entretanto, de acordo com a relação temporal de nossos resultados, sugere-se que o déficit da MCD, principalmente no TRO, esteja mais associado às alterações noradrenérgicas no córtex pré-frontal, enquanto que as alterações catecolaminérgicas no hipocampo e amígdala estariam mais envolvidas com o comprometimento da MLD no TRO e de ambas as memórias na EPI.

Corroborando com esta hipótese, Mello-Carpes e Izquierdo (2013) demonstraram que a via do núcleo do trato solitário → núcleo paragigantocelular → LC → hipocampo é requerida para a consolidação de uma MLD no TRO. Já na EPI, a modulação noradrenérgica é requerida tanto no córtex pré-frontal medial como no hipocampo dorsal para a aquisição do aprendido (YANG e LIANG, 2014). Além disso, a administração de NA no córtex pré-frontal medial imediatamente antes

da seção de treino do TRO reverte os prejuízos na MCD e MLD causados pela lesão bilateral do LC induzida por 6-OHDA (dados não publicados do nosso grupo de pesquisa).

Adicionalmente, a amígdala possui um papel importante na formação de memórias emocionais, como a memória avaliada na EPI, onde um estímulo sensorial (choque) promove uma resposta adaptativa (não descer da plataforma) (UEMATSU, TAN e JOHANSEN, 2015). Nossos resultados evidenciaram prejuízos cognitivos na tarefa da EPI 7 e 21 dias após a indução da lesão do LC por 6-OHDA, sendo estes os mesmos períodos nos quais foi encontrado depleção dopaminérgica na amígdala. Entre os neurotransmissores liberados nesta estrutura encefálica, a DA possui um papel crítico na formação de memórias de caráter emocional, sendo necessária a modulação de receptores dopaminérgicos para a formação de uma memória de medo (LEE, LEE e KIM, 2016). Shi *et al.* (2017) demonstraram, recentemente, o envolvimento dos receptores dopaminérgicos do tipo D2 da amígdala basolateral para a extinção a longo prazo de uma memória de medo.

Por fim, a administração bilateral de 6-OHDA no LC de ratos foi capaz de causar comportamento tipo-depressivo a partir de 21 dias após a cirurgia. No entanto, a lesão não alterou os parâmetros relacionados à ansiedade e anedonia avaliados. Baseado nos níveis de monoaminas e seus metabólitos encontrados neste estudo, a exacerbação do comportamento tipo-depressivo pela lesão do LC pode estar relacionada à disfunção da neurotransmissão noradrenérgica no estriado, hipocampo e córtex pré-frontal. Podendo ainda ter alguma participação do prejuízo dopaminérgico evidenciado na amígdala. A indução do comportamento tipo-depressivo após a administração de 6-OHDA no LC foi recentemente descrita em camundongos C57Bl/6 (SZOT *et al.*, 2016). Szot *et al.* (2016) reportaram que uma lesão pequena de neurônios do LC (cerca de 25 a 40%) induzida pela administração bilateral de 5 µg/hem de 6-OHDA induz comportamento tipo-depressivo avaliado no TNF 21 dias após a infusão da neurotoxina.

Contudo, o nosso trabalho é o primeiro a demonstrar esse efeito tipo-depressivo em ratos após a administração bilateral de 6-OHDA no LC. Anteriormente, Cervo *et al.* (1991) já haviam investigado o efeito de 6 µg/hem de 6-OHDA no LC de ratos frente ao TNF, porém não observaram alteração comportamental 14 dias após a cirurgia, corroborando com nossos achados que o comportamento tipo-depressivo só começa a ser expresso após decorridos 21 dias da indução da lesão. O mesmo foi descrito com a utilização de diferentes doses da neurotoxina DSP4, em que até 15 dias não foram encontradas alterações tipo-

depressivas nesse teste (HARRO *et al.*, 1999a; HARRO *et al.*, 1999b; RAMPERSAUD *et al.*, 2012).

De maneira oposta ao encontrado em nosso estudo, camundongos lesionados no LC com 6-OHDA apresentaram um comportamento do tipo-anedônico no teste de preferência à sacarose 21 dias após a administração da neurotoxina, indicando diferenças dos efeitos neurotóxicos da lesão do LC por 6-OHDA entre essas espécies (SZOT *et al.*, 2016). Corroborando com uma possível distinção entre espécies, ratos tratados com DSP4 também não apresentaram alterações no teste de preferência a sacarose duas semanas após a administração da neurotoxina (HARRO *et al.*, 1999a; RAMPERSAUD *et al.*, 2012).

Em relação a alterações preditivas de ansiedade, camundongos com 12 meses de idade apresentaram comportamento tipo-ansioso no teste do campo aberto após injeções mensais de DSP4 (JARDANHAZI-KURUTZ *et al.*, 2010). Por outro lado, ratos tratados com esta mesma neurotoxina apresentaram um aumento da porcentagem de tempo nos braços abertos do LCE 28 dias após a administração, indicando um efeito tipo-ansiolítico induzido por esta neurotoxina (LAPIZ *et al.*, 2001). Além destes dados não estarem de acordo com os demonstrados em nosso estudo após uma lesão do LC por 6-OHDA, é importante destacar que a degeneração causada pelo DSP4 não é restrita ao LC, podendo afetar outros núcleos noradrenérgicos.

2.7 CONCLUSÕES

Com base no exposto, concluímos que a 6-OHDA foi capaz de ativar a via de apoptose e promover neurodegeneração noradrenérgica do LC de ratos, que culminou em disfunção monoaminérgica central, prejudicando, de maneira dose- e tempo-dependente, a performance motora, olfatória, cognitiva e emocional dos animais. De especial destaque, é a primeira vez na literatura que é reportada a indução de prejuízo na discriminação olfatória e comportamento tipo-depressivo após a indução de lesão do LC pela infusão de 6-OHDA. Finalmente, o presente estudo é pioneiro em mostrar a ativação da via de apoptose no LC após a administração de 6-OHDA nesta estrutura.

3 CAPÍTULO 3: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE NORADRENALINA FRENTE AOS PREJUÍZOS COMPORTAMENTAIS INDUZIDOS PELA ADMINISTRAÇÃO DE 6-OHDA NO LC: ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES β_3 -ADRENÉRGICOS

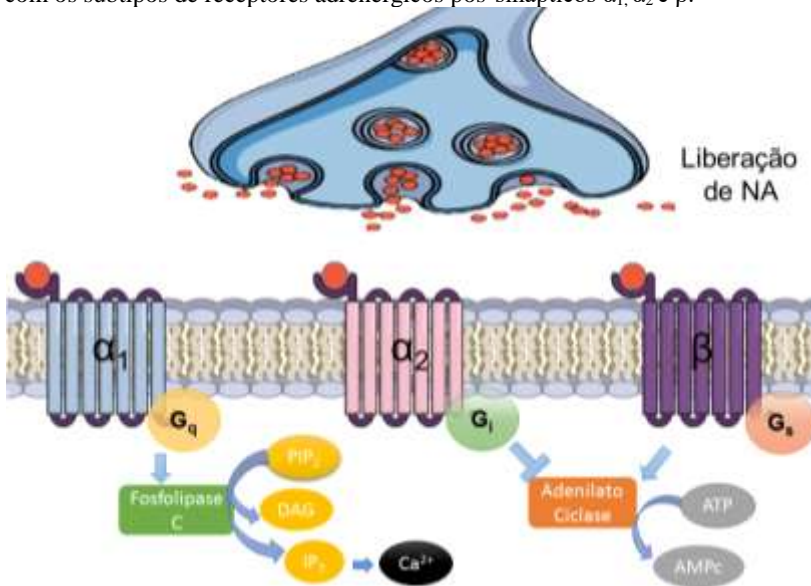
3.1 INTRODUÇÃO

3.1.1 Receptores adrenérgicos

Os receptores adrenérgicos [α_1 (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}); α_2 (α_{2A} , α_{2B} , α_{2C}) ou β (β_1 , β_2 , β_3)] podem ser ativados pela NA e adrenalina, embora no SNC a modulação seja realizada basicamente pela NA. Esses receptores pertencem a família dos receptores metabotrópicos, ou seja, apresentam 7 domínios transmembrana em forma de α -hélice conectados por três voltas intracelulares e extracelulares, uma porção amino-terminal extracelular e outra carboxi-terminal intracelular, sendo esta última a região de acoplamento da proteína G (BALDWIN, 1993). Todos os subtipos de receptores adrenérgicos podem ser encontrados em neurônios pós-sinápticos. No entanto, os receptores do subtipo α_2 também estão presentes nos terminais nervosos e na região somatodendrítica de neurônios pré-sinápticos. Quando ativados, os receptores α_2 possuem como função a inibição da liberação de neurotransmissores e redução da frequência de disparo neuronal em neurônios monoaminérgicos (BYLUND, 2007).

Como ilustrado na Fig. 17, os receptores do subtipo α_1 estão acoplados à proteína G estimulatória do tipo G_q , que desencadeia a formação dos segundos mensageiros trifosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG), com consequente aumento do cálcio (Ca^{2+}) intracelular, através da ativação da enzima fosfolipase C. Já os receptores do subtipo α_2 possuem um caráter inibitório devido ao seu acoplamento à proteína G do tipo G_i que, quando estimulada, inibe a atividade da enzima adenilato ciclase, reduzindo a formação do segundo mensageiro monofosfato cíclico de adenosina (AMPC). Por sua vez, os receptores adrenérgicos do subtipo β , que são acoplados à proteína G estimulatória do tipo G_s , ativam a adenilato ciclase, elevando os níveis intracelulares de AMPC (BYLUND, 2007).

Figura 17 – Cascatas de sinalização moduladas pela interação da noradrenalina com os subtipos de receptores adrenérgicos pós-sinápticos α_1 , α_2 e β .



Legenda: AMPc = adenosina monofosfato cíclico; ATP = trifosfato de adenosina; DAG = diacilglicerol; IP_3 = trifosfato de inositol; NA = noradrenalina; PIP_2 = fosfatidilinositol-4,5-bifosfato.

Fonte: Figura criada pela autora.

Estes receptores apresentam-se amplamente distribuídos no SNC, estando presentes tanto em células neuronais como em células não neuronais (SZABADI, 2013). Nas estruturas cerebrais, os receptores adrenérgicos apresentam ampla expressão (níveis de RNAm) e distribuição, como apresentado no Quadro 3. Desta forma, é evidente a importância do sistema noradrenérgico em algumas estruturas encefálicas. Destaca-se que no LC é observada uma elevada expressão de auto receptores α_{2A} , essenciais para a modulação da liberação de NA por suas projeções axonais. O córtex cerebral e o hipocampo expressam todos os subtipos de receptores adrenérgicos, com exceção do subtipo α_{2B} , que é encontrado apenas no tálamo. O sistema olfatório, principalmente o bulbo olfatório, se destaca pelos altos níveis de RNAm de uma ampla variedade de receptores adrenérgicos. A amígdala, cerebelo e tálamo, embora em menor proporção, também apresentam uma expressão variada destes receptores (MCCUNE, VOIGT e HILL, 1993; NICHOLAS, PIERIBONE e HOKFELT, 1993; SCHEININ *et al.*,

1994; SUMMERS *et al.*, 1995; DAY *et al.*, 1997; DOMYANCIC e MORILAK, 1997; ABRAHAM *et al.*, 2008).

Quadro 3 – Expressão gênica semi-quantitativa dos subtipos dos receptores adrenérgicos α_1 , α_2 e β em diferentes áreas encefálicas de ratos machos adultos.

Estrutura Receptor	α_{1A}	α_{1B}	α_{1D}	α_{2A}	α_{2B}	α_{2C}	β_1	β_2	β_3
Amígdala	++	+	+	+ / ++	-	+	+	+ / ++	
Cerebelo	++	+	±	+	-	+ / ++	±	++	+
Córtex	++	++	+++	++	-	+ / ++	++ / +++	++	+++
Estriado	±	±	-	-	-	+++	±	±	++
Hipocampo	+	±	++++	++	-	+++	++	+++	+++
Hipotálamo	++	+	±	++	-	±	-	+	+
LC	++	±	-	++++	-	-	-	-	
Núcleos da Rafe	+	+++	-	±	-	±	±	-	
Sistema Olfatório	++++	++	++++	+	-	+++	+	+++	
Tálamo	+	+++	±	±	+ / ++	±	+++	++	

- Significa níveis não detectáveis de mRNA; ± significa expressão muito baixa; + significa expressão baixa; ++ significa expressão moderada; +++ significa expressão alta; ++++ significa expressão abundante. Quadrantes em branco significam que a expressão gênica ainda não foi avaliada. Dados obtidos a partir dos trabalhos de Mccune, Voigt e Hill (1993), Nicholas, Pieribone e Hokfelt (1993), Scheinin *et al.* (1994), Summers *et al.* (1995), Nicholas, Hokfelt e Pieribone (1996), Day *et al.* (1997), Domyancic e Morilak (1997) e Abraham *et al.* (2008).

Além disso, sabe-se que os receptores adrenérgicos dos subtipos α_1 , β_1 e β_2 são amplamente expressos em astrócitos (HERTZ *et al.*, 2010). Recentemente, os receptores β_3 também foram identificados nestas células (CATUS *et al.*, 2011). Ainda, os receptores dos subtipos α e β são encontrados em capilares sanguíneos, sendo importantes no controle da microcirculação cerebral (HAMEL, 2006).

3.1.2 Receptores β_3 -adrenérgicos

O receptor β_3 -adrenérgico foi descoberto no início da década de 1980, sendo inicialmente denominado de receptor β -adrenérgico atípico, por diferir dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgico (ARCH, 1989). O interesse por esse receptor aumentou desde que sua sequência de aminoácidos foi identificada, evidenciando que o receptor β_3 -adrenérgico possui uma homologia de aproximadamente 50% com os outros subtipos de receptores β -adrenérgico (PERRONE e SCILIMATI, 2011). Estudos de modelagem molecular identificaram que os resíduos Asp 117, Ser 208, Ser 209, Ser 212, Arg 315, Asn 332, localizados no sítio de ligação do receptor β_3 -adrenérgico, são importantes para sua interação com ligantes através de pontes de hidrogênio (SAHI, TEWATIA e MALIK, 2012).

De acordo com o ligante, o receptor β_3 -adrenérgico possui diferentes vias de sinalização que podem ser ativadas (SAHI, TEWATIA e MALIK, 2012). Como descrito anteriormente, este receptor é do tipo metabotrópico com 7 domínios transmembranares que se acopla um subtipo de proteína G. Geralmente, o receptor β_3 -adrenérgico interage com a proteína G_s , estimulando a produção de AMPc (Fig. 22). Contudo, há evidências de que agonistas seletivos dos receptores β_3 -adrenérgicos desencadeiam efeitos mediados pela ativação da via de sinalização da proteína G_i – óxido nítrico sintase endotelial (eNOS/NOS-3) – óxido nítrico (NO) – monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) (POTT *et al.*, 2006).

Em humanos, estes receptores são expressos em diversos tecidos, como, por exemplo, coração, tecido adiposo, vesícula biliar, trato gastrointestinal, bexiga urinária e SNC. Devido a sua vasta expressão e efeitos fisiológicos, o receptor β_3 -adrenérgico tem sido investigado como alvo para o tratamento de muitas doenças, tais como, obesidade, diabetes tipo 2, caquexia, síndrome metabólica, insuficiência cardíaca, bexiga hiperativa, câncer do colo do útero, síndrome do intestino irritável, ansiedade e depressão (PERRONE e SCILIMATI, 2010). Somado a isto, possuem um papel essencial para a homeostase da glicose e balanço energético (SAHI, TEWATIA e MALIK, 2012; DIENEL e CRUZ, 2016).

Embora estudos de ligação específica tenham falhado em encontrar a presença dos receptores β_3 -adrenérgicos no SNC (SIMIAND *et al.*, 1992), estudos utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) indicaram que estes receptores são expressos no hipocampo, córtex, estriado, amígdala, hipotálamo, cerebelo e tronco cerebral

(RODRIGUEZ *et al.*, 1995; SUMMERS *et al.*, 1995; CLAUSTRE *et al.*, 2008), e também em astrócitos (CATUS *et al.*, 2011). Como abordado na seção 1.1.2.1, do capítulo 1, pág. 36, e corroborado pelos resultados apresentados no capítulo 2, a modulação noradrenérgica em algumas dessas regiões pode induzir alterações comportamentais, como os prejuízos olfatórios, cognitivos e tipo-depressivo demonstrados anteriormente.

Neste sentido, Claustre *et al.* (2008) demonstraram que a estimulação dos receptores β_3 -adrenérgicos pelo agonista SR58611A (Amibegron®) promoveu um aumento de 5-HT e NA em diversas regiões cerebrais de roedores. Esta elevação nos níveis de 5-HT tem sido relacionada a efeitos metabólicos periféricos mediados pela ativação desses receptores (CONSOLI *et al.*, 2007). No entanto, o aumento nos níveis de NA promovido pelo agonista SR58611A é proveniente da estimulação central dos receptores β_3 -adrenérgicos, provavelmente daqueles localizados no LC, que induzem o aumento da taxa de disparo desses neurônios. O efeito do SR58611A sobre os níveis de NA e a 5-HT tem sido sugerido como o mecanismo de seus efeitos tipo-antidepressivo e tipo-ansiolítico (CLAUSTRE *et al.*, 2008).

De especial atenção, a estimulação dos receptores β_3 -adrenérgicos contribui para a modulação da homeostase energética através do aumento da captação de glicose pelos astrócitos (CATUS *et al.*, 2011). Adicionalmente, uma melhora na consolidação da memória após a estimulação dos receptores β_3 -adrenérgicos tem sido observada e relacionada à captação astrocitária da glicose (GIBBS, HUTCHINSON e SUMMERS, 2008), uma vez que esse efeito é reduzido quando previamente é administrada uma forma não metabolizável da glicose, a 2-deoxiglicose, ou a citocalasina B, um inibidor do transportador de glicose (GIBBS e SUMMERS, 2002).

Em relação a função olfatória, é necessária uma melhor caracterização do envolvimento dos receptores β -adrenérgicos em adultos. No entanto, demonstrou-se que roedores adultos utilizam tanto receptores α - quanto β -adrenérgicos para realização da discriminação entre odores (LINSTER, NAI e ENNIS, 2011). Somado a isso, um experimento com ovelhas tratadas com propranolol (um antagonista não seletivo dos receptores β -adrenérgicos) no bulbo olfatório mostrou que estas falharam em reconhecer o odor de seus próprios cordeiros (LEVY *et al.*, 1990). Por outro lado, uma vasta literatura tem demonstrado a importância de receptores para o aprendizado olfatório, memórias olfatórias e preferência por odores em ratos recém-nascidos (para revisão Yuan, Shakhawat e Harley (2014)).

3.2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Com base na literatura e nos resultados apresentados até o momento, observa-se que a degeneração de neurônios noradrenérgicos no LC promovida pela administração de 6-OHDA nesta estrutura induziu prejuízos comportamentais – olfatórios, cognitivos e emocionais – e disfunção da neurotransmissão noradrenérgica nas seguintes regiões cerebrais: LC, bulbo olfatório, córtex pré-frontal, hipocampo e estriado. Desta forma, a disfunção/redução de NA nestas regiões pode estar envolvida na exacerbação de tais comprometimentos comportamentais. Somado a isto, há evidências de que os receptores β_3 -adrenérgicos modulam funções cognitivas e emocionais, possivelmente pela interação com a NA em regiões encefálicas que possuem uma maior expressão de receptores β_3 -adrenérgicos, como o córtex e o hipocampo. Além disso, o papel dos receptores β -adrenérgicos sobre a discriminação olfatória necessita ser melhor caracterizado.

Portanto, a hipótese desse capítulo prevê que a administração i.n. de NA restaura os comportamentos olfatório, cognitivo e tipo-depressivo induzidos pela infusão de 6-OHDA no LC de ratos por modular, ao menos em parte, os receptores β_3 -adrenérgicos.

3.3 OBJETIVOS

3.3.1 Objetivo geral

Este capítulo possuiu como objetivo geral determinar se a administração i.n. de NA é capaz de restaurar os comportamentos olfatório, cognitivo e tipo-depressivo causados pela infusão de 6-OHDA no LC de ratos por modular, ao menos em parte, os receptores β_3 -adrenérgicos.

3.3.2 Objetivos específicos

- Estudar o efeito restaurador da administração i.n. de NA frente aos prejuízos comportamentais promovidos pela infusão de 6-OHDA no LC de ratos;
- Avaliar o envolvimento dos receptores β_3 -adrenérgicos no efeito restaurador da NA através da administração i.n. do antagonista SR59230A.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Animais

Os animais e as suas condições de manutenção no biotério foram idênticas aquelas descritas previamente no item 2.4.1, capítulo 2, pág. 56.

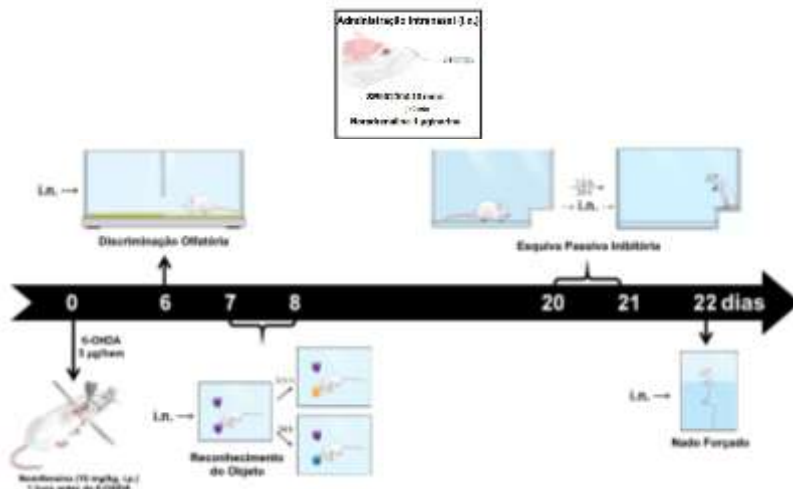
3.4.2 Drogas

O maleato de nomifensina foi dissolvido em solução salina a uma concentração de 10 mg/kg e administrada por via i.p. a um volume de 1 mL/kg (CAILLE *et al.*, 1999). A 6-OHDA foi dissolvida em solução salina contendo 0,02 % de ácido ascórbico a uma concentração de 2,5 µg/µL, da qual 2 µL foram administrados por hemisfério, totalizando a dose de 5 µg/hem. Apenas o veículo da 6-OHDA foi administrado no grupo SHAM. O antagonista seletivo dos receptores β_3 -adrenérgicos, SR59230A (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EUA), foi dissolvido em salina e infundido bilateralmente por via i.n. a uma taxa de 10 µL/min, na dose de 10 nmol/narina durante 1 min (KANZLER, JANUARIO e PASCHOALINI, 2011). O mesmo veículo, tempo e taxa de infusão foram utilizados para a infusão i.n. de NA (bitartarato de L-norepinefrina monohidratada, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EUA) na dose de 1 µg/narina (BARSEGYAN, MCGAUGH e ROOZENDAAL, 2014; YANG e LIANG, 2014).

3.4.3 Protocolo experimental

O efeito restaurador da NA frente aos prejuízos comportamentais induzidos pela 6-OHDA, bem como a modulação dos receptores β_3 -adrenérgicos neste efeito, foram investigados nesta etapa da presente tese. Para isso, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica (conforme descrito previamente no item 2.4.3, capítulo 2, pág. 58) e antes dos testes comportamentais receberam a infusão i.n. bilateral de salina ou SR59230A 10 min antes de nova administração i.n. de salina ou NA. As administrações i.n. foram realizadas imediatamente antes dos testes de discriminação olfatória e TNF. Para o TRO, as infusões foram feitas antes da sessão de treino, na fase de aquisição da memória; enquanto que para a tarefa da EPI as administrações foram realizadas imediatamente após a sessão de treino, na fase de consolidação da memória. A sequência detalhada dos testes comportamentais, bem como o momento das administrações i.n. estão representadas na Fig. 18.

Figura 18 – Linha do tempo ilustrando o protocolo utilizado neste capítulo para a avaliação do efeito da administração i.n. de noradrenalina, bem como da modulação dos receptores β_3 -adrenérgicos, frente aos prejuízos comportamentais induzidos pela administração de 6-OHDA no LC.



Fonte: Figura criada pela autora através da plataforma www.mindthegraph.com.

3.4.4 Administração intranasal

Para a administração i.n. de SR59230A e NA utilizou-se um procedimento semelhante ao descrito por Prediger *et al.* (2006). Os animais foram levemente anestesiados com isoflurano 0,96% (0.75 CAM; Abbot Laboratórios do Brasil Ltda, RJ, Brasil), e um tubo de polietileno (PE 10) foi introduzido aproximadamente 7 mm na narina do animal. Um volume de 10 μ L de SR59230A (correspondente a uma dose de 10 nmol/narina) (KANZLER, JANUARIO e PASCHOALINI, 2011) ou veículo foi administrado nas narinas do animal a uma taxa de infusão de 10 μ L/min, com o auxílio de uma micro seringa de 10 μ L (Hamilton, EUA), acoplada a uma bomba de infusão (Insight, Brasil) (Fig. 19). Após um intervalo de 10 min (KANZLER, JANUARIO e PASCHOALINI, 2011), utilizando o mesmo sistema de administração descrito acima, realizou-se a infusão i.n. de 10 μ L de solução contendo uma dose de 1 μ g de NA em cada narina (BARSEGYAN, MCGAUGH e ROOZENDAAL, 2014; YANG e LIANG, 2014).

Figura 19 – Representação do sistema utilizado para a administração i.n. do antagonista dos receptores β_3 -adrenérgicos SR59230A e noradrenalina em ratos.



Fonte: Figura criada pela autora através da plataforma www.mindthegraph.com.

3.4.5 Testes comportamentais

3.4.5.1 Discriminação olfatória

A avaliação no teste da discriminação olfatória feita no dia 6 após a cirurgia, foi realizada de acordo com o protocolo já descrito no item 2.4.4.3, capítulo 2, pág. 59.

3.4.5.2 Reconhecimento do objeto

O TRO foi conduzido nos dias 7 e 8 conforme o protocolo previamente descrito no item 2.4.4.4, capítulo 2, pág. 60.

3.4.5.3 Esquiva passiva inibitória

A tarefa da EPI foi realizada nos dias 20 e 21 de acordo com o protocolo previamente descrito no item 2.4.4.5, capítulo 2, pág. 61.

3.4.5.4 Nado forçado

No dia 22 foi realizado o TNF conforme o protocolo descrito no item 2.4.4.6, capítulo 2, pág. 62.

3.4.6 Análises estatísticas

A distribuição dos dados foi verificada pelo teste de normalidade de D'Agostino - Pearson. O teste *t* de Student foi utilizado para comparar a porcentagem de tempo e a porcentagem de reconhecimento frente ao valor teórico de 50% no teste de discriminação olfatória e TRO, respectivamente. Os dados provenientes da EPI foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Para análise estatística do TNF, aplicou-se ANOVA de duas vias seguida do *post hoc* de Tukey quando necessário.

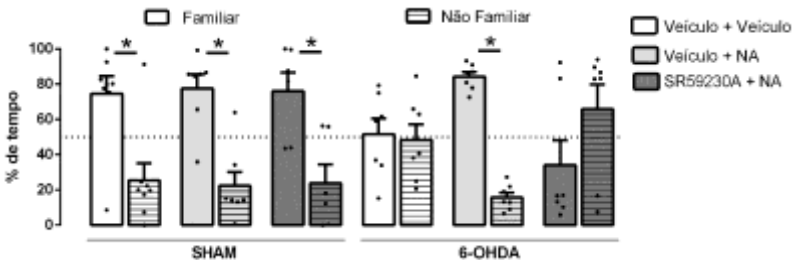
Os resultados estão apresentados como média \pm o E.P.M. exceto os dados da EPI que estão expressos como mediana com intervalos interquartis. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Todas as análises foram realizadas utilizando os programas computacionais GraphPad Prism 6.0 (GraphPad, San Diego, EUA) e Statistica 13.0 (StatSoft Inc., La Jolla, EUA).

3.5 RESULTADOS

3.5.1 A infusão intranasal de noradrenalina reverte os déficits olfatórios induzidos pela administração de 6-OHDA no LC através da modulação dos receptores β_3 -adrenérgicos

A Fig. 20 ilustra o efeito da infusão i.n. de NA e do antagonista dos receptores β_3 -adrenérgicos, SR59230, sobre o prejuízo olfatório causado pela lesão do LC 6 dias após a administração da 6-OHDA.

Figura 20 – Efeito da administração intranasal de noradrenalina e sua modulação sobre os receptores β_3 -adrenérgicos frente ao prejuízo na discriminação olfatória de ratos promovida pela lesão do LC por 6-OHDA.



Legenda: Os dados estão expressos em porcentagem de tempo que o animal permaneceu em cada compartimento (média + E.P.M. de 6 – 8 animais/grupo). * $p < 0,05$ comparado ao valor teórico de 50% (Teste *t* de Student). NA = noradrenalina.

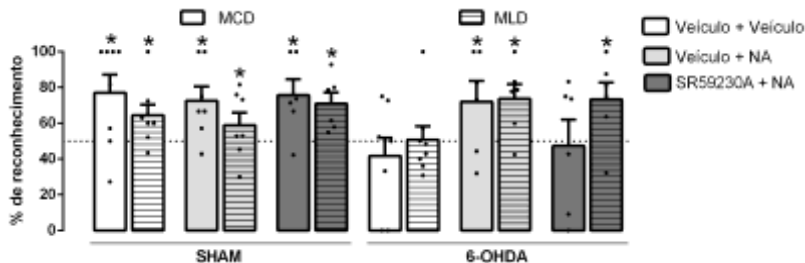
O teste *t* de Student revelou que todos os grupos SHAM foram capazes de discriminar os dois compartimentos [veículo + veículo: $t_{(7)} = 1,325$; $p = 0,0410$ / veículo + NA: $t_{(6)} = 3,512$; $p = 0,0126$ / SR59230 + NA: $t_{(5)} = 2,462$; $p = 0,0471$], demonstrando que as doses de SR59230 e NA não tiveram qualquer efeito *per se*. No entanto, corroborando com nossos dados anteriores, os ratos lesionados por 6-OHDA no LC que receberam apenas veículo pela via i.n. apresentaram porcentagens de tempo equivalentes em ambos os compartimentos [$t_{(6)} = 0,187$; $p = 0,8575$]. De especial interesse, esse déficit olfatório induzido pela 6-OHDA foi revertido pela infusão i.n. de NA [$t_{(6)} = 12,31$; $p < 0,0001$], devido a modulação – pelo menos em partes – dos receptores β_3 -adrenérgicos [$t_{(6)} = 1,135$; $p = 0,2996$], demonstrado pelo bloqueio do efeito restaurador da NA no grupo 6-OHDA (SR59230A + NA).

3.5.2 A infusão intranasal de noradrenalina restaura os prejuízos cognitivos no teste de reconhecimento de objeto induzidos pela administração de 6-OHDA no LC: envolvimento dos receptores β_3 -adrenérgicos

A fim de verificar o efeito da NA bem como a modulação dos receptores β_3 -adrenérgicos frente aos déficits cognitivos causados pela lesão do LC por 6-OHDA, infusões i.n. de SR59230A e NA foram realizadas antes da sessão de treino do TRO 7 dias após a cirurgia (Fig. 21). Nenhuma diferença estatística foi evidenciada entre o tempo de exploração dos objetos idênticos na fase de treino, demonstrando que os animais não possuíram preferência por nenhum deles (dados não mostrados).

Contudo, nas seções de teste, o teste *t* de Student mostrou que a porcentagem de reconhecimento exibida pelos animais de todos os grupos SHAM foram diferente do valor teórico de 50%, indicando que não houve efeito *per se* do SR59230A e da NA tanto na MCD [veículo + veículo: $t_{(7)} = 2,671$; $p = 0,0320$ / veículo + NA: $t_{(6)} = 2,821$; $p = 0,0303$ / SR59230 + NA: $t_{(5)} = 2,871$; $p = 0,0349$], como na MLD [veículo + veículo: $t_{(7)} = 2,451$; $p = 0,0440$ / veículo + NA: $t_{(6)} = 2,768$; $p = 0,0325$ / SR59230 + NA: $t_{(5)} = 3,401$; $p = 0,0192$]. De acordo com o demonstrado no capítulo anterior, os ratos lesionados com 6-OHDA exibiram um prejuízo da MCD nesta tarefa [$t_{(7)} = 0,331$; $p = 0,7500$], o qual foi revertido pela modulação dos receptores β_3 -adrenérgicos pela NA [veículo + NA: $t_{(5)} = 3,246$; $p = 0,0228$ / SR59230 + NA: $t_{(5)} = 0,182$; $p = 0,8628$].

Figura 21 – Efeito da infusão intranasal de noradrenalina e sua modulação sobre os receptores β_3 -adrenérgicos frente aos prejuízos mnemônicos promovidos pela administração de 6-OHDA no LC de ratos no teste do reconhecimento do objeto.



Legenda: Os dados estão expressos em porcentagem de reconhecimento do objeto novo (média + E.P.M.) de 6 – 8 animais/grupo. * $p < 0,05$ comparado ao valor teórico de 50% (Teste t de Student). MCD = memória de curta duração; MLD = memória de longa duração; NA = noradrenalina.

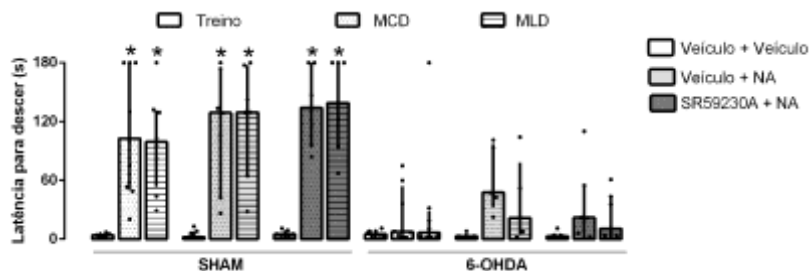
Por sua vez, a MLD no TRO foi prejudicada pela administração da neurotoxina no LC [$t_{(7)} = 0,0863$; $p = 0,9337$], sendo esta restaurada pela infusão i.n. de NA [$t_{(5)} = 2,910$; $p = 0,0334$]. No entanto, o efeito restaurador da NA sobre a MLD no TRO não foi bloqueado pela administração i.n. prévia do antagonista SR59230A [$t_{(5)} = 2,527$; $p = 0,0496$], indicando que este efeito da NA é independente da modulação dos receptores β_3 -adrenérgicos.

3.5.3 A infusão intranasal de noradrenalina não reverte o dano mnemônico causado pela administração de 6-OHDA no LC observado no teste da esQUIVA passiva inibitória

Como representado na Fig. 22, o efeito da NA também foi testado frente ao déficit nas MCD e MLD observados na EPI 20 dias após a indução da lesão do LC pela 6-OHDA. Neste sentido, as infusões i.n. foram realizadas imediatamente após a sessão de treino. O teste de Kruskal-Wallis evidenciou que todos os grupos SHAM apresentaram diferença significativa na latência para descer da plataforma entre a sessão de treino e ambas as sessões de teste [veículo + veículo: $H_{(3)} = 15,48$; $p = 0,0004$ / veículo + NA: $H_{(3)} = 13,58$; $p < 0,0001$ / SR59230 + NA: $H_{(3)} = 13,57$; $p = 0,0001$], demonstrando que os animais aprenderam a tarefa e recordam o choque. Corroborando com os dados anteriores, a lesão por 6-OHDA causou um prejuízo da MCD e MLD,

demonstrado pela ausência de diferença estatística entre a latência para descer da plataforma na sessão de treino e nas sessões de teste [$H_{(3)} = 1,685$; $p = 0,4306$]. Curiosamente, a dose de 1 $\mu\text{g}/\text{narina}$ de NA infundida imediatamente após a sessão de treino da EPI não foi capaz de restaurar a capacidade mnemônica dos animais nesta tarefa [$H_{(3)} = 5,936$; $p = 0,0698$].

Figura 22 – Efeito da infusão intranasal de noradrenalina e sua modulação sobre os receptores β_3 -adrenérgicos frente aos déficits cognitivos observados na tarefa da esquiwa passiva inibitória após a lesão do LC de ratos por 6-OHDA.



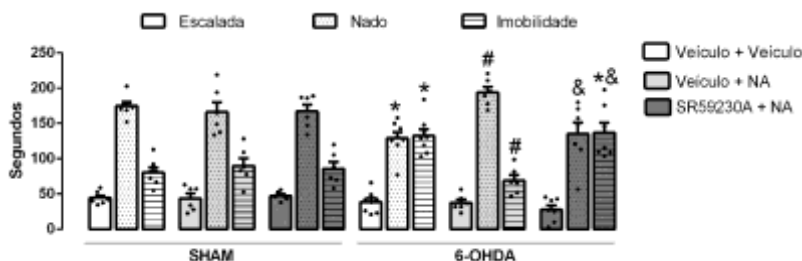
Legenda: A latência em segundos para descer da plataforma está representada como mediana com intervalo interquartil de 6 – 8 animais/grupo. $*p < 0,05$ comparado a sessão de treino do mesmo grupo (Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn). MCD = memória de curta duração; MLD = memória de longa duração; NA = noradrenalina.

3.5.4 A infusão intranasal de noradrenalina reverte o comportamento tipo-depressivo induzido pela administração de 6-OHDA no LC: envolvimento dos receptores β_3 -adrenérgicos

A Fig. 23 demonstra o efeito da infusão i.n. de NA e do antagonista SR59230, sobre o comportamento tipo-depressivo causado pela lesão do LC 22 dias após a administração da 6-OHDA. As infusões i.n. foram realizadas imediatamente antes da sessão de teste. A ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Tukey não demonstrou qualquer efeito *per se* do SR59230A e da NA frente ao comportamento no TNF. Porém, como esperado, os ratos lesionados por 6-OHDA no LC que receberam apenas veículo pela via i.n. apresentaram comportamentos do tipo-depressivo indicados pela redução no tempo de nado [$F_{(1,34)} = 13,233$; $p = 0,0009$] e aumento no tempo de imobilidade [$F_{(1,34)} = 27,172$; $p < 0,0001$]. De maneira interessante, o

comportamento tipo-depressivo induzido pela 6-OHDA foi revertido pela infusão i.n. de NA, demonstrado pelo aumento no tempo de nado [$F_{(1,34)} = 11,344$; $p = 0,0019$] e redução no tempo de imobilidade [$F_{(1,34)} = 13,148$; $p = 0,0009$]. Ainda, foi encontrada uma diferença significativa entre o grupo 6-OHDA (veículo + NA) e 6-OHDA (SR59230A + NA), indicando que o efeito restaurador da NA deve-se – pelo menos em partes – a modulação dos receptores β_3 -adrenérgicos [nado: $F_{(1,34)} = 6,891$; $p = 0,0129$ / imobilidade: $F_{(1,34)} = 11,993$; $p = 0,0015$].

Figura 23 – Efeito da administração intranasal de noradrenalina e sua modulação sobre os receptores β_3 -adrenérgicos frente ao comportamento tipo-depressivo induzido pela administração de 6-OHDA no LC de ratos.



Legenda: Os dados estão expressos em média + E.P.M. de 6 – 8 animais/grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SHAM (veículo + veículo); # $p < 0,05$ comparado ao grupo 6-OHDA (veículo + veículo); & $p < 0,05$ comparado ao grupo 6-OHDA (veículo + NA) (ANOVA de duas vias seguida do *post hoc* de Tukey). NA = noradrenalina.

3.6 DISCUSSÃO

O envolvimento da disfunção noradrenérgica no prejuízo da discriminação olfatória, déficits das MCD e MLD avaliados no TRO e comportamento tipo-depressivo causados pela administração bilateral de 6-OHDA no LC de ratos foi reforçado através do efeito restaurador observado após a infusão i.n. de NA. Esse efeito restaurador não foi observado na tarefa da EPI. Adicionalmente, foi demonstrado que o envolvimento – ao menos em parte – dos receptores β_3 -adrenérgicos no efeito restaurador exercido pela NA sobre os prejuízos da olfação, MCD e comportamento tipo-depressivo.

O envolvimento dos receptores β -adrenérgicos na modulação da função olfatória permanece pouco explorado na literatura. Entretanto, estudos farmacológicos e de modelagem molecular já demonstraram que

a combinação de efeitos da NA sobre a ativação dos receptores α_1 - e α_2 -adrenérgicos das células granulares e mitrais no bulbo olfatório são responsáveis pela modulação da detecção e discriminação de odores (LISTER, NAI e ENNIS, 2011). No presente estudo foi demonstrado que a infusão i.n. de NA reverteu o prejuízo na discriminação olfatória induzido pela degeneração do LC causada pela 6-OHDA através de modulação, ao menos em parte, dos receptores β_3 -adrenérgicos. Esta é a primeira evidência de que esse receptor adrenérgico possa estar associado a modulação de uma função olfatória. Uma vez que a expressão dos receptores β_3 -adrenérgicos ainda não foi reportada no sistema olfatório, sugere-se que esse efeito esteja relacionado a modulação cortical (RODRIGUEZ *et al.*, 1995; SUMMERS *et al.*, 1995).

Nossos dados relacionados a função cognitiva sugerem uma diferença entre os danos da aquisição da memória de reconhecimento (avaliada no TRO) e consolidação da memória aversiva (analisada na EPI) induzidas pela lesão do LC pela 6-OHDA. Esse mesmo perfil discriminatório já foi observado anteriormente (MELLO-CARPES e IZQUIERDO, 2013). Após a administração i.n. de NA, apenas os prejuízos na MCD e MLC observados no TRO foram revertidos. Neste sentido, a hipótese de que a disfunção mnemônica encontrada na EPI possa estar mais associada com o déficit dopaminérgico encontrado na amígdala ganha mais embasamento. De fato, camundongos deficientes de DA apresentaram reversão do déficit de aprendizado após os níveis de DA na amígdala serem reestabelecidos pela restauração da síntese de DA na área tegmentar ventral (FADOK, DICKERSON e PALMITER, 2009).

O envolvimento dos receptores β_3 -adrenérgicos também foi investigado, evidenciando que apenas o efeito restaurador da NA frente a MCD no TRO é mediado pela interação deste neurotransmissor com o receptor do tipo β_3 . A melh da consolidação da memória após a estimulação desses receptores tem sido associada a um aumento da captação astrocitária de glicose, via transportador de glicose GLUT 1 (GIBBS e SUMMERS, 2002; GIBBS, HUTCHINSON e SUMMERS, 2008). De maneira interessante, Tamburella *et al.* (2010) demonstraram que o agonista dos receptores β_3 -adrenérgicos estimula a expressão de BDNF hipocampal, um fator neurotrófico envolvido na mediação de funções cognitivas, incluindo a MCD (SUZUKI *et al.*, 2011). No entanto, a participação do receptor β_3 -adrenérgico no efeito restaurador da NA frente a MLD no TRO não pode ser completamente excluída uma

vez que apenas uma dose do antagonista SR59230A foi testada neste estudo.

Referente ao TNF, observamos que o comportamento tipo-depressivo induzido pela degeneração do LC após administração de 6-OHDA foi revertido pela administração i.n. de NA, devido a modulação – pelo menos em parte – dos receptores β_3 -adrenérgicos. De acordo com o apresentado e discutido no capítulo anterior, a exacerbação do comportamento tipo-depressivo pela lesão do LC provavelmente estaria relacionado a disfunção da neurotransmissão noradrenérgica, principalmente, no estriado, hipocampo e córtex pré-frontal. Podendo ainda ter alguma participação do prejuízo dopaminérgico evidenciado na amígdala. Desta forma, a reversão do comportamento tipo-depressivo pela administração i.n. de NA corroborou a participação do prejuízo noradrenérgico. Além disso, a NA parece mediar este efeito através da interação com os receptores β_3 -adrenérgicos.

A caracterização funcional do papel dos receptores β_3 -adrenérgicos em alterações emocionais tem sido demonstrado através dos efeitos apresentados pelo seu agonista seletivo, SR58611, o qual já chegou até estudos clínicos de fase III para o tratamento de transtornos de ansiedade e da depressão (PERRONE e SCILIMATI, 2011). Em roedores, a ativação do receptor β_3 -adrenérgico promoveu efeito tipo-ansiolítico e antidepressivo associado a uma elevação nos níveis de 5-HT e NA em diversas regiões cerebrais (CONSOLI *et al.*, 2007; CLAUSTRE *et al.*, 2008; OVERSTREET, STEMMELIN e GRIEBEL, 2008; STEMMELIN *et al.*, 2008; TAMBURELLA *et al.*, 2010). O potencial antidepressivo do SR58611 também foi mostrado frente a um modelo inato de depressão e no modelo de estresse crônico moderado, com efeitos comparáveis a de antidepressivos usados na clínica, como a fluoxetina (OVERSTREET, STEMMELIN e GRIEBEL, 2008; STEMMELIN *et al.*, 2008). Destaca-se, ainda, que o aumento de NA foi relacionado ao aumento na taxa de disparo dos neurônios do LC, o qual foi evidenciado tanto após administração sistêmica quanto local do agonista (CLAUSTRE *et al.*, 2008).

3.7 CONCLUSÕES

Os resultados deste capítulo demonstraram de maneira pioneira o efeito restaurador da infusão i.n. de NA, através da modulação, ao menos em parte, dos receptores β_3 -adrenérgicos, frente ao prejuízo olfatório, o déficit da MCD acessado no TRO e o comportamento tipo-depressivo causados pela administração de 6-OHDA no LC de ratos.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através do uso de abordagens comportamentais e neuroquímicas demonstramos que a administração de 6-OHDA no LC induz degeneração noradrenérgica desse sistema, disfunção monoaminérgica central e exacerbação de déficits comportamentais. Destaca-se, ainda, que demonstramos pela primeira vez que a lesão noradrenérgica seletiva promovida por 6-OHDA no LC ativa a via de morte neuronal por apoptose, através da elevação dos níveis de caspase-3 e da relação Bax/Bcl2. Deve ser destacado que o prejuízo na discriminação olfatória e o comportamento tipo-depressivo causado por esse protocolo de degeneração ainda não havia sido demonstrado em ratos. Sugerimos, ainda, que o déficit olfatório aqui encontrado possa estar associado a alterações da neurotransmissão noradrenérgica no bulbo olfatório e córtex pré-frontal. Por outro lado, o dano da memória de reconhecimento possivelmente está associado às alterações noradrenérgicas hipocámpais e no córtex pré-frontal, enquanto que uma redução dos níveis de dopamina na amígdala estaria mais associada ao prejuízo de memórias aversivas. Já o comportamento tipo-depressivo poderia ser desencadeado por alterações noradrenérgicas no hipocampo e estriado, dopaminérgicas na amígdala, e mantido pelo prejuízo noradrenérgico cortical. Entretanto, para a confirmação desta hipótese, destacamos a necessidade do desenvolvimento de estudos adicionais utilizando a administração estereotáxica de agonistas e antagonistas seletivos para receptores noradrenérgicos e dopaminérgicos em diferentes estruturas encefálicas.

Por fim, evidenciamos que o efeito restaurador da NA, infundida por via i.n., frente ao prejuízo olfatório, MCD no TRO e comportamento tipo-depressivo foi mediado, ao menos em parte, pelos receptores β_3 -adrenérgicos. Com isso, evidenciamos que embora a ação neurotóxica da 6-OHDA sobre as conexões noradrenérgicas provenientes do LC esteja sendo subutilizada nas últimas décadas, seu uso demonstrou-se útil para o estudo das conexões e funções relacionadas a este núcleo noradrenérgico, abrindo caminho para futuras investigações sobre as alterações fisiopatológicas e comportamentais envolvendo a transmissão noradrenérgica mediada pelo LC através da utilização da neurotoxina 6-OHDA como, por exemplo, o envolvimento de receptores β_3 -adrenérgicos na modulação comportamental exercida pela NA após a indução de um modelo de degeneração.

REFERÊNCIAS

- ABE, H.; ISHIDA, Y.; IWASAKI, T. Perirhinal N-methyl-D-aspartate and muscarinic systems participate in object recognition in rats. *Neurosci Lett*, v. 356, n. 3, p. 191-4, 2004.
- ABRAHAM, P. A. *et al.* . beta1- and beta2-adrenoceptor induced synaptic facilitation in rat basolateral amygdala. *Brain Res*, v. 1209, p. 65-73, 2008.
- ADAMS, L. M.; GEYER, M. A. Effects of 6-hydroxydopamine lesions of locus coeruleus on startle in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 73, n. 4, p. 394-8, 1981.
- ARCH, J. R. The brown adipocyte beta-adrenoceptor. *Proc Nutr Soc*, v. 48, n. 2, p. 215-23, 1989.
- ARCHER, T. *et al.* . Attenuation of sensory preconditioning by noradrenaline depletion in the rat. *Behav Brain Res*, v. 20, n. 1, p. 47-56, 1986.
- ASTON-JONES, G.; COHEN, J. D. An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: adaptive gain and optimal performance. *Annu Rev Neurosci*, v. 28, p. 403-50, 2005.
- ASTON-JONES, G.; WATERHOUSE, B. Locus coeruleus: From global projection system to adaptive regulation of behavior. *Brain Res*, v. 1645, p. 75-8, 2016.
- ATTEMS, J.; WALKER, L.; JELLINGER, K. A. Olfactory bulb involvement in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol*, v. 127, n. 4, p. 459-75, 2014.
- BALDWIN, J. M. The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J*, v. 12, n. 4, p. 1693-703, 1993.
- BARGER, G.; DALE, H. H. Chemical structure and sympathomimetic action of amines. *J Physiol*, v. 41, n. 1-2, p. 19-59, 1910.
- BARROS, D. M.; RAMIREZ, M. R.; IZQUIERDO, I. Modulation of working, short- and long-term memory by nicotinic receptors in the

basolateral amygdala in rats. *Neurobiol Learn Mem*, v. 83, n. 2, p. 113-8, 2005.

BARSEGYAN, A.; MCGAUGH, J. L.; ROOZENDAAL, B. Noradrenergic activation of the basolateral amygdala modulates the consolidation of object-in-context recognition memory. *Front Behav Neurosci*, v. 8, p. 160, 2014.

BAUMGARTEN, H. G. *et al.* . Long-lasting selective depletion of brain serotonin by 5,6-dihydroxytryptamine. *Acta Physiol Scand Suppl*, v. 373, p. 1-15, 1971.

BAUMGARTEN, H. G.; LACHENMAYER, L. 5,7-dihydroxytryptamine: improvement in chemical lesioning of indoleamine neurons in the mammalian brain. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, v. 135, n. 3, p. 399-414, 1972.

BENARROCH, E. E. The locus ceruleus norepinephrine system: functional organization and potential clinical significance. *Neurology*, v. 73, n. 20, p. 1699-704, 2009.

BIANCARDI, V. *et al.* . Role of locus coeruleus noradrenergic neurons in cardiorespiratory and thermal control during hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol*, v. 170, n. 2, p. 150-6, 2010.

BIELAU, H. *et al.* . Immunohistochemical evidence for impaired nitric oxide signaling of the locus coeruleus in bipolar disorder. *Brain Res*, v. 1459, p. 91-9, 2012.

BLANDINI, F.; ARMENTERO, M. T.; MARTIGNONI, E. The 6-hydroxydopamine model: news from the past. *Parkinsonism Relat Disord*, v. 14 Suppl 2, p. S124-9, 2008.

BLUM, D. *et al.* . Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, v. 65, n. 2, p. 135-72, 2001.

BLUM, D. *et al.* . p53 and Bax activation in 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells. *Brain Res*, v. 751, n. 1, p. 139-42, 1997.

- BORODOVITSYNA, O.; FLAMINI, M.; CHANDLER, D. Noradrenergic Modulation of Cognition in Health and Disease. *Neural Plast*, v. 2017, p. 6031478, 2017.
- BRAAK, H.; BRAAK, E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, v. 82, n. 4, p. 239-59, 1991.
- BRAAK, H. *et al.* . Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res*, v. 318, n. 1, p. 121-34, 2004.
- BRAAK, H. *et al.* . Parkinson's disease: affection of brain stem nuclei controlling premotor and motor neurons of the somatomotor system. *Acta Neuropathol*, v. 99, n. 5, p. 489-95, 2000.
- BREESE, G. R. *et al.* . The neonate-6-hydroxydopamine-lesioned rat: a model for clinical neuroscience and neurobiological principles. *Brain Res Brain Res Rev*, v. 48, n. 1, p. 57-73, 2005.
- BRITTON, D. R. *et al.* . Brain norepinephrine depleting lesions selectively enhance behavioral responsiveness to novelty. *Physiol Behav*, v. 33, n. 3, p. 473-8, 1984.
- BYLUND, D. B. Receptors for norepinephrine and signal transduction pathways. In: ORDWAY, G. A.; SCHWARTZ, M. A., *et al.* (Ed.). *Brain Norepinephrine: Neurobiology and Therapeutics*. New York: Cambridge University Press, 2007. p.105 - 130.
- CAILLE, S. *et al.* . Total neurochemical lesion of noradrenergic neurons of the locus ceruleus does not alter either naloxone-precipitated or spontaneous opiate withdrawal nor does it influence ability of clonidine to reverse opiate withdrawal. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 290, n. 2, p. 881-92, 1999.
- CANNON, W. B.; ROSENBLUETH, A. *Autonomic neuro-effector systems*. New York, : The Macmillan Company, 1937. xiv p., 1 l., 229 p.
- CATUS, S. L. *et al.* . Role of beta-adrenoceptors in glucose uptake in astrocytes using beta-adrenoceptor knockout mice. *Br J Pharmacol*, v. 162, n. 8, p. 1700-15, 2011.

CERVO, L. *et al.* . Role of central serotonergic neurons in the effect of sertraline in rats in the forced swimming test. *Eur J Pharmacol*, v. 196, n. 3, p. 217-22, 1991.

CHANDLER, D. J.; GAO, W. J.; WATERHOUSE, B. D. Heterogeneous organization of the locus coeruleus projections to prefrontal and motor cortices. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 111, n. 18, p. 6816-21, 2014.

CHANDLEY, M. J. *et al.* . Gene expression deficits in pontine locus coeruleus astrocytes in men with major depressive disorder. *J Psychiatry Neurosci*, v. 38, n. 4, p. 276-84, 2013.

CLARK, T. K. Male rat sexual behavior compared after 6-OHDA and electrolytic lesions in the dorsal NA bundle region of the midbrain. *Brain Res*, v. 202, n. 2, p. 429-43, 1980.

CLAUSTRE, Y. *et al.* . Effects of the beta3-adrenoceptor (Adrb3) agonist SR58611A (amibegron) on serotonergic and noradrenergic transmission in the rodent: relevance to its antidepressant/anxiolytic-like profile. *Neuroscience*, v. 156, n. 2, p. 353-64, 2008.

COHEN, G.; HEIKKILA, R. E. The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. *J Biol Chem*, v. 249, n. 8, p. 2447-52, 1974.

COLE, B. J.; ROBBINS, T. W. Dissociable effects of lesions to the dorsal or ventral noradrenergic bundle on the acquisition, performance, and extinction of aversive conditioning. *Behav Neurosci*, v. 101, n. 4, p. 476-88, 1987.

CONSOLI, D. *et al.* . Behavioral effects of the beta3 adrenoceptor agonist SR58611A: is it the putative prototype of a new class of antidepressant/anxiolytic drugs? *Eur J Pharmacol*, v. 573, n. 1-3, p. 139-47, 2007.

CORBETTA, M.; PATEL, G.; SHULMAN, G. L. The reorienting system of the human brain: from environment to theory of mind. *Neuron*, v. 58, n. 3, p. 306-24, 2008.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci*, v. 23, n. 5, p. 238-45, 2002.

CRYAN, J. F.; PAGE, M. E.; LUCKI, I. Noradrenergic lesions differentially alter the antidepressant-like effects of reboxetine in a modified forced swim test. *Eur J Pharmacol*, v. 436, n. 3, p. 197-205, 2002.

CURTIN, J. F.; DONOVAN, M.; COTTER, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods*, v. 265, n. 1-2, p. 49-72, 2002.

CUTILLAS, B. *et al.* . Caspase inhibition protects nigral neurons against 6-OHDA-induced retrograde degeneration. *Neuroreport*, v. 10, n. 12, p. 2605-8, 1999.

DANIAL, N. N.; KORSMEYER, S. J. Cell death: critical control points. *Cell*, v. 116, n. 2, p. 205-19, 2004.

DAS, D. *et al.* . Neurotransmitter-based strategies for the treatment of cognitive dysfunction in Down syndrome. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 54, p. 140-8, 2014.

DAY, H. E. *et al.* . Distribution of alpha 1a-, alpha 1b- and alpha 1d-adrenergic receptor mRNA in the rat brain and spinal cord. *J Chem Neuroanat*, v. 13, n. 2, p. 115-39, 1997.

DAYAN, P.; YU, A. J. Phasic norepinephrine: a neural interrupt signal for unexpected events. *Network*, v. 17, n. 4, p. 335-50, 2006.

DEVOTO, P.; FLORE, G. On the origin of cortical dopamine: is it a co-transmitter in noradrenergic neurons? *Curr Neuropharmacol*, v. 4, n. 2, p. 115-25, 2006.

DICKSON, D. W. *et al.* . Evidence that incidental Lewy body disease is pre-symptomatic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*, v. 115, n. 4, p. 437-44, 2008.

DIENEL, G. A.; CRUZ, N. F. Aerobic glycolysis during brain activation: adrenergic regulation and influence of norepinephrine on astrocytic metabolism. *J Neurochem*, v. 138, n. 1, p. 14-52, 2016.

DOMYANCIC, A. V.; MORILAK, D. A. Distribution of alpha1A adrenergic receptor mRNA in the rat brain visualized by in situ hybridization. *J Comp Neurol*, v. 386, n. 3, p. 358-78, 1997.

DOTY, R. L. *Handbook of olfaction and gustation*. Third edition. Wiley-Blackwell, 2015. ISBN 9781118139226 (cloth).

DRAGOVICH, T.; RUDIN, C. M.; THOMPSON, C. B. Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death. *Oncogene*, v. 17, n. 25, p. 3207-13, 1998.

DRAGUNOW, M.; LAVERTY, R. Failure of dorsal bundle lesions in rats to increase distractibility to a low intensity tone. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 18, n. 5, p. 673-5, 1983.

ELLIOTT, T. R. On the action of adrenalin. *J Physiol*, v. 32, n. 5-6, p. 401-67, 1904.

ENGELBRECHT, A. H. *et al.* . Evidence that noradrenergic neurons in the A1 and A2 nuclei are lesioned by low doses of 6-OHDA injected into the locus coeruleus. *J Neurosci Methods*, v. 52, n. 1, p. 57-60, 1994.

ESPAY, A. J.; LEWITT, P. A.; KAUFMANN, H. Norepinephrine deficiency in Parkinson's disease: the case for noradrenergic enhancement. *Mov Disord*, v. 29, n. 14, p. 1710-9, 2014.

EULER, U. S. V. A sympathomimetic pressor substance in animal organ extracts. *Nature*, v. 156, p. 18-19, 1945.

EVERITT, B. J. *et al.* . The effects of lesions to ascending noradrenergic neurons on discrimination learning and performance in the rat. *Neuroscience*, v. 10, n. 2, p. 397-410, 1983.

FADOK, J. P.; DICKERSON, T. M.; PALMITER, R. D. Dopamine is necessary for cue-dependent fear conditioning. *J Neurosci*, v. 29, n. 36, p. 11089-97, 2009.

FEINSTEIN, D. L.; KALININ, S.; BRAUN, D. Causes, consequences, and cures for neuroinflammation mediated via the locus coeruleus: noradrenergic signaling system. *J Neurochem*, v. 139 Suppl 2, p. 154-178, 2016.

FRITSCHY, J. M.; GRZANNA, R. Selective effects of DSP-4 on locus coeruleus axons: are there pharmacologically different types of noradrenergic axons in the central nervous system? *Prog Brain Res*, v. 88, p. 257-68, 1991.

FULCERI, F. *et al.* . Abnormal involuntary movements (AIMs) following pulsatile dopaminergic stimulation: severe deterioration and morphological correlates following the loss of locus coeruleus neurons. *Brain Res*, v. 1135, n. 1, p. 219-29, 2007.

FULLER, P. M.; SAPER, C. B.; LU, J. The pontine REM switch: past and present. *J Physiol*, v. 584, n. Pt 3, p. 735-41, 2007.

GIBBS, M. E.; HUTCHINSON, D. S.; SUMMERS, R. J. Role of beta-adrenoceptors in memory consolidation: beta3-adrenoceptors act on glucose uptake and beta2-adrenoceptors on glycogenolysis. *Neuropsychopharmacology*, v. 33, n. 10, p. 2384-97, 2008.

GIBBS, M. E.; SUMMERS, R. J. Effects of glucose and 2-deoxyglucose on memory formation in the chick: interaction with beta(3)-adrenoceptor agonists. *Neuroscience*, v. 114, n. 1, p. 69-79, 2002.

GLINKA, Y. Y.; YODIM, M. B. Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. *Eur J Pharmacol*, v. 292, n. 3-4, p. 329-32, 1995.

GOLDSTEIN, L. B. Effects of bilateral and unilateral locus coeruleus lesions on beam-walking recovery after subsequent unilateral sensorimotor cortex suction-ablation in the rat. *Restor Neurol Neurosci*, v. 11, n. 1, p. 55-63, 1997.

GROMOVA, E. A.; SEMENOVA, T. P.; GRISHCHENKO, N. I. [Differences in the effects of 6-hydroxydopamine on rat learning with intraventricular and local administration into nuclei of the brain

- catecholaminergic system]. *Biull Eksp Biol Med*, v. 96, n. 8, p. 6-8, 1983.
- GRZANNA, R.; MOLLIVER, M. E. The locus coeruleus in the rat: an immunohistochemical delineation. *Neuroscience*, v. 5, n. 1, p. 21-40, 1980.
- GUAN, X.; BLANK, J. L.; DLUZEN, D. E. Role of olfactory bulb norepinephrine in the identification and recognition of chemical cues. *Physiol Behav*, v. 53, n. 3, p. 437-41, 1993.
- GUERIN, D. *et al.* . Noradrenergic neuromodulation in the olfactory bulb modulates odor habituation and spontaneous discrimination. *Behav Neurosci*, v. 122, n. 4, p. 816-26, 2008.
- GUERIN, D. *et al.* . Early locus coeruleus degeneration and olfactory dysfunctions in Tg2576 mice. *Neurobiol Aging*, v. 30, n. 2, p. 272-83, 2009.
- GUIMARAES, J. *et al.* . Locus coeruleus is involved in weight loss in a rat model of Parkinson's disease: an effect reversed by deep brain stimulation. *Brain Stimul*, v. 6, n. 6, p. 845-55, 2013.
- HAMEL, E. Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. *J Appl Physiol* (1985), v. 100, n. 3, p. 1059-64, 2006.
- HANSEN, N. The Longevity of Hippocampus-Dependent Memory Is Orchestrated by the Locus Coeruleus-Noradrenergic System. *Neural Plast*, v. 2017, p. 2727602, 2017.
- HARRO, J. *et al.* . Chronic mild unpredictable stress after noradrenergic denervation: attenuation of behavioural and biochemical effects of DSP-4 treatment. *Eur Neuropsychopharmacol*, v. 10, n. 1, p. 5-16, 1999a.
- HARRO, J. *et al.* . Dose-dependent effects of noradrenergic denervation by DSP-4 treatment on forced swimming and beta-adrenoceptor binding in the rat. *J Neural Transm (Vienna)*, v. 106, n. 7-8, p. 619-29, 1999b.
- HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, v. 407, n. 6805, p. 770-6, 2000.

HERTZ, L. *et al.* . Adrenoceptors in brain: cellular gene expression and effects on astrocytic metabolism and $[Ca^{2+}]_i$. *Neurochem Int*, v. 57, n. 4, p. 411-20, 2010.

HICKEY, L. *et al.* . Optoactivation of locus ceruleus neurons evokes bidirectional changes in thermal nociception in rats. *J Neurosci*, v. 34, n. 12, p. 4148-60, 2014.

HOLETS, V. R. *et al.* . Locus coeruleus neurons in the rat containing neuropeptide Y, tyrosine hydroxylase or galanin and their efferent projections to the spinal cord, cerebral cortex and hypothalamus. *Neuroscience*, v. 24, n. 3, p. 893-906, 1988.

INGHAM, C. A. *et al.* . Morphological changes in the rat neostriatum after unilateral 6-hydroxydopamine injections into the nigrostriatal pathway. *Exp Brain Res*, v. 93, n. 1, p. 17-27, 1993.

ITOI, K.; OHARA, S.; KOBAYASHI, K. Selective ablation of dopamine beta-hydroxylase neurons in the brain by immunotoxin-mediated neuronal targeting: new insights into brain catecholaminergic circuitry and catecholamine-related diseases. *Adv Pharmacol*, v. 68, p. 155-66, 2013.

ITOI, K. *et al.* . Targeting of locus ceruleus noradrenergic neurons expressing human interleukin-2 receptor alpha-subunit in transgenic mice by a recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38: a study for exploring noradrenergic influence upon anxiety-like and depression-like behaviors. *J Neurosci*, v. 31, n. 16, p. 6132-9, 2011.

IZQUIERDO, I. *et al.* . Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res*, v. 103, n. 1, p. 1-11, 1999.

JACKSON-LEWIS, V. *et al.* . Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurodegeneration*, v. 4, n. 3, p. 257-269, 1995.

JARBE, T. U. *et al.* . Acquisition and reversal of taste/tactile discrimination after forebrain noradrenaline depletion. *Behav Neurosci*, v. 102, n. 6, p. 925-33, 1988.

- JARDANHAZI-KURUTZ, D. *et al.* . Induced LC degeneration in APP/PS1 transgenic mice accelerates early cerebral amyloidosis and cognitive deficits. *Neurochem Int*, v. 57, n. 4, p. 375-82, 2010.
- JEON, B. S.; JACKSON-LEWIS, V.; BURKE, R. E. 6-Hydroxydopamine Lesion of the Rat Substantia Nigra: Time Course and Morphology of Cell Death. *Neurodegeneration*, v. 4, n. 2, p. 131-137, 1995.
- JONSSON, G. *et al.* . DSP4 (N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine)--a useful denervation tool for central and peripheral noradrenaline neurons. *Eur J Pharmacol*, v. 72, n. 2-3, p. 173-88, 1981.
- KANZLER, S. A.; JANUARIO, A. C.; PASCHOALINI, M. A. Involvement of beta3-adrenergic receptors in the control of food intake in rats. *Braz J Med Biol Res*, v. 44, n. 11, p. 1141-7, 2011.
- KEMPADOO, K. A. *et al.* . Dopamine release from the locus coeruleus to the dorsal hippocampus promotes spatial learning and memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 113, n. 51, p. 14835-14840, 2016.
- KHAKPOUR-TALEGHANI, B. *et al.* . The locus coeruleus involves in consolidation and memory retrieval, but not in acquisition of inhibitory avoidance learning task. *Behav Brain Res*, v. 189, n. 2, p. 257-62, 2008.
- KRAHL, S. E. *et al.* . Locus coeruleus lesions suppress the seizure-attenuating effects of vagus nerve stimulation. *Epilepsia*, v. 39, n. 7, p. 709-14, 1998.
- KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*, v. 87, n. 1, p. 99-163, 2007.
- KU, Y. C. *et al.* . Different involvement of ventral and dorsal norepinephrine pathways on norepinephrine reuptake inhibitor-induced locomotion and antidepressant-like effects in rats. *Neurosci Lett*, v. 514, n. 2, p. 179-84, 2012.
- LANGLAIS, P. J.; CONNOR, D. J.; THAL, L. Comparison of the effects of single and combined neurotoxic lesions of the nucleus basalis

magnocellularis and dorsal noradrenergic bundle on learning and memory in the rat. *Behav Brain Res*, v. 54, n. 1, p. 81-90, 1993.

LANGSTON, J. W. *et al.* . Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, v. 219, n. 4587, p. 979-80, 1983.

LAPIZ, M. D. *et al.* . Effects of central noradrenaline depletion by the selective neurotoxin DSP-4 on the behaviour of the isolated rat in the elevated plus maze and water maze. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 155, n. 3, p. 251-9, 2001.

LEE, J. H.; LEE, S.; KIM, J. H. Amygdala Circuits for Fear Memory: A Key Role for Dopamine Regulation. *Neuroscientist*, 2016.

LEVI-MONTALCINI, R. The nerve growth factor 35 years later. *Science*, v. 237, n. 4819, p. 1154-62, 1987.

LEVI-MONTALCINI, R.; BOOKER, B. Destruction of the Sympathetic Ganglia in Mammals by an Antiserum to a Nerve-Growth Protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 46, n. 3, p. 384-91, 1960.

LEVY, F. *et al.* . Importance of beta-noradrenergic receptors in the olfactory bulb of sheep for recognition of lambs. *Behav Neurosci*, v. 104, n. 3, p. 464-9, 1990.

LI, Y. *et al.* . Retrograde optogenetic characterization of the pontospinal module of the locus coeruleus with a canine adenoviral vector. *Brain Res*, v. 1641, n. Pt B, p. 274-90, 2016.

LINSTER, C.; CLELAND, T. A. Neuromodulation of olfactory transformations. *Curr Opin Neurobiol*, v. 40, p. 170-177, 2016.

LINSTER, C.; NAI, Q.; ENNIS, M. Nonlinear effects of noradrenergic modulation of olfactory bulb function in adult rodents. *J Neurophysiol*, v. 105, n. 4, p. 1432-43, 2011.

LIU, X.; YE, K.; WEINSHENKER, D. Norepinephrine Protects against Amyloid-beta Toxicity via TrkB. *J Alzheimers Dis*, v. 44, n. 1, p. 251-60, 2015.

LOUGHLIN, S. E.; FOOTE, S. L.; BLOOM, F. E. Efferent projections of nucleus locus coeruleus: topographic organization of cells of origin demonstrated by three-dimensional reconstruction. *Neuroscience*, v. 18, n. 2, p. 291-306, 1986.

LOWRY, O. H. *et al.* . Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, v. 193, n. 1, p. 265-75, 1951.

MADRIGAL, J. L.; FEINSTEIN, D. L.; DELLO RUSSO, C. Norepinephrine protects cortical neurons against microglial-induced cell death. *J Neurosci Res*, v. 81, n. 3, p. 390-6, 2005.

MADRIGAL, J. L. *et al.* . Neuroprotective actions of noradrenaline: effects on glutathione synthesis and activation of peroxisome proliferator activated receptor delta. *J Neurochem*, v. 103, n. 5, p. 2092-101, 2007.

MASON, S. T.; FIBIGER, H. C. Regional topography within noradrenergic locus coeruleus as revealed by retrograde transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol*, v. 187, n. 4, p. 703-24, 1979.

MASON, S. T.; ROBERTS, D. C.; FIBIGER, H. C. Noradrenergic influences on catalepsy. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 60, n. 1, p. 53-7, 1978.

MATHEUS, F. C. *et al.* . Temporal Dissociation of Striatum and Prefrontal Cortex Uncouples Anhedonia and Defense Behaviors Relevant to Depression in 6-OHDA-Lesioned Rats. *Mol Neurobiol*, v. 53, n. 6, p. 3891-3899, 2016.

MCCORMICK, D. A. Neurotransmitter actions in the thalamus and cerebral cortex. *J Clin Neurophysiol*, v. 9, n. 2, p. 212-23, 1992.

MCCUNE, S. K.; VOIGT, M. M.; HILL, J. M. Expression of multiple alpha adrenergic receptor subtype messenger RNAs in the adult rat brain. *Neuroscience*, v. 57, n. 1, p. 143-51, 1993.

MCMILLAN, P. J. *et al.* . Differential response of the central noradrenergic nervous system to the loss of locus coeruleus neurons in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Brain Res*, v. 1373, p. 240-52, 2011.

MELLO-CARPES, P. B.; IZQUIERDO, I. The Nucleus of the Solitary Tract --> Nucleus Paragigantocellularis --> Locus Coeruleus --> CA1 region of dorsal hippocampus pathway is important for consolidation of object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem*, v. 100, p. 56-63, 2013.

MINOR, B. G. *et al.* . Noradrenergic and serotonergic involvement in brief shock-induced analgesia in rats. *Behav Neurosci*, v. 102, n. 6, p. 915-24, 1988.

MOHAMMED, A. K. *et al.* . Central noradrenaline depletion attenuates amphetamine-induced locomotor behavior. *Neurosci Lett*, v. 64, n. 2, p. 139-44, 1986.

MOORE, R. Y. Catecholamine neuron systems in brain. *Ann Neurol*, v. 12, n. 4, p. 321-7, 1982.

NEOPHYTOU, S. I. *et al.* . Effects of lesioning noradrenergic neurones in the locus coeruleus on conditioned and unconditioned aversive behaviour in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 25, n. 6, p. 1307-21, 2001.

NICHOLAS, A. P.; HOKFELT, T.; PIERIBONE, V. A. The distribution and significance of CNS adrenoceptors examined with in situ hybridization. *Trends Pharmacol Sci*, v. 17, n. 7, p. 245-55, 1996.

NICHOLAS, A. P.; PIERIBONE, V. A.; HOKFELT, T. Cellular localization of messenger RNA for beta-1 and beta-2 adrenergic receptors in rat brain: an in situ hybridization study. *Neuroscience*, v. 56, n. 4, p. 1023-39, 1993.

NICHOLS, A. J.; WILSON, A. C.; HILEY, C. R. Effects of chemical sympathectomy with 6-hydroxydopamine on cardiac output and its distribution in the rat. *Eur J Pharmacol*, v. 109, n. 2, p. 263-8, 1985.

OCHU, E. E.; ROTHWELL, N. J.; WATERS, C. M. Caspases mediate 6-hydroxydopamine-induced apoptosis but not necrosis in PC12 cells. *J Neurochem*, v. 70, n. 6, p. 2637-40, 1998.

- OKNINA, N. B. [The dynamic behavioral changes in rats after destruction of the locus coeruleus]. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova*, v. 41, n. 3, p. 543-50, 1991.
- OLIVER, G.; SCHAFER, E. A. The Physiological Effects of Extracts of the Suprarenal Capsules. *J Physiol*, v. 18, n. 3, p. 230-76, 1895.
- OLNEY, J. W.; HO, O. L.; RHEE, V. Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp Brain Res*, v. 14, n. 1, p. 61-76, 1971.
- OLNEY, J. W.; SHARPE, L. G. Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science*, v. 166, n. 3903, p. 386-8, 1969.
- OVERSTREET, D. H.; STEMMELIN, J.; GRIEBEL, G. Confirmation of antidepressant potential of the selective beta3 adrenoceptor agonist amibegron in an animal model of depression. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 89, n. 4, p. 623-6, 2008.
- OWEN, S. R. *et al.* . Lesions of the dorsal noradrenergic bundle and rewarded running: the role of pretraining. *Behav Brain Res*, v. 5, n. 1, p. 3-9, 1982.
- PAMPHLETT, R. Uptake of environmental toxicants by the locus ceruleus: a potential trigger for neurodegenerative, demyelinating and psychiatric disorders. *Med Hypotheses*, v. 82, n. 1, p. 97-104, 2014.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press, 1986.
- PELLEGRINO, R. *et al.* . Olfactory function in patients with hyposmia compared to healthy subjects - An fMRI study. *Rhinology*, v. 54, n. 4, p. 374-381, 2016.
- PELLOW, S. *et al.* . Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*, v. 14, n. 3, p. 149-67, 1985.
- PERRONE, M. G.; SCILIMATI, A. beta(3)-Adrenoceptor agonists and (antagonists as) inverse agonists history, perspective, constitutive

activity, and stereospecific binding. *Methods Enzymol*, v. 484, p. 197-230, 2010.

_____. beta(3)-Adrenoceptor ligand development history through patent review. *Expert Opin Ther Pat*, v. 21, n. 4, p. 505-36, 2011.

PIETRZAK, R. H. *et al.* . Association of posttraumatic stress disorder with reduced in vivo norepinephrine transporter availability in the locus coeruleus. *JAMA Psychiatry*, v. 70, n. 11, p. 1199-205, 2013.

PISA, M.; FIBIGER, H. C. Evidence against a role of the rat's dorsal noradrenergic bundle in selective attention and place memory. *Brain Res*, v. 272, n. 2, p. 319-29, 1983.

PISA, M.; MARTIN-IVERSON, M. T.; FIBIGER, H. C. On the role of the dorsal noradrenergic bundle in learning and habituation to novelty. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 30, n. 4, p. 835-45, 1988.

POLAK, P. E.; KALININ, S.; FEINSTEIN, D. L. Locus coeruleus damage and noradrenaline reductions in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain*, v. 134, n. Pt 3, p. 665-77, 2011.

PORCEDDU, M. L. *et al.* . Role of ventral mesencephalic reticular formation and related noradrenergic and serotonergic bundles in turning behaviour as investigated by means of kainate, 6-hydroxydopamine and 5,7-dihydroxytryptamine lesions. *Brain Res*, v. 262, n. 2, p. 187-200, 1983.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, v. 229, n. 2, p. 327-336, 1977.

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

POTT, C. *et al.* . Beta3-adrenergic stimulation in the human heart: signal transduction, functional implications and therapeutic perspectives. *Pharmazie*, v. 61, n. 4, p. 255-60, 2006.

- PREDIGER, R. D. *et al.* . The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. *Exp Neurol*, v. 202, n. 2, p. 391-403, 2006.
- PREDIGER, R. D.; BATISTA, L. C.; TAKAHASHI, R. N. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. *Neurobiol Aging*, v. 26, n. 6, p. 957-64, 2005.
- PRZEDBORSKI, S. *et al.* . Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience*, v. 67, n. 3, p. 631-47, 1995.
- PUCIŁOWSKI, O.; KOZAK, W.; VALZELLI, L. Effect of 6-OHDA injected into the locus coeruleus on apomorphine-induced aggression. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 24, n. 3, p. 773-5, 1986.
- RAMPERSAUD, N. *et al.* . Exendin-4 reverses biochemical and behavioral deficits in a pre-motor rodent model of Parkinson's disease with combined noradrenergic and serotonergic lesions. *Neuropeptides*, v. 46, n. 5, p. 183-93, 2012.
- REY, N. L. *et al.* . Locus coeruleus degeneration exacerbates olfactory deficits in APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiol Aging*, v. 33, n. 2, p. 426 e1-11, 2012.
- ROBERTS, D. C.; PRICE, M. T.; FIBIGER, H. C. The dorsal tegmental noradrenergic projection: an analysis of its role in maze learning. *J Comp Physiol Psychol*, v. 90, n. 4, p. 363-72, 1976.
- RODRIGUEZ, M. *et al.* . Evidence for the presence of beta 3-adrenergic receptor mRNA in the human brain. *Brain Res Mol Brain Res*, v. 29, n. 2, p. 369-75, 1995.
- ROOM, P.; POSTEMA, F.; KORF, J. Divergent axon collaterals of rat locus coeruleus neurons: demonstration by a fluorescent double labeling technique. *Brain Res*, v. 221, n. 2, p. 219-30, 1981.

- ROSS, S. B. Long-term effects of N-2-chlorethyl-N-ethyl-2-bromobenzylamine hydrochloride on noradrenergic neurones in the rat brain and heart. *Br J Pharmacol*, v. 58, n. 4, p. 521-7, 1976.
- ROSS, S. B.; RENYL, A. L. On the long-lasting inhibitory effect of N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP 4) on the active uptake of noradrenaline. *J Pharm Pharmacol*, v. 28, n. 5, p. 458-9, 1976.
- ROSS, S. B.; STENFORS, C. DSP4, a selective neurotoxin for the locus coeruleus noradrenergic system. A review of its mode of action. *Neurotox Res*, v. 27, n. 1, p. 15-30, 2015.
- ROYET, J. P.; GERVAIS, R.; ARANEDA, S. Effect of local 6-OHDA and 5,6-DHT injections into the rat olfactory bulb on neophobia and learned aversion to a novel food. *Behav Brain Res*, v. 10, n. 2-3, p. 297-309, 1983.
- RUBIN, R. P. A brief history of great discoveries in pharmacology: in celebration of the centennial anniversary of the founding of the American Society of Pharmacology and Experimental Therapeutics. *Pharmacol Rev*, v. 59, n. 4, p. 289-359, 2007.
- RUCKERT, N.; BUBSER, M.; SCHMIDT, W. J. 6-Hydroxydopamine lesion of locus coeruleus and the antiparkinsonian potential of NMDA-receptor antagonists in rats. *J Neural Transm (Vienna)*, v. 104, n. 4-5, p. 363-77, 1997.
- SAHI, S.; TEWATIA, P.; MALIK, B. K. Modeling and simulation studies of human beta3 adrenergic receptor and its interactions with agonists. *Curr Comput Aided Drug Des*, v. 8, n. 4, p. 283-95, 2012.
- SANER, A.; THOENEN, H. Model experiments on the molecular mechanism of action of 6-hydroxydopamine. *Mol Pharmacol*, v. 7, n. 2, p. 147-54, 1971.
- SANTOS, V. V. *et al.* . Acyl ghrelin improves cognition, synaptic plasticity deficits and neuroinflammation following amyloid beta (Abeta1-40) administration in mice. *J Neuroendocrinol*, 2017.
- SAUER, H.; OERTEL, W. H. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-

- hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neurosci*, v. 59, n. 2, p. 401-15, 1994.
- SAWYNOK, J.; REID, A. Effect of 6-hydroxydopamine-induced lesions to ascending and descending noradrenergic pathways on morphine analgesia. *Brain Res*, v. 419, n. 1-2, p. 156-65, 1987.
- SCHEININ, M. *et al.* . Distribution of alpha 2-adrenergic receptor subtype gene expression in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, v. 21, n. 1-2, p. 133-49, 1994.
- SCHMUED, L. C.; HOPKINS, K. J. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res*, v. 874, n. 2, p. 123-30, 2000.
- SCHWARZ, L. A.; LUO, L. Organization of the locus coeruleus-norepinephrine system. *Curr Biol*, v. 25, n. 21, p. R1051-R1056, 2015.
- SCHWARZ, L. A. *et al.* . Viral-genetic tracing of the input-output organization of a central noradrenaline circuit. *Nature*, v. 524, n. 7563, p. 88-92, 2015.
- SEGURA AGUILAR, J.; KOSTRZEWA, R. M. Neurotoxins and neurotoxic species implicated in neurodegeneration. *Neurotox Res*, v. 6, n. 7-8, p. 615-30, 2004.
- SELDEN, N. R. *et al.* . Damage to ceruleo-cortical noradrenergic projections impairs locally cued but enhances spatially cued water maze acquisition. *Behav Brain Res*, v. 39, n. 1, p. 29-51, 1990.
- SELDEN, N. R.; EVERITT, B. J.; ROBBINS, T. W. Telencephalic but not diencephalic noradrenaline depletion enhances behavioural but not endocrine measures of fear conditioning to contextual stimuli. *Behav Brain Res*, v. 43, n. 2, p. 139-54, 1991.
- SENOH, S. *et al.* . 2,4,5-tri-hydroxyphenethylamine, a new metabolite of 3,4-dihydroxyphenethylamine. *Journal of the American Chemical Society*, v. 81, p. 1768 - 1769, 1959.

SHENG, J. G. *et al.* . Alterations in striatal glial fibrillary acidic protein expression in response to 6-hydroxydopamine-induced denervation. *Exp Brain Res*, v. 95, n. 3, p. 450-6, 1993.

SHI, Y. W. *et al.* . Regulation of Fear Extinction in the Basolateral Amygdala by Dopamine D2 Receptors Accompanied by Altered GluR1, GluR1-Ser845 and NR2B Levels. *Front Behav Neurosci*, v. 11, p. 116, 2017.

SHIPLEY, M. T.; HALLORAN, F. J.; DE LA TORRE, J. Surprisingly rich projection from locus coeruleus to the olfactory bulb in the rat. *Brain Res*, v. 329, n. 1-2, p. 294-9, 1985.

SIMIAND, J. *et al.* . Antidepressant profile in rodents of SR 58611A, a new selective agonist for atypical beta-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol*, v. 219, n. 2, p. 193-201, 1992.

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

SLATTERY, D. A. *et al.* . The GABAB receptor-positive modulator GS39783 and the GABAB receptor agonist baclofen attenuate the reward-facilitating effects of cocaine: intracranial self-stimulation studies in the rat. *Neuropsychopharmacology*, v. 30, n. 11, p. 2065-72, 2005.

SQUIRE, L. R.; DEDE, A. J. Conscious and unconscious memory systems. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, v. 7, n. 3, p. a021667, 2015.

STARK, S. M.; YASSA, M. A.; STARK, C. E. Individual differences in spatial pattern separation performance associated with healthy aging in humans. *Learn Mem*, v. 17, n. 6, p. 284-8, 2010.

STEMMELIN, J. *et al.* . Stimulation of the beta3-Adrenoceptor as a novel treatment strategy for anxiety and depressive disorders. *Neuropsychopharmacology*, v. 33, n. 3, p. 574-87, 2008.

STERPENICH, V. *et al.* . The locus ceruleus is involved in the successful retrieval of emotional memories in humans. *J Neurosci*, v. 26, n. 28, p. 7416-23, 2006.

SULLIVAN, R. M. *et al.* . Bilateral 6-OHDA lesions of the locus coeruleus impair associative olfactory learning in newborn rats. *Brain Res*, v. 643, n. 1-2, p. 306-9, 1994.

SUMMERS, R. J. *et al.* . Expression of beta 3-adrenoceptor mRNA in rat brain. *Br J Pharmacol*, v. 116, n. 6, p. 2547-8, 1995.

SUZUKI, A. *et al.* . Upregulation of CREB-mediated transcription enhances both short- and long-term memory. *J Neurosci*, v. 31, n. 24, p. 8786-802, 2011.

SWANSON, L. W.; HARTMAN, B. K. The central adrenergic system. An immunofluorescence study of the location of cell bodies and their efferent connections in the rat utilizing dopamine-beta-hydroxylase as a marker. *J Comp Neurol*, v. 163, n. 4, p. 467-505, 1975.

SZABADI, E. Functional neuroanatomy of the central noradrenergic system. *J Psychopharmacol*, v. 27, n. 8, p. 659-93, 2013.

SZOT, P. *et al.* . Depressive-like behavior observed with a minimal loss of locus coeruleus (LC) neurons following administration of 6-hydroxydopamine is associated with electrophysiological changes and reversed with precursors of norepinephrine. *Neuropharmacology*, v. 101, p. 76-86, 2016.

SZOT, P. *et al.* . Sequential Loss of LC Noradrenergic and Dopaminergic Neurons Results in a Correlation of Dopaminergic Neuronal Number to Striatal Dopamine Concentration. *Front Pharmacol*, v. 3, p. 184, 2012a.

SZOT, P. *et al.* . Lesioning noradrenergic neurons of the locus coeruleus in C57Bl/6 mice with unilateral 6-hydroxydopamine injection, to assess molecular, electrophysiological and biochemical changes in noradrenergic signaling. *Neuroscience*, v. 216, p. 143-57, 2012b.

TADAIESKY, M. T. *et al.* . Effects of SR141716A on Cognitive and Depression-Related Behavior in an Animal Model of Premotor Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis*, v. 2010, p. 238491, 2010.

- 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. 830-40, 2008.
- TAIT, D. S. *et al.* . Lesions of the dorsal noradrenergic bundle impair attentional set-shifting in the rat. *Eur J Neurosci*, v. 25, n. 12, p. 3719-24, 2007.
- TAMBURELLA, A. *et al.* . The beta3 adrenoceptor agonist, amibegron (SR58611A) counteracts stress-induced behavioral and neurochemical changes. *Eur Neuropsychopharmacol*, v. 20, n. 10, p. 704-13, 2010.
- TATSUMI, M. *et al.* . Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters. *Eur J Pharmacol*, v. 340, n. 2-3, p. 249-58, 1997.
- THOENEN, H.; TRANZER, J. P. Chemical sympathectomy by selective destruction of adrenergic nerve endings with 6-Hydroxydopamine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol*, v. 261, n. 3, p. 271-88, 1968a.
- _____. [On the possibility of chemical sympathectomy by selective destruction of adrenergic nerve endings with 6-hydroxydopamine (6-OH-DA)]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol*, v. 260, n. 2, p. 212-3, 1968b.
- THOMAS TAYRA, J. *et al.* . The neuroprotective and neurorescue effects of carbamylated erythropoietin Fc fusion protein (CEPO-Fc) in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res*, v. 1502, p. 55-70, 2013.
- TOWELL, A.; MUSCAT, R.; WILLNER, P. Effects of pimozide on sucrose consumption and preference. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 92, n. 2, p. 262-4, 1987.
- TROADEC, J. D. *et al.* . Noradrenaline provides long-term protection to dopaminergic neurons by reducing oxidative stress. *J Neurochem*, v. 79, n. 1, p. 200-10, 2001.
- TSALTAS, E.; GRAY, J. A.; PRESTON, G. C. Effects of lesions to the dorsal noradrenergic bundle on counterconditioning of punished barpressing. *Physiol Behav*, v. 40, n. 1, p. 7-15, 1987.

TSUDA, K.; YOKOO, H.; GOLDSTEIN, M. Neuropeptide Y and galanin in norepinephrine release in hypothalamic slices. *Hypertension*, v. 14, n. 1, p. 81-6, 1989.

TSURUOKA, M. *et al.* . The nucleus locus coeruleus/subcoeruleus contributes to antinociception during freezing behavior following the air-puff startle in rats. *Brain Res*, v. 1393, p. 52-61, 2011.

UEMATSU, A.; TAN, B. Z.; JOHANSEN, J. P. Projection specificity in heterogeneous locus coeruleus cell populations: implications for learning and memory. *Learn Mem*, v. 22, n. 9, p. 444-51, 2015.

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

UNGERSTEDT, U.; ARBUTHNOTT, G. W. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res*, v. 24, n. 3, p. 485-93, 1970.

VANDERWOLF, C. H.; BAKER, G. B. The role of brain noradrenaline in cortical activation and behavior: a study of lesions of the locus coeruleus, medial thalamus and hippocampus-neocortex and of muscarinic blockade in the rat. *Behav Brain Res*, v. 78, n. 2, p. 225-34, 1996.

VANICEK, T. *et al.* . The norepinephrine transporter in attention-deficit/hyperactivity disorder investigated with positron emission tomography. *JAMA Psychiatry*, v. 71, n. 12, p. 1340-9, 2014.

VERMEIREN, Y.; DE DEYN, P. P. Targeting the norepinephrinergic system in Parkinson's disease and related disorders: The locus coeruleus story. *Neurochem Int*, v. 102, p. 22-32, 2017.

VOGT, M. The concentration of sympathin in different parts of the central nervous system under normal conditions and after the administration of drugs. *J Physiol*, v. 123, n. 3, p. 451-81, 1954.

WADDINGTON, J. L. Effects of nomifensine and desipramine on the sequelae of intracerebrally-injected 6-OHDA and 5,6-DHT. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 13, n. 6, p. 915-7, 1980.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull*, v. 83, n. 3, p. 482-504, 1976.

WENK, G. *et al.* . Neurotransmitters and memory: role of cholinergic, serotonergic, and noradrenergic systems. *Behav Neurosci*, v. 101, n. 3, p. 325-32, 1987.

WILEY, R. G.; KLINE, I. R. Neuronal lesioning with axonally transported toxins. *J Neurosci Methods*, v. 103, n. 1, p. 73-82, 2000.

WOO, C. C. *et al.* . Early locus coeruleus lesions increase the density of beta-adrenergic receptors in the main olfactory bulb of rats. *Int J Dev Neurosci*, v. 14, n. 7-8, p. 913-9, 1996.

WRENN, C. C. *et al.* . Central noradrenergic lesioning using anti-DBH-saporin: anatomical findings. *Brain Res*, v. 740, n. 1-2, p. 175-84, 1996.

YANG, F. C.; LIANG, K. C. Interactions of the dorsal hippocampus, medial prefrontal cortex and nucleus accumbens in formation of fear memory: difference in inhibitory avoidance learning and contextual fear conditioning. *Neurobiol Learn Mem*, v. 112, p. 186-94, 2014.

YUAN, Q.; SHAKHAWAT, A. M.; HARLEY, C. W. Mechanisms underlying early odor preference learning in rats. *Prog Brain Res*, v. 208, p. 115-56, 2014.

ZAROW, C. *et al.* . Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. *Arch Neurol*, v. 60, n. 3, p. 337-41, 2003.

ZWEIG, R. M. *et al.* . Locus coeruleus involvement in Huntington's disease. *Arch Neurol*, v. 49, n. 2, p. 152-6, 1992.