

PRINCIPAIS SUBSTÂNCIAS PARA OS MODELOS EXPERIMENTAIS DA DOENÇA DE PARKINSON POR ESTEREOTAXIA EM ROEDORES

Nicole Tortoro^{1,*}, Lívia Marangoni,¹ Isabella Marson,¹ Luciana Canabarro,⁵
Paulo Henrique Pires de Aguiar,^{3,4} Yasin Temel,²

RESUMO

Introdução: A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais frequente, atingindo 1% da população idosa. Suas manifestações clínicas são diversas, incluindo manifestações motoras, cognitivas, sensoriais e autonômicas. A DP é caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais, concomitantemente com a presença de corpos de Lewy; entretanto, sua etiologia não está completamente elucidada. Tendo em vista a inexistência de tratamento capaz de mitigar completamente o comprometimento funcional imposto pela DP, **Metodologia:** este artigo busca, por meio de uma revisão sistemática de literatura, avaliar as diferentes neurotoxinas utilizadas na indução laboratorial da DP, descrever seus efeitos em roedores e reconhecer suas semelhanças com os aspectos da patologia em questão **Objetivo:** com o objetivo de elucidar os mecanismos fisiopatológicos da Doença de Parkinson, e assim, auxiliar pesquisas futuras que permitam a elaboração de terapias promissoras. **Discussão:** Foram comparadas as 5 neurotoxinas mais utilizadas em modelos animais de indução da doença de Parkinson: (1) Rotenona; (2) Paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina-dicloreto); (3) Aminocromo; (4) 6-OHDA (6-hidroxi-dopamina) e (5) MPTP (metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina) e **Conclusão:** concluiu-se que embora modelos experimentais de DP repliquem certos aspectos da doença, como sintomas motores, degeneração do nigro-estado e formação de α -sinucleína; eles são incapazes de reproduzir os sintomas cognitivos e a formação dos corpos de Lewy, sendo portanto, insuficientes na reprodução integral dos mecanismos fisiopatológicos e fenotípicos da doença de Parkinson.

Palavras-chave: Principais substâncias; Modelos Animais; Doença de Parkinson.

MAIN SUBSTANCES FOR EXPERIMENTAL MODELS OF PARKINSON'S DISEASE BY STEREOTAXY IN RODENTS

ABSTRACT

Background: Parkinson's disease (PD) is the second most frequent neurodegenerative disease, affecting 1% of the elderly population. Its clinical manifestations are diverse, including motor, cognitive, sensory and autonomic manifestations. PD is characterized by the loss of nigrostriatal dopaminergic neurons, concomitant with the presence of Lewy body; however, its etiology is not completely elucidated. Given the lack of treatment capable of completely mitigating the functional impairment imposed by PD, **Methodology:** this article seeks, through a systematic literature review, to evaluate the different neurotoxins used in laboratory induction of PD, describe its effects in rodents and recognize its similarities with the aspects of the pathology in question **Objective:** with the objective of elucidating the pathophysiological mechanisms of Parkinson's Disease, and thus, assisting future researches that allow the development of promising therapies. **Discussion:** The 5 most used neurotoxins in animal models of Parkinson's disease induction were compared: (1) Rotenone; (2) Paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridine-dichloride); (3) Aminochrome; (4) 6-OHDA (6-hydroxydopamine) and (5) MPTP (methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) and **Conclusion:** it was concluded that although experimental models of PD replicate certain aspects of the disease, such as motor symptoms, nigrostate degeneration and α -synuclein formation; they are unable to reproduce cognitive symptoms and the formation of Lewy bodies, and are therefore insufficient to fully reproduce the pathophysiological and phenotypic mechanisms of Parkinson's disease.

Keywords: Main Substances; Animal Models; Parkinson's Disease.

- 1 Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, Graduação em Medicina, Sorocaba, São Paulo, Brasil
- 2 Maastricht University, Departamento de Neurocirurgia, Holanda
- 3 Faculdade de Medicina do ABC, Departamento de Pesquisa e Inovação, Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Santo André, São Paulo, Brasil
- 4 Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, Departamento de Neurologia, Sorocaba, São Paulo, Brasil
- 5 Instituto de Assistência Médica ao Servidos Público do Estado, Pós-graduação, São Paulo, Brasil. E-mail: nicole.tortoro@hotmail.com

INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP), descrita inicialmente em 1817 por James Parkinson, é a segunda doença neurodegenerativa mais frequente, depois da Doença de Alzheimer (1,2); sendo responsável por atingir 1% da população idosa e acometer tanto homens quanto mulheres. Contudo, é mais frequente em homens devido ao estresse físico enfrentado por eles ao longo da vida e aos possíveis efeitos neuroprotetores do estrogênio na mulher (1–3). Além disso, a DP é o distúrbio de movimento neurodegenerativo mais frequente ao redor do mundo (4). No contexto brasileiro, a DP apresenta uma prevalência estimada em 3,3% em indivíduos com idade superior a 65 anos. Com o aumento da expectativa de vida, a tendência é que esse número se eleve (1,3,4). Dessa forma, faz-se necessário o estudo mais aprofundado acerca do tema, para proporcionar tratamentos mais adequados aos pacientes.

A doença de Parkinson (DP) é caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais, concomitantemente com a presença de inclusões citoplasmáticas eosinofílicas chamadas de corpos de Lewy, que são a marca patológica da doença de Parkinson, composto por proteínas dos neurofilamentos, α -sinucleína, ubiquitina, α - β -cristalina, sendo que seu surgimento pode estar relacionado com a extensa perda neuronal. A α -sinucleína é uma proteína expressada no SNC, principalmente em neurônios pré-sinápticos. A acumulação de α -sinucleína do tipo selvagem (WT) em neurônios dopaminérgicos leva à diminuição da atividade do complexo mitocondrial I e ao aumento da geração de espécies reativas de oxigênio, levando ao estresse oxidativo e liberação de citocromo c no citosol. Tendo isso em vista e a ideia de criação de um modelo experimental que se assemelhe a DP, foi relatado que a exposição aguda a neurotoxinas induz déficits motores e morte celular dopaminérgica nigroestriatal rápida, interrompendo a função mitocondrial ou aumentando o estresse oxidativo, enquanto a administração crônica de algumas neurotoxinas induz modelos progressivos que podem incluir agregados alfa-sinucleína (5).

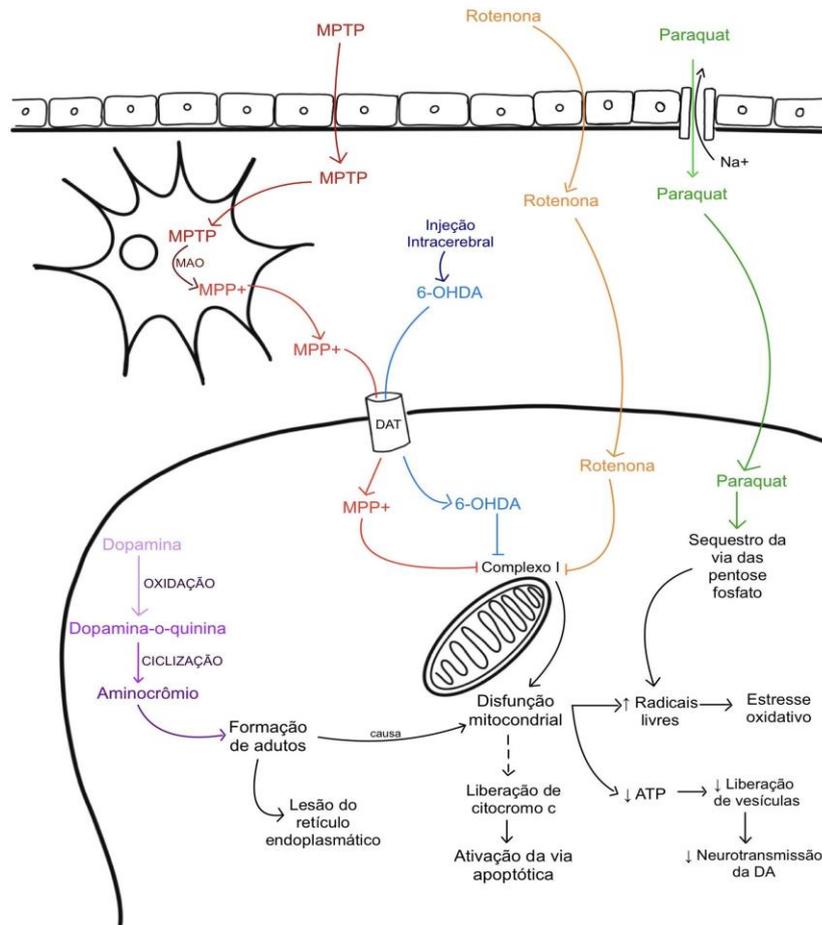
Embora a etiologia da DP não esteja totalmente elucidada, é conhecido que a apoptose (morte celular programada) é um fenômeno importante para a neurodegeneração da DP (2,4,6), a qual pode ser originada pelos principais mecanismos:

- 1) Déficit no sistema de remoção de proteínas anormais, como como alfa-sinucleína, parkin, PINK-1, LRRK-2;
- 2) Disfunção mitocondrial e geração de estresse oxidativo com aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (Reactive Oxygen Species - ROS);
- 3) Excitocidade e deposição férrica excessiva.

Em adição, toxinas exógenas e endógenas estão relacionadas às formas esporádicas da PD, podendo ativar a apoptose por meio de alguns desses mecanismos, como pesticidas, sendo os principais exemplos o inseticida rotenona e o herbicida paraquat (PQ; 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina-dicloreto), ambos causando neurodegeneração por estresse oxidativo (5), contudo a rotenona atinge esse efeito pela inibição do complexo I mitocondrial (4,7), enquanto o paraquat sequestra a via das pentoses-fosfato e estimula o ciclo redox do PQ (8). É importante ressaltar que a exposição a uma ou duas dessas substâncias durante a vida foi associada epidemiologicamente a maiores chances de desenvolvimento de Parkinson (9).

Além disso, outras toxinas podem ser citadas, como 6-OHDA, um análogo estrutural de dopamina, que quando injetado de forma intracerebral, uma vez que não ultrapassa a barreira hematocefálica, induz disfunção mitocondrial de neurônios dopaminérgicos da SNc; outro papel significativo desta toxina é a capacidade de desregular o equilíbrio de glutamina-glutamato entre astrócitos e neurônios no corpo estriado, desequilibrando os processos cerebrais excitatórios e inibitórios, o que potencialmente levariam a anormalidades a longo prazo nas atividades glutamatérgicas e GABAérgicas, e aminocromo, que por meio da formação de adutos com proteínas citoplasmáticas, dentre elas a alfa-sinucleína e o complexo I mitocondrial, induz disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, ocasionando a diminuição da exocitose de vesículas dopaminérgicas (2,4,6,10). Outra substância significativa para a indução dessa doença é o MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), na medida que seu íon danifica seletivamente os neurônios dopaminérgicos devido ao seu efeito inibidor no complexo I, resultando na redução da síntese de ATP e no acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), ativando a via apoptótica das caspases, e age seletivamente em neurônios dopaminérgicos, reduzindo a sua concentração e acarretando comprometimento de funções neuronais condizentes com a sintomatologia da DP (11). Dessa forma, observa-se a combinação de diversos fatores que levam à neurodegeneração dos neurônios dopaminérgicos.

Figura 1 - Mecanismos de ação



Rotenona: é um composto hidrofóbico e, portanto, cruza a BHE e a membrana citoplasmática, chegando à mitocôndria onde inibe o complexo I mitocondrial, que leva a depleção de ATP e aumento de ROS, ocasionando estresse oxidativo. Além disso, a disfunção mitocondrial leva ao acúmulo de ferro. *Paraquat*: atravessa a BHE por transportadores de aminoácidos Na⁺-dependente e, após entrar no neurônio, causa sequestro da via das pentoses fosfato, aumentando a redução de NADPH e o ciclo redox do paraquat. Isso causa elevação na produção de ROS e estresse oxidativo. *MPTP*: é capaz de cruzar a BHE e, no interior das células da glia, é convertido em MPP⁺ pela MAO-B. O MPP⁺ é então internalizado nos neurônios via DAT e, na mitocôndria, inibe o complexo I, levando à redução de ATP, o qual despolariza a membrana e permite influxo de Ca²⁺. Ademais, a inibição do complexo aumenta a produção de radicais livres, podendo oxidar o DNA e causar morte celular. A disfunção mitocondrial pode levar também à apoptose. *6-OHDA*: não é capaz de ultrapassar a BHE, sendo assim, precisa ser administrada por injeção intracerebral. Entra nos neurônios via DAT e causa inibição do complexo I mitocondrial. Sofre auto-oxidação intracelular que produz radicais livres e leva a peroxidação lipídica e oxidação do DNA, exacerbando o estresse oxidativo e disfunção mitocondrial. Além disso, inibe a MAO A/B, acentuando a inibição do complexo I mitocondrial. *Aminocrômio*: induz a formação de adutos proteicos, causando lesão do retículo endoplasmático e da mitocôndria. A lesão mitocondrial reduz a produção de ATP, a qual diminui a liberação de vesículas de dopamina e, portanto, afeta a neurotransmissão.

As manifestações clínicas da DP incluem bradicinesia, rigidez, tremor de repouso, alteração postural e de marcha. No entanto, as características motoras nos pacientes com Parkinson são heterogêneas, sendo divididos em dois subtipos principais: presença de tremor dominante e praticamente sem outras alterações motoras, e o outro subtipo apresentando

síndrome acinético-rígida, instabilidade postural e instabilidade de marcha (6). Além disso, existem outras variações quanto aos sintomas motores e suas gravidades. Os sintomas não-motores, causados devido às conexões de diversas áreas cerebrais com os terminais dopaminérgicos advindos da SNc para o estriado, como núcleo accumbens e tálamo, que podem estar presentes são: disfunção olfativa, comprometimento cognitivo, sintomas psiquiátricos, distúrbios de sono, disfunção autonômica, depressão, ansiedade, dor e fadiga (6,12). Dessa maneira, o déficit dopaminérgico pode interferir diretamente com as desordens motoras devido às projeções sensório-motoras (via nigroestriatal), com as desordens cognitivas devido às projeções do processamento associativo (via mesocortical) e com as desordens do comportamento devido às projeções dopaminérgicas via mesolímbica.

Tendo em vista a diversidade sintomática da doença de Parkinson e considerando-se que não existe tratamento capaz de mitigar completamente o prejuízo funcional imposto pela doença, faz-se ímpar o desenvolvimento de recursos terapêuticos mais efetivos. Com esse intuito, os modelos animais de reprodução laboratorial da Doença de Parkinson buscam elucidar os mecanismos etiológicos, fenotípicos e fisiopatológicos da doença. À vista disso, a presente revisão tem o objetivo de avaliar as diferentes neurotoxinas utilizadas na indução laboratorial da DP, descrever seus efeitos em roedores e reconhecer suas semelhanças com aspectos da patologia em questão, com o propósito de auxiliar futuras pesquisas que permitam a elaboração de terapias promissoras.

METODOLOGIA

Este estudo constitui uma revisão narrativa de caráter descritivo a respeito das principais substâncias selecionadas para compor um modelo experimental da Doença de Parkinson em roedores. Foram selecionados artigos por três revisores (I.M.M, L.M e N.T) desde Abril 2020 até Agosto 2020, utilizando as plataformas PUBMED, SciELO e EMBASE, sendo utilizada principalmente pela pesquisa focada nos mecanismos biomédicos das substâncias analisadas. As palavras chaves de procura foram “Rotenone”, “Paraquat”, “Parkinson disease”, “pathogenic mechanism”, “neurotoxina”, “Hidroxi-dopamine”, “6-OHDA”, “MPTP”, “Aminochrome”, “animal model”, “neuroinflammation”, “neurodegeneration”, “nigro-striatal pathway”, “oxidative stress”, “parkinsonism”, “neurotoxicity”, sempre com os operadores lógicos OR e AND para combinar estes descritores. Além disso, as referências dos artigos selecionados foram analisadas com a

finalidade de identificar outros artigos que atendessem aos critérios de inclusão e que não houvessem sido localizados nas bases de dados consultadas.

A inclusão dos artigos foi realizada primariamente pela leitura exploratória, seguida da leitura seletiva, por meio dos resumos e, em seguida, pela leitura interpretativa de seu objetivo, metodologia, discussão e conclusão, daqueles que foram avaliados e contemplavam os objetivos necessários para o estudo. Selecionamos ensaios clínicos, estudos comparativos experimentais e revisões de literatura. Foi definido como critério de elegibilidade para inclusão dos artigos relatos de experimentos concluídos, expondo as vantagens e desvantagens de cada método. Dos artigos encontrados, selecionamos 57 de acordo com a sua concordância para o estudo, sendo englobados estudos dos períodos 1995 até 2020, tantos artigos nacionais quanto internacionais.

RESULTADOS

Tabela 1 - Neurotoxinas e seus efeitos em roedores por diferentes vias de administração

Neurotoxina	Espécies	Mecanismo de ação	Rotas	Efeitos	Comportamento
OHDA	Roedores	<ul style="list-style-type: none"> Disfunção mitocondrial (ativação do complexo I) Inibição de MAO-A e B Estresse oxidativo Ativação de vias apoptóticas 	SnpC (Bilateral)	Degeneração dopaminérgica estriatal	Adipsia, afagia, convulsões e ausência de déficits motores
			Estriado (Unilateral)	Degeneração retrograda dos neurônios nigro-estriados Diminuição na densidade da fibra de projeção positiva para TH no cíngulo e no córtex motor	Déficits motores assimétricos e comportamento rotacional
			Feixe prosencefálico (Unilateral)	Perda de células ou fibras dopaminérgicas no SNc ipsilateral e no estriado Diminuição de células TH+ no estriado	Rigidez de membros, déficits cognitivos e mnemônicos
Paraquat	Roedores	<ul style="list-style-type: none"> Estímulo do ciclo redox e inibição de anti-oxidantes Produção de ânions superóxidos Ativação da via apoptótica mitocondrial Ativação da microglia Senescência astrocitária 	Intraperitoneal	Diminuição de células TH+ na SnpC Perda de neurônios dopaminérgicos concentrada na área ventral inclusões da proteína alfa-sinucleína	Alterações na atividade motora espontânea e prejuízo na coordenação motora
			Subcutânea	Lesão seletiva de neurônios dopaminérgicos na SNpc Diminuição de células TH+ Aumento da proteína alfa-sinucleína	Déficits da coordenação motora e aumento de 62% da proteína alfa-sinucleína
Rotenona	Roedores	<ul style="list-style-type: none"> Inibição do complexo I Estresse oxidativo por produção de ROS Ativação microglial Indução da apoptose aceleração da agregação e fibrilação da alfa-sinucleína 	Subcutânea e intraperitoneal	Degeneração dopaminérgica seletiva na via nigroestriatal, afetando primariamente os terminais nervosos Redução da imunorreatividade à TH e redução dos sinais DAT-positivos Neurodegeneração colinérgica no núcleo motor dorsal do vago e no plexo mioentérico Acúmulo de α -sinucleína	Déficits motores Sintomas gastrointestinais
MTPT	Roedores	<ul style="list-style-type: none"> Inibição do complexo I Indução da apoptose 	Subcutânea	Perda de neurônios dopaminérgicos e parâmetros funcionais no núcleo estriado Degeneração de neurônios dopaminérgicos, não associada a perdas funcionais	Déficit motor
Aminocrómio	Roedores	<ul style="list-style-type: none"> Formação de adutos com proteínas celulares Lesão de organelas e do citoesqueleto Autofagia Disfunção mitocondrial → depleção dos níveis de ATP, e diminuição do transporte e exocitose de vesículas sinápticas dopaminérgicas 	Estriado (Unilateral)	Alterações morfológicas dos neurônios dopaminérgicos Nigro-estriados Redução dos níveis basais de dopamina, vesículas dopaminérgicas, e GABA Ausência de perda significativa de neurônios dopaminérgicos	Comportamento motor contralateral

DISCUSSÃO

Escolha para o estudo de modelos experimentais realizados em roedores

Os roedores são extensivamente estudados em campos biomédicos porque são convenientes para cuidar em condições de laboratório e têm vários protocolos experimentais detalhados, incluindo diferentes formas de administração de medicamentos e avaliações

comportamentais. Uma vantagem dos modelos de PD de roedores é que a degeneração dopaminérgica nigroestriatal se correlaciona com déficits motores em camundongos e ratos. Isso pode ser observado e medido com uma série de testes comportamentais simples, a maioria dos quais envolve a medição do movimento, aderência ou força das patas dianteiras. Os testes comportamentais em roedores incluem o teste de campo aberto para uma avaliação geral da atividade locomotora, o teste de degrau para medir acinesia e o teste de poste para medir bradicinesia (13,14). A força pode ser medida pelos testes de força e coordenação da aderência (14). É difícil medir diretamente a rigidez em roedores, mas o desempenho no teste do rotarod é responsável por vários fatores, como equilíbrio, força e coordenação (14).

Roedores com lesões unilaterais exibirão comportamento motor assimétrico onde déficits no uso do membro contralateral podem ser medidos e comparados ao membro ipsilateral como controle interno. O comportamento circulante induzido por drogas, como a L-dopa, é uma medida mais dramática de uma lesão unilateral (7,14). Nesses testes, a administração de anfetamina estimula a liberação de dopamina no lado contralateral intacto, resultando em rotação ipsilateral, enquanto a apomorfina causa rotações contralaterais devido à hipersensibilidade à dopamina no lado lesionado. Lembrando que os testes motores também podem ser usados para avaliar a discinesia. Para o estudo de sintomas não motores em roedores, o método preferido é usar um modelo como uma lesão nigroestriatal parcial, que não causa déficits motores simultâneos que possam afetar os resultados do teste. Os padrões de sono, bebida e alimentação são monitorados para avaliar distúrbios do sono e perda de peso (15). Para modelar sintomas neuropsiquiátricos, um painel de testes complementares pode ser usado, onde o teste de suspensão da cauda ou o teste de natação forçada é usado para modelar depressão ou desespero comportamental (15). A redução no comportamento de construção de ninhos específico para espécies de camundongos pode ser usada para modelar tarefas motivadoras e orientadas a objetivos (14).

Principais substâncias utilizadas nos modelos experimentais de DP

OHDA

A 6-OHDA é uma substância análoga da dopamina e norepinefrina, que é encontrada no núcleo caudado humano em concentrações ideais, sendo produzido de forma endógena a partir de hidroxilação de metabólitos da dopamina. Para a formação de um modelo experimental de DP, é necessário que a solução que contém a hidroxidopamina seja administrada diretamente no cérebro, especificamente no estriado, na substância negra pars

compacta (SNc) ou até no feixe prosencefálico medial, a fim de obter a neurodegeneração, dado que não atravessa a barreira hematoencefálica, provavelmente devido a sua polaridade (7,16).

O 6-OHDA injetado no SNc ou no estriado é transferido pelo transportador de dopamina (DAT) para os neurônios dopaminérgicos, acumulando-se nas mitocôndrias e agindo ao inibir a atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial (17). Lembrando que ele também é transferido para neurônios noradrenérgicos, por meio de transportadores de monoaminas. Uma vez dentro das células, o 6-OHDA sofre auto-oxidação ou degradação metabólica e produz radicais peróxido de hidrogênio, superóxido e hidroxila. Esse processo causa peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e oxidação de DNA e, finalmente, exacerba o estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (18).

O 6-OHDA inibe a monoamina oxidase A / B (MAO-A / B), acentuando a inibição do complexo I mitocondrial. Tal mecanismo de deficiência induz a expressão do gene BAX, que resulta na ativação da via de apoptose por meio das caspases 3 e 9. Com isso, pode-se sugerir que o próprio 6-OHDA, e não só seus produtos de oxidação, é responsável pela neurotoxicidade (19). Além disso, o 6-OHDA também pode inibir a atividade dos complexos mitocondriais IV e diminuir o potencial da membrana mitocondrial, o que resulta na liberação de citocromo c no citosol celular, formando-se um complexo que ativa irreversivelmente as caspases, outro caminho que leva a apoptose celular (5,19,20). Embora existam sugestões de que a via apoptótica extrínseca possa estar ativa na doença de Parkinson, seu papel permanece incerto. Pensa-se que o mecanismo predominante da morte neuronal seja a via apoptótica intrínseca. Envolve uma sequência de eventos, incluindo geração aumentada de espécies reativas de oxigênio, liberação do citocromo c e depleção de ATP, além da ativação da caspase-9 e caspase 3, mecanismos cujos quais se repetem nos modelos experimentais de 6-OHDA. Apesar do mecanismo de depleção de neurônios dopaminérgicos deste modelo se assemelham aos da DP, ele não promove a agregação de da proteína alfa-sinucleína, mesmo que interaja com ela, nem à formação de corpos de Lewis, achados patognomônicos da etiologia de Parkinson (21).

As injeções intracerebrais de 6-OHDA em roedores permitem a escolha de atingir o SNpc, estriado ou feixe do prosencéfalo medial (22) e a geração de modelos hemiparkinsonianos unilaterais (23). Injeções bilaterais geralmente causam adipisia, afagia, convulsões e alta mortalidade (16). Em ratos, as injeções de SNpc de 6-OHDA resultam em grande degeneração dopaminérgica em 24 horas e 90% de perda de dopamina no estriado em

alguns dias (7,22). No entanto, injetado no estriado, o 6-OHDA causa uma degeneração retrógrada dos neurônios nigro-estriados durante um período de 1 a 3 semanas (22). Injeções unilaterais levam a déficits motores assimétricos e comportamento rotacional, também utilizados para avaliar a discinesia induzida por L-dopa (7,22). Uma vantagem do modelo unilateral é que permitem o uso dos membros ipsilaterais não lesionados do mesmo animal como controle interno, desde que seja comprovada a normalidade deste membro anteriormente a injeção.

A injeção bilateral de 6-OHDA (dose baixa: 0,017 mg / kg) no SNpc lesiona parcialmente os neurônios dopaminérgicos nigrais e não provoca déficits motores (24). Quando administrado em alta dose (0.032 mg/kg), resulta na diminuição da atividade do complexo mitocondrial I, contribuindo para a morte de neurônios dopaminérgicos diretamente via mecanismos EROS, incluindo aumento da produção de EROS e diminuição da síntese de ATP (25,26). Outro uso da 6-OHDA é a injeção unilateral no feixe prosencefálico medial de rato. O modelo de lesão feixe prosencefálico medial é adequado para imitar a DP e pesquisar as funções específicas de vários interneurônios estriatais no processo patológico da DP. A injeção unilateral de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial direito de camundongos leva a perda de células ou fibras dopaminérgicas no SNC ipsilateral e no estriado (27). A injeção unilateral de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial de ratos também resultou em rigidez dos membros, déficits cognitivos e mnemônicos, bem como uma perda significativa de expressão de TH e o conteúdo de DA no estriado ou SNpc (28–30).

A injeção intra estriatal de 6-OHDA induziu uma degeneração retrógrada de neurônios dopaminérgicos no SNpc e uma diminuição na densidade da fibra de projeção positiva para TH no cíngulo e no córtex motor, sugerindo que esse modelo pode ser ideal para estudar os mecanismos da patologia cortical e diminuição cognitiva na DP (31).

Paraquat

Paraquat (PQ, 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina-dicloreto) é um herbicida cuja estrutura química é semelhante à do MPP+, metabólito ativo do MPTP. Foi, a partir dessa semelhança, proposta a possibilidade de o paraquat danificar o sistema dopaminérgico nigroestriatal (32). Ele é um composto hidrofílico e, por isso, não é capaz de atravessar livremente a barreira hemato-encefálica (BHE). Sendo assim, sua entrada no SNC ocorre por transportadores de aminoácidos, em um processo Na⁺-dependente e DAT-independente (7,11).

Diferentemente do que é esperado pela sua estrutura semelhante à do MPP+, o PQ não inibe o complexo I mitocondrial (33). Sua toxicidade se dá pelo sequestro da via das pentoses-fosfato para aumentar a redução de NADPH, estimulando o ciclo redox do paraquat. A reação redox do PQ com o oxigênio molecular resulta em ânions superóxidos, aumentando, portanto, a produção de ROS, e causando estresse oxidativo (8). Ademais, o PQ prejudica a reciclagem redox da glutatona e da tireodoxina, inibindo a função desses anti-oxidantes celulares e contribuindo ainda mais para o estresse oxidativo (11,33). Kumar et al (34) constatou que a glutatona mostrou-se reduzida após tratamento com PQ.

Paraquat diminui a glicose extracelular e aumenta a intracelular por intensificar sua captação, uma vez que aumenta a translocação de transportadores de glicose, GLUT e SGLT, para a membrana plasmática. Dessa forma, há ampliação do transporte de glicose e carbono para a via das pentoses-fostato (8). A atividade pró-apoptótica do PQ é mediada pela via apoptótica mitocondrial, ativada devido disfunção desta organela (11), ocorrendo hiper-regulação de componentes da família Bcl-2 com consequente liberação de citocromo c e ativação das caspases 9 e 3 (11,34). A micróglia aparenta ter um papel na degeneração induzida por PQ, podendo ser fonte de ROS, tendo em vista que sua ativação pode ocorrer após uma injeção do herbicida (7). Há também evidências de que o PQ causa senescência de astrócitos os quais, por sua vez, reduziriam a viabilidade dos neurônios dopaminérgicos além de suprimir a proliferação e migração de células progenitoras neuronais, que serviria como uma resposta a certas lesões e patologias (35).

Os modelos animais que buscam reproduzir a patologia da Doença de Parkinson (DP) utilizando o PQ são realizados principalmente em roedores, resultando na reprodução de diversas características neuropatológicas e clínicas da doença. A administração intraperitoneal do herbicida aos animais leva à diminuição de células TH-positivas na substância nigra pars compacta (SNPc), evidenciando a perda de neurônios dopaminérgicos nessa região (32,34–37), sendo essa seletividade confirmada pelo fato de não haver comprometimento de neurônios dopaminérgicos em outras áreas como o hipocampo e substância nigra pars reticulata (32). Ademais, o padrão de perda celular desencadeado é não-homogêneo, sendo a área ventral a mais acometida da SNPc, assim como ocorre na DP (7). A toxicidade do PQ em relação aos neurônios dopaminérgicos se mostrou dose-dependente com uma perda na SNPc de 10, 18 e 28%, induzida respectivamente por 1, 5 e 10 mg/Kg do herbicida; assim como idade-dependente, com animais de 6 semanas e 5 meses de idade apresentando uma perda de

células TH-positivas de aproximadamente 25%, enquanto animais mais velhos (18 meses) perderam 33%, mostrando-se mais susceptíveis (32).

Por outro lado, os dados sobre depleção dos níveis de dopamina e seus metabólitos no corpo estriado são heterogêneos, podendo não se mostrar presente (32), contudo, alguns autores apresentaram sucesso ao reproduzir essa característica com o PQ (34). Outro aspecto importante buscados nos modelos de indução de DP e que se mostra presente com o PQ são as inclusões da proteína alfa-sinucleína (11), apesar disso, os corpos de Lewis, patognomônicos da patologia do Parkinson, não são encontrados. O PQ também é capaz de reproduzir aspectos fenotípicos ligados à DP como déficits motores, com alterações na atividade motora espontânea e prejuízo na coordenação motora (34,36).

A administração de PQ subcutânea por mini bombas osmóticas (2,5mg/Kg/ dia), menos comum que a intraperitoneal, foi capaz de reproduzir não só a seletividade de lesão de neurônios dopaminérgicos na SNPc, com redução de 41% nas células TH-positivas após 8 semanas, como também ocasionou depleção de dopamina no corpo estriado em 18% com 5 semanas de tratamento, déficits da coordenação motora e aumento de 62% da proteína alfa-sinucleína (37).

Faz-se importante ressaltar que, apesar de reproduzir diversos aspectos da DP, o modelo de PQ em roedores apresenta limitações como alterações destoantes da dopamina estriatal, ausência de sintomas não motores e variação na magnitude do comprometimento dos neurônios dopaminérgicos. Ademais, a indução com o PQ é um processo frágil e pode ser influenciado pelo método utilizado, tendo em vista que três doses de 10mg/kg intraperitoneal, intervalados em uma semana, podem causar perda de 28% de células TH-positivas na SNPc (32), ou apresentar nenhum efeito sobre elas (38).

Rotenona

A rotenona é um componente natural extraído de raízes de plantas e usado como pesticida (11,33). Por ser altamente hidrofóbico, cruza facilmente a barreira hematoencefálica (BHE), não dependendo de DAT para adentrar no citosol (39). Essa substância possui ação inibidora sobre o complexo I NADH-desidrogenase (4,7). Contudo, apesar de causar depleção de ATP, sua toxicidade decorre de estresse oxidativo por aumento na produção de ROS, sendo assim, não é resultado de um defeito bioenergético (40). A inibição do complexo I mitocondrial resulta também em desregulação da homeostase de ferro e acúmulo deste, o qual foi implicado na patologia da DP (4). Ademais, a rotenona está

envolvida com ativação microglial, dano oxidativo a proteínas, lipídeos e DNA, indução da apoptose, e aceleração da agregação e fibrilação da alfa-sinucleína (41). Outros efeitos da rotenona também foram relatados, como inibição da formação de microtúbulos de tubulina e inibição do proteossomo, porém sugere-se que este último seja secundário ao estresse oxidativo e disfunção microtubular (7).

A exposição de roedores à rotenona reproduz vários traços característicos encontrados na patologia da DP: perda de neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal (39,42–46), depleção de dopamina no corpo estriado (42,43), sintomas motores (39,42–46) e não motores (42,45), e inclusões de alfa-sinucleína nas células TH-positivas restantes (42,44,45). A administração subcutânea crônica de rotenona em roedores por meio de mini bombas osmóticas causa degeneração dopaminérgica seletiva na via nigroestriatal, afetando primeiramente e de forma mais severa os terminais nervosos no corpo estriado em comparação com os corpos celulares desses neurônios na SNPc (39,45,46), evidenciados pela redução da imunorreatividade à TH e redução dos sinais DAT-positivos (39,45). Ademais, são ocasionados déficits motores, um dos principais aspectos clínicos presentes no Parkinson (39,45,46). Doses de 2,5 mg/Kg/ dia, via subcutânea, por 4 semanas fomentou, além da lesão nigroestriatal dopaminérgica e das alterações motoras, neurodegeneração colinérgica no núcleo motor dorsal do vago e no plexo mioentérico, assim como acúmulo de alfa-sinucleína nessas regiões e na SNPc, porém sem formação de corpos de Lewis; e disfunção gastrointestinal, um sintoma não-motor comum em pacientes com DP (45).

Injeções intraperitoneais de rotenona também originam lesão preferencial dos terminais dopaminérgicos no corpo estriado, com redução da imunorreatividade à TH assim como diminuição da dopamina e seus metabólitos HVA e DOPAC (43,44), além disso, a perda de células TH-positivas também é observada na substância nigra (SN) (44). A seletividade para neurônios dopaminérgicos é notada igualmente pelo fato de os níveis de noradrenalina e serotonina não serem afetados (43). A administração intraperitoneal de rotenona causa alterações motoras, manifestando-se com hipoatividade (43) e até mesmo de uma forma mais severa com bradicinesia, instabilidade postural e rigidez debilitantes; bem como inclusões citoplasmáticas de alfa-sinucleína na SN (44).

Apesar de reproduzir muitos traços importantes da DP, a administração de rotenona via subcutânea ou intraperitoneal não espelha a forma com que a substância entra no organismo de uma pessoa exposta a ela. A exposição ambiental de camundongos à rotenona (dose de 5mg/Kg de peso por 2 a 6 semanas) mimetiza as formas de entrada do pesticida no

corpo humano, além de causar redução de neurônios TH-positivos nos animais de forma tempo-dependente: em 22% após 4 semanas, e em 39% após 6 semanas. Origina também (1) lesão dos terminais dopaminérgicos estriatais, com redução da imunorreatividade à TH e depleção dos níveis de dopamina e DOPAC no corpo estriado; (2) acúmulo de alfa-sinucleína; (3) sintomas motores, apresentando alteração da movimentação espontânea e da coordenação motora após 4 semanas de exposição; e (4) sintomas não-motores precedendo alterações motoras, como disfunção gastrointestinal e olfatória após uma e duas semanas, respectivamente, do início do tratamento (42). Mesmo apresentando muitas das características buscadas em modelos de indução de Parkinson em roedores, a rotenona apresenta limitações como variabilidade de animais que desenvolvem lesão nigroestriatal dopaminérgica, inconsistência na magnitude da lesão, bem como localização e distribuição das lesões no corpo estriado (44), e toxicidade aguda (33).

MPTP

O MTPT (Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine), uma neurotoxina, bioproduto da síntese de MPPP (1-methyl-4-phenyl-4-propionoxypiperidine), foi produzido pela primeira vez por Ziering e Lee, em 1947 (47), contudo, adquiriu relevância médica na década de 1980, quando Dr Langston e seus colegas, após se depararem com sintomas semelhantes aos da doença de Parkinson em pacientes sob efeito de MPTP, reconheceram o potencial dessa toxina de criar um modelo válido de estudo da doença (48).

Após cruzar a barreira hemato-encefálica, nas células da glia, o MPTP é convertido pela enzima monoamino oxidase B (MAO-B) em seu metabólito tóxico 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺). O MPP⁺ é internalizado pelas células dopaminérgicas através do DAT - uma proteína transportadora de dopamina dependente de energia - e concentrado no citoplasma por meio de dois mecanismos: (1) A neuromelanina, que forma um complexo com o MPP⁺, retardando sua liberação citoplasmática, e (2) os transportadores vesiculares de monomania (VMAT), que confinam a neurotoxina em vesículas sinápticas. O MPP⁺ livre no citosol penetra na mitocôndria por transporte ativo e inibe a atividade do complexo I, ocasionando inibição subsequente da oxidação dos substratos ligados a NAD⁺ e α -cetoglutarato desidrogenase. (49) Mediante inibição mitocondrial, os níveis intracelulares de ATP diminuem, suscitando despolarização da membrana celular, que leva à um aumento extracelular de glutamato, responsável por estimular receptores NMDA dos neurônios dopaminérgicos, os quais promovem abertura dos canais de cálcio e aumento da concentração

intracelular desse íon. O aumento intracelular de cálcio induz a produção de óxido nítrico (NO), por meio da ativação da enzima óxido nítrico sintetase. NO reage com oxigênio, formando radicais livres, que oxidam diversas moléculas intracelulares, dentre elas o DNA, gerando estresse oxidativo, que pode ser responsável pela morte celular. (48) Outro mecanismo pelo qual o MPTP desencadeia morte celular é através da indução de apoptose. A lesão mitocondrial possibilita a liberação do citocromo C no citoplasma, o qual ativa a via pró-apoptótica das caspases (49).

Em primatas, a exposição ao MPTP induz a depleção dos níveis de dopamina, através de um padrão de lesão nigroestriatal semelhante ao observado na doença de Parkinson: maior degeneração dos neurônios dopaminérgicos no núcleo putamen em relação ao núcleo caudado, associada à preservação substancial dos estriossomos. Outra semelhança ao Parkinson é o comprometimento extraestriatal, caracterizado pela depleção dopaminérgica, noradrenergica e serotoninérgica no tronco cerebral, no subcórtex e no córtex. Além das similitudes anatomo-patológicas descritas, o MPTP suscita modificações fenotípicas análogas à DP, dentre elas, desordens motoras, evidenciadas por bradicinesia, rigidez e tremores; prejuízos cognitivos e comportamentais e distúrbios no ciclo sono-vigília. Não obstante o potencial dos modelos de MPTP em produzir uma fenocópia praticamente perfeita da DP, ainda existem barreiras em relação à reprodutibilidade plena da doença, sendo a principal delas a ausência de formação dos corpos de Lewis, um marco histo-patológico do Parkinson. Outro entrave é a impraticabilidade de se instituir um modelo único de estudo, sendo necessário o uso de diferentes espécies de primatas e em diferentes regimes de administração de MPTP, de acordo com os sintomas, estágio da doença e características anatomopatológicas desejadas. Finalmente, um terceiro obstáculo é a dificuldade de estabelecer parâmetros de avaliação da resposta comportamental que sejam reprodutíveis e fidedignos. (50)

Em ratos, a injeção subcuânea de MPTP, sob regime de 2 a 4 doses de 12mg/Kg, levou à degeneração de neurônios dopaminérgicos no núcleo estriado, associada a perda de parâmetros funcionais, dentre eles a captação e liberação de DA; a redução da expressão do gene MAO-B; e diminuição do conteúdo de VMAT2 e DAT. Tais alterações estriatais foram responsáveis pelo déficit motor encontrado. Na substância nigra, apesar da perda de massa de neurônios dopaminérgicos, houve preservação dos parâmetros funcionais. Apesar da semelhança topográfica ao padrão de lesão da DP humana, cujo dano neuronal concentra-se nas camadas ventral, lateral e posterior da Pars-compacta, preservando as regiões medial e anterior, o modelo de MPTP em ratos não é capaz de reproduzir integralmente a doença, posto

que a sensibilidade à lesão estriatal e à alterações comportamentais são significativamente variáveis de acordo a cepa e idade do rato e ao regime de administração. Ademais, à semelhança dos estudos em primatas, outro obstáculo a ser superado é a dificuldade de interpretação das alterações comportamentais. (48)

Aminocrômio

Os modelos pré-clínicos de estudo da doença de Parkinson majoritariamente recorrem à neurotoxinas exógenas para indução de lesão nigroestriatal. Todavia, tais toxinas não são capazes de reproduzir plenamente o processo neurodegenerativo duradouro e progressivo da doença, porquanto fomentam perda maciça e acelerada de neurônios dopaminérgicos. Isto posto, o Aminocrômio, neurotoxina endógena precursora da neuromelanina, torna-se uma alternativa viável para estudo da DP, tendo em vista que seu mecanismo de ação fundamenta-se na promoção de disfunção na liberação de dopamina, em oposição à perda significativa de neurônios dopaminérgicos. (51)

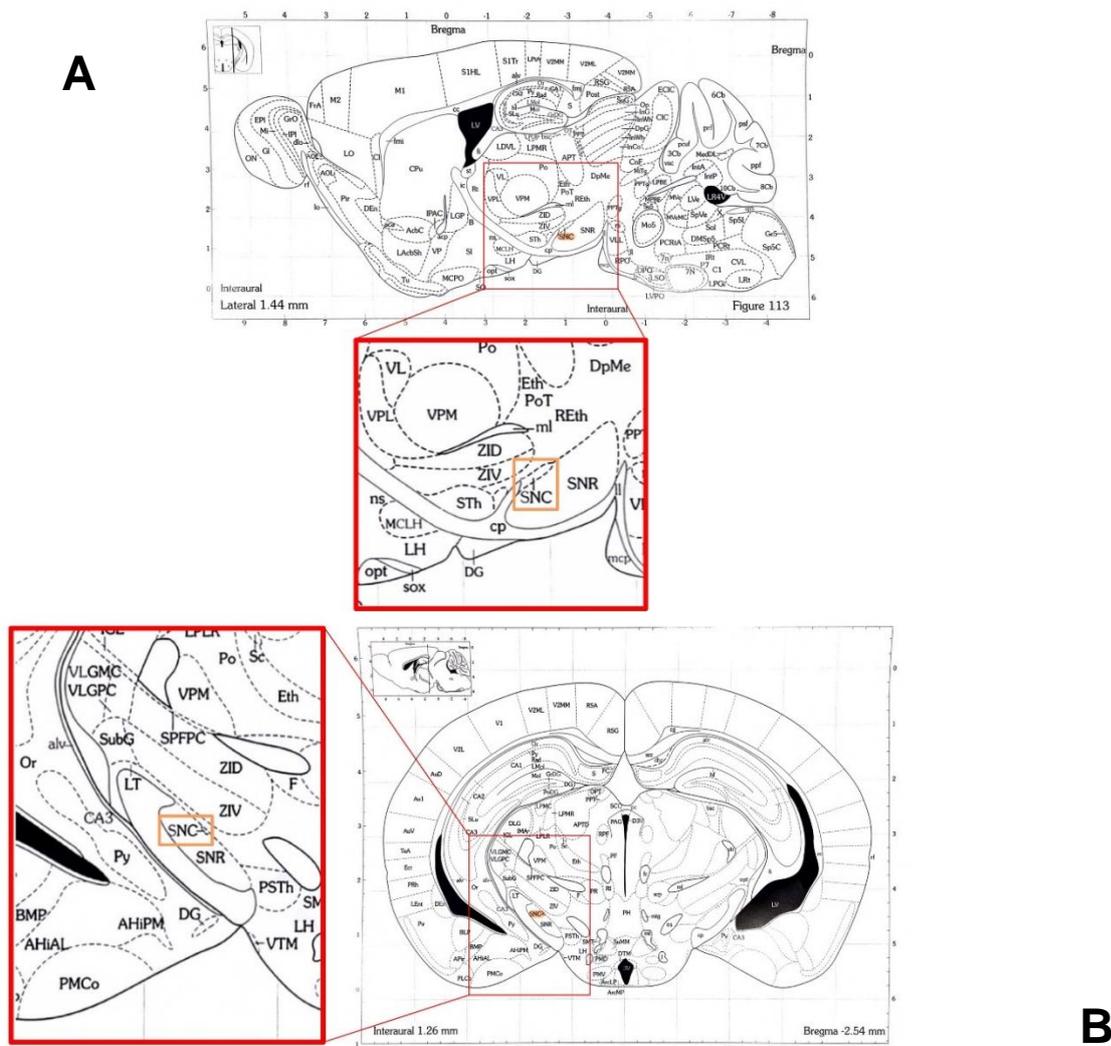
O aminocrômio é o metabólito resultante da oxidação, catalisada pela enzima tirosinase, da dopamina livre no citoplasma à neuromelanina: a Dopamina, por meio de uma série de reações oxidativas, é convertida à Dopamina-o-quinona, que sofre ciclização, dando origem ao aminocrômio (52). O aminocrômio é então convertido em 5,6-indolequinone e posteriormente em neuromelanina. A neuromelanina apresenta papel neuroprotetor, e gradativamente, com o envelhecimento, se acumula em vacúolos nos neurônios dopaminérgicos (10). Em condições fisiológicas, a neurotoxicidade do aminocrômio é prevenida por meio de 3 mecanismos protetivos: (1) A enzima VMAT-2, que promove a captação da dopamina em vesículas monoaminérgicas, prevenido a permanência de dopamina livre no citoplasma, (2) a enzima DT-Diaforase, que catalisa a redução do aminocrômio à leucoaminocrômio e (3) a enzima M2 - glutathione transferase humana, que catalisa a conjugação de aminocrômio à 4-S-glutathionil-5,6-di-hidroxiindolina (53,54). Caso não seja inativado, o aminocrômio forma adutos com diversas proteínas celulares (10), dentre elas a alfa-sinucleína, os complexos mitocondriais I e III, a isocitrato desidrogenase, a actina e a beta tubulina (52), a UCHL-1, os transportadores de dopamina e a ubiquitinol citocromo C redutase. Esses adutos induzem neurotoxicidade por meio da promoção de disfunção mitocondrial; estresse lisossômico e do retículo endoplasmático; disfunção em proteases; distúrbios na autofagia, destruição da arquitetura do citoesqueleto, neuroinflamação e estresse oxidativo. In vivo, a disfunção mitocondrial, principal mecanismo de lesão relacionado ao

aminocrômio, ocasiona depleção dos níveis de ATP, resultando na diminuição do transporte e exocitose de vesículas sinápticas dopaminérgicas (55,56).

Em ratos, a injeção unilateral de aminocrômio no corpo estriado acarretou alterações morfológicas nos neurônios dopaminérgicos do corpo estriado e da substância nigra, caracterizadas por redução do volume celular e lesão mitocondrial, acompanhada de depleção nos níveis de ATP e diminuição substancial do metabolismo basal. As alterações morfológicas foram acompanhadas de redução significativa dos níveis basais de dopamina, devido à diminuição do número de vesículas monoaminérgicas no terminal perisináptico dos neurônios dopaminérgicos, seguida de desbalanço na produção de gaba; no entanto, sem aumento significativo de glutamato. Apesar de não haver perda significativa de neurônios dopaminérgicos, foram observados comportamentos motores contralaterais. (51,57)

Em suma, apesar das vantagens do aminocrômio como modelo pré-clínico do PD, tais como (1) o fato de o aminocrômio ser uma neurotoxina endógena que é produzida no Parkinson; (2) a semelhança dos mecanismos de indução de neurotoxicidade do Aminocrômio e da PD (disfunção mitocondria, estresse oxidativo, formação de alfa-sinucleína) e (3) a progressão mais lenta da lesão nigro-estriatal induzida por aminocrômio; ainda são necessários estudos futuros para elucidar completamente a fisiopatologia da doença. (10)

Figura 2 - Ilustração da SNc (substância negra pars compacta). Um dos possíveis alvos estereotóxicos em roedores, sendo A a vista lateral e B a vista anterior (58).



CONCLUSÃO

Apesar de os modelos experimentais de DP utilizando neurotoxinas replicarem determinados aspectos da doença, como os sintomas motores, a degeneração nigro-estriatal e a formação de α -sinucleína - exclusiva do Paraquat e da Rotenona; São incapazes de reproduzir os sintomas cognitivos e a formação de corpos de Lewy. Isto posto, conclui-se que os modelos atuais são insuficientes na reprodução integral dos mecanismos fisiopatológicos e fenotípicos da doença de Parkinson, sendo necessário o aperfeiçoamento e a associação de modelos para a completa elucidação da fisiopatologia da doença e para o desenvolvimento de terapias efetivas.

REFERÊNCIAS

1. Carmo MRS do. Efeito Neuroprotetor Do Antagonismo Dos Receptores P2X7 No Parkinsonismo Experimental Induzido Por 6-OHda. Universidade Federal do Ceará; 2015.
2. Gama MC. INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DA CAFEÍNA EM UM MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE PARKINSON. Universidade Federal de Santa Catarina; 2008.
3. Santos VL. PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DA DOENÇA DE PARKINSON NO BRASIL. Centro Universitário de Brasília, UniCEUB; 2015.
4. Muñoz Y, Carrasco CM, Campos JD, Aguirre P, Núñez MT. Parkinson's Disease: The Mitochondria-Iron Link. Vol. 2016, Parkinson's Disease. Hindawi Limited; 2016.
5. Williams-Gray C. Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects [Internet]. Stoker TB, Greenland JC, editors. Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects. Codon Publications; 2018. 70–72; 83–91 p. Available from: <https://exonpublications.com/index.php/exon/article/view/183>
6. Kalia L V, Lang AE. Parkinson's disease. Lancet [Internet]. 2015 Aug;386(9996):896–912. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673614613933>
7. Bové J, Perier C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. Neuroscience [Internet]. 2012 Jun;211:51–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.10.057>
8. Powers R, Lei S, Anandhan A, Marshall D, Worley B, Cerny R, et al. Metabolic Investigations of the Molecular Mechanisms Associated with Parkinson's Disease. Metabolites [Internet]. 2017 May 24;7(2):22. Available from: <http://www.mdpi.com/2218-1989/7/2/22>
9. Tanner CM, Kame F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, et al. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. Environ Health Perspect. 2011;119(6):866–72.
10. Segura-Aguilar J. Aminochrome as preclinical model for Parkinson's disease. Oncotarget [Internet]. 2017 Jul 11;8(28):45036–7. Available from: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.18353>
11. Zeng X-S, Geng W-S, Jia J-J. Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism and Assessment. ASN Neuro [Internet]. 2018 Jan 29;10:175909141877743. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1759091418777438>
12. Rao SS, Hofmann LA, Shakil A. Parkinson's disease: Diagnosis and treatment. Am Fam Physician. 2006;74(12).
13. Blume SR, Cass DK, Tseng KY. Stepping test in mice: A reliable approach in determining forelimb akinesia in MPTP-induced Parkinsonism. Exp Neurol [Internet]. 2009 Sep;219(1):208–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.05.017>

14. Sedelis M, Schwarting RK., Huston JP. Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* [Internet]. 2001 Nov;125(1-2):109-25. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432801003096>
15. Taylor TN, Greene JG, Miller GW. Behavioral phenotyping of mouse models of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* [Internet]. 2010 Jul 29;211(1):1-10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2010.03.004>
16. Jackson-Lewis V, Blesa J, Przedborski S. Animal models of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* [Internet]. 2012 Jan;18:S183-5. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1353-8020\(11\)70057-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1353-8020(11)70057-8)
17. Glinka Y, Tipton KF, Youdim MBH. Nature of Inhibition of Mitochondrial Respiratory Complex I by 6-Hydroxydopamine. *J Neurochem* [Internet]. 1996 Nov 23;66(5):2004-10. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1471-4159.1996.66052004.x>
18. Hwang O. Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *Exp Neurobiol* [Internet]. 2013 Mar 30;22(1):11-7. Available from: <http://www.en-journal.org/journal/view.html?doi=10.5607/en.2013.22.1.11>
19. Glinka YY, Youdim MBH. Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. *Eur J Pharmacol Environ Toxicol Pharmacol* [Internet]. 1995 Mar;292(3-4):329-32. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0926691795900403>
20. Prajapati SK, Garabadu D, Krishnamurthy S. Coenzyme Q10 Prevents Mitochondrial Dysfunction and Facilitates Pharmacological Activity of Atorvastatin in 6-OHDA Induced Dopaminergic Toxicity in Rats. *Neurotox Res* [Internet]. 2017 May 27;31(4):478-92. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12640-016-9693-6>
21. Blandini F, Armentero MT, Martignoni E. The 6-hydroxydopamine model: News from the past. *Park Relat Disord*. 2008;14(SUPPL.2):124-9.
22. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's Disease. *Neuron* [Internet]. 2003 Sep;39(6):889-909. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627303005683>
23. Schober A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res* [Internet]. 2004 Oct 28;318(1):215-24. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00441-004-0938-y>
24. Drui G, Carnicella S, Carcenac C, Favier M, Bertrand A, Boulet S, et al. Loss of dopaminergic nigrostriatal neurons accounts for the motivational and affective deficits in Parkinson's disease. *Mol Psychiatry* [Internet]. 2014 Mar 12;19(3):358-67. Available from: <http://www.nature.com/articles/mp20133>
25. DABBENI-SALA F, Santo S, FRANCESCHINI D, D. SKAPER S, PIETRO GIUSTI A. Melatonin protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity in rats: a role for mitochondrial complex I activity. *FASEB J* [Internet]. 2001 Jan;15(1):164-70. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fj.00-0129com>

26. Ferrigno A, Vairetti M, Ambrosi G, Rizzo V, Richelmi P, Blandini F, et al. Selective blockade of mGlu5 metabotropic glutamate receptors is protective against hepatic mitochondrial dysfunction in 6-OHDA lesioned Parkinsonian rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* [Internet]. 2015 Jun;42(6):695–703. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/1440-1681.12410>
27. Park SE, Song K-I, Kim H, Chung S, Youn I. Graded 6-OHDA-induced dopamine depletion in the nigrostriatal pathway evokes progressive pathological neuronal activities in the subthalamic nucleus of a hemi-parkinsonian mouse. *Behav Brain Res* [Internet]. 2018 May;344(February):42–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.02.014>
28. Ma Y, Zhan M, OuYang L, Li Y, Chen S, Wu J, et al. The effects of unilateral 6-OHDA lesion in medial forebrain bundle on the motor, cognitive dysfunctions and vulnerability of different striatal interneuron types in rats. *Behav Brain Res* [Internet]. 2014 Jun;266:37–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2014.02.039>
29. Avagliano C, Russo R, De Caro C, Cristiano C, La Rana G, Piegari G, et al. Palmitoylethanolamide protects mice against 6-OHDA-induced neurotoxicity and endoplasmic reticulum stress: In vivo and in vitro evidence. *Pharmacol Res* [Internet]. 2016 Nov;113:276–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2016.09.004>
30. Hegazy MA, Maklad HM, Samy DM, Abdelmonsif DA, El Sabaa BM, Elnozahy FY. Cerium oxide nanoparticles could ameliorate behavioral and neurochemical impairments in 6-hydroxydopamine induced Parkinson's disease in rats. *Neurochem Int* [Internet]. 2017 Sep;108:361–71. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197018616304545>
31. Becker B, Demirbas M, Johann S, Zendedel A, Beyer C, Clusmann H, et al. Effect of Intrastratial 6-OHDA Lesions on Extrastratial Brain Structures in the Mouse. *Mol Neurobiol* [Internet]. 2017 Jun 14;4240–52. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12035-017-0637-9>
32. McCormack AL, Thiruchelvam M, Manning-Bog AB, Thiffault C, Langston JW, Cory-Slechta DA, et al. Environmental Risk Factors and Parkinson's Disease: Selective Degeneration of Nigral Dopaminergic Neurons Caused by the Herbicide Paraquat. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2002 Jul;10(2):119–27. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969996102905073>
33. Chia SJ, Tan EK, Chao YX. Historical perspective: Models of Parkinson's disease [Internet]. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020. p. 2464. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/7/2464>
34. Kumar A, Singh BK, Ahmad I, Shukla S, Patel DK, Srivastava G, et al. Involvement of NADPH oxidase and glutathione in zinc-induced dopaminergic neurodegeneration in rats: Similarity with paraquat neurotoxicity. *Brain Res* [Internet]. 2012 Feb;1438:48–64. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899311022293>

35. Chinta SJ, Woods G, Demaria M, Rane A, Zou Y, McQuade A, et al. Cellular Senescence Is Induced by the Environmental Neurotoxin Paraquat and Contributes to Neuropathology Linked to Parkinson's Disease. *Cell Rep* [Internet]. 2018 Jan;22(4):930–40. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124717319290>
36. Somayajulu-Nițu M, Sandhu JK, Cohen J, Sikorska M, Sridhar T, Matei A, et al. Paraquat induces oxidative stress, neuronal loss in substantia nigra region and Parkinsonism in adult rats: Neuroprotection and amelioration of symptoms by water-soluble formulation of Coenzyme Q10. *BMC Neurosci* [Internet]. 2009;10(1):88. Available from: <http://bmcneurosci.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2202-10-88>
37. Cristóvão AC, Campos FL, Je G, Esteves M, Guhathakurta S, Yang L, et al. Characterization of a Parkinson's disease rat model using an upgraded paraquat exposure paradigm. *Eur J Neurosci* [Internet]. 2020 Aug 3;52(4):3242–55. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ejn.14683>
38. Breckenridge CB, Sturgess NC, Butt M, Wolf JC, Zadory D, Beck M, et al. Pharmacokinetic, neurochemical, stereological and neuropathological studies on the potential effects of paraquat in the substantia nigra pars compacta and striatum of male C57BL/6J mice. *Neurotoxicology* [Internet]. 2013 Jul;37:1–14. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161813X13000454>
39. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov A V, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* [Internet]. 2000 Dec;3(12):1301–6. Available from: http://www.nature.com/articles/nn1200_1301
40. Sherer TB, Betarbet R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim JH, et al. Mechanism of Toxicity in Rotenone Models of Parkinson's Disease. *J Neurosci* [Internet]. 2003 Nov 26;23(34):10756–64. Available from: <http://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.23-34-10756.2003>
41. Nisticò R, Mehdawy B, Piccirilli S, Mercuri N. Paraquat-and Rotenone-Induced Models of Parkinson's Disease. *Int J Immunopathol Pharmacol* [Internet]. 2011 Apr;24(2):313–22. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/039463201102400205>
42. Liu Y, Sun JD, Song LK, Li J, Chu SF, Yuan YH, et al. Environment-contact administration of rotenone: A new rodent model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res*. 2015;294:149–61.
43. Alam M, Schmidt W. Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. *Behav Brain Res* [Internet]. 2002 Oct;136(1):317–24. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432802001808>
44. Cannon JR, Tapias V, Na HM, Honick AS, Drolet RE, Greenamyre JT. A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2009 May;34(2):279–90. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969996109000230>

45. Miyazaki I, Isooka N, Imafuku F, Sun J, Kikuoka R, Furukawa C, et al. Chronic Systemic Exposure to Low-Dose Rotenone Induced Central and Peripheral Neuropathology and Motor Deficits in Mice: Reproducible Animal Model of Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 May 4;21(9):3254. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/9/3254>
46. Murakami S, Miyazaki I, Miyoshi K, Asanuma M. Long-Term Systemic Exposure to Rotenone Induces Central and Peripheral Pathology of Parkinson's Disease in Mice. *Neurochem Res* [Internet]. 2015 Jun 18;40(6):1165–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-015-1577-2>
47. Langston JW. The MPTP Story. *J Parkinsons Dis* [Internet]. 2017 Mar 6;7(s1):S11–9. Available from: <https://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JPD-179006>
48. Meredith GE, Rademacher DJ. MPTP Mouse Models of Parkinson's Disease: An Update. *J Parkinsons Dis* [Internet]. 2011;1(1):19–33. Available from: <https://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JPD-2011-11023>
49. Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou MF, Benabid AL, Sadoul R, et al. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: Contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease [Internet]. Vol. 65, *Progress in Neurobiology*. 2001. p. 135–72. Available from: www.elsevier.com/locate/pneurobio
50. Porras G, Li Q, Bezard E. Modeling Parkinson's Disease in Primates: The MPTP Model. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2012 Mar 1;2(3):a009308–a009308. Available from: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a009308>
51. Herrera A, Muñoz P, Paris I, Díaz-Veliz G, Mora S, Inzunza J, et al. Aminochrome induces dopaminergic neuronal dysfunction: a new animal model for Parkinson's disease. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2016 Sep 21;373(18):3583–97. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-016-2182-5>
52. Muñoz P, Huenchuguala S, Paris I, Segura-Aguilar J. Dopamine Oxidation and Autophagy. *Parkinsons Dis* [Internet]. 2012;2012:1–13. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/pd/2012/920953/>
53. Segura-Aguilar J. On the role of endogenous neurotoxins and neuroprotection in Parkinson's disease. Vol. 12, *Neural Regeneration Research*. Medknow Publications; 2017. p. 897–901.
54. Muñoz P, Paris I, Sanders LH, Greenamyre JT, Segura-Aguilar J. Overexpression of VMAT-2 and DT-diaphorase protects substantia nigra-derived cells against aminochrome neurotoxicity. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2012 Jul;1822(7):1125–36. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443912000750>

55. Segura-Aguilar J. On the Role of Aminochrome in Mitochondrial Dysfunction and Endoplasmic Reticulum Stress in Parkinson's Disease. *Front Neurosci* [Internet]. 2019 Mar 29;13(March):1–6. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2019.00271/full>
56. Segura-Aguilar J, Huenchuguala S. Aminochrome Induces Irreversible Mitochondrial Dysfunction by Inducing Autophagy Dysfunction in Parkinson's Disease. *Front Neurosci* [Internet]. 2018 Mar 13;12(MAR):1–5. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2018.00106/full>
57. Leal PC, Lins LCRF, de Gois AM, Marchioro M, Santos JR. Commentary: Evaluation of Models of Parkinson's Disease. *Front Neurosci* [Internet]. 2016 Jun 21;10(JUN):1–4. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnins.2016.00283/abstract>
58. PAXINOS, G; FRANKLIN, K. B. J. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2. Ed. Amsterdam: academic Press, 2001. P. 52 e 113.