UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE PSICOLOGIA

CAMILA SILVA SIQUEIRA

Influência da adrenalectomia bilateral nos eventos neurodegenerativos no modelo do parkinsonismo experimental pela 6-OHDA nigral. Enfoque aos mecanismos parácrinos gliais envolvidos na neuroproteção e cicatrização.

São Paulo

2009

CAMILA SILVA SIQUEIRA

Influência da adrenalectomia bilateral nos eventos neurodegenerativos no modelo do parkinsonismo experimental pela 6-OHDA nigral. Enfoque aos mecanismos parácrinos gliais envolvidos na neuroproteção e cicatrização.

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Neurociência e Comportamento.

Área de concentração: Neurociências e comportamento
Orientador: Professor Dr. Gerson Chadi

São Paulo

2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catalogação na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Siqueira, Camila Silva.

Influência da adrenalectomia bilateral nos eventos neurodegenerativos no modelo do parkinsonismo experimental pela 6-OHDA nigral. Enfoque aos mecanismos parácrinos gliais envolvidos na neuroproteção e cicatrização / Camila Silva Siqueira; orientador Gerson Chadi. -- São Paulo, 2008.

123 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Neurociências e Comportamento) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Doença de Parkinson 2. Corticosterona 3. Matriz extracelular 4. Neurodegeneração I. Título.

RC382

FOLHA DE APROVAÇÃO

Camila Silva Siqueira

Influência da adrenalectomia bilateral nos eventos neurodegenerativos no modelo do parkinsonismo experimental pela 6-OHDA nigral. Enfoque aos mecanismos parácrinos gliais envolvidos na neuroproteção e cicatrização.

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Neurociência e Comportamento.
Área de Concentração: Neurociência e Comportamento

Aprovada em: __/__/____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição:_____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição:_____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição:_____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição:_____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição:_____ Assinatura: _____

A Deus Pai e a Deus Filho, meu maior agradecimento, pela vida, bênçãos, força, fé e por estar a todo momento dentro de mim.

Aos meus queridos pais José e Eunice: os quais me ensinaram o valores reais da vida. Obrigada pelo exemplo, confiança e amor.

Ao meu querido irmão Tots: pai do garoto mais lindo do mundo, meu amigo e companheiro.

Ao meu amado marido Paulinho: Dedico esse trabalho a você. Sua força, confiança e amor foram fundamentais para o término desse trabalho. Obrigada por sempre estar ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Gerson Chadi, por ter me dado a oportunidade de realizar esse trabalho. Muito obrigada pelos ensinamentos e confiança no meu trabalho. Os tempos vividos sob a sua orientação foram fundamentais para o meu crescimento não só acadêmico, mas também pessoal.

A amiga Dra. Vânia Gomide, pelos ensinamentos das técnicas realizadas no início do mestrado como do modelo experimental do parkinsonismo e por ter compartilhado o seu encantamento pela ciência que é contagiante.

A amiga Dra. Jéssica R. Maximino, pelo acompanhamento nas técnicas de Western blot e estatística. Muito obrigada, pelo companheirismo, atenção, e amizade.

As amigas do Lim 45: Beatriz Levy; Bianca de Luca; Maura Laureano. As quais me ajudaram em todo o processo, com seus conselhos e estímulos. Amigas que com certeza me acompanharão pelo resto da vida.

Aos colegas do laboratório de Neurocirurgia Funcional LIM 45: Jinger do Carmo, e Rafaela Pestana, Tatiana Duobles, Juliana Prado, André Bombeiro, Andréas Betz, Rebeca Boets, Susana Telles, Chary Ely . Muito Obrigada pelo apoio, conselhos e ajudas.

Aos funcionários do LIM 45: Sarah, Florence e Gilmar, muito obrigada pela ajuda profissional e amizade.

Aos colegas do laboratório de Neurotransmissão e Regulação Neural da Pressão Arterial: em especial a Dra. Merari Ferrari e ao Dr. Daniel Carneiro. Muito Obrigada pelos conselhos e amizade.

Aos funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas III, Faculdade de Medicina de USP e do departamento de Neurociências e comportamento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnologia (CNPq) pela concessão de bolsa auxílio à pesquisa

As minhas grandes amigas: Ana Paula, Alessandra, Caroline, Eliana, Érika, Renata e Silvia. Grandes companheiras que sempre me incentivaram muito. Muito obrigada por essa amizade.

Aos meus familiares pelo incentivo e apoio.

A realização deste trabalho contou com os auxílios concedidos:

FAPESP (98/13122-5)

FAPESP (99/01319-1)

FAPESP (07/00491-3)

CNPq (485102/2007-2; 311797/2006-7)

CNPq para C.S.

RESUMO

Siqueira, C.S. **Influência da adrenalectomia bilateral nos eventos neurodegenerativos no modelo do parkinsonismo experimental pela 6-OHDA nigral. Enfoque aos mecanismos parácrinos gliais envolvidos na neuroproteção e cicatrização.** 2009. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Psicologia – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Este trabalho tem o objetivo avaliar o efeito da adrenalectomia bilateral no processo neurodegenerativo e cicatricial na via nigro estriatal dopaminérgica lesada pela 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em ratos, e deste modo contribuir para a interpretação dos efeitos dos hormônios adreno esteróides nos processos neurodegenerativos e neurotróficos nas lesões do sistema nervoso central.
Ratos Wistar adultos jovens foram submetidos à cirurgia de retirada bilateral das glândulas adrenais ou cirurgia simulada para a mesma. Após 2 dias, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para lesão do sistema nigro estriatal dopaminérgico através da injeção unilateral de 6-OHDA na substância negra. Os animais receberam diariamente doses de reposição hormonal de corticosterona (10mg/kg) ou solução veículo.
Após um período de 72 horas, 1 semana e 3 semanas, os animais foram sacrificados por decapitação, e as regiões do mesencéfalo ventral e corpo estriado foram dissecados bilateralmente. O tecido foi processado para o método de Western blot onde foram analisados os seguintes marcadores: tirosina hidroxilase (TH – enzima que participa da via de conversão da dopamina), proteína ácida fibrilar glial (GFAP – proteína do filamento intermediário do citoesqueleto do astrócito), bem como as moléculas da matriz extracelular fosfacan, neurocan, sulfato de condroitina e NG2, a proteína Laminina e finalmente, o fator de crescimento fibroblástico-2 (FGF-2) na região do mesencéfalo ventral, onde observa-se ações tróficas nos neurônios dopaminérgicos nigras que podem exercer efeitos no processo inflamatório pelas suas ações gliogênica e angiogênica. Deste modo, a neurodegeneração dopaminérgica foi avaliada pelos níveis da TH, a ativação astrocitária pelos níveis da GFAP, o processo de cicatrização pela regulação das moléculas da matriz extracelular e as respostas tróficas pelo FGF-2. Pelos resultados obtidos é possível que hormônios glicocorticóides adrenais modulem os elementos envolvidos na neurodegeneração e reparo e cicatrização do sistema dopaminérgico

Palavras-chave: Doença de Parkinson, corticosterona, matriz extracelular, neurodegeneração

ABSTRACT

This study has the objective to evaluate the effect of the bilateral adrenalectomy in the neurodegenerative process and cicatrization on the nigroestriatal pathway injury through 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in rat, and in this way contribute for the interpretation of the adreno esteroides hormones effects in the neurodegenerative and neurotrophics process in the central nervous system.injury

Adult rats wistar were submitted in a surgery to take the bilateral adrenal gland or a simulate surgery of the same. After 2 days the animals was involved into a stereotaxic surgery to nigroestriatal dopaminergic lesion with a unilateral injection of the 6-OHDA in the nigra. The animals received daily corticosterone hormonal (10mg/kg) or vehicle solution.

After a period of 72 hours, 1 week and 3 weeks, the animals were decapitated, and the regions of the ventral midbrain and striatum it was bilaterally dissected. The tissue was processed by Western blot method and analyzed for the following markers: tyrosine hydroxylase (TH - enzyme that join of the dopamine conversion pathway), glial fibrilar acid protein (GFAP – protein of the intermediary filament of the astrocyte citoesqueleto, the moleculars extracellular matrix phosphacan, neurocan, chondroitin sulfate and NG2, the Laminin protein and finally, the neurotrophic factor (FGF-2) in the region of ventral midbrain, where watched trophic actions in the dopaminergic neurons that could have effects in the inflammatory processes by your gliogenic and angiogenic actions. In this way, the dopaminergic neurodegeneration was evaluated by the TH levels, the astrocytary activation by the GFAP levels, the cicatrization processes by the molecules regulation of the extracellular matrix and the trophics FGF-2 answers. By the results it is possible that adrenal glucocorticoid hormones modulate the elements involved in neurodegeneration, repair and cicatrization of the dopaminergic system

Key words: Parkinsons Disease, corticosterone, extracellular matrix, neurodegeneration

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 12.03.08, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1246/07** , intitulado: **"INFLUÊNCIA DA ADRENALECTOMIA BILATERAL NOS EVENTOS NEURODEGENATIVOS NO MODELO DO PARKINSONISMO EXPERIMENTAL PELA 6-OHDA NIGRAL. ENFOQUE AOS MECANISMOS PARÁCRINOS GLIAIS ENVOLVIDOS NA NEUROPROTEÇÃO E CICATRIZAÇÃO"** apresentado pelo **DEPARTAMENTO DE NEUROLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c").

Pesquisador(a) Responsável: **Prof.Dr. Gerson Chadi**

Pesquisador Executante : Camila Silva

CAPPesq, 17 de março de 2008.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos. 225, 5º andar - CEP 05430 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br
tms

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 2

1.1 CORTICOSTERÓIDE 2
1.1.1 AÇÃO DOS CORTICOSTERÓIDES NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL 3
1.2 DOENÇA DE PARKINSON 5
1.3 MOLÉCULAS DA MATRIZ EXTRACELULAR - PROTEOGLICANOS 8
1.4 RELAÇÃO ENTRE O HORMÔNIO CORTICOSTERONA E LESÃO NO SNC 10

2. OBJETIVOS 13

2.1 OBJETIVOS GERAIS 13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 13

3. MATERIAIS E MÉTODO 15

3.1 ADRENALECTOMIA BILATERAL 15
3.2 LESÕES DO SISTEMA NIGRO-ESTRIATAL DOPAMINÉRGICO 16
3.3 REPOSIÇÃO HORMONAL 17
3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS 18
3.5 EUTANÁSIA 19
3.6 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E WESTERN BLOTTING 19
3.7 IMUNOHISTOQUÍMICA DA TIROSINA HIDROXILASE (TH) 20
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA 21

4. RESULTADOS 24

4.1 ANÁLISE DOS NÍVEIS DA PROTEÍNA PELO WESTERN BLOT 24
4.1.1 Níveis da proteína TH no Mesencéfalo Ventral 24
4.1.2 Níveis da proteína TH no Corpo Estriado 29
4.1.3 Nível da GFAP no Mesencéfalo Ventral 34
4.1.4 Nível da GFAP no Corpo Estriado 39
4.1.5 Nível da proteína Fosfacan no Mesencéfalo Ventral 44
4.1.5.1 Fosfacan com peso molecular de 175 kDa 44
4.1.5.2 Fosfacan com peso molecular de 300 kDa 44
4.1.6 Nível da proteína Fosfacan no Corpo Estriado 50
4.1.6.1 Fosfacan com peso molecular de 175 kDa 50
4.1.6.2 Fosfacan com peso molecular de 300 kDa 50
4.1.7 Nível da proteína Neurocan no Mesencéfalo ventral 56
4.1.8 Nível da proteína Neurocan no Corpo estriado 61
4.1.9 Níveis da proteína NG2 no Mesencéfalo Ventral 66
4.1.10 Níveis da proteína NG2 no Corpo Estriado 71
4.1.11 Níveis da Proteína Sulfato de Condroitina no Mesencéfalo Ventral 76
4.1.12 Níveis da Proteína Sulfato de Condroitina no Corpo Estriado 81
4.1.13 Níveis da Proteína Laminina no Mesencéfalo Ventral 86
4.1.14 Níveis da proteína Laminina no Corpo Estriado 91
4.1.15 Nível da proteína FGF-2 no Mesencéfalo Ventral 96
4.2 ANÁLISE DO DESAPARECIMENTO DOS NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS NA SUBSTÂNCIA NEGRA PELA IMUNOHISTOQUÍMICA. 100

5. DISCUSSÃO 102

6. CONCLUSÃO 111

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS* 113

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Corticosteróide

O corticosteróide faz parte do grupo de hormônios esteróides, os quais são lipídios de cadeia complexa que derivam da molécula de colesterol. Os esteróides são amplamente distribuídos nos organismos vivos os quais incluem os hormônios sexuais, a vitamina D e os esteróis, e são representados por três classes distintas de substância, sendo essas, os glicocorticóides, os mineralocorticóides e os hormônios sexuais.

Os glicocorticóides são o maior subtipo de hormônio esteróide, modulando um grande número de funções metabólicas, cardiovascular, imunológicas e comportamentais (Bamberger et al., 1996). A corticosterona é um hormônio da classe dos glicocorticóides liberado pelo córtex das glândulas adrenais (Gower, 1993). Geralmente a nomenclatura corticosteróide é utilizada como sinônimos de glicocorticóide.

O controle da secreção dos corticosteróides é regulado por neurônios do hipotálamo, principalmente do núcleo paraventricular. O hipotálamo, através de uma retroalimentação negativa dos glicocorticóides, secreta neurotransmissores como o liberador de corticotrofina (CRH), que controla a secreção pela hipófise anterior do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). O ACTH, por sua vez, liga-se a receptores específicos na membrana plasmática das células do córtex adrenal e exerce controle sobre a secreção da corticosterona. A ação do ACTH na glândula adrenal é rápida, dentro de minutos após sua liberação há um aumento da concentração de esteróides no sangue venoso da adrenal, sendo o cortisol detectável de 2-3 minutos após a administração de ACTH (Allen e Allen, 1975; Herman e Cullinan, 1997).

A corticosterona eleva seus níveis circulantes em resposta ao estresse ou inflamações e passam facilmente pela barreira hemato-encefálica, atravessando a membrana celular e ao se ligarem em receptores intracelulares específicos (De Kloet et al., 1991). No conjunto de suas ações, a corticosterona está envolvida na regulação do

comportamento, na sinalização neuroquímica e nos eventos neurodegenerativos e neurotróficos (Nichols et al., 1990).

Sabe-se, que o hormônio corticosteróide age através de seus receptores localizados no citosol das células, sendo que após a ligação o complexo desloca-se para o núcleo onde interage com elementos específicos do DNA, modificando a atividade transcripcional dos genes alvos ou interagindo com outras proteínas nucleares (De Kloet et al., 1991; O'Donnell et. al., 1995; Bamberger et. al., 1996).

Os hormônios esteróides, em especial os corticosteróides são importantes na manutenção de várias funções no sistema nervoso central (SNC) (Fuxe et al., 1985).

1.1.1 Ação dos Corticosteróides no Sistema Nervoso Central

A ação do hormônio corticosteróide é muito importante para manter muitas das funções no SNC, sendo que seus receptores estão distribuídos abundantemente através desse (Fuxe et al., 1985), podendo agir em neurônios e células gliais através do receptor específico, atuando como moléculas neurotróficas (Cintra et al., 1994b; Dallman, 2005).

Há estudos que indicam que essa ação no SNC influencia a plasticidade/trofismo no animal adulto (Pollock et al., 1990; Laping et al., 1991; Chao et al., 1998) e pode estar relacionado com a habilidade de regular a expressão de fatores neurotróficos (Barbany e Persson, 1993; Chao e McEwen, 1994; Riva et al., 1995a; Riva et al., 1995b; Smith et al., 1995), como verificado por Chadi et al. em 1993a, que observou que a administração de corticosterona é capaz de aumenta a imunorreatividade do FGF-2 principalmente na célula glial na substância negra de ratos.

A regulação desses fatores por hormônios esteróides pode ser também mediada por ações de expressão imediata de novos genes (Nichols et al., 1990).

Geralmente, frente a um quadro de retirada das glândulas adrenais, procedimento conhecido como adrenalectomia (ADX), ocorre um aumento na capacidade de ligações

exercida pelo corticosteróide no hipocampo e córtex frontal do rato (McEwen, 1986; Turner, 1986), e quando há indução do corticosteróide exogenamente administrado, ocorre uma alteração do nível desses que é acompanhado também por uma mudança concomitante de mRNA do corticosteróide (O'Donnell et. al., 1995).

Sabe-se também que frente a um quadro de lesão no SNC (Nichols et al., 1990) ou estresse em áreas sensitivas, como no hipocampo, ocorre um aumento na concentração e expressão da corticosterona (Cintra et al., 1994a; Cintra et al., 1994b).

Além disso, há um grande número de astrócitos imunorreativos ao corticosteróide na substância negra (Fuxe et al., 1994b). A interação entre o corticosteróide e o sistema dopaminérgico mesencefálico, tem recebido uma atenção especial nos últimos anos, por estarem envolvidos em condições psicopatológicas como na depressão e esquizofrenia (Deroche et al., 1995).

O hormônio corticosteróide pode contribuir para a hiperatividade de neurônios dopaminérgicos o qual expressam receptores de corticosteróides, podendo aumentar a concentração extracelular de dopamina (Härfstrand et al., 1986). É possível que a corticosterona possa aumentar a síntese de dopamina na área tegmantar ventral (VTA), mas a ADX não afeta o número de neurônios dopaminérgicos no VTA, mas é capaz de diminuir a transmissão dopaminérgica no núcleo accubens (Piazza et al., 1996).

A anormal secreção de corticosterona é evidente em pacientes com depressão, esquizofrenia e Doença de Parkinson (DP) (Mizoguchi et al., 2004).

Apesar de não haver evidência da regulação direta de receptores dopaminérgicos no estriado pela corticosterona (Lammers et al., 1999), há evidências da interação entre o receptor de corticosteróide e neurônios dopaminérgicos nas regiões envolvidas na DP, analisado isto em estudos com camundongos transgênicos, que expressam menos receptores de corticosteróides. Esses mesmos camundongos mostraram um aumento da

concentração de dopamina nos receptores D1 e D2 no corpo estriado e uma diminuição do transporte de dopamina na substância negra (Cyr et al., 2001).

Assim, pelo fato dos receptores de corticosterona aumentarem sua expressão quando há lesão no SNC, podendo prevenir ou acelerar a neurodegeneração na região do hipocampo do rato adulto (Nichols et al., 2005) e por ser um modulador da plasticidade neuronal, a corticosterona pode estar envolvida em doenças neurodegenerativas de progressão lenta como a DP (Metz, 2007).

1.2 Doença de Parkinson

A DP foi descrita pela primeira vez por James Parkinson em 1817. É uma doença comum entre idosos, afetando 1 em cada 100 pessoas por volta dos 75 anos de idade e 1 em cada 1000 pessoas por volta dos 65 anos de idade (Morris, 2000).

A DP é caracterizada por uma lentidão de movimento, tremor de repouso, rigidez e instabilidade postural, sendo uma desordem progressiva do SNC causada pela degeneração dos neurônios dopaminérgicos na substância negra, causa essa ainda não conhecida, mas sabe-se que a neuroinflamação é um importante fator para que haja perda neuronal dopaminérgica (Gao et. al., 2003). Estes neurônios normalmente projetam-se ao corpo estriado, constituído pelos núcleos caudados e putâmen, cujos neurônios carregam os receptores da dopamina.

Esta projeção dos neurônios da substância negra para o corpo estriado é apenas um componente da complexa interconexões entre as estruturas profundas dos núcleos da base (núcleos caudado, putâmen, globo pálido, subtalâmico, accumbens, a substância negra e a área tegmental ventral) (Wilson, 1998; Martin, 1998; Young, 1999).

Os neurônios da porção compacta da substância negra fornecem a entrada dopaminérgica para o estriado. Estes neurônios dopaminérgicos modulam a saída inibitória monosináptica GABA-ergicas do globo pálido e da substância negra reticulada,

que se projetam por uma via inibitória GABA-ergica nos núcleos do ventrolateral e ventroanterior do tálamo. Estimulação e desinibição direta desta via nos núcleos talâmicos resultam em um aumento na sua saída excitatória do córtex motor. Uma outra via (indireta) polissináptica do corpo estriado reduz a saída talâmica do córtex motor. O envolvimento dos neurônios inibitórios estriatais GABA-ergicos, projetam-se para o globo pálido externo que, por sua vez, inibe o núcleo subtalâmico. Este núcleo tem conexões glutamatergicas excitatória com a substância negra reticulata e o globo pálido interno (Smith et.al., 1998; Delong, 2003).

A perda de células nigrais dopaminérgicas induz a uma diminuição de dopamina no corpo estriado. A dopamina ativa os receptores estriatais D1 excitatórios na via direta e inibe os receptores D2 inibitórios na via indireta. A diminuição da dopamina diminui a atividade da via direta e aumenta a atividade da via indireta, reduzindo desse modo à excitação talâmica do córtex motor (Fig. 1).

Muitas pesquisas estão sendo realizadas a fim de recuperar e evitar a perda de células dopaminérgicas que causam prejuízo nas atividades motoras dos pacientes portadores da DP.

Muitos estudos estão focados em analisar a influência do hormônio corticosterona nos receptores dopaminérgicos, na síntese e transporte da dopamina, mas somente poucos grupos conseguiram analisar a influência da sinalização dopaminérgica por ativação ou atividade da corticosterona (Mizoguchi et al., 2004; De Kloet et al., 2005).

No sistema mesolímbico, observou-se que os glicocorticóides são capazes de aumentar o efeito da sinalização de agonistas dopaminérgicos, desse modo ajudando no direcionamento do comportamento (Marinelli e Piazza, 2002).

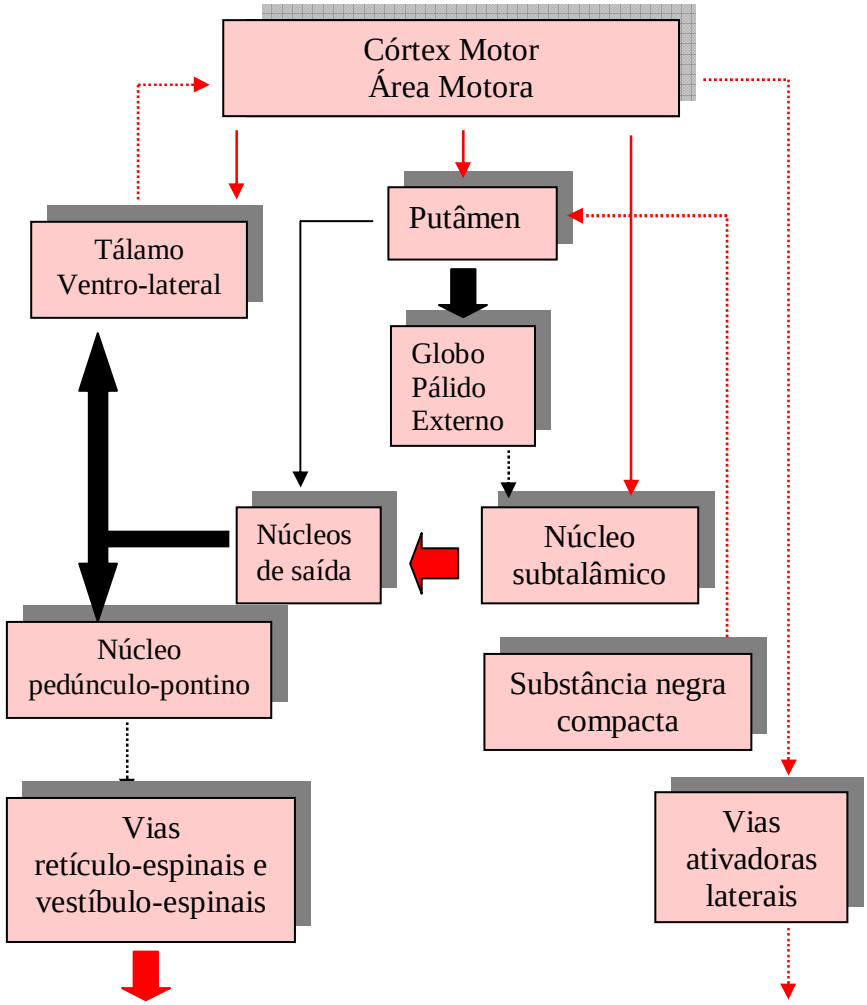


Figura 1: Representação esquemática da circuitaria dos núcleos da base na doença de Parkinson. As setas vermelhas indicam as conexões excitatórias. As setas pretas indicam que a conexão é inibitória. As setas grossas indicam atividade neural aumentada e as setas tracejadas indicam atividade neural diminuída. A diminuição da aferência dopaminérgica da substância negra para o corpo estriado leva a um aumento da atividade, na via indireta, e uma diminuição da atividade da via direta, assim inibindo o tálamo e diminuindo a saída das áreas motoras do córtex motor (adaptação Smith et al., 1998)

Ainda não se sabe da influência da ligação entre o sistema dopaminérgico e corticosteróide na DP, mas quando esses sistemas são afetados, observa-se uma reversão de um dos sintomas da DP como um aumento dos níveis de dopamina resultando em uma melhora na memória de trabalho (Lange et al., 1992, Lange et. al., 1995).

Então, é importante analisar a influência hormonal na neurodegeneração e neuroproteção nos neurônios dos núcleos da base, com interesse em particular na patofisiologia da DP.

1.3 Moléculas da matriz extracelular - Proteoglicanos

A falência na regeneração do SNC é devida muito mais a fatores extrínsecos de neurônios no presente meio, do que a fatores intrínsecos que impedem estas células lesadas de regenerarem suas fibras (Gates et al., 1995; Matsui e Oohira, 2004).

Frente a lesões no SNC, como na DP, ocorre a formação de uma cicatriz glial, a qual consiste na proliferação e migração das células gliais, principalmente da reação astrocitária, da microglia e do percursor de olingodendrócito que auto-regula as moléculas da matriz extracelular, que tem como papel principal inibir o crescimento axonal (Grimpe e Silver, 2002; Carulli et al., 2005).

Dentre as principais moléculas da matriz extracelular, destacam-se os proteoglicanos (PG) que são glicoproteínas. Dentro desse grupo de proteoglicanos destacam-se os hialectanos ou lecticanos. Os hialectanos caracterizam-se por possuírem dois componentes, sendo esses, a proteína eixo e a fração glucidína, a qual é formada pelos glicosaminoglicanos. Os glicosaminoglicanos são formados pela polimerização de dímeros de açúcares simples, sendo os glicosaminoglicanos dos hialectanos o tipo sulfato de condroitina, por essa razão existe a denominação proteoglicano sulfato de condroitina o qual une-se ao ácido hialurónico e outras molécula da matriz extracelular para formarem uma rede tridimensional de natureza protéica, a qual cumpre a função de homeostase do tecido nervoso (Rhodes e Fawcett, 2004).

Eles são encontrados na superfície de células, sendo os principais componentes da matriz extracelular no SNC de mamíferos (Esko, 1991; Bovolenta e Fernaud-Espinosa, 2000; Carulli et al., 2005).

Os proteoglicanos são geralmente classificados conforme a natureza molecular da cadeia de glicosaminoglicano ligada ao seu núcleo protéico, como proteoglicano sulfato de heparan (PGHS), proteoglicano sulfato de condroitina (PGCS), proteoglicano sulfato de dermatan (PGDS) e proteoglicano sulfato de keratan (PGKS).

O PGCS é um dos principais tipos de proteoglicano, sendo o mais abundante tipo em expressão no SNC dos mamíferos (Steindler et al., 1990; Carulli et al., 2005). Entre os principais PGCS encontram-se o agregan, versican, neurocan, neuroglycan D, fosfacan e NG2. No sistema nervoso a condroitina atua principalmente como uma barreira molecular afetando o crescimento axonal, a migração celular e a plasticidade, através da cadeia linear de glicosaminoglicano (Carulli et al., 2005).

Outro componente da matriz extracelular é a laminina, a qual está associada a vasos no SNC (Miner, 2008) e durante o desenvolvimento do SNC tem como função guiar o crescimento axonal sendo também determinante para a regeneração atuando no crescimento axonal (Liesi, 1985).

Estudos têm sugerido que o sulfato de condroitina tanto inibe como favorece os substratos favoráveis para o crescimento de neurônios in vivo e in vitro (Faissner et al. 1995).

Se por um lado, moléculas da matriz extracelular são importantes por orientar o crescimento de fibras durante a denervação do SNC, muitas delas agem impossibilitando o crescimento das fibras lesadas nas fases pós-natais (Jones et al., 2003; Rhodes e Fawcett, 2004).

A constatação de como respostas endócrinas e inflamatórias regulam o desenvolvimento, a diferenciação e a sobrevida dos neurônios nos períodos pré e pós natais bem como senil é importante para as pesquisas relacionadas à contenção dos mecanismos de morte celular nas doenças neurodegenerativas, em especial na DP (Nichols et al., 2005).

1.4 Relação entre o hormônio corticosterona e Lesão no SNC

Frente a um quadro de lesão no SNC, observa-se uma reatividade aumentada de astrócitos e microglia. Estas células são fontes de fatores neurotróficos e citocinas que regulam o processo de fechamento das barreiras encefálicas, reparo e cicatrização dos eventos neuroprotetivos, degenerativos e regenerativos neuronais após lesões do SNC (Nguyen et al., 2002).

Estudos recentes sugerem que a ADX induz a apoptose neuronal, contribuindo desse modo para melhor interpretação dos mecanismos de morte neuronal, neuroproteção e a função da atividade glial reacionária (Masters et al., 1996; Nichols et al., 2005)

O tratamento com corticosterona pode prevenir a apoptose, e diminuir a ativação astrocitária e a proliferação e ou reação da microglia (Nichols et al., 2005). Entretanto, alguns autores mostraram o efeito contrário a este em regiões específicas do SNC, indicando que o mecanismo de ação da droga exogenamente administrada ainda é desconhecida.

Segundo O'Callaghan et. al. em 1989, a corticosterona inibiu a expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (marcador astrocitário) no SNC, em especial no hipocampo, e a administração de corticosteróide exógeno foi capaz de reverter a ADX, mas não a lesão causada pelo trimethyltin, aumentando assim a concentração de GFAP.

A habilidade dos glicocorticóides em poder modular a regulação das respostas gliais parece ser importante no processo de recuperação de insultos fisiológicos e restauro da função normal ou mesmo da progressão de doenças neurodegenerativas (Morale et al., 2004; Nadeau e Rivest, 2003; Nichols et al., 2001).

Por outro lado, alguns estudos já observaram que a expressão do fator básico de crescimento de fibroblastos nas células gliais (FGF-2) (do Carmo Cunha et al., 2007). A ADX reduz o aumento do RNAm do FGF-2 dos astrócitos da substância negra no lado

ipsilateral a lesão por 6-hidroxidopamina (6-OHDA), um modelo de parkinsonismo experimental que promove a lesão seletiva dos neurônios dopaminérgicos das projeções nigroestriatais (Chadi et al., 1998).

A administração de corticosteróides pode aumentar a imunorreatividade do FGF-2 principalmente na célula glial na substância negra de ratos (Chadi et al., 1993a).

Outro estudo mostrou que a ADX em ratos promoveu a diminuição da memória de trabalho nesses animais, efeito inferido pela diminuição da liberação de dopamina no córtex pré-frontal. Esta disfunção pôde ser revertida com a reposição hormonal de corticosterona, indicando assim a especificidade da relação (Claustre et al., 1986). Níveis alterados de glicocorticóides foram constatados em pacientes com depressão, esquizofrenia e DP por Mizoguchi et al. em 2004, mostrando que a correlação da modulação hormonal e disfunção neurológica também são constatadas na clínica.

Deste modo, esse trabalho busca entender o papel do hormônio corticosterona no processo de neurodegeneração, em especial na patofisiologia da DP, e se há uma influência desse hormônio na expressão das moléculas na matriz extracelular, as quais exercem um papel importante nesse mecanismo, já que são impeditivas do crescimento neuronal. Entender melhor esse processo é importante, para que assim novas estratégias para estudos possam ser utilizadas.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Analisar a influência da oblação dos hormônios adrenoesteróides, promovida pela adrenalectonia bilateral em ratos nos processos neurodegenerativos e de reparo e cicatrização do sistema nigroestriatal dopaminérgico submetido a injeção nigral de 6-OHDA.

2.2 Objetivos específicos

Através do método de Western blot, analisar o efeito da adrenalectomia bilateral nas áreas de projeções nigroestriatais dopaminérgicas (porção ventral do mesencéfalo e corpo estriado) após injeção unilateral de 6-OHDA nigral:

1. Nível da enzima tirosina hidroxilase (TH), conversora da dopamina.
2. Nível da GFAP.
3. Nível das moléculas da matriz extracelular, fosfacan, neurocan, sulfato de condroitina e NG2
4. Nível da proteína laminina
5. Nível da proteína FGF-2 no mesencéfalo ventral.
6. Avaliação do desaparecimento de neurônios dopaminérgicos na substância negra por método imunohistoquímico.

MATERIAS E MÉTODO

3. Materiais e Método

3.1 Adrenalectomia bilateral

Foram utilizados para esse experimento 72 ratos machos da linhagem Wistar, pesando entre 180 e 220 gramas, obtidos do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP). Os animais foram mantidos em condições constantes de temperatura e umidade, com ciclo claro e escuro de 12 horas (dia às 7 horas e noite às 19 horas) e com livre acesso a ração e água. Permaneceram nessas condições durante 6 dias antes do início do experimento para adaptação ao novo meio ambiente. A pesagem dos animais foi realizada 24 horas antes da cirurgia, para diminuir o estresse pré-operatório. Os animais foram operados no período matutino seguindo sempre os mesmos critérios.

Os animais que foram submetidos à adrenalectomia bilateral e a cirurgia simulada para adrenalectomia, foram anestesiados com uma mistura de ketamina (62,5 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) via intraperitonial. Após serem anestesiados, os animais foram tricotomizados na região lombar. A pele da região lombar foi incisada, resultando em uma abertura longitudinal de aproximadamente 2 centímetros na musculatura lombar. A glândula suprarenal encontra-se inserida na gordura perirenal, próxima ao pólo superior do rim. Durante a retirada das glândulas, houve um cuidado especial para evitar a ruptura das mesmas, assim como das vísceras abdominais. Finalmente, promoveu-se o fechamento dos planos incisados utilizando fios de algodão.

Os animais que foram submetidos à cirurgia simulada para adrenalectomia (SHAM), seguiram os mesmos critérios de procedimento realizado para os animais submetidos à adrenalectomia, com exceção a retirada das glândulas adrenais.

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram colocados em caixas com maravalha em decúbito ventral. Suas línguas foram lateralizadas para fora da boca na intenção de impedir a obstrução das vias respiratórias. As caixas sofreram uma elevação

na porção cranial do corpo dos animais em relação à porção caudal. Os animais foram aquecidos, por meio de uma resistência elétrica colocada a meio metro de distância das caixas sendo sua temperatura cuidadosamente observada no intuito de prevenir hipotermia.

Após o termino do efeito do anestésico, os animais foram estimulados à deambulação pela caixa e a ingestão imediata de água para os animais que sofreram cirurgia simulada e a ingestão de salina (0,9%) com água filtrada para aqueles animais que tiveram suas glândulas adrenais retiradas. Os animais foram observados durante as 6 primeiras horas do período pós-operatório e cuidadosamente acondicionados em local apropriado no interior do biotério de experimentação.

3.2 Lesões do sistema nigro-estriatal dopaminérgico

As injeções nigrais foram realizadas com a utilização de um aparelho estereotáxico (David Kopf, EUA) acoplado a um micromanipulador (David Kopf) que é fixado ao aparelho, fornecendo assim o suporte para a agulha utilizada na injeção da neurotoxina dopaminérgica. Para a infusão rigorosamente controlada, foi utilizada uma bomba de injeção (Orion, EUA) e uma seringa de 50µl (Hamilton, EUA) acoplada a um sistema de tubos conectados a uma agulha.

Após 2 dias da cirurgia para a adrenalactomia bilateral, os mesmos ratos Wistar, foram anestesiados novamente por via intraperitonial com uma mistura de ketamina (62,5 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Após a tricotomia da região dorsal da cabeça, os animais foram posicionados no aparelho estereotáxico e tiveram a pele da cabeça rebatida e as suturas cranianas expostas. Após a determinação do bregma, o braço do aparelho estereotáxico foi posicionado nas coordenadas (Paxinos e Watson, 1986) determinadas (-4,8mm CC; +1,4mm LL em relação ao bregma e -7,6mm AP em relação à dura-mater). Neste ponto foi feita uma perfuração com uma broca específica, com o cuidado de não

ferir a dura-máter. Então, a agulha foi deslocada para baixo, até que atinja o ponto determinado pelas coordenadas e mantida nesta posição para a infusão da neurotoxina. A dose de 6-OHDA a ser utilizada neste estudo foi de 8µg/4µl (6-OHDA/solvente). O solvente utilizado na dose foi de 0,2mg/ml (ácido ascórbico /salina) (Rodrigues et al., 2001).

Durante o procedimento cirúrgico, a 6-OHDA preparada foi resfriada a 4ºC e protegida da luz. Após 15 minutos de injeção, a bomba de infusão foi mantida ligada para evitar o refluxo da droga e a agulha foi lentamente removida do interior do cérebro. A pele dos animais foi suturada e os mesmos foram liberados e realizados os procedimentos pós-operatórios como descritos na cirurgia de adrenalectomia.

3.3 Reposição Hormonal

Após os procedimentos cirúrgicos de adrenalectomia, a reposição hormonal foi iniciada (Chadi et al., 1993). Os animais receberam doses diárias de corticosterona ou veículo de diluição da corticosterona no período da tarde entre as 15 e 16 horas, por via intraperitonial, visando mimetizar o pico endógeno hormonal vespertino que ocorre normalmente nestes animais. A corticosterona foi diluída (10mg/Kg de peso, Sigma Chemical Co., EUA) em uma solução veículo composta por água bi-destilada contendo carboximetilcelulose sódica (0,25%, Sigma) e polioxietileno sorbital mono-oleato (Tween 80, 0,2%, Sigma). A diluição da droga foi realizada de modo que cada animal receba 1ml de solução por 100g de peso por injeção. A primeira dose de injeção contendo hormônio corticosterona ou veículo foi no dia do ato cirúrgico. Todos os animais receberam novas injeções, nas mesmas dosagens diariamente até o dia do sacrifício.

3.4 Grupos Experimentais

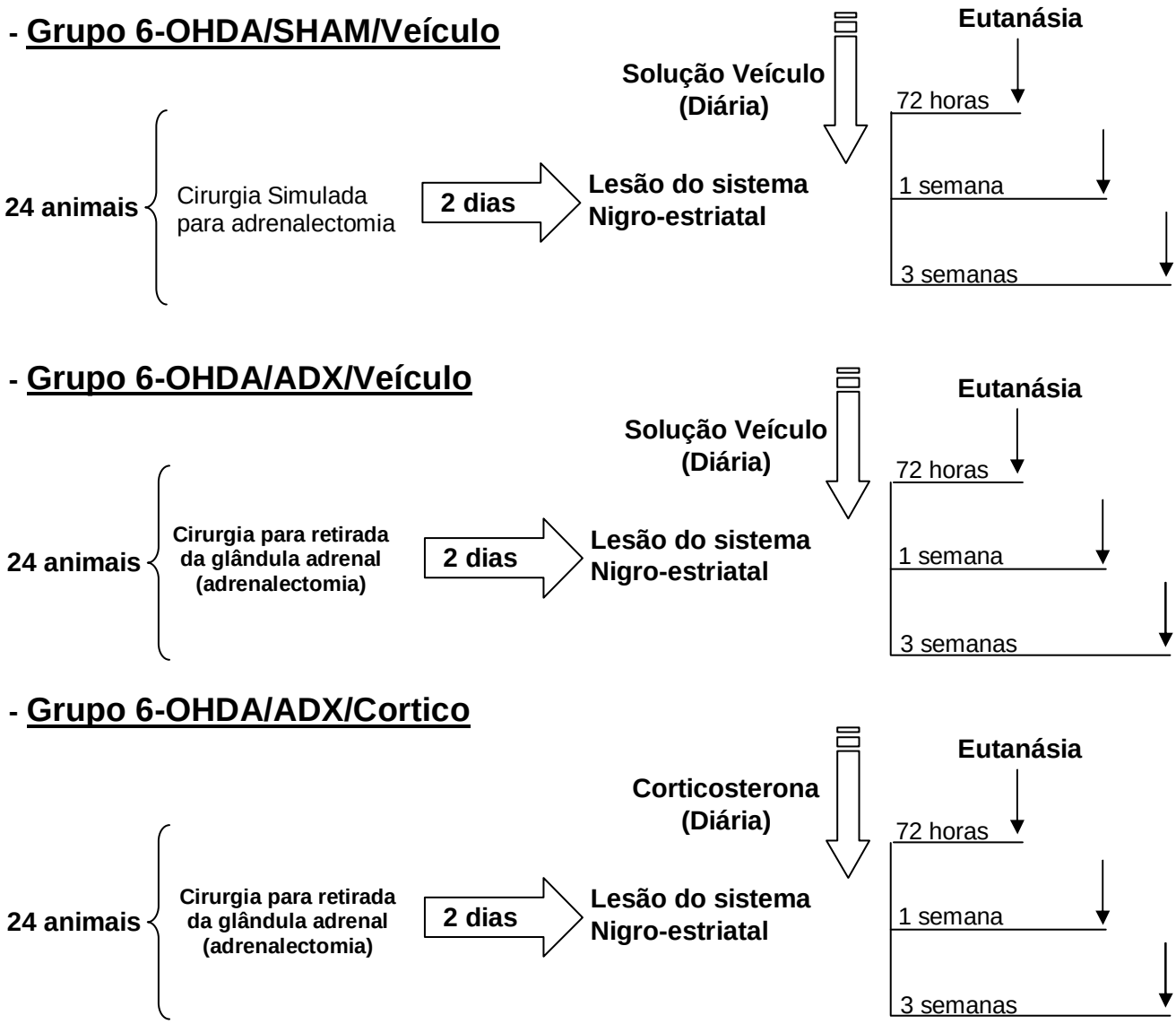


Figura 2: Esquema dos grupos experimentais. O experimento foi realizado com 72 animais, os quais foram divididos aleatoriamente em três grupos, assim compondo 24 animais por grupo. Os grupos experimentais foram: **6-OHDA/SHAM/Veículo**, animais submetidos à cirurgia simulada de adrenalectomia, dois dias após foram submetido à lesão pela 6-OHDA e receberam administração de solução veículo via intraperitonial diariamente até o dia do sacrifício; **ADX/6-OHDA/Veículo**, animais submetidos à adrenalectomia, dois dias após foram submetido lesão pela 6-OHDA e receberam administração de solução veículo via intraperitonial diariamente até o dia do sacrifício; **ADX/6-OHDA/Cortico**, animais foram submetidos à adrenalectomia, dois dias após foram submetido lesão pela 6-OHDA e receberam administração de corticosterona via intraperitonial diariamente até o dia do sacrifício. O sacrifício dos animais em 72 horas, 1 semana e 3 semanas ocorreu de maneira randomizada após a lesão dopaminérgica.

3.5 Eutanásia

Os animais sofreram eutanásia por decapitação nos procedimentos acima descritos. Os encéfalos dos animais foram retirados e as áreas de interesse para o estudo foram cuidadosamente dissecadas bilateralmente, as quais foram: mesencéfalo ventral contendo a substância negra, corpo estriado, hipocampo e córtex frontal. Após a retirada as áreas de estudo foram colocadas em eppendorfs devidamente identificados e congelados em gelo seco e armazenados na temperatura de -70 ºC. O lado contralateral a lesão foi utilizado como controle.

3.6 Extração de Proteínas e Western Blotting

As áreas descritas acima, retiradas de cada animal foi homogeneizada em solução tampão para extração da proteína total. Primeiramente, as áreas foram lisadas e homogeneizadas, com auxílio de pipetagem vigorosa, utilizando-se 250µL de tampão de lise constituído de NP40 (1%), deoxicolato de sódio (0,5%), SDS (1%), EDTA (1mmol/L), EGTA (1mmol/L) e coquetel inibidor de proteases (Sigma, 1%) em PBS (Ph 7,4). Após a extração protéica, os tubos foram centrifugados a 14000rpm durante 20 minutos a 4ºC, e a quantidade de proteína foi determinada usando o método de Bradford (Bradford, 1976).

As amostras foram diluídas em tampão de lise a fim de se obter quantidade de 60µg em 12,5µL, que foram desnaturadas à 100ºC durante 3 minutos e aplicadas às canaletas do gel de poliacrilamida a 6% ou 12% para fracionamento. Em um dos pocinhos foram aplicados 5µL de marcador de peso molecular (Kaleidoscope, pré-corado, Bio-Rad, EUA). O tampão de corrida foi preparado com trisma (25mmol/L), glicina (0,2mol/L) e SDS (0,1%), as proteínas foram separadas através de aplicação de 100 volts durante 1 hora e 40 minutos.

Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) utilizando tampão de transferência gelado contendo trisma (25mmol/L), glicina (0,2mol/L) e metanol (10%) durante 1 hora a 100V.

A membrana foi então incubada com solução de bloqueio dos sítios não ocupados durante 15 minutos à temperatura ambiente. A solução de bloqueio foi constituído a base de leite (10%) em TBS-T (tampão trisma-salina com tween 20 a 0,05%). Após este bloqueio, as membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos primários: TH (60kDa) e Alfa Tubulina(50kDa) fazendo uma dupla marcação; GFAP (53kDa); Fosfacan (300kDa e 175kDa), Neurocan (130kDa), Sulfato de Condroitina (250kDa) os quais foram previamente tratados com a enzima da chondroitinase por 30 minutos a 37ºC e NG2 (300kDa); Laminina (67kDa); FGF-2 (23kDa) diluídos todos em leite (3%) em TBS-T, durante 24 horas à 4ºC sob agitação constante. O anticorpo secundário foi conjugado a uma peroxidase (HRP-conjugado), a incubação da membrana com este anticorpo foi feita em temperatura ambiente durante1 hora.

Após a incubação com os anticorpos secundários, as membranas foram lavadas por duas vezes com TBS-T e uma vez com TBS durante 10 minutos cada. A reação aconteceu através de incubação com reagente quimioluminescente (Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus, ECL kit, Perkinelmer, EUA) durante exatamente 1 minuto. As membranas foram expostas a filme sensível a quimioluminescência (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences) durante o período de 30 segundos a 5 minutos, dependendo do anticorpo e revelados conforme instruções do fabricante.

3.7 Imunohistoquímica da Tirosina Hidroxilase (TH)

Um grupo de animais lesados e que recebeu a cirurgia simulada da ADX e injeções Sistêmicas de solução veículo foram sacrificados 1 semana após a cirurgia e o tecido processado para imunohistoquímica. Os animais foram perfundidos com paraformoldeído

como descrito anteriormente (Chadi e Gomide, 2004).

Foi realizada a marcação do anticorpo monoclonal anti-tirosina hidroxilase (TH) feito em camundongos por imunohistoquímica para avaliar qualitativamente a quantidade de neurônios dopaminérgicos imunomarcados, comparando o lado ipsilateral a lesão de 1 semana com o lado contralateral. As secções obtidas foram incubadas por 24 horas em câmaras umidificadas a 4℃ com o anticorpo TH (1:12 00)

O método imunohistoquímico foi descrito com detalhes por Chadi et al., 1993b; Chadi et al., 1994. O sistema de imunoperoxidase indireta empregando a avidina-biotina (ABC) (Hsu et al., 1981; Vectastain, EUA) foi usado com 3-3'-diaminobenzina tetrahidroclorido (DAB, Sigma, EUA) como cromógeno. Depois de lavadas em tampão fosfato, as secções foram incubadas com imunoglobulinas biotinilidas (vector, EUA, diluído 1:200) por uma hora. Essas imunoglobulinas são obtidas de ovelha ou cavalo e produzidas contra anticorpos de animais, cujo anticorpos primários serão retirados. Os anticorpos foram diluídos em tampão fosfato contendo 0,5% Triton X-100. Numa terceira incubação, a avidina e uma peroxidase biotinilida foram introduzidas (Vectastain, Vector, EUA; ambas diluídas 1:100) durante 45 minutos. A reação foi completada com 0,03% de DAB (Sigma) como cromógeno e H_2O_2 (Sigma) durante 10 minutos. Os procedimentos imunohistoquímico foram uniformizados, assim, foi considerado o ponto de saturação de DAB, a diluição do anticorpo primário longe da saturação e um tempo de incubação ajustado de tal modo, que os elementos mais escuros das secções medulares estivessem inferior a saturação (Zoli et al., 1990).

3.8 Análise Estatística

Os dados quantitativos do Western blot foram analisados e comparados estatisticamente através do teste t de Student pareado para comparações entre as regiões ipsilateral e contralateral à lesão no mesmo grupo, teste ANOVA de duas vias com o objetivo de analisar a interação entre tempo de lesão e tratamento aplicado e pelo

teste ANOVA de uma via de comparações múltiplas, com significância de 95%, com o objetivo de avaliar a evolução temporal em cada grupo estudado. Níveis de significância menores que 5% foram considerados.

.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1 Análise dos níveis da proteína pelo Western Blot

4.1.1 Níveis da proteína TH no Mesencéfalo Ventral

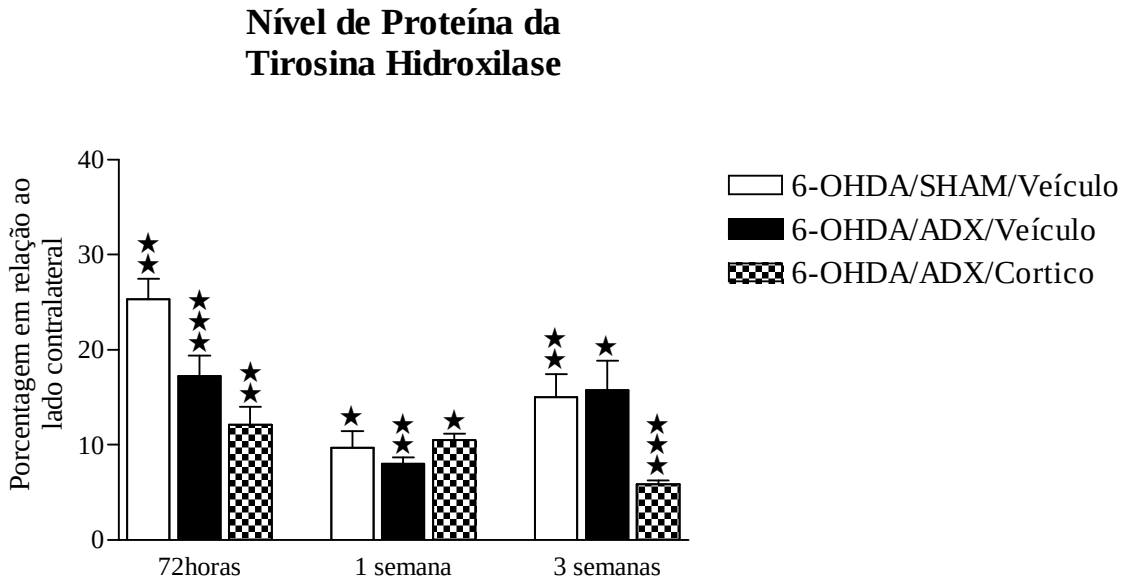
A figura 3A mostra reduções das porcentagens dos níveis de TH no lado ipsilateral do mesencéfalo ventral dos grupos 6-OHDA/SHAM/Veículo, 6-OHDA/ADX/Veículo e 6-OHDA/ADX/Cortico em relação ao lado contralateral respectivamente, 25,31%, 17,25% e 12,12% em 72 horas; 9,68%, 8,02% e 10,47% em 1 semana; 15,03%, 15,71% e 5,83% em 3 semanas.

O teste ANOVA de uma via de medidas repetidas mostrou diferença da evolução temporal nos grupos 6-OHDA/SHAM/Veículo ($p=0,0002$; $F=22,81$); 6-OHDA/ADX/Veículo ($p=0,0272$; $F=5,853$); 6-OHDA/ADX/Cortico ($p=0,0304$; $F=5,054$), na região ipsilateral em relação ao período de 72horas (Fig. 5A, B e C). Ainda, o resultado do pós teste de Tukey's das comparações entre os grupos estão apresentados na figura 5.

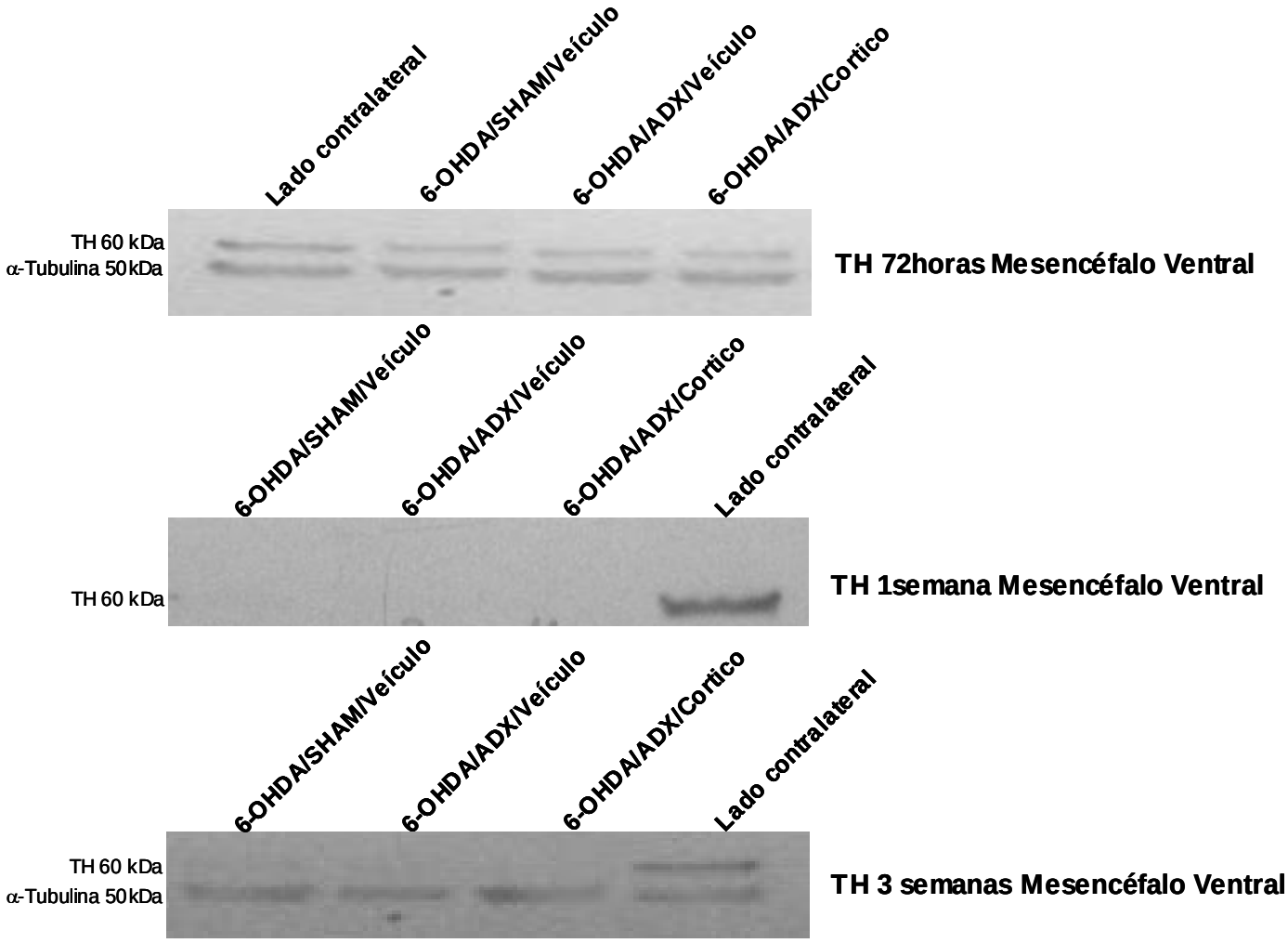
Os resultados dos níveis de TH nos grupos experimentais ipsilateral e nos períodos estudados são apresentados na figura 4. Os resultados do teste ANOVA de duas vias que avaliou o efeito do tempo, do tratamento e da interação tratamento x tempo são apresentados na tabela 1. Maior número de diferenças foi observado entre os grupos 6-OHDA/ADX/Cortico x 6-OHDA/SHAM/Veículo e 6-OHDA/ADX/Cortico x 6-OHDA/ADX/Veículo. Diferenças entre os grupos 6-OHDA/ADX/Veículo e 6-OHDA/SHAM/Veículo foi observada apenas no tempo.

Figura 3: A figura mostra através da análise por densidade óptica relativa do nível da proteína Tirosina Hidroxilase (TH) para avaliar o efeito da injeção nigral da 6-OHDA na região do mesencéfalo ventral (A e ilustrado na B). Observa-se na figura **A** os grupos estudados comparando-se o lado ipsilateral com o lado contralateral a lesão em valores de porcentagem, onde o lado contralateral corresponde a 100% e os valores do lado ipsilateral estão demonstrados nessa figura. ★★★ $p<0,001$; ★★ $p<0,01$; ★ $p<0,05$, representam diferenças segundo o teste t pareado. Na figura **B** está ilustrado o nível da proteína TH como base de comparação o lado contralateral e da proteína estrutural α-tubulina nos períodos de 72 horas e 3 semanas (normatização).

A


Nível de Proteína da
Tirosina Hidroxilase
Porcentagem em relação ao
lado contralateral
40
30
20
10
0
72horas
1 semana
3 semanas
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico

B


Lado contralateral
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
TH 60 kDa
α-Tubulina 50kDa
TH 72horas Mesencéfalo Ventral
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
Lado contralateral
TH 60 kDa
TH 1semana Mesencéfalo Ventral
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
Lado contralateral
TH 60 kDa
α-Tubulina 50kDa
TH 3 semanas Mesencéfalo Ventral

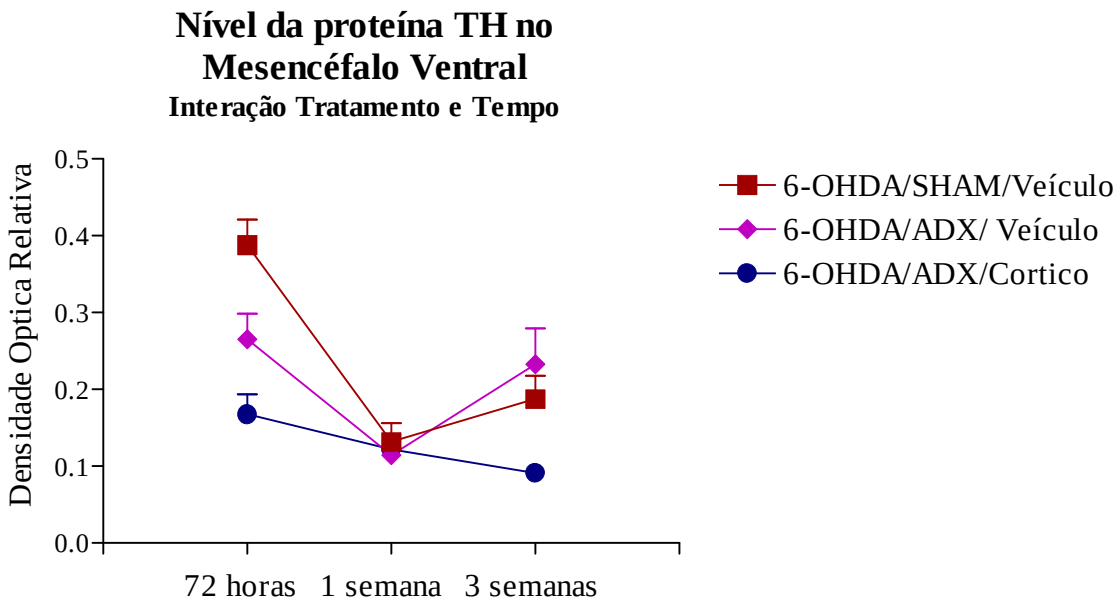


Figura 4: A figura mostra a evolução temporal dos grupos na região ipsilateral no mesencéfalo ventral com relação ao nível da proteína TH, que foi quantificada através de densidade óptica relativa. Observa-se diferença estatisticamente significante entre os grupos com relação ao tempo, tratamento e a interação desses como mostra a tabela 1 abaixo.

Tabela 1. Análise realizada pelo teste ANOVA de duas vias para verificar interação entre os grupos mediante o tratamento realizado e o tempo de lesão. ★★★ p<0,001; ★★ p<0,01; ★ p<0,05; —— sem significância estatística, representado através do pós teste de bonferroni.

Grupos	**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Veículo**	**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**	**6-OHDA/ADX/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**
Tempo	**p=0,0001; F=23,32**	**p=0,0001; F=25,11**	**p=0,0015; F=8,239**
Tratamento	**p=0,2116; F=1,63**	**p=0,0001; F=31,83**	**p=0,0006; F=14,65**
Interação	**p=0,0330; F=3,846**	**p=0,0005; F= 10,05**	**p=0,0153; F= 4,841**
	72 hs 1 semana 3 semanas	**72 hs 1 semana 3 semanas**	**72 hs 1 semana 3 semanas**
	★ —— ——	★★★ —— ★	★ —— ★★

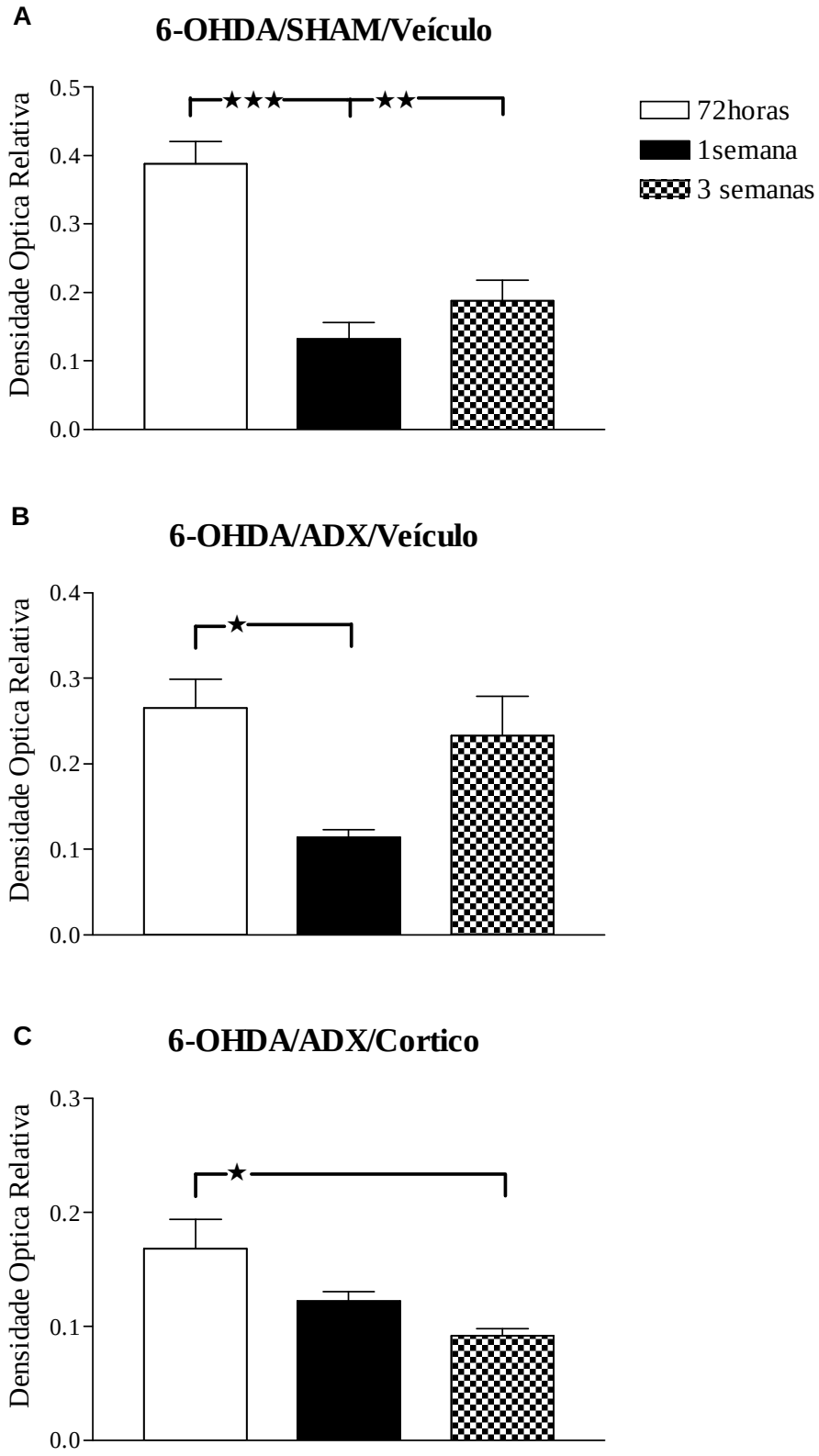


Figura 5: A figura mostra a expressão da proteína TH, no mesencéfalo ventral através da análise do teste ANOVA de medidas repetidas aplicando o pós-test de Tukey's. Observa-se uma diferença estatisticamente significante nos 3 grupos analisados.

★★★ p<0,001; ★★ p< 0,01; ★ p<0,05.

4.1.2 Níveis da proteína TH no Corpo Estriado

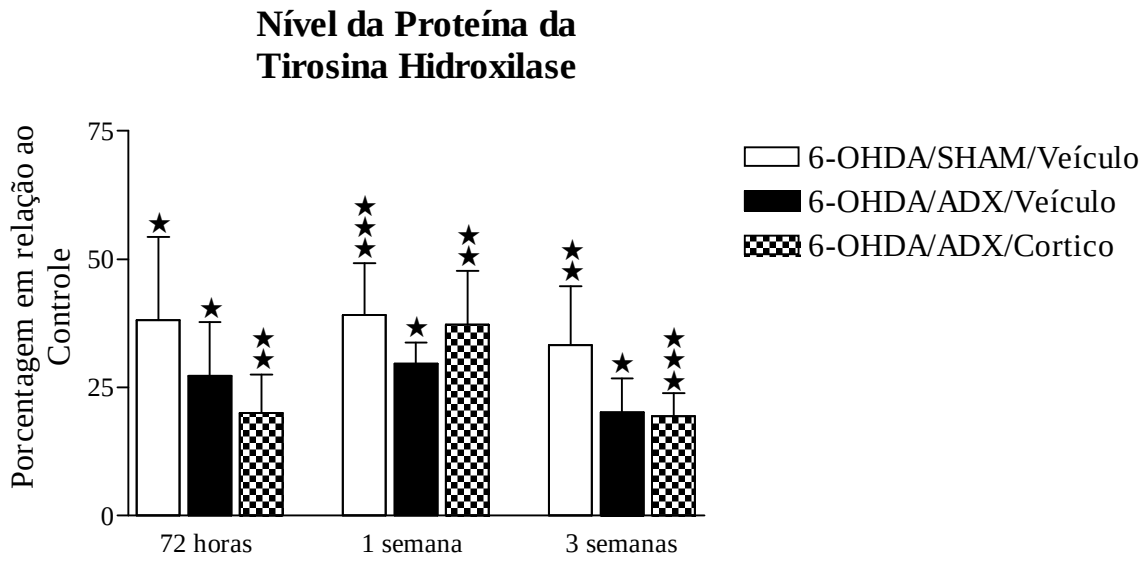
A figura 6A mostra a diminuição dos níveis de TH no lado ipsilateral à lesão do corpo estriado já em 72horas quando comparado com o lado contralateral à lesão nos grupos 6-OHDA/SHAM/Veículo (38,12%), 6-OHDA/ADX/Veículo (27,29%) e 6-OHDA/ADX/Cortico (20,05%), baseado na estatística do teste t pareado mantendo essa diminuição em 1 semana 39,11%, 29,62% e 37,22% e 3 semanas 33,26%, 20,07% e 19,34% respectivamente, não havendo diferenças entre os grupos ao longo do tempo.

A análise entre os grupos, na região ipsilateral, em cada um dos períodos (72horas, 1 semana e 3 semanas) não foi estatisticamente diferente, desse modo não foi observada interação entre o tratamento e o tempo de lesão ($p>0,05$) (Fig. 7).

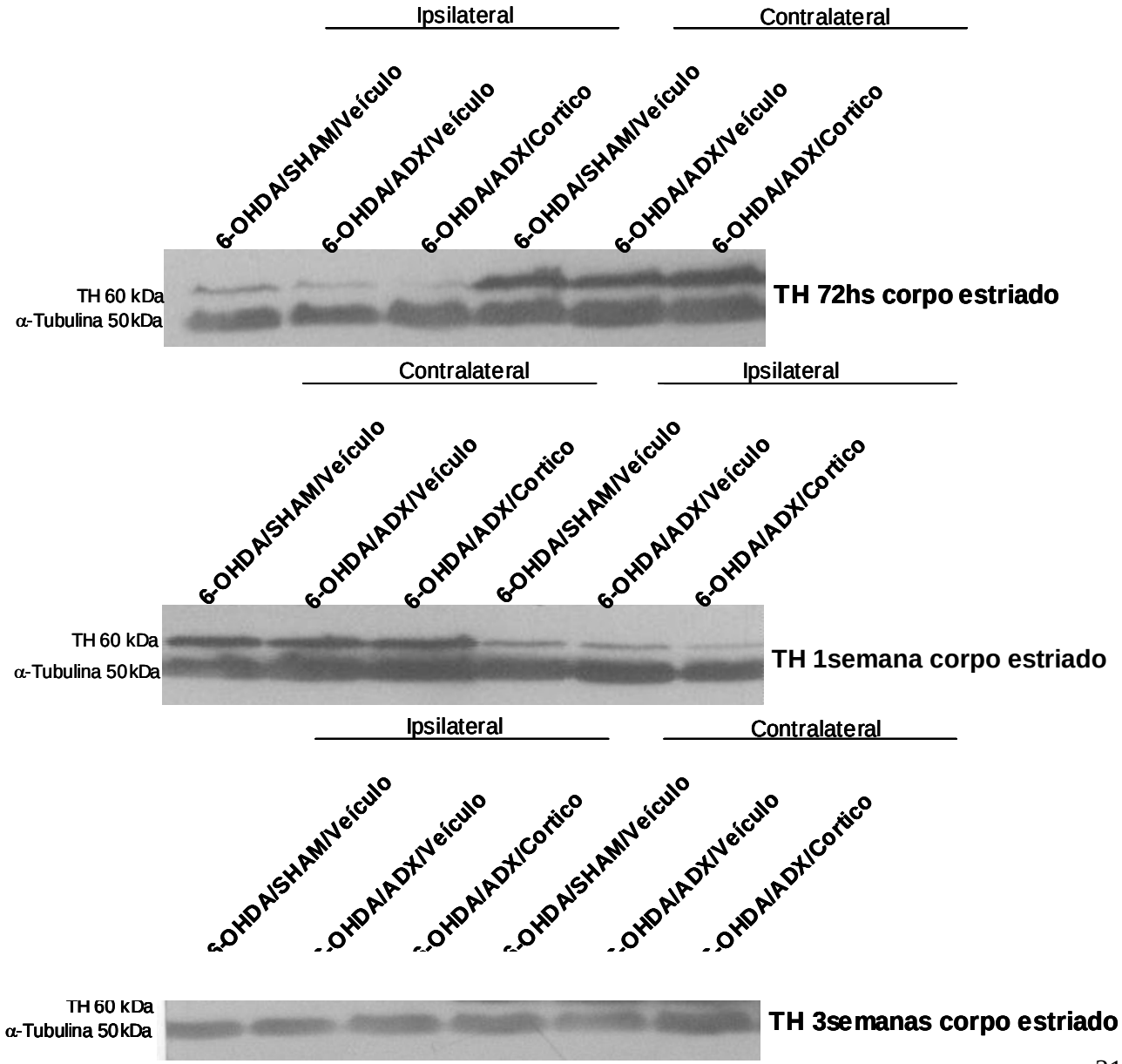
O teste ANOVA de uma via de medidas repetidas não mostrou diferença da evolução temporal nos grupos 6-OHDA/SHAM/Veículo ($p=0,5814$; $F=0,5808$); 6-OHDA/ADX/Veículo ($p=0,3223$; $F=1,376$); 6-OHDA/ADX/Cortico ($p=0,3024$; $F=1,469$). (Fig. 8A, B e C).

Figura 6: A figura mostra através da análise por densidade óptica relativa do nível da proteína Tirosina Hidroxilase (TH) para avaliar o efeito da injeção nigral da 6-OHDA na região do corpo estriado (A e ilustrado na B). Observa-se na figura **A** os grupos estudados comparando-se o lado ipsilateral com o lado contralateral a lesão em valores de porcentagem, onde o lado contralateral corresponde a 100% e os valores do lado ipsilateral estão demonstrados nessa figura. ★★★ $p<0,001$; ★★ $p<0,01$; ★ $p<0,05$, representam diferenças segundo o teste t pareado. Na figura **B** está ilustrado o nível da proteína TH como base de comparação o lado contralateral e da proteína estrutural α-tubulina (normatização).

A


Nível da Proteína da Tirosina Hidroxilase
Porcentagem em relação ao Controle
75
50
25
0
72 horas
1 semana
3 semanas
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico

B


Ipsilateral
Contralateral
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
TH 60 kDa
α-Tubulina 50kDa
TH 72hs corpo estriado
Contralateral
Ipsilateral
TH 1semana corpo estriado
TH 3semanas corpo estriado

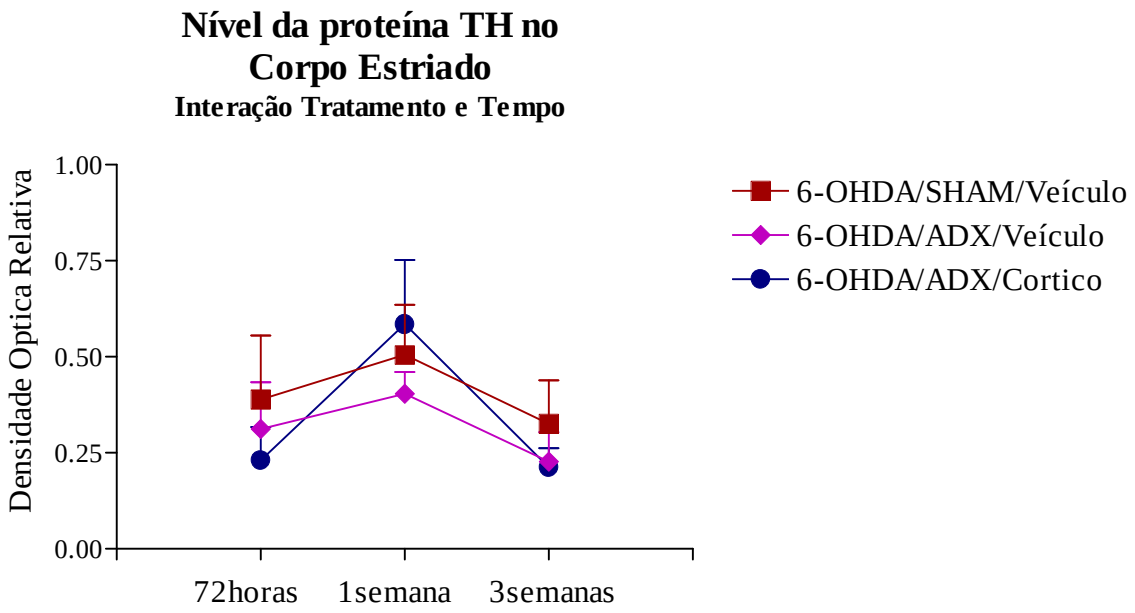


Figura 7: A figura mostra a evolução temporal dos grupos na região ipsilateral com relação ao nível da proteína TH, que foi quantificado através de densidade óptica relativa. Não observamos diferenças entre os grupos no tempo e no tratamento como mostra a tabela 2 abaixo.

Tabela 2. Análise realizada pelo teste ANOVA de duas vias para verificar interação entre os grupos mediante o tratamento realizado e o tempo de lesão. ── Não houve diferença estatisticamente significante, representado através do pós teste de bonferroni.

Grupos	**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Veículo**	**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**	**6-OHDA/ADX/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**
Tempo	**p=0,7027; F=0,3579**	**p=0,0770; F=2,796**	**p=0,1421; F=2,112**
Tratamento	**p=0,7317; F=0,1202**	**p=0,5406; F=0,3832**	**p=0,7957; F=0,06848**
Interação	**p=0,8194; F=0,2008**	**p=0,6088; F= 0,5046**	**p=0,3181; F= 1,199**
	72 hs 1 semana 3 semanas	**72 hs 1 semana 3 semanas**	**72 hs 1 semana 3 semanas**
	── ── ──	── ── ──	── ── ──

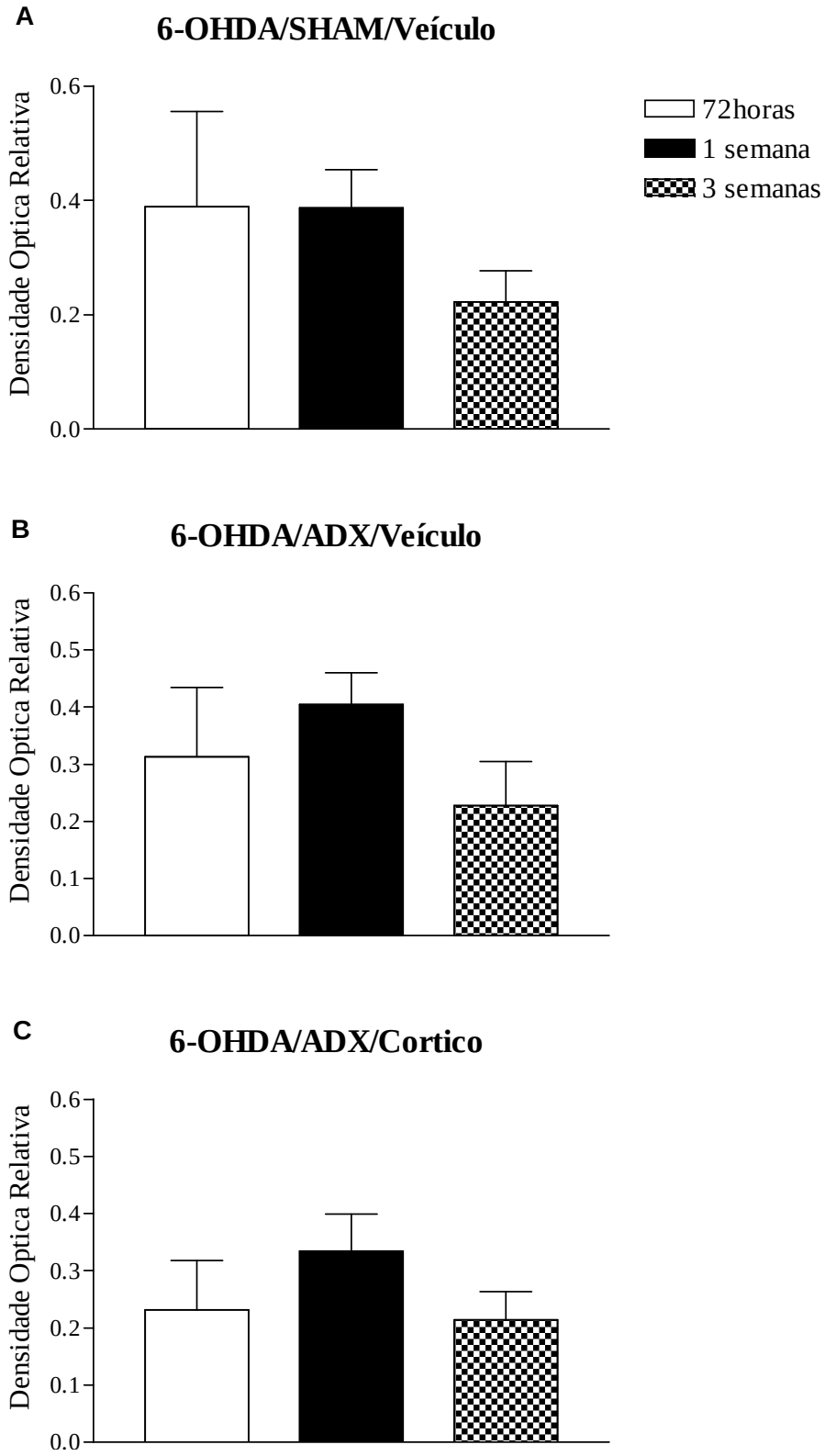


Figura 8: A figura mostra a expressão da proteína TH, no corpo estriado através da análise do teste ANOVA de medidas repetidas aplicando o pós-teste de Tukey's. Não observa-se uma diferença estatisticamente significante nos 3 grupos analisados.

4.1.3 Nível da GFAP no Mesencéfalo Ventral

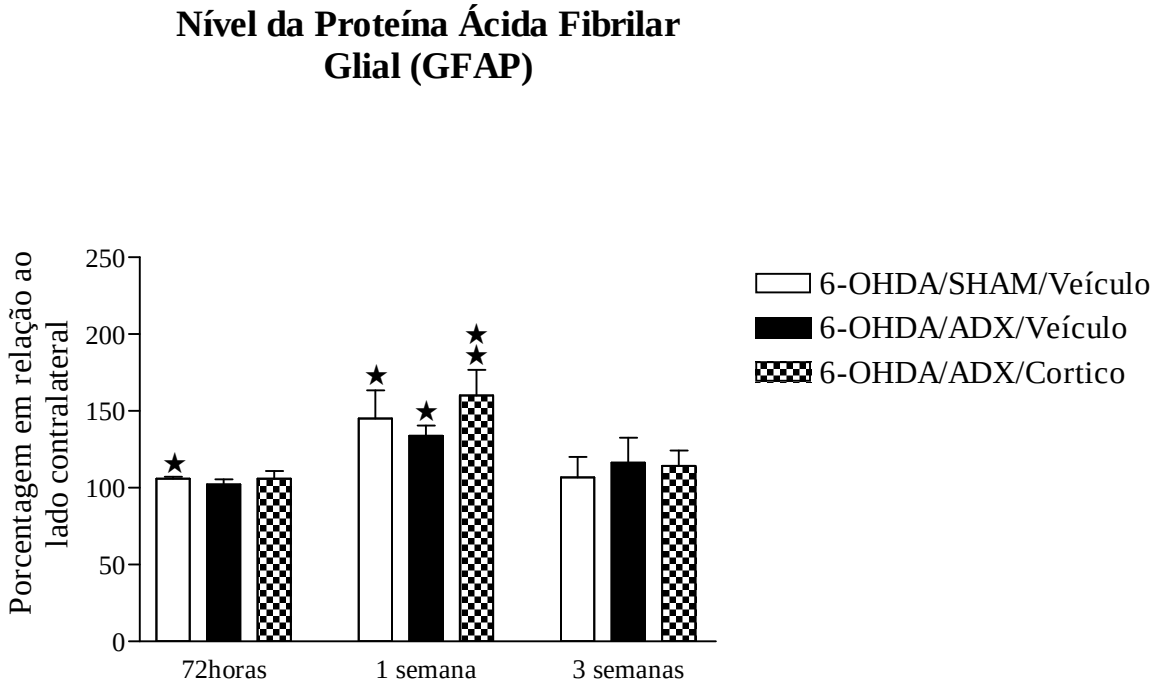
A figura 9A mostra o aumento dos níveis da GFAP no lado ipsilateral a lesão no mesencéfalo ventral. Observa-se que em 72 horas há uma diferença no grupo 6-OHDA/SHAM/Veículo (106%) o que não ocorre nos grupos 6-OHDA/ADX/Veículo (102,31%) e 6-OHDA/ADX/Cortico (105,91%) essas diferenças acentuam-se com 1 semana pós lesão 6-OHDA/SHAM/Veículo (145,11%),6-OHDA/ADX/Veículo (134,09%) e 6-OHDA/ADX/Cortico (160,37%). Já com 3 semanas de lesão não há diferença do lado ipsilateral com relação ao lado contralateral 6-OHDA/SHAM/Veículo (106,70%),6-OHDA/ADX/Veículo (116,28%) e 6-OHDA/ADX/Cortico (114,40%).

O resultado do teste ANOVA de duas vias avaliou o efeito do tempo, do tratamento e da interação tempo e tratamento e observa-se uma diferença com relação ao tempo de lesão: 6-OHDA/SHAM/Veículo x 6-OHDA/ADX/Veículo ($p<0,01$; $F=5,680$); 6-OHDA/SHAM/Veículo x 6-OHDA/ADX/Cortico ($p<0,01$; $F=6,324$); 6-OHDA/ADX/Veículo x 6-OHDA/ADX/Cortico ($p<0,001$; $F=9,712$) (Fig. 10 e Tabela 3).

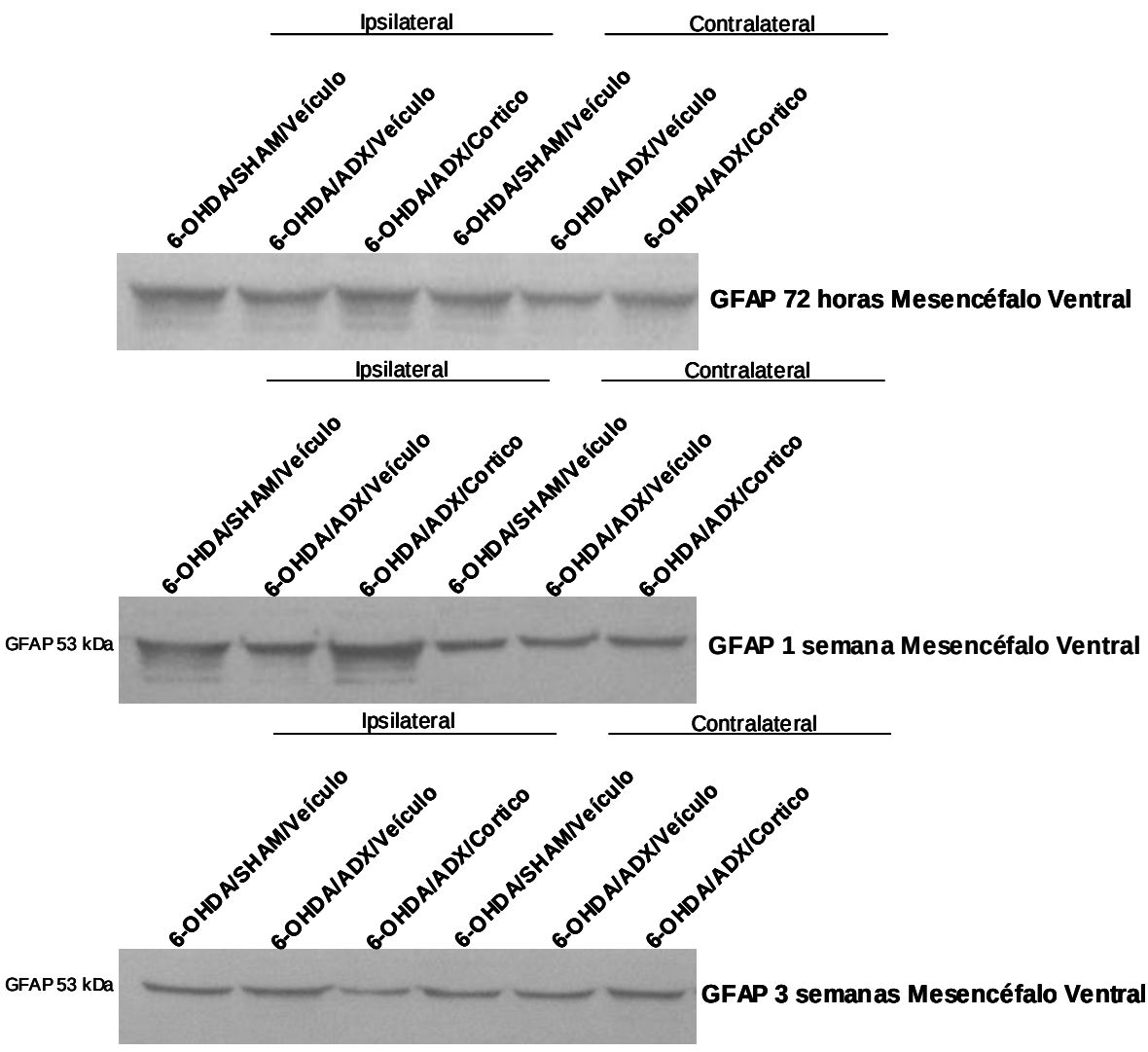
Através do teste ANOVA de medidas repetidas observa-se nos grupos com adrenalectomia um efeito temporal, com relação ao período de 72 horas, para um aumento de GFAP, 6-OHDA/ADX/Veículo ($p=0,0009$, $F=15,18$) e no grupo 6-OHDA/ADX/Cortico ($p=0,0088$; $F=7,886$). Já no grupo 6-OHDA/SHAM/Veículo ($p= 0,1980$; $F= 1,997$) não houve diferença temporal (Fig. 11A, B e C).

Figura 9: A figura mostra através da análise por densidade óptica relativa do nível da proteína acida fibrilar glial (GFAP) para avaliar o efeito da injeção nigral da 6-OHDA na região do mesencéfalo ventral (A e ilustrado na B). Observa-se na figura **A** os grupos estudados comparando-se o lado ipsilateral com o lado contralateral a lesão em valores de porcentagem, onde o lado contralateral corresponde a 100% e os valores do lado ipsilateral estão demonstrados nessa figura. ★★$p<0,01$; ★$p<0,05$, representam diferenças segundo o teste t pareado. Na figura **B** está ilustrado o nível da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) como base de comparação o lado contralateral.

A


Nível da Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP)
Porcentagem em relação ao lado contralateral
250
200
150
100
50
0
72horas
1 semana
3 semanas
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico

B


Ipsilateral
Contralateral
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
GFAP 72 horas Mesencéfalo Ventral
GFAP 53 kDa
GFAP 1 semana Mesencéfalo Ventral
GFAP 3 semanas Mesencéfalo Ventral

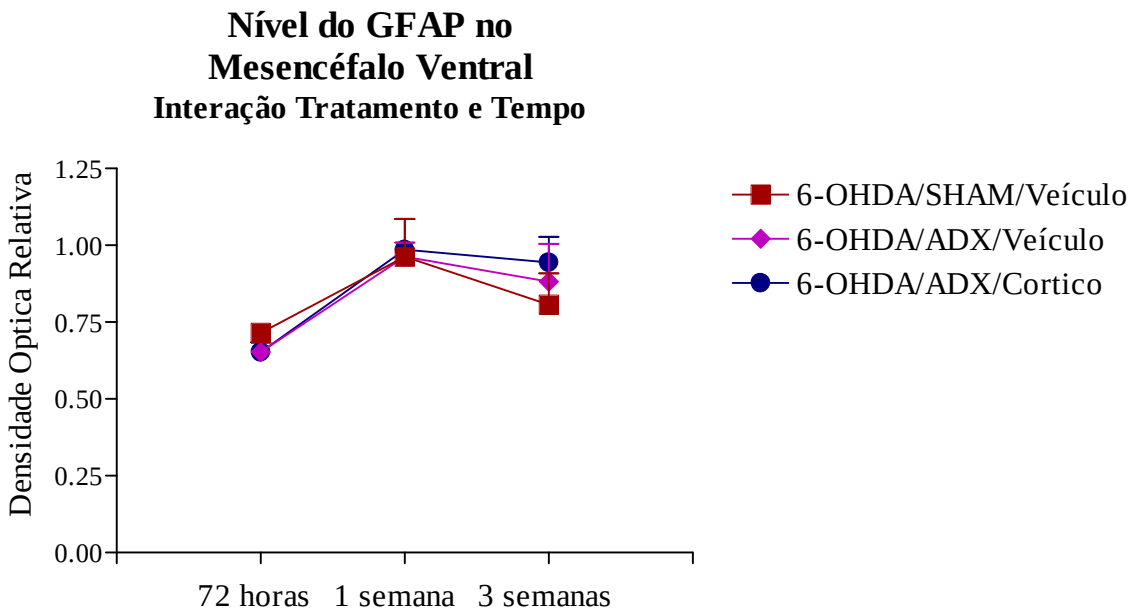


Figura 10: A figura mostra a evolução temporal dos grupos, na região ipsilateral com relação ao nível da GFAP, que foi quantificado através de densidade óptica relativa. Não observa-se diferença estatisticamente significante entre os grupos com relação ao tratamento, mas encontra-se diferença na interação com o tempo como mostra a tabela 3 abaixo.

Tabela 3. Análise realizada pelo teste ANOVA de duas vias para verificar interação entre os grupos mediante o tratamento realizado e o tempo de lesão. —— sem significância estatística, representado através do pós teste de bonferroni.

Grupos	**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Veículo**			**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**			**6-OHDA/ADX/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**		
Tempo	**p=0,0083; F=5,68**			**p=0,0053; F=6,324**			**p=0,0006; F=9,712**		
Tratamento	**p=0,9503; F=0,0039**			**p=0,6337; F=0,2319**			**p=0,6580; F=0,2000**		
Interação	**p=0,7040; F=0,3553**			**p=0,4792; F=0,7546**			**p=0,9202; F= 0,08341**		
	72 hs	**1 semana**	**3 semanas**	**72 hs**	**1 semana**	**3 semanas**	**72 hs**	**1 semana**	**3 semanas**
	——	——	——	——	——	——	——	——	——

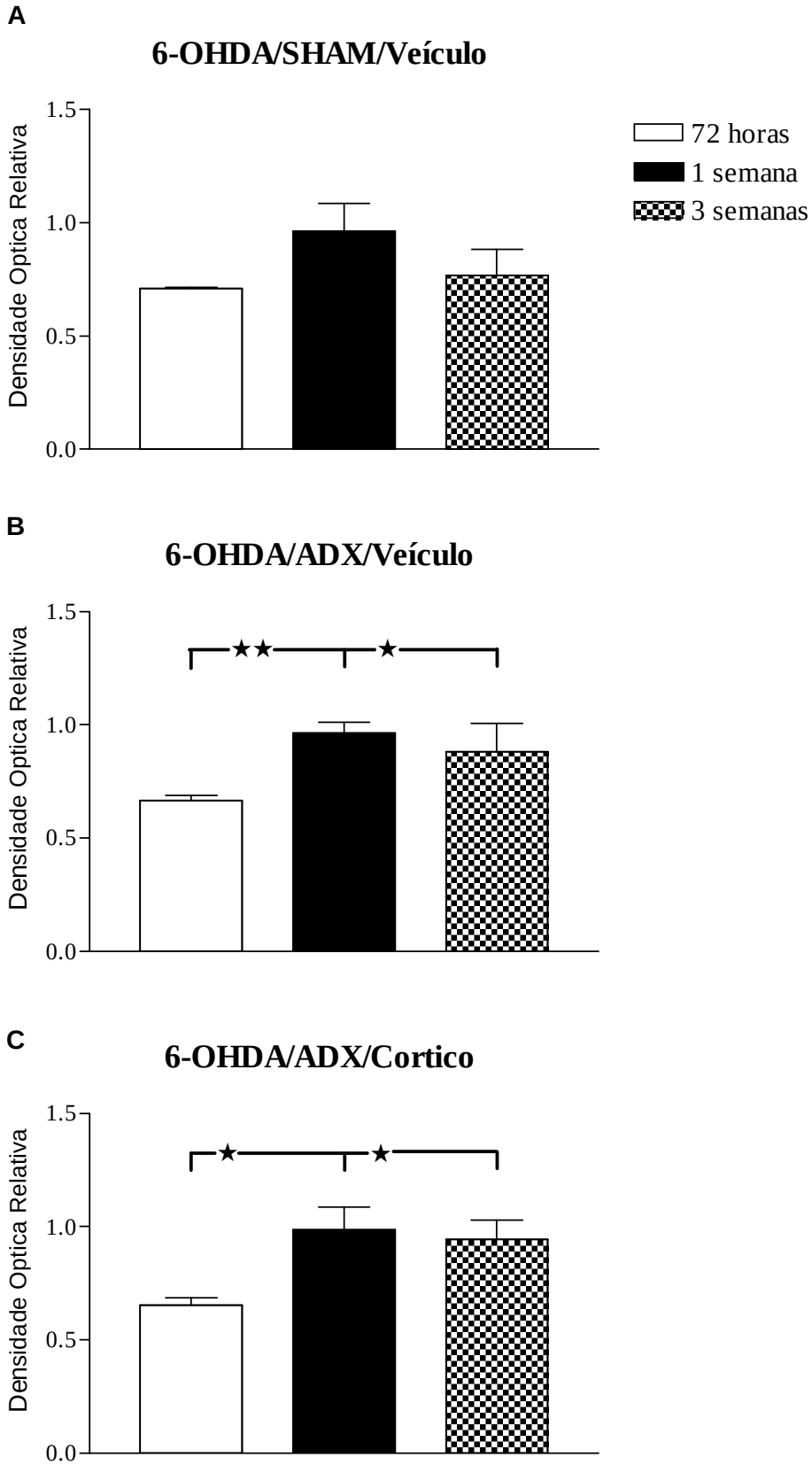


Figura 11: A figura mostra a expressão da GFAP, no mesencéfalo ventral através da análise do teste ANOVA de medidas repetidas aplicando o pós-teste de Tukey's.

★★ p<0,01; ★ p<0,05.

4.1.4 Nível da GFAP no Corpo Estriado

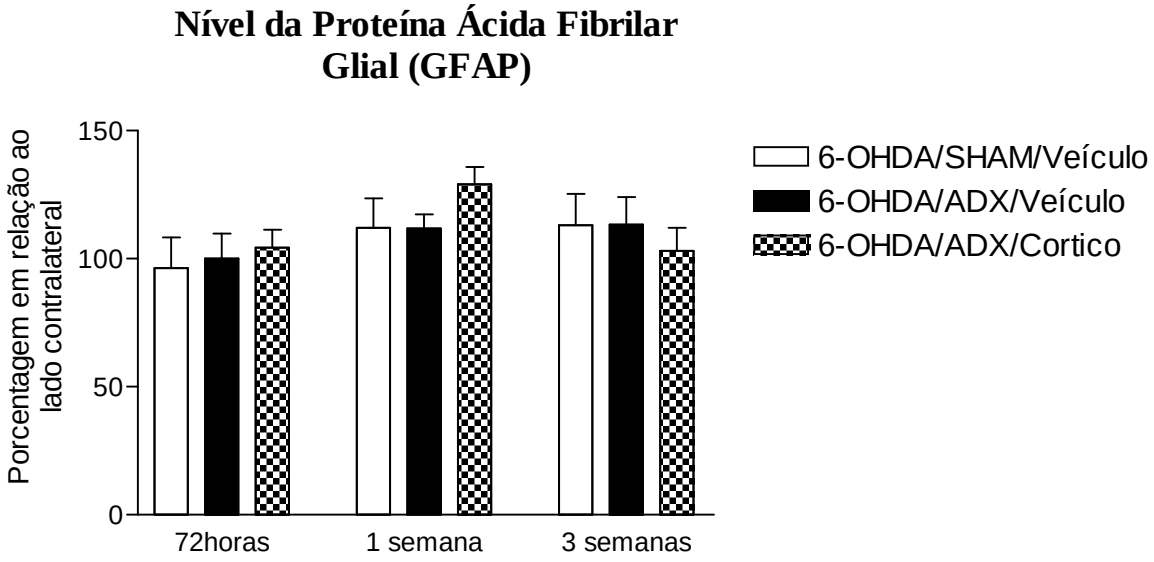
Na região do corpo estriado não houve diferença do nível da proteína na comparação entre o lado ipsilateral e contralateral a lesão nos três grupos analisados 6-OHDA/SHAM/Veículo; 6-OHDA/ADX/Veículo; 6-OHDA/ADX/Cortico ($p>0,05$) como demonstrado respectivamente em 72 horas 96,49%, 100% e 104,43%; em 1 semana 112,21%, 112,00% e 129,25%; e em 3 semanas 113,17%, 113,30% e 103,06% (Fig. 12A).

A análise de cada grupo através do teste ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito temporal nos níveis de GFAP no grupo 6-OHDA/ADX/Cortico ($p=0,0491$; $F=4,496$) o que não ocorreu nos grupos 6-OHDA/SHAM/Veículo ($p=0,1434$; $F=2,500$); 6-OHDA/ADX/Veículo ($p=0,1620$; $F=2,305$) (Fig. 14A, B e C).

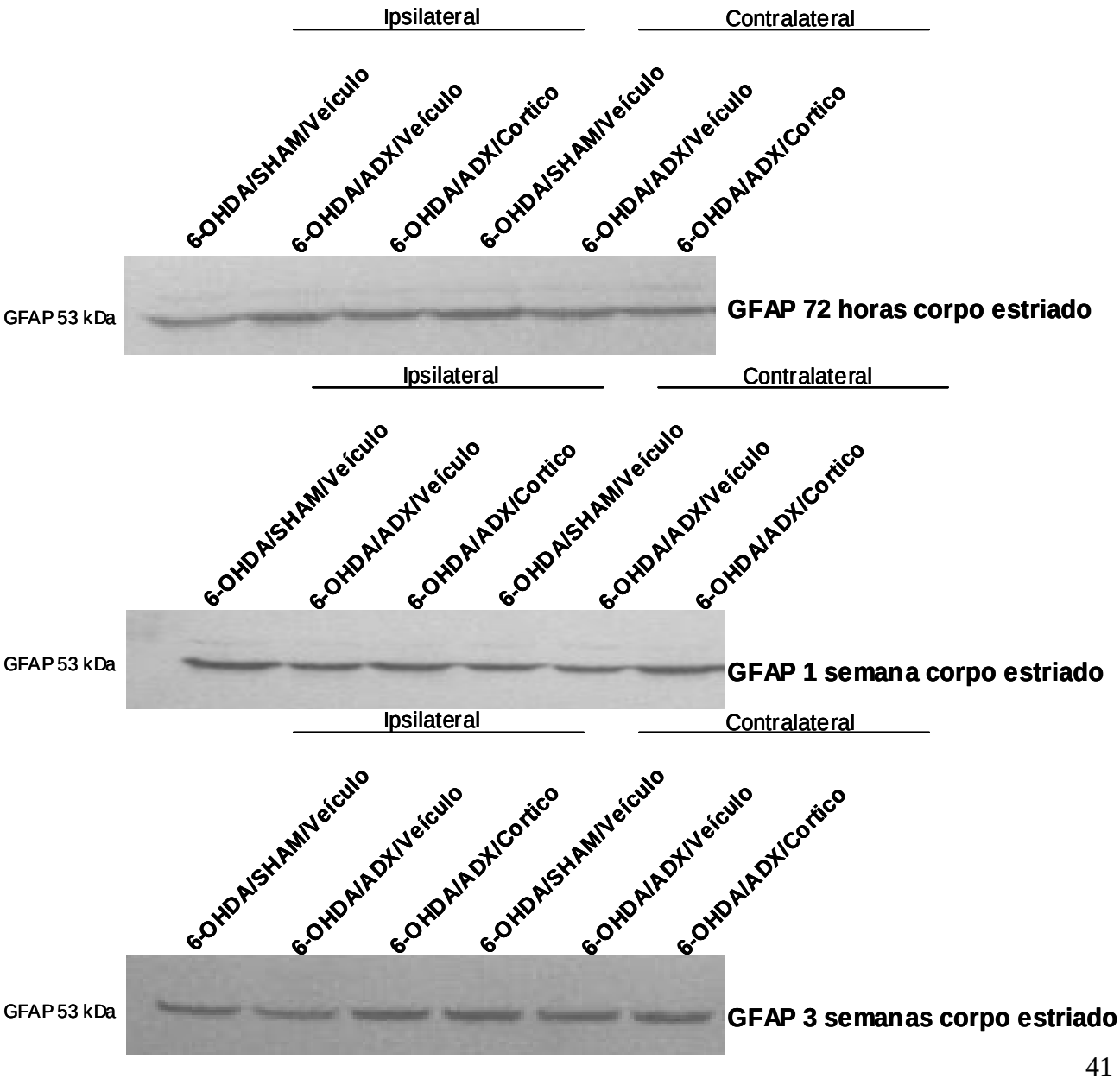
Os resultados do teste ANOVA de duas vias que avaliou o efeito do tempo, do tratamento e da interação tratamento x tempo são apresentadas na figura 13 e tabela 4, não houve diferenças entre os grupos.

Figura 12: A figura mostra através da análise por densidade óptica relativa do nível da proteína acida fibrilar glial (GFAP) para avaliar o efeito da injeção nigral da 6-OHDA na região do corpo estriado (A e ilustrado na B). Observa-se na figura **A** os grupos estudados comparando-se o lado ipsilateral com o lado contralateral a lesão em valores de porcentagem, onde o lado contralateral corresponde a 100% e os valores do lado ipsilateral estão demonstrados nessa figura. Não houve diferença estatisticamente significante segundo o teste t pareado. Na figura **B** está ilustrado o nível da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) como base de comparação o lado contralateral.

A


Nível da Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP)
Porcentagem em relação ao lado contralateral
150
100
50
0
72horas
1 semana
3 semanas
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico

B


Ipsilateral
Contralateral
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
GFAP 53 kDa
GFAP 72 horas corpo estriado
Ipsilateral
Contralateral
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
GFAP 53 kDa
GFAP 1 semana corpo estriado
Ipsilateral
Contralateral
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
GFAP 53 kDa
GFAP 3 semanas corpo estriado

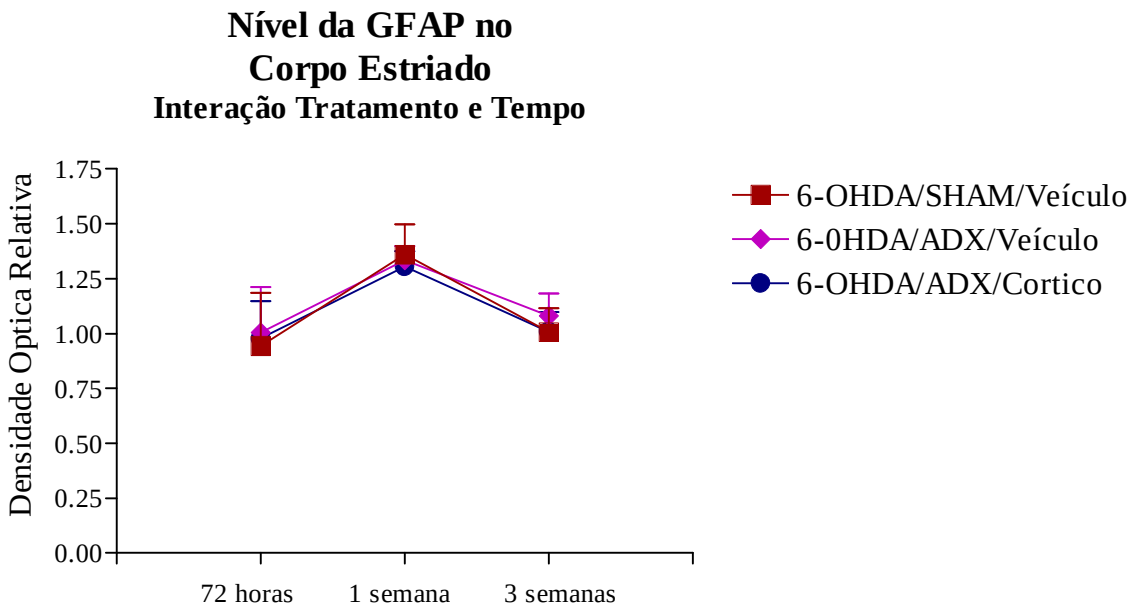


Figura 13: A figura mostra a evolução temporal dos grupos, na região ipsilateral com relação ao nível da GFAP, que foi quantificado através de densidade óptica relativa. Não há diferenças estatisticamente significante entre os grupos com relação ao tratamento mas há uma tendência com relação ao tempo nas três análises comparativas como mostra a tabela 4 abaixo.

Tabela 4. Análise realizada pelo teste ANOVA de duas vias para verificar interação entre os grupos mediante o tratamento realizado e o tempo de lesão. —— sem significância estatística, representado através do pós teste de bonferroni.

Grupos	**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Veículo**	**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**	**6-OHDA/ADX/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**
Tempo	**p=0,0767; F=2,818**	**p=0,0513; F=3,310**	**p=0,0548; F=3,228**
Tratamento	**p=0,7877; F=0,0,0739**	**p=0,09620; F=0,0023**	**p=0,7061; F=0,1452**
Interação	**p=0,9511; F=0,05023**	**p=0,9610; F=0,0398**	**p=0,9817; F= 0,0185**
	72 hs 1 semana 3 semanas	**72 hs 1 semana 3 semanas**	**72 hs 1 semana 3 semanas**
	—— —— ——	—— —— ——	—— —— ——

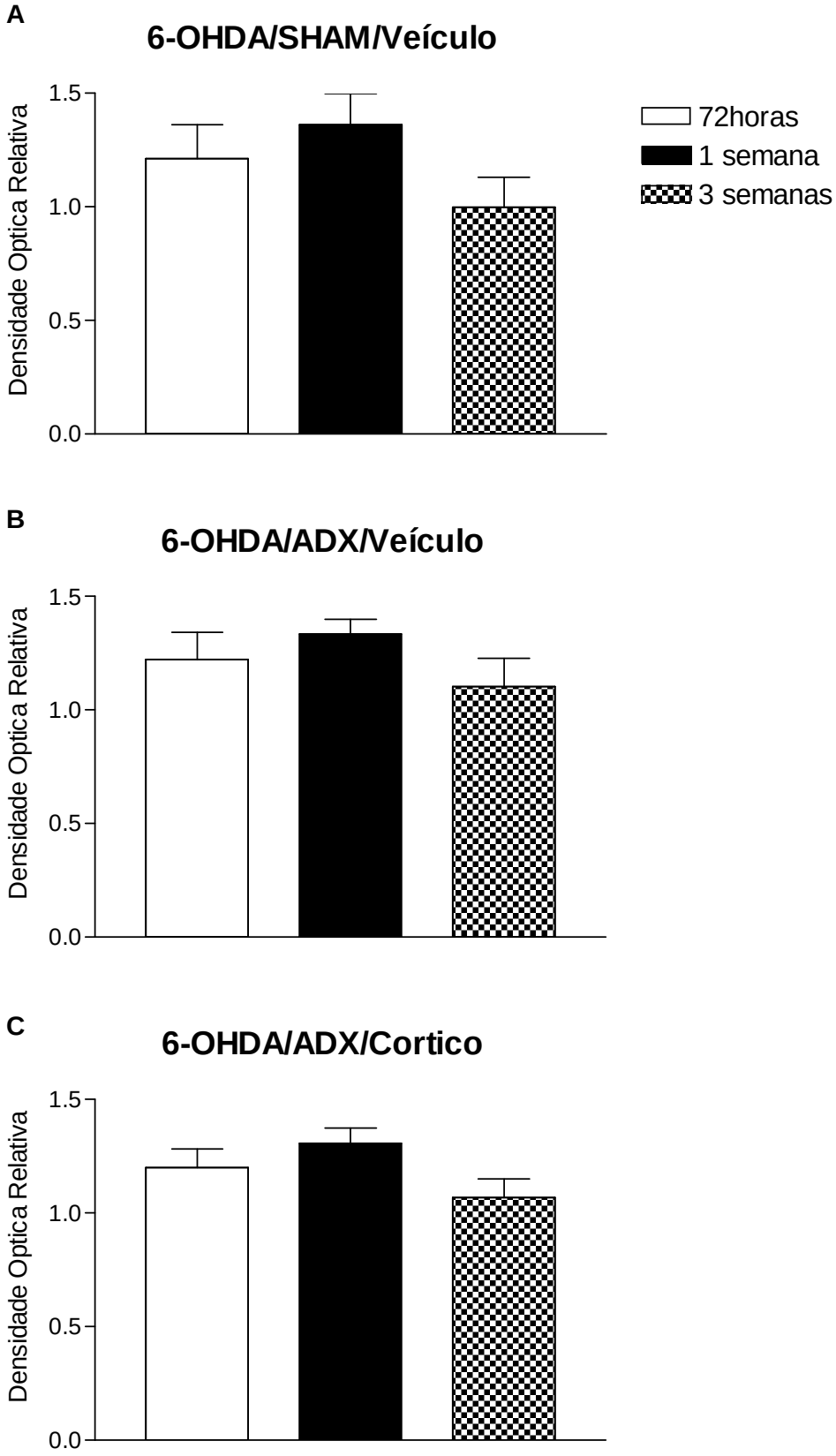


Figura 14: A figura mostra a expressão da GFAP, no corpo estriado através da análise do teste ANOVA de medidas repetidas. Não houve diferença estatisticamente significante aplicando o pós-teste de Tukey's.

4.1.5 Nível da proteína Fosfacan no Mesencéfalo Ventral

Na realização da técnica de Western blot, encontramos 2 pesos moleculares diferentes da proteína fosfacan, os quais estão descritos separadamente.

4.1.5.1 Fosfacan com peso molecular de 175 kDa

Não foi observada diferenças estatisticamente significantes na expressão dessa proteína de peso molecular 175kDa, entre as regiões ipsilateral e contralateral a lesão ($p>0,05$) (Fig.15A).

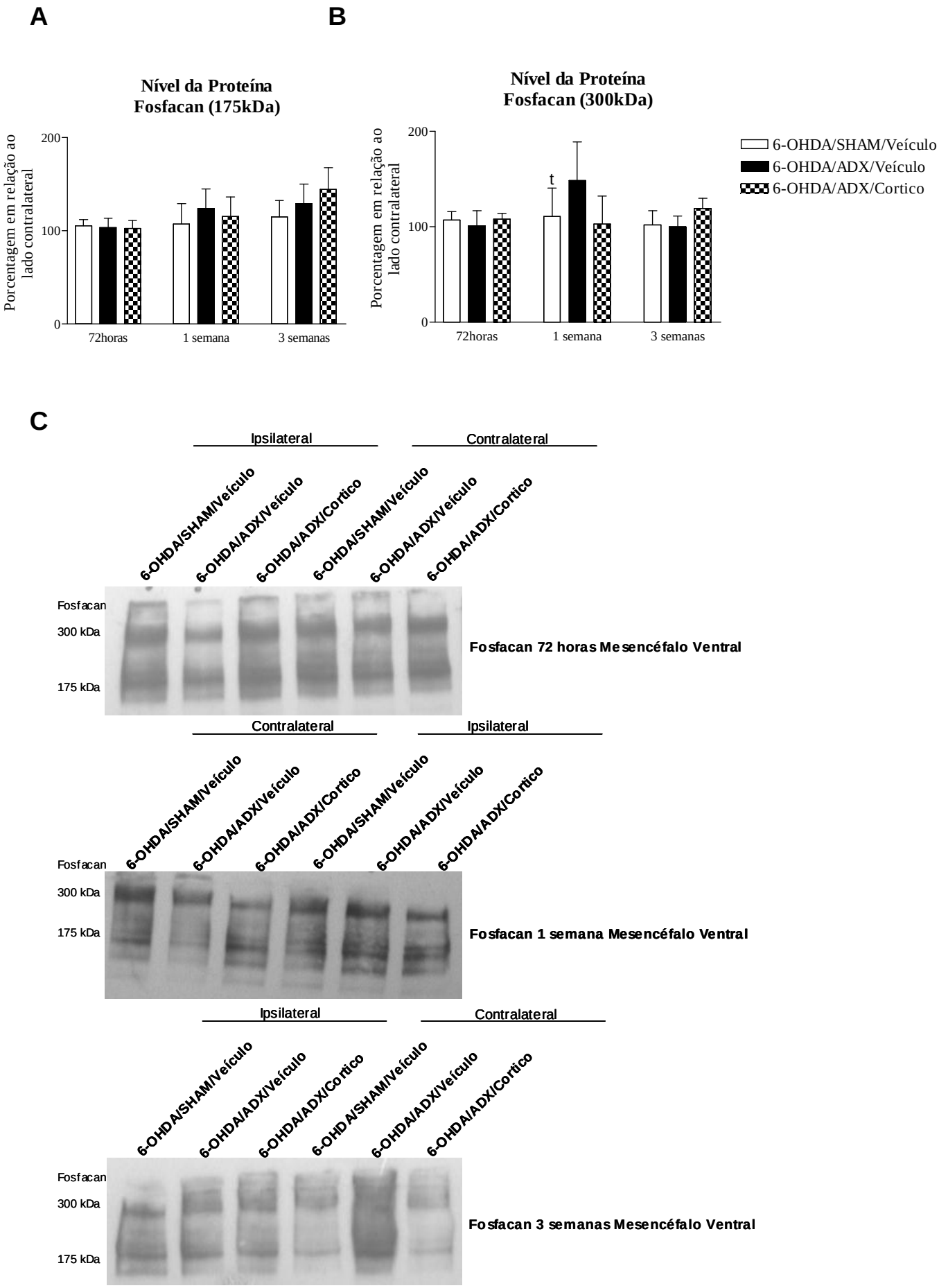
Através do teste ANOVA de duas vias, observa-se que o nível da proteína de baixo peso molecular do fosfacan mostrou-se diferente no tempo em relação aos grupos 6-OHDA/SHAM/Veículo x 6-OHDA/ADX/Veículo ($p<0,05$) e entre os grupos 6-OHDA/ADX/Veículo x 6-OHDA/ADX/Cortico ($p<0,05$) (Fig. 16B e tabela 5A).

Na figura 17A, B e C, pelo teste ANOVA de uma via de medidas repetidas, observa-se uma diferença significante no grupo 6-OHDA/ADX/Cortico entre o período de 72 horas e 3 semanas ($p<0,05$), o que não foi observado nos demais grupo.

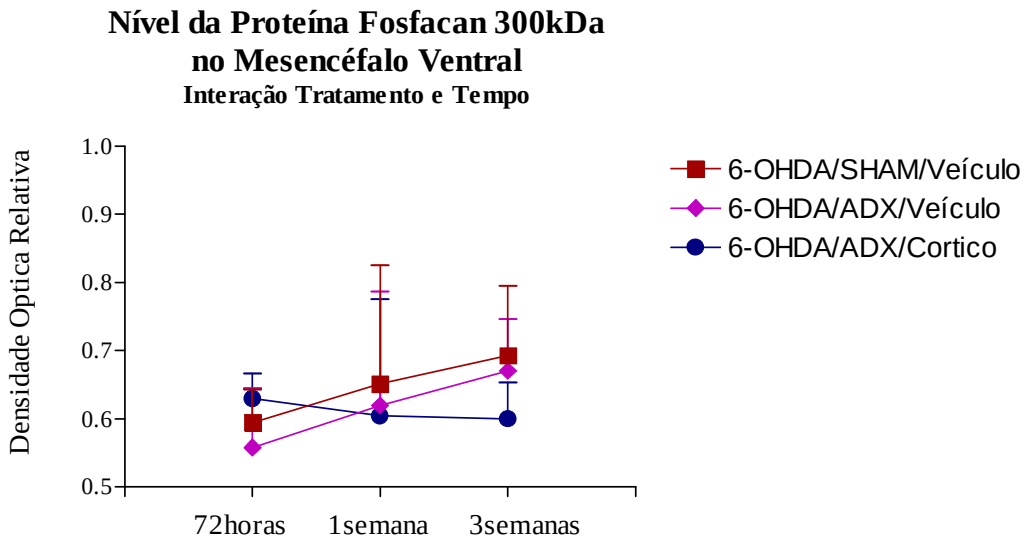
4.1.5.2 Fosfacan com peso molecular de 300 kDa

Na análise dessa proteína, não foi observada diferenças estatisticamente significantes entre os grupos analisados, e também não foi observado diferenças na expressão dessa proteína de peso molecular mais alto, entre as regiões ipsilateral e contralateral a lesão ($p>0,05$) (Fig. 15B). Através da análise pelo teste ANOVA de duas vias, não foram encontradas diferença do efeito do tempo, tratamento e da interação tratamento x tempo (Fig.16A e tabela 5B). Também não foi encontrada diferença estatisticamente significante ao realizar o teste ANOVA de medidas repetidas para avaliação temporal de cada grupo (Fig. 17D, E e F).

Figura 15: A figura mostra a densidade óptica relativa do nível da proteína fosfacan de 175kDa (**A**) e 300 kDa (**B**) para avaliar o efeito da ativação da mesma após injeção nigral da 6-OHDA na região do mesencéfalo ventral (ilustrados ambos em **C**). Observa-se na figura **A** e **B** os grupos estudados comparando-se o lado ipsilateral com o lado contralateral a lesão em valores de porcentagem, onde o lado contralateral corresponde a 100% e os valores do lado ipsilateral estão demonstrados nessa figura. Não houve diferenças estatisticamente significante segundo o teste t pareado. Na figura **B** observa-se que no grupo 6-OHDA/SHAM/Veículo em 1 semana houve uma tendência entre o lado ipsilateral e contralateral (t = 0,08). Na figura **C** é ilustrado o nível da proteína fosfacan nos 2 pesos moleculares (300kDa e 175kDa) como base de comparação o lado contralateral.


A
B
Nível da Proteína
Fosfacan (175kDa)
Nível da Proteína
Fosfacan (300kDa)
Porcentagem em relação ao lado contralateral
200
100
0
72horas
1 semana
3 semanas
t
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
C
Ipsilateral
Contralateral
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
Fosfacan
300 kDa
175 kDa
Fosfacan 72 horas Mesencéfalo Ventral
Contralateral
Ipsilateral
Fosfacan 1 semana Mesencéfalo Ventral
Ipsilateral
Contralateral
Fosfacan 3 semanas Mesencéfalo Ventral

A



B

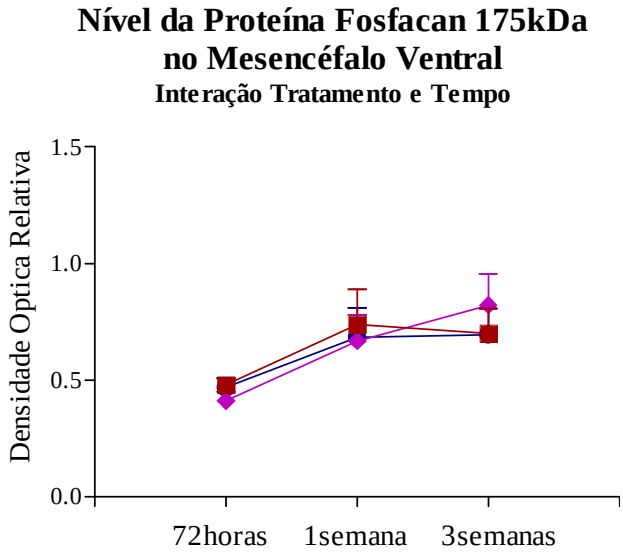


Figura 16: A figura mostra a evolução temporal do nível da proteína Fosfacan de 300kDa (**A**) e 175kDa(**B**) no mesencéfalo ventral no lado ipsilateral a lesão, que foi quantificado através de densidade óptica relativa. Não observamos diferenças estatisticamente significantes entre os grupos com relação ao tratamento, mas encontramos diferença na interação com o tempo na proteína de 175kDa como mostra a tabela 5A .

Tabela 5A. Fosfacan 175kDa, análise realizada pelo teste ANOVA de duas vias para verificar interação entre os grupos mediante o tratamento e o tempo. ── sem significância estatística, representado através do pós teste de bonferroni.

Grupos	**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Veículo**	**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**	**6-OHDA/ADX/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**
Tempo	**p=0,0151; F=4,983**	**p=0,0696; F=2,984**	**p=0,0105; F=5,419**
Tratamento	**p=0,9480; F=0,004348**	**p=0,7837; F=0,07707**	**p=0,8270; F=0,04872**
Interação	**p=0,05679; F=0,5788**	**p=0,9682; F=0,03236**	**p=0,6301; F= 0,4699**
	72 hs 1 semana 3 semanas	**72 hs 1 semana 3 semanas**	**72 hs 1 semana 3 semanas**
	── ── ──	── ── ──	── ── ──

Tabela 5B. Fosfacan 300kDa, análise realizada pelo teste ANOVA de duas vias para verificar interação entre os grupos mediante o tratamento e o tempo. ── sem significância estatística, representado através do pós teste de bonferroni.

Grupos	**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Veículo**	**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**	**6-OHDA/ADX/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**
Tempo	**p= 0,6862; F= 0,3815**	**p= 0,9595; F= 0,04142**	**p= 0,9378; F= 0,06437**
Tratamento	**p= 0,7607; F= 0,09454 ...**	**p= 0,7188; F= 0,1323**	**p= 0,9606; F= 0,002477**
Interação	**p= 0,9982; F= 0,001780**	**p= 0,8608; F= 0,1506**	**p= 0,8252; F= 0,1934**
	72 hs 1 semana 3 semanas	**72 hs 1 semana 3 semanas**	**72 hs 1 semana 3 semanas**
	── ── ──	── ── ──	── ── ──

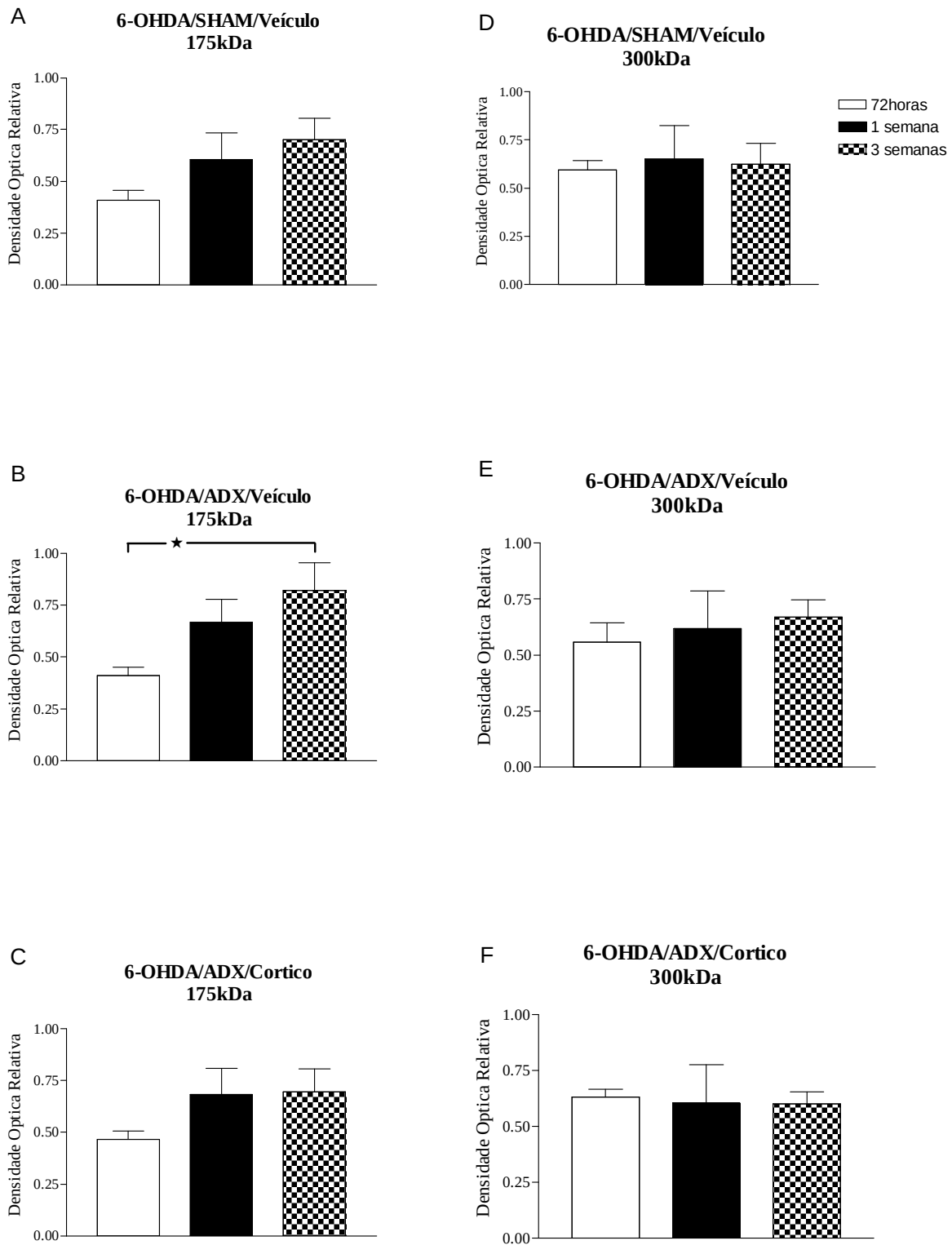


Figura 17: A figura mostra a expressão da proteína fosfacan com 175kDa (**A**, **B** e **C**) e com 300kDa (**D**, **E** e **F**), no mesencéfalo ventral através da análise do teste ANOVA de medidas repetidas aplicando o pós teste de Tukey's. Observa-se diferença estatística no período entre 72horas e 3 semanas no grupo 6-OHDA/ADX/Veículo (175kDa). ★ p<0,05.

4.1.6 Nível da proteína Fosfacan no Corpo Estriado

Assim como visto no mesencéfalo ventral, há 2 pesos moleculares diferentes da proteína fosfacan no corpo estriado, os quais estão descritos separadamente.

4.1.6.1 Fosfacan com peso molecular de 175 kDa

Foi observada uma diferenças estatisticamente significantes na expressão dessa proteína de peso molecular 175kDa, entre as regiões ipsilateral e contralateral a lesão ($p<0,05$) em 72horas no grupo 6-0HDA/SHAM/Veículo e em 3 semanas no grupo 6-OHDA/SHAM/Veículo (Fig.18A).

Através do teste ANOVA de duas vias, não foi observada diferença do efeito do tempo, tratamento e da interação tratamento x tempo (Fig.19 A e Tabela 6).

Na figura 20A, B e C, pelo teste ANOVA de uma via de medidas repetidas, observa-se uma diferença significante no grupo 6-OHDA/SHAM/Veículo entre o período de 72 horas e 1 semanas ($p<0,05$), o que não foi observado nos demais grupo.

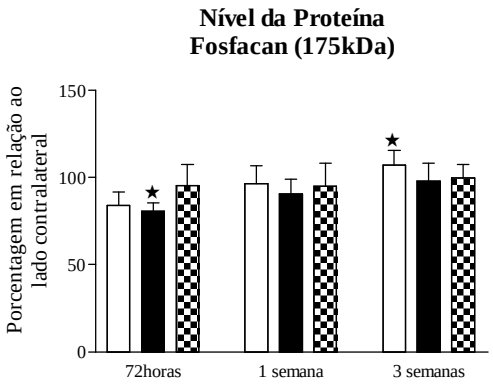
4.1.6.2 Fosfacan com peso molecular de 300 kDa

Na análise dessa proteína, não foi observada diferenças estatisticamente significantes entre os grupos analisados, e também não foi observado diferenças na expressão dessa proteína de peso molecular mais alto, entre as regiões ipsilateral e contralateral a lesão ($p>0,05$) (Fig. 18B).

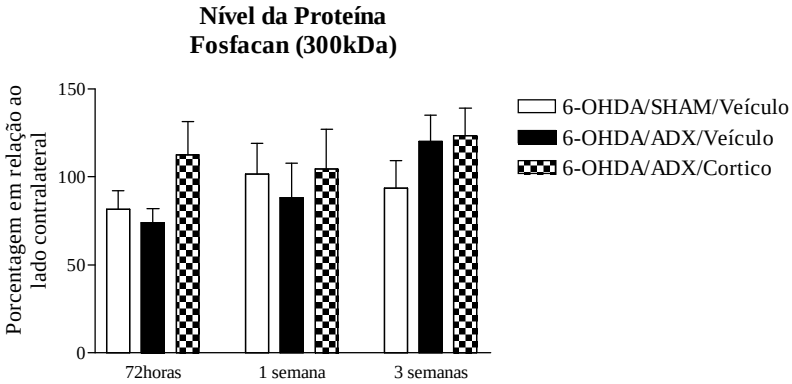
Através da análise pelo teste ANOVA de duas vias, não foram encontradas diferença do efeito do tempo, tratamento e da interação tratamento x tempo (Fig.19B e Tabela 6). Assim como não foi encontrada diferenças estatisticamente significante quando aplicado o teste ANOVA de medidas repetidas (Fig.20D, E e F)

Figura 18: A figura mostra a densidade óptica relativa do nível da proteína fosfacan de 175kDa (**A**) e 300 kDa (**B**) para avaliar o efeito da ativação da mesma após injeção nigral da 6-OHDA na região do corpo estriado (ilustrados ambos em **C**). Observa-se na figura **A** e **B** os grupos estudados comparando-se o lado ipsilateral com o lado contralateral em valores de porcentagem, onde o lado contralateral corresponde a 100% e os valores do lado ipsilateral estão demonstrados na figura. ★ $p < 0,05$ representa diferença segundo o teste t pareado. Na figura **C** é ilustrado o nível da proteína fosfacan nos 2 pesos moleculares (300kDa e 175kda) como base de comparação o lado contralateral.

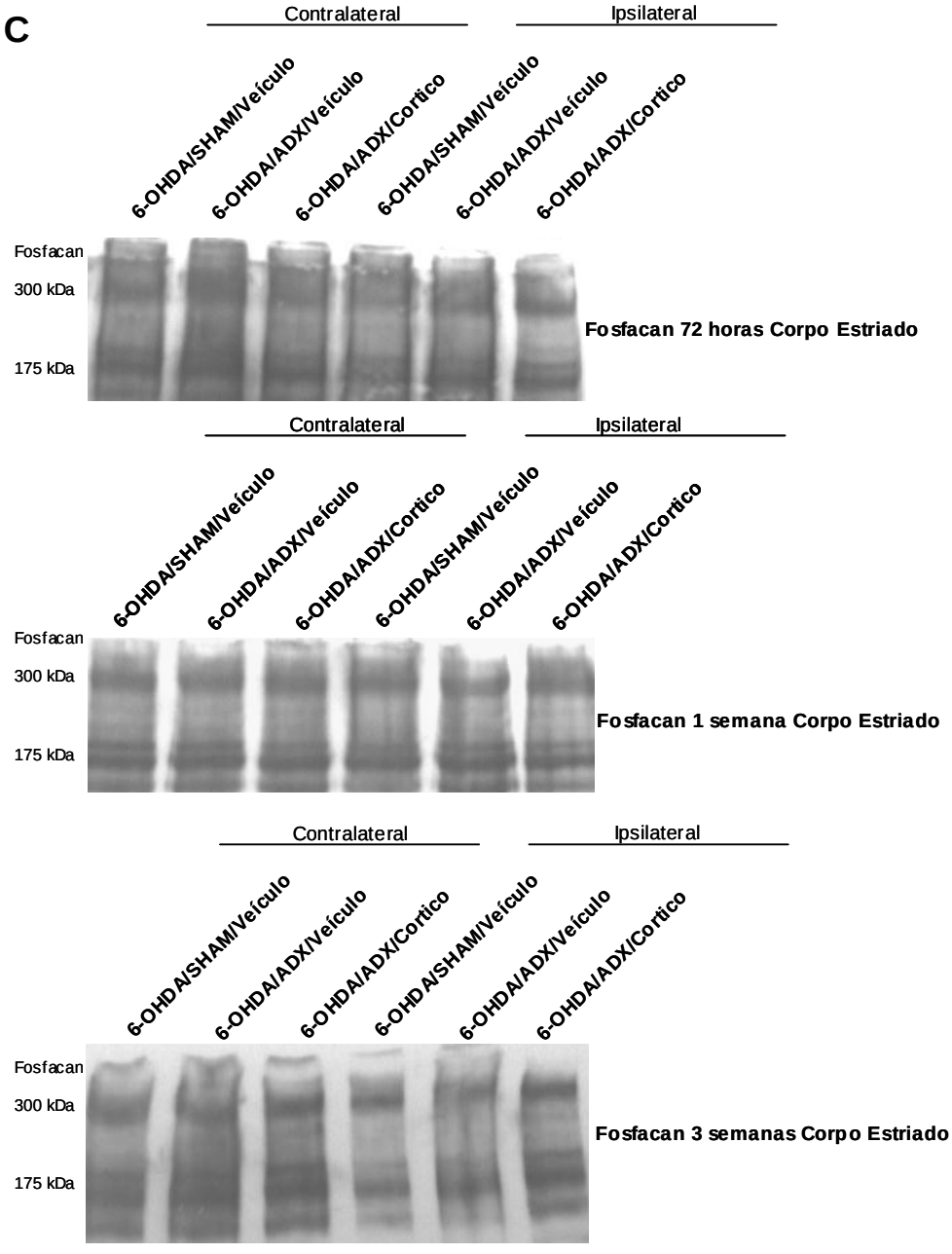
A


Nível da Proteína
Fosfacan (175kDa)
Porcentagem em relação ao lado contralateral
150
100
50
0
72horas
1 semana
3 semanas

B


Nível da Proteína
Fosfacan (300kDa)
Porcentagem em relação ao lado contralateral
150
100
50
0
72horas
1 semana
3 semanas
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico

C


Contralateral
Ipsilateral
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
Fosfacan
300 kDa
175 kDa
Fosfacan 72 horas Corpo Estriado
Contralateral
Ipsilateral
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
Fosfacan
300 kDa
175 kDa
Fosfacan 1 semana Corpo Estriado
Contralateral
Ipsilateral
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
Fosfacan
300 kDa
175 kDa
Fosfacan 3 semanas Corpo Estriado

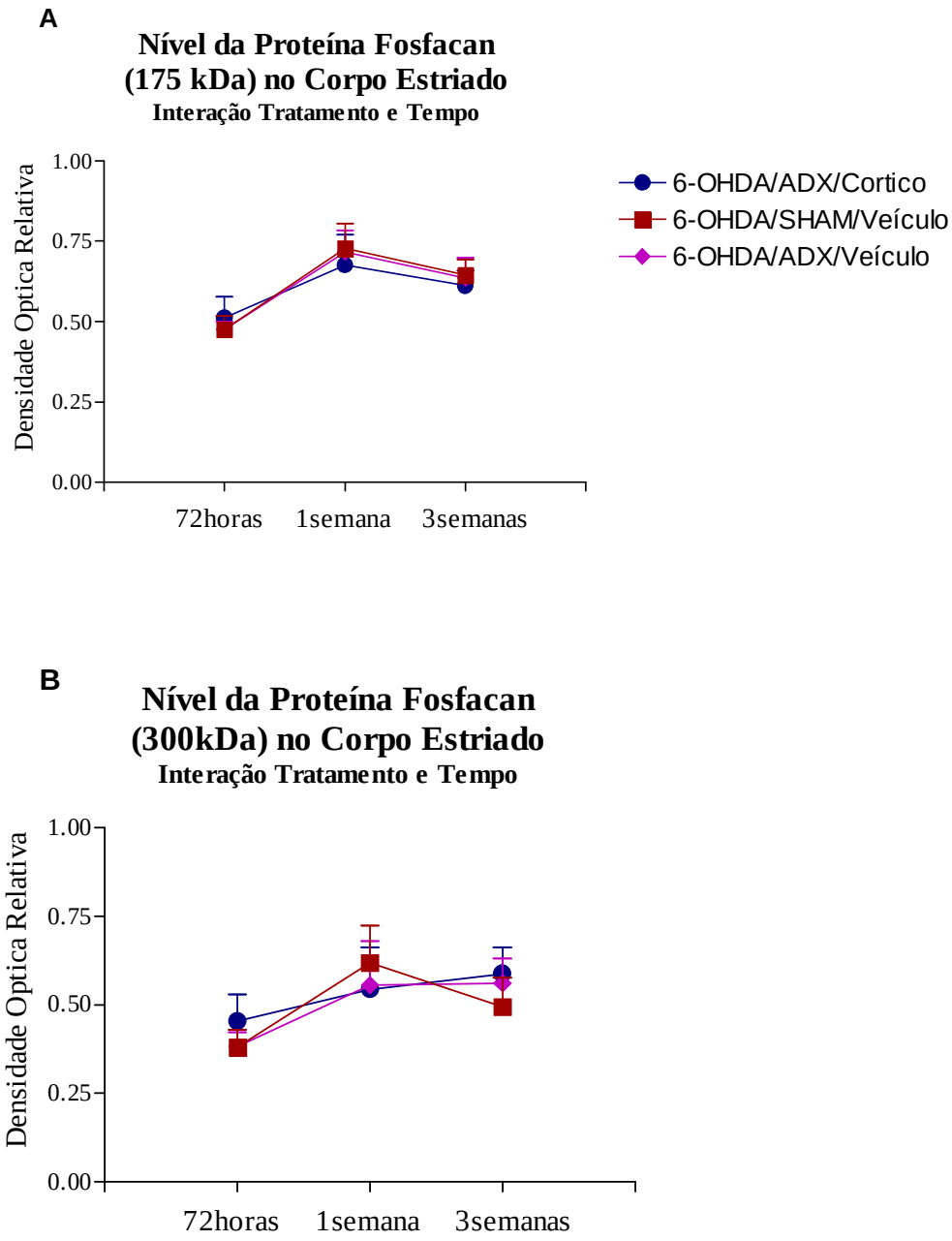


Figura 19: As figura mostram a evolução temporal do nível da proteína Fosfacan de 175kDa (**A**) e 300kDa(**B**) no corpo estriado no lado ipsilateral a lesão, que foi quantificado através de densidade óptica relativa. Não observamos diferenças estatisticamente significantes entre os grupos com relação ao tratamento, mas encontramos diferença na interação com o tempo na proteína de 175kDa como mostra a tabela 6A.

Tabela 6A. Fosfacan 175kDa, análise realizada pelo teste ANOVA de duas vias para verificar interação entre os grupos mediante o tratamento e o tempo. ── sem significância estatística, representado através do pós teste de bonferroni.

Grupos	**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Veículo**	**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**	**6-OHDA/ADX/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**
Tempo	**p=0,0006; F=9,573**	**p=0,0119; F=5,158**	**p=0,0130; F=5,036**
Tratamento	**p=0,8724; F=0,02623**	**p=0,7715; F=0,08588**	**p=0,8792; F=0,02349**
Interação	**p=0,9954; F=0,004625**	**p=0,7793; F=0,2514**	**p=0,8190; F=0,2010**
	72hs 1semana 3semanas	**72hs 1semana 3semana**	**72hs 1semana 3semana**

Tabela 6B. Fosfacan 300kDa, análise realizada pelo teste ANOVA de duas vias para verificar interação entre os grupos mediante o tratamento e o tempo. ── sem significância estatística, representado através do pós teste de bonferroni.

Grupos	**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Veículo**	**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**	**6-OHDA/ADX/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**
Tempo	**p=0,0535; F=3,233**	**p=0,1631; F=1,928**	**p=0,1811; F=1,810**
Tratamento	**p=0,9754; F=0,00096**	**p=0,6707; F=0,1844**	**p=0,6963; F=0,1553**
Interação	**p=0,7443; F=0,2982**	**p=0,5803; F=0,5543**	**p=0,8931; F=0,1135**
	72hs 1semana 3semanas	**72hs 1semana 3semana**	**72hs 1semana 3semanas**

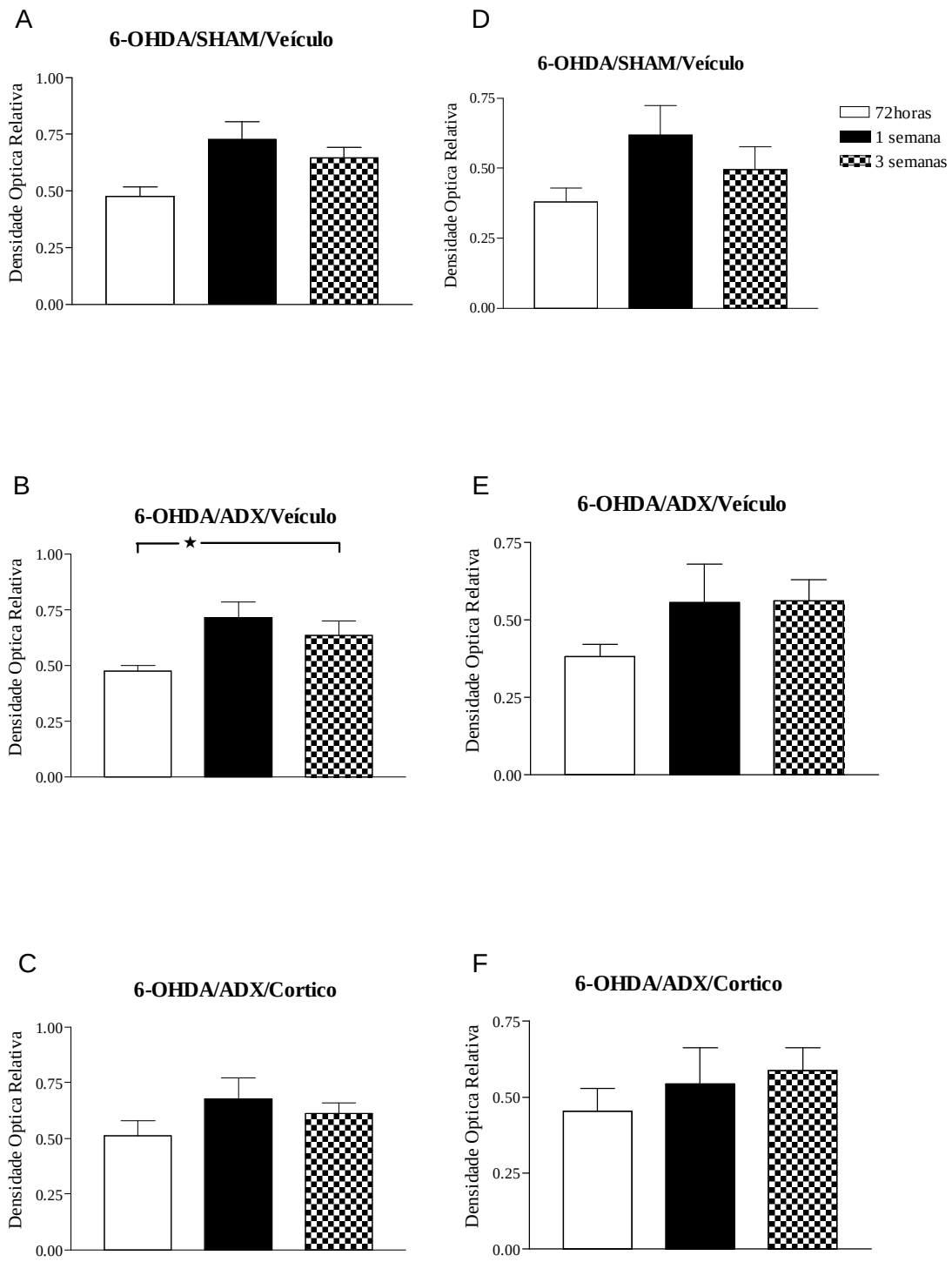


Figura 20: A figura mostra a expressão da proteína fosfacan com 175kDa (**A**, **B** e **C**) e com 300kDa (**D**, **E** e **F**), no corpo estriado através da análise do teste ANOVA de medidas repetidas aplicando o pós teste de Tukey's. Observa-se diferença estatística no período entre 72horas e 3 semanas no grupo 6-OHDA/ADX/Veículo (175kDa). ★ $p<0,05$.

4.1.7 Nível da proteína Neurocan no Mesencéfalo ventral

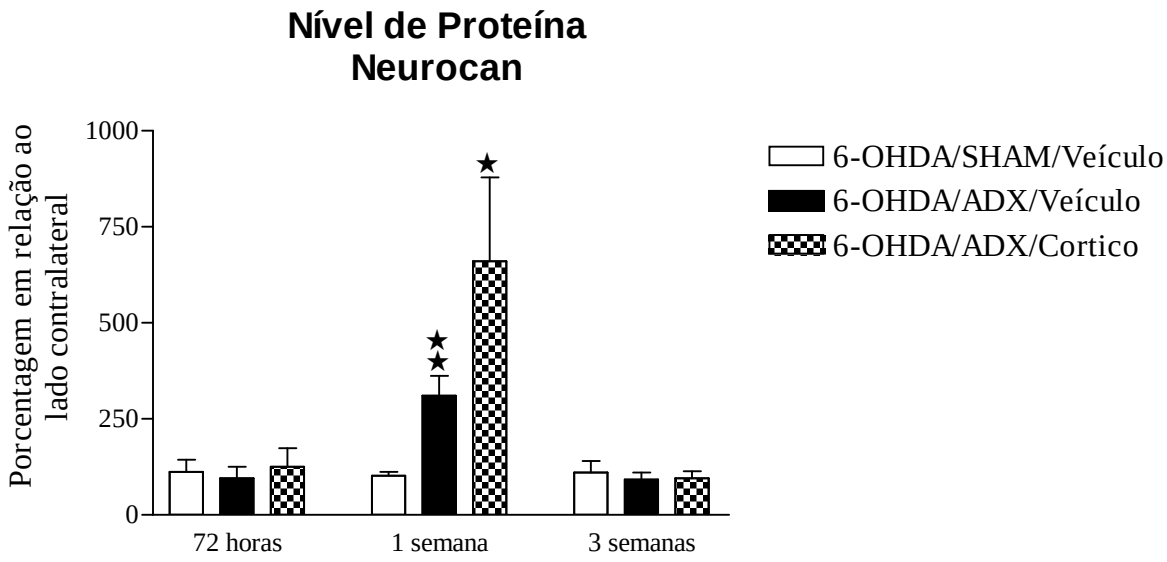
A figura 21A mostra os níveis da proteína neurocan no lado ipsilateral do mesencéfalo ventral dos grupos 6-OHDA/SHAM/Veículo, 6-OHDA/ADX/Veículo e 6-OHDA/ADX/Cortico em relação ao lado contralateral respectivamente, 111,31%, 95,30% e 125,77% em 72 horas; 101,63%, 310,77% e 659,78% em 1 semana; 110,48%, 90,97% e 94,97% em 3 semanas.

A análise por densidade óptica relativa, também evidenciou que com o decorrer do tempo a expressão de neurocan foi modificada e em 1 semana pode-se verificar que a diferença de tratamento entre os grupos foi diferente no grupo 6-OHDA/SHAM/Veículo x 6-OHDA/ADX/Cortico ($p<0,01$), e as diferenças encontradas com 1 semana já não são visíveis em 3 semanas quando a expressão do neurocan diminui ($p>0,05$) (Fig. 22).

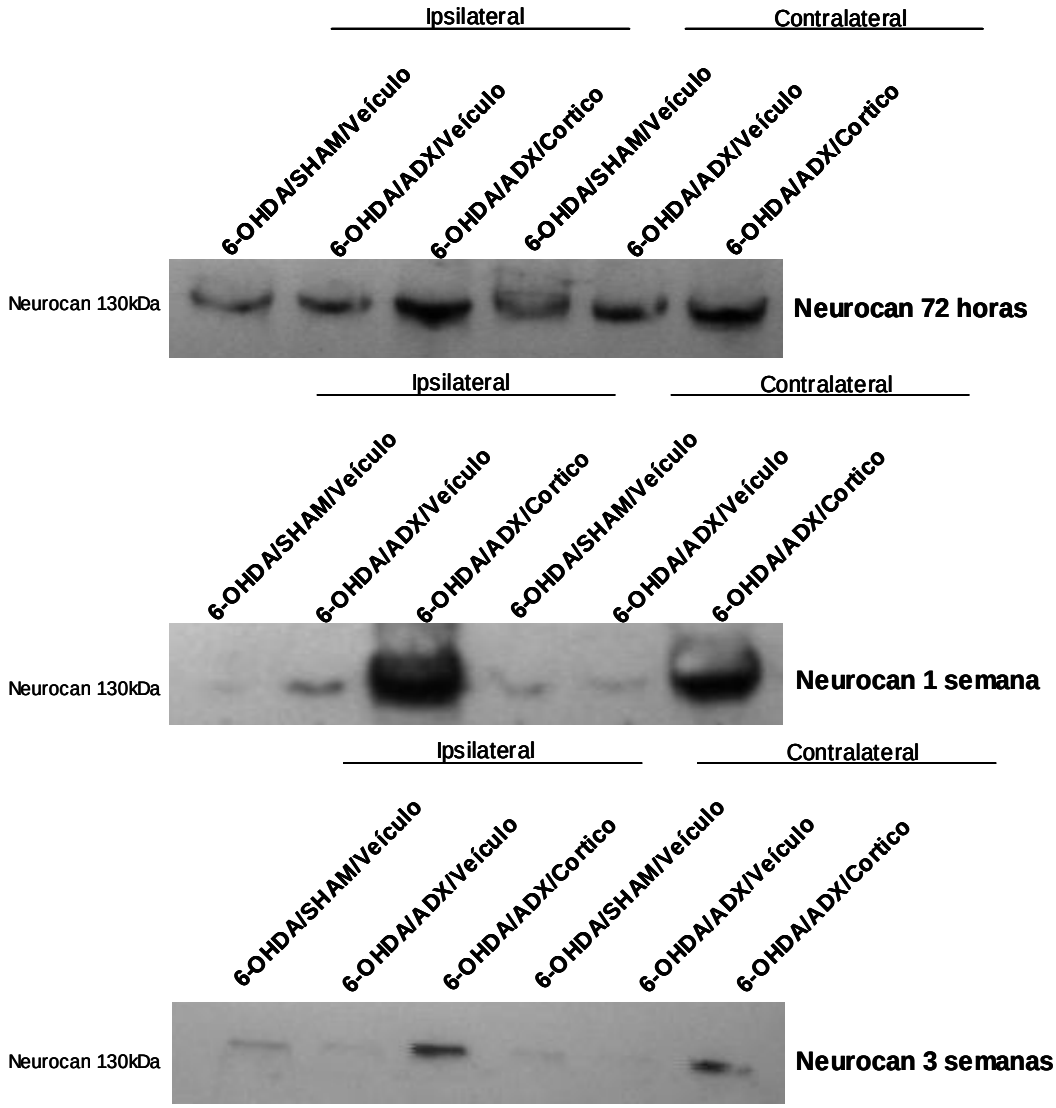
Pela análise do teste ANOVA de uma via de mediadas repetidas observa-se um aumento do nível da proteína neurocan em 72 horas nos grupos 6-OHDA/SHAM/Veículo e 6-OHDA/ADX/Veículo, quando comparado com os períodos de 1 semana e 3 semanas, o que não é observado no grupos 6-OHDA/ADX/Cortico que tem o nível da proteína aumentada com 1 semana (Fig.23A, B e C)

Figura 21: A figura mostra a densidade óptica relativa do nível da proteína Neurocan 130kDa para avaliar o efeito da ativação da mesma após injeção nigral da 6-OHDA na região do mesencéfalo ventral (**A** e ilustrado em **B**). Observa-se na figura **A** os grupos estudados comparando-se o lado ipsilateral com o lado contralateral em valores de porcentagem, onde o lado contralateral corresponde a 100% e os valores do lado ipsilateral estão demonstrados na figura. Não houve diferença estatisticamente significante segundo o teste t pareado. Na figura **B** é ilustrado o nível da proteína neurocan como base de comparação o lado contralateral.

A


Nível de Proteína
Neurocan
Porcentagem em relação ao lado contralateral
1000
750
500
250
0
72 horas
1 semana
3 semanas
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico

B


Ipsilateral
Contralateral
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
Neurocan 130kDa
Neurocan 72 horas
Neurocan 1 semana
Neurocan 3 semanas

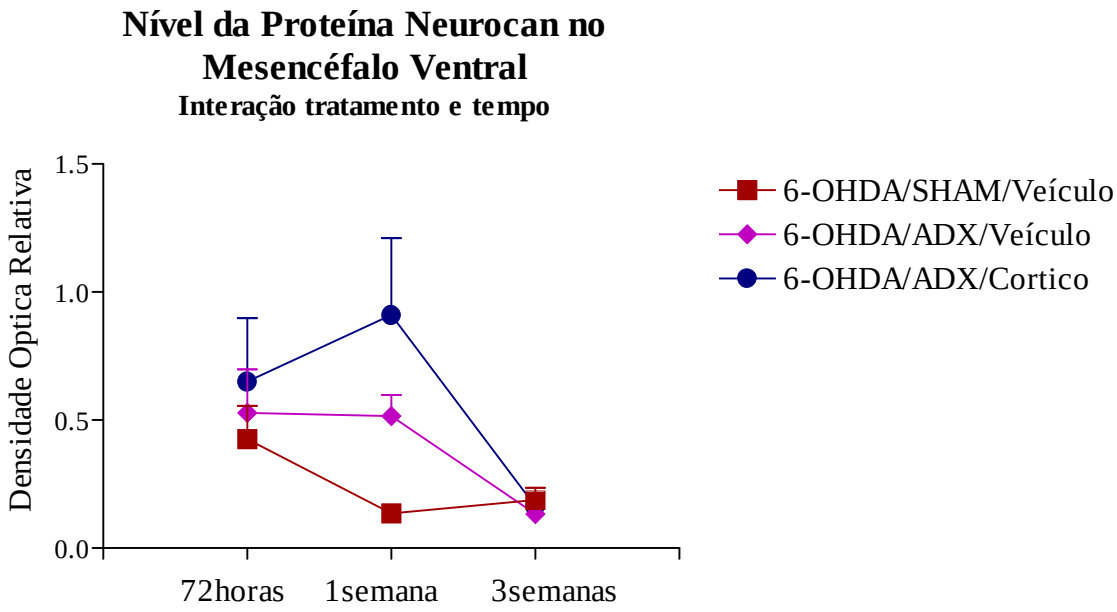


Figura 22: A figura mostra a evolução temporal dos grupos com relação ao nível da proteína neurocan, que foi quantificado através de densidade óptica relativa. Observa-se diferenças entre os grupos com relação ao tratamento e ao tempo como mostra a tabela 7abaixo.

Tabela 7. A tabela mostra o resultado da análise estatística da proteína Neurocan na substância negra entre os grupos experimentais segundo o teste ANOVA de duas vias, para verificar interação entre os grupos em relação ao tempo de lesão e ao tratamento.

★★ p<0,01; ★ p< 0,05; —— não houve interação, representado através do pós teste de bonferroni.

Grupos	**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Veículo**	**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**	**6-OHDA/ADX/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**
Tempo	**p=0,0029; F=7,319**	**p=0,0605; F=3,095**	**p=0,0122; F=5,184**
Tratamento	**p=0,0665; F=3,657**	**p=0,0399; F=4,628**	**p=0,3239; F=1,008**
Interação	**p=0,0962; F=2,556**	**p=0,0675; F=2,962**	**p=0,5330; F= 0,6437**
	72 hs 1 semana 3 semanas	**72 hs 1 semana 3 semanas**	**72 hs 1 semana 3 semanas**
	—— ★ ——	—— ★★ ——	—— —— ——

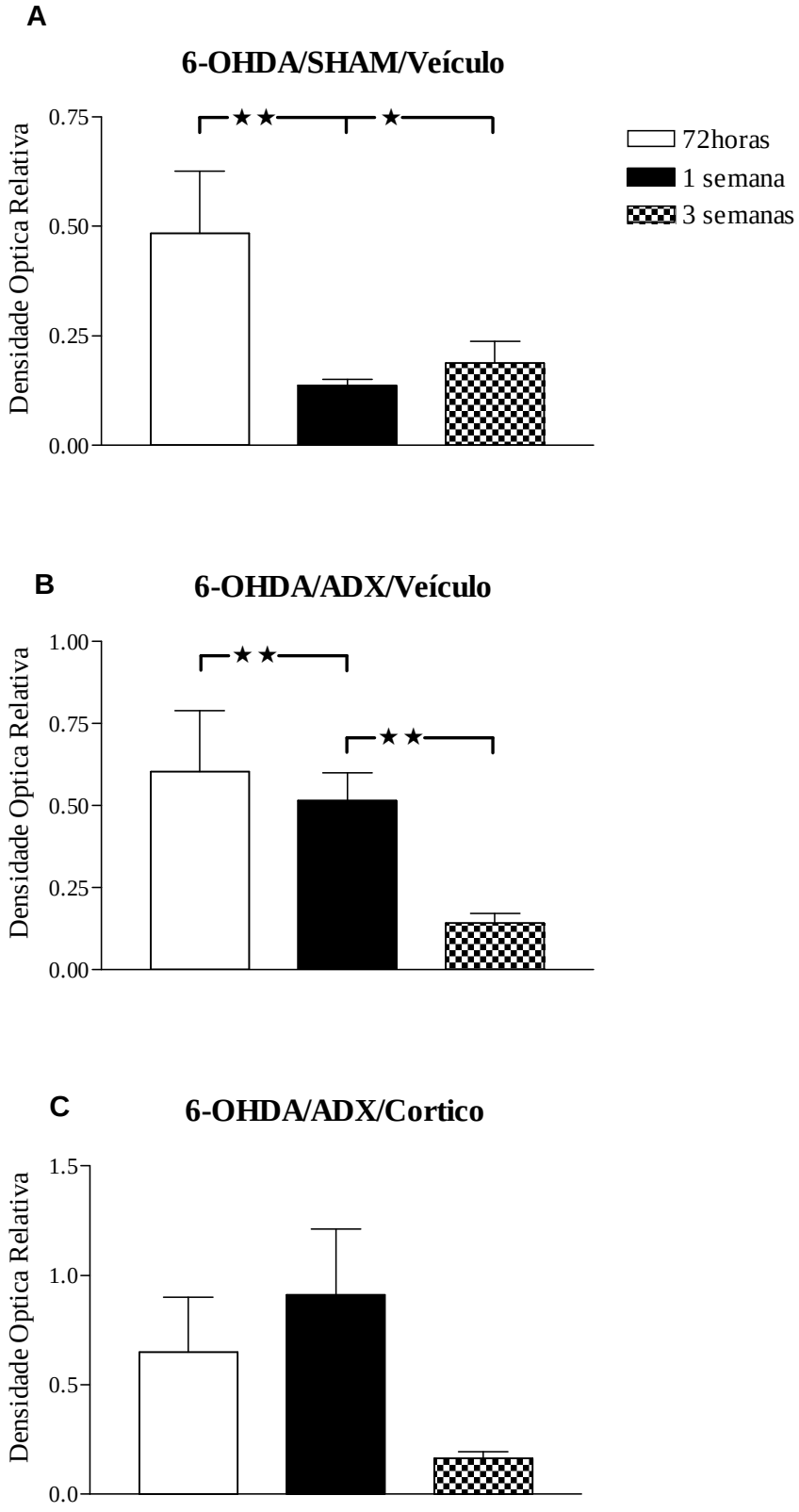


Figura 23: A figura mostra a expressão da proteína neurocan, no mesencéfalo ventral através da análise do teste ANOVA de medidas repetidas aplicando o Test de Tukey's, observamos uma diferença estatisticamente significante nos grupos 6-OHDA/SHAM/Veículo e 6-OHDA/ADX/Veículo . ★★ $p<0,01$; ★ $p<0,05$.

4.1.8 Nível da proteína Neurocan no Corpo estriado

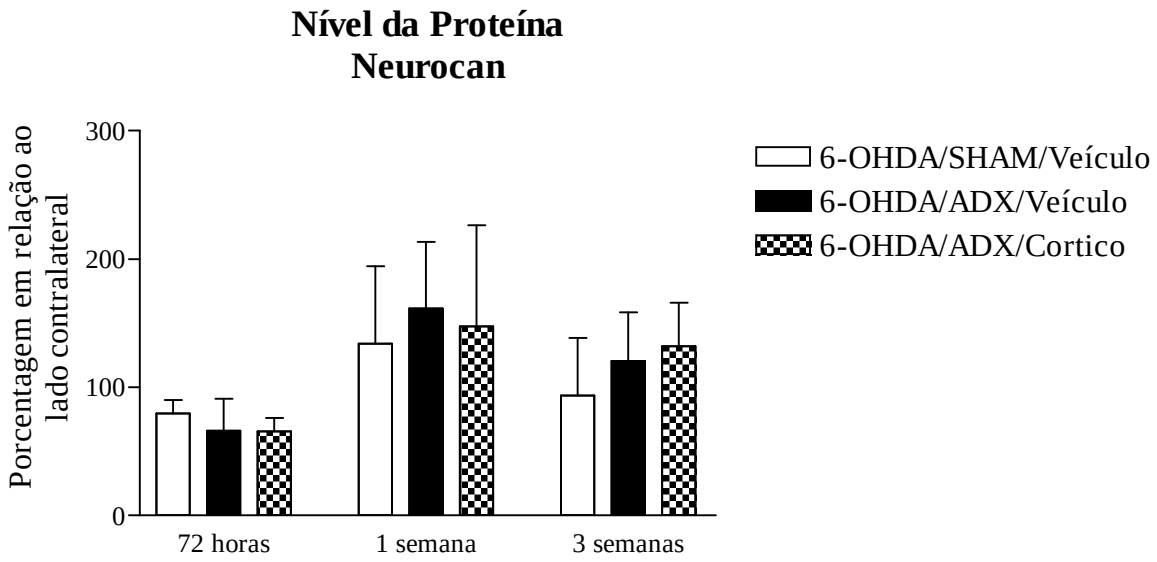
A figura 24A mostra os níveis da proteína neurocan no lado ipsilateral do corpo estriado dos grupos 6-OHDA/SHAM/Veículo, 6-OHDA/ADX/Veículo e 6-OHDA/ADX/Cortico em relação ao lado contralateral respectivamente, 79,96%, 66,18% e 65,81% em 72 horas; 133,75%, 162,47% e 157,56% em 1 semana; 93,37%, 120,27% e 132,14% em 3 semanas.

A análise por densidade óptica relativa, através do teste ANOVA de medidas repetidas não evidenciou uma mudança na expressão do neurocan no corpo estriado nos três grupos analisados 6-OHDA/SHAM/Veículo, 6-OHDA/ADX/Veículo e 6-OHDA/ADX/Cortico (Fig. 26).

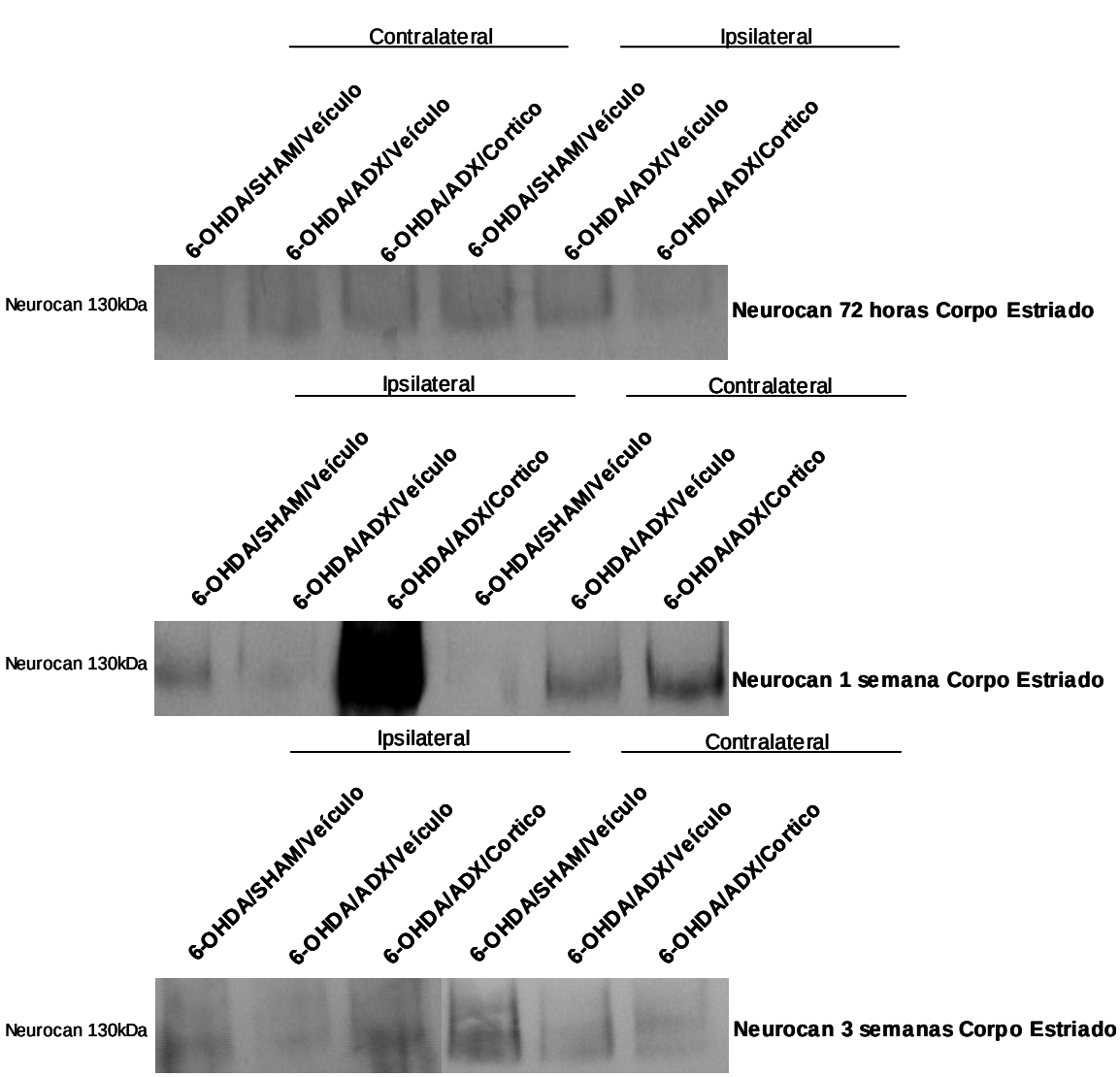
Os resultados do teste ANOVA de duas vias que avaliou o efeito do tempo, do tratamento e da interação tratamento x tempo são apresentadas na figura 25 e tabela 8, não houve diferenças entre os grupos.

Figura 24: A figura mostra a densidade óptica relativa do nível da proteína Neurocan 130kDa para avaliar o efeito da ativação da mesma após injeção nigral da 6-OHDA na região do corpo estriado (**A** e ilustrados em **B**). Observa-se na figura **A** os grupos estudados comparando-se o lado ipsilateral com o lado contralateral em valores de porcentagem, onde o lado contralateral corresponde a 100% e os valores do lado ipsilateral estão demonstrados na figura. Não houve diferença estatisticamente significante segundo o teste t pareado. Na figura **B** é ilustrado o nível da proteína neurocan como base de comparação o lado contralateral.

A


Nível da Proteína
Neurocan
Porcentagem em relação ao lado contralateral
300
200
100
0
72 horas
1 semana
3 semanas
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico

B


Contralateral
Ipsilateral
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
Neurocan 130kDa
Neurocan 72 horas Corpo Estriado
Ipsilateral
Contralateral
Neurocan 130kDa
Neurocan 1 semana Corpo Estriado
Ipsilateral
Contralateral
Neurocan 130kDa
Neurocan 3 semanas Corpo Estriado

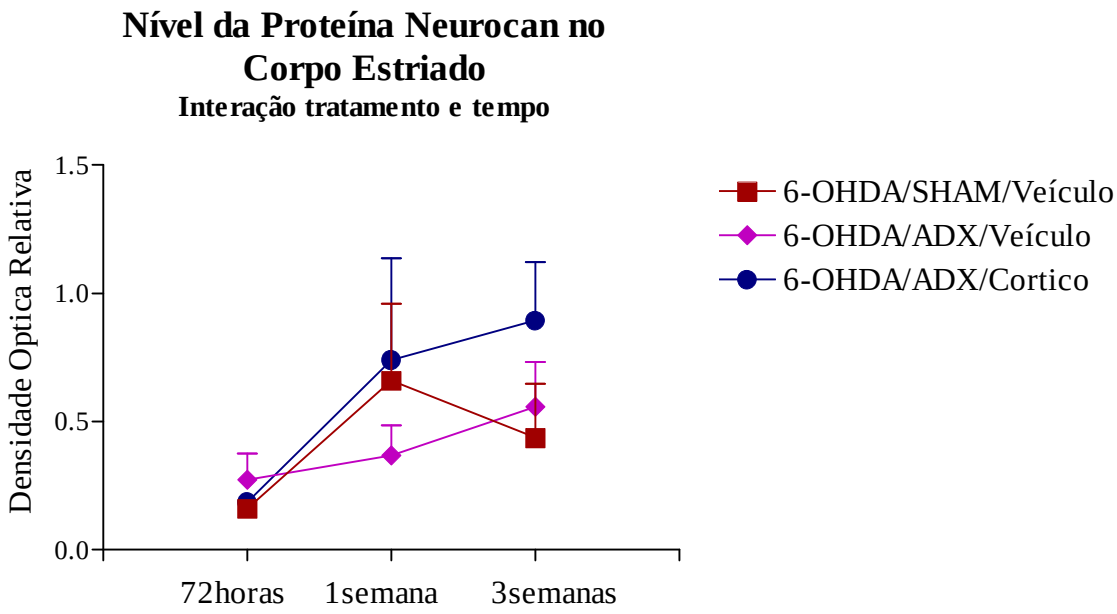


Figura 25: A figura mostra a evolução temporal dos grupos com relação ao nível da proteína neurocan, que foi quantificado através de densidade óptica relativa. Não observa-se diferenças entre os grupos com relação ao tratamento e ao tempo como mostra a tabela 8 abaixo.

Tabela 8. A tabela mostra o resultado da análise estatística da proteína Neurocan no corpo estriado entre os grupos experimentais segundo o teste ANOVA de duas vias, para verificar interação entre os grupos em relação ao tempo de lesão e ao tratamento.

—— não houve interação, representado através do pós teste de bonferroni.

Grupos	**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Veículo**	**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**	**6-OHDA/ADX/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**
Tempo	**p=0,1979; F=1,714**	**p=0,0626; F=3,044**	**p=0,0751; F=2,835**
Tratamento	**p=0,8905; F=0,01931**	**p=0,3462; F=0,9160**	**p=0,2469; F=1,397**
Interação	**p=0,4508; F=0,8190**	**p =0,6206; F=0,4848**	**p=0,4957; F= 0,7191**
	72 hs 1 semana 3 semanas	**72 hs 1 semana 3 semanas**	**72 hs 1 semana 3 semanas**
	—— —— ——	—— —— ——	—— —— ——

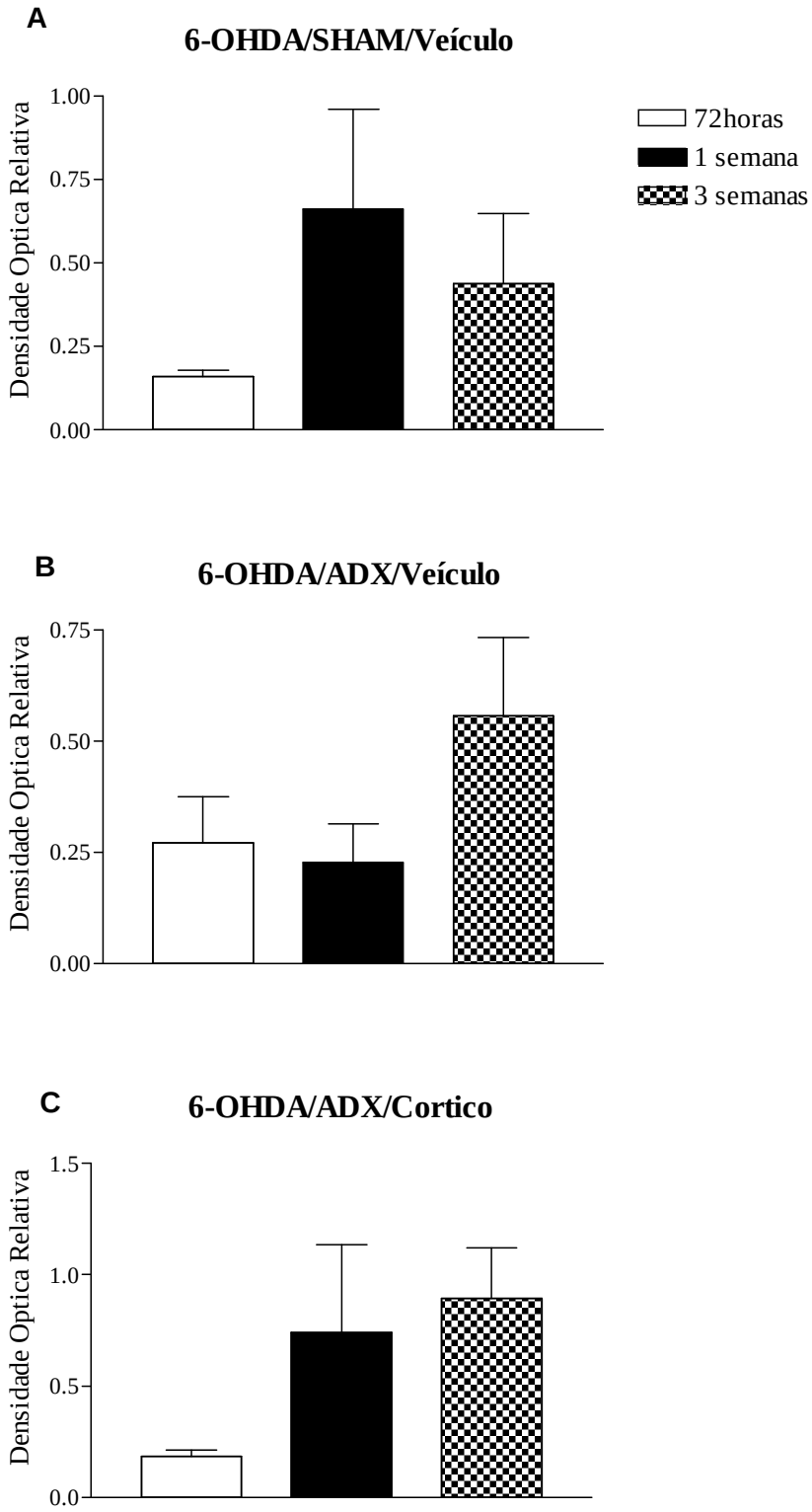


Figura 26: A figura mostra a expressão da proteína neurocan, no corpo estriado através da análise do teste ANOVA de medidas repetidas aplicando o pós teste de Tukey's, não observa-se diferença estatisticamente significante nos grupos analisados.

4.1.9 Níveis da proteína NG2 no Mesencéfalo Ventral

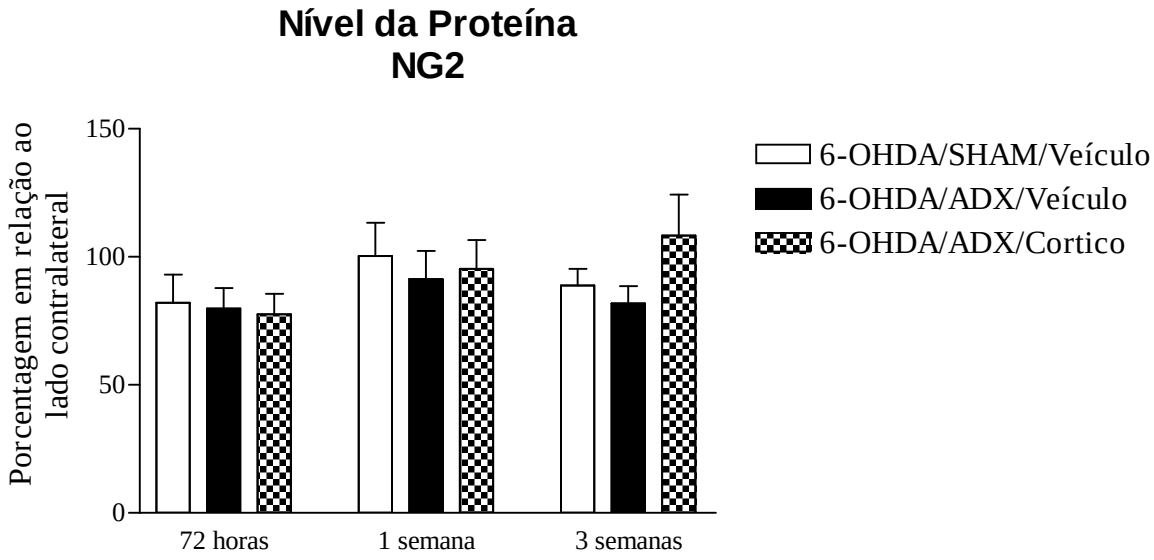
A figura 27A mostra a porcentagem do nível da proteína NG2 no lado ipsilateral do mesencéfalo ventral dos grupos 6-OHDA/SHAM/Veículo, 6-OHDA/ADX/Veículo e 6-OHDA/ADX/Cortico em relação ao lado contralateral respectivamente, 82,03%, 79,79% e 77,49% em 72 horas; 100,15%, 91,20% e 95,30% em 1 semana; 88,79%, 81,75% e 108,34% em 3 semanas, sem haver diferença estatisticamente significante.

Para uma análise do nível da proteína NG2 pelo efeito do tratamento, do tempo e da interação tratamento x tempo, foi realizado o teste ANOVA de duas vias cujo resultado está presente na tabela 9 e ilustrados na figura 28. Foi observada uma diferença no tempo de lesão nos três grupos analisados

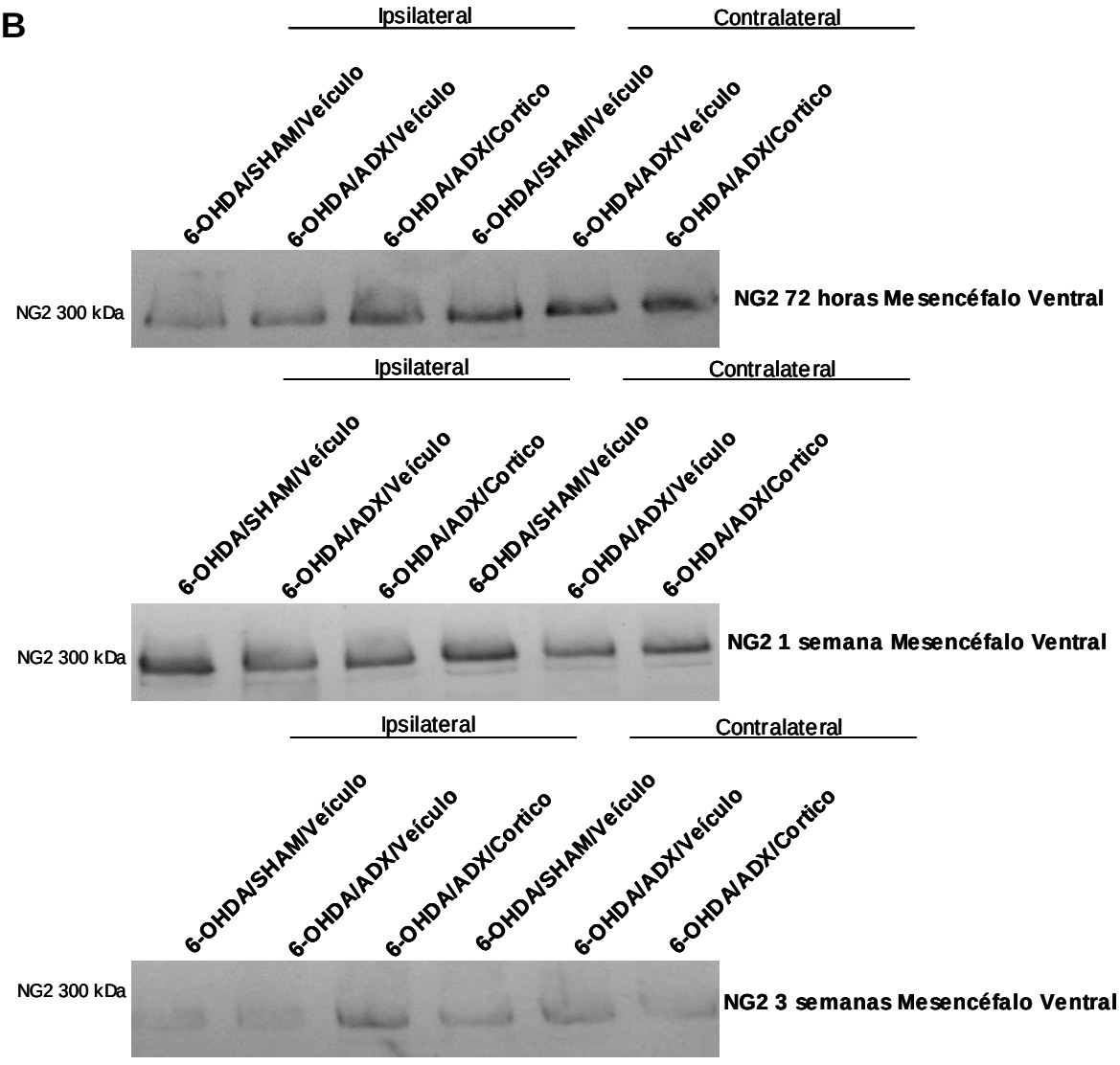
O teste ANOVA de uma via de medidas repetidas mostrou diferença da evolução temporal nos grupos 6-OHDA/SHAM/Veículo ($p=0,004$; $F=9,88$); 6-OHDA/ADX/Veículo ($p=0,005$; $F=9,06$); 6-OHDA/ADX/Cortico ($p=0,005$; $F=9,35$), como apresentado na figura 29.

Figura 27: A figura mostra a densidade óptica relativa do nível da proteína NG2 para avaliar o efeito da injeção nigral da 6-OHDA no mesencéfalo ventral (A e ilustrado na B). Observa-se na figura **A** os grupos estudados, comparando-se o lado ipsilateral com o lado contralateral em valores de porcentagem, onde o lado contralateral corresponde a 100% e os valores do lado ipsilateral estão demonstrados na figura. Não houve diferença estatisticamente significante segundo o teste t pareado. Na figura **B** é ilustrado o nível da proteína NG2 como base de comparação o lado contralateral.

A


Nível da Proteína
NG2
Porcentagem em relação ao lado contralateral
150
100
50
0
72 horas
1 semana
3 semanas
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico

B


Ipsilateral
Contralateral
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
NG2 300 kDa
NG2 72 horas Mesencéfalo Ventral
Ipsilateral
Contralateral
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
NG2 300 kDa
NG2 1 semana Mesencéfalo Ventral
Ipsilateral
Contralateral
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
NG2 300 kDa
NG2 3 semanas Mesencéfalo Ventral

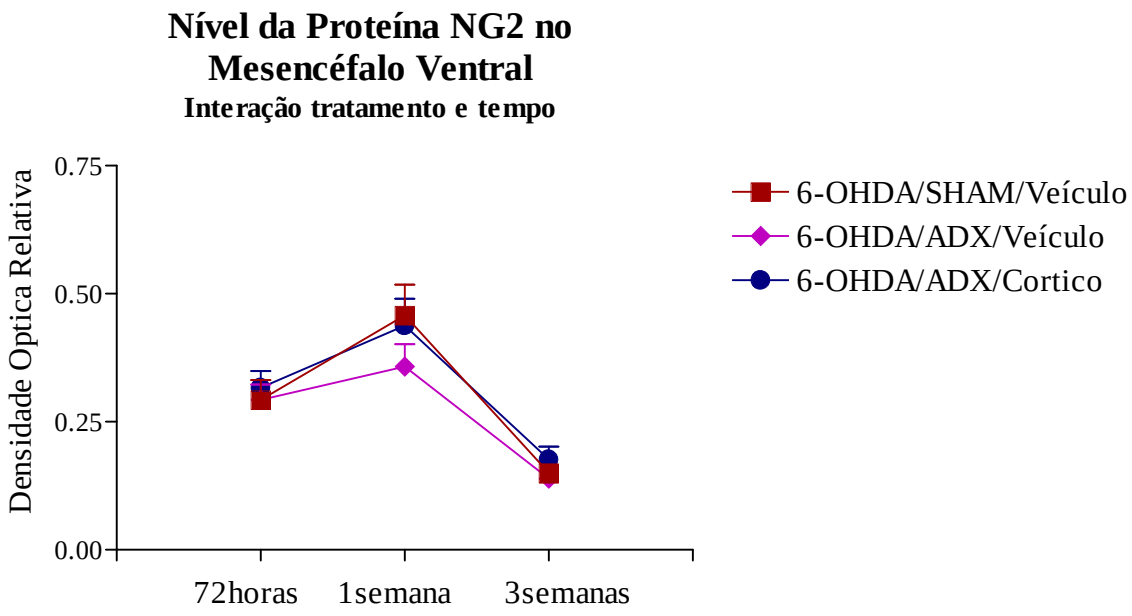


Figura 28: A figura mostra a evolução temporal dos grupos com relação ao nível da proteína NG2, que foi quantificada através de densidade óptica relativa. Observa-se uma diferença estatisticamente significante com relação ao tempo de lesão nos grupos estudados, como mostra a tabela 9 abaixo.

Tabela 9. Análise realizada pelo teste ANOVA de duas vias para verificar interação entre os grupos mediante o tratamento e o tempo. —— sem significância estatística, representado através do pós teste de bonferroni.

Grupos	**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Veículo**	**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**	**6-OHDA/ADX/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**
Tempo	**p=0,0001; F=25,65**	**p=0,0001; F=25,26**	**p=0,0001; F=24,26**
Tratamento	**p=0,2309; F=1,496**	**p=0,7656; F=0,09055**	**p=0,1120; F=2,682**
Interação	**p=0,3464; F=1,098**	**p=0,8173; F= 0,2031**	**p=0,7009; F= 0,3596**
	72 hs 1 semana 3 semanas	**72 hs 1 semana 3 semanas**	**72 hs 1 semana 3 semanas**
	—— —— ——	—— —— ——	—— —— ——

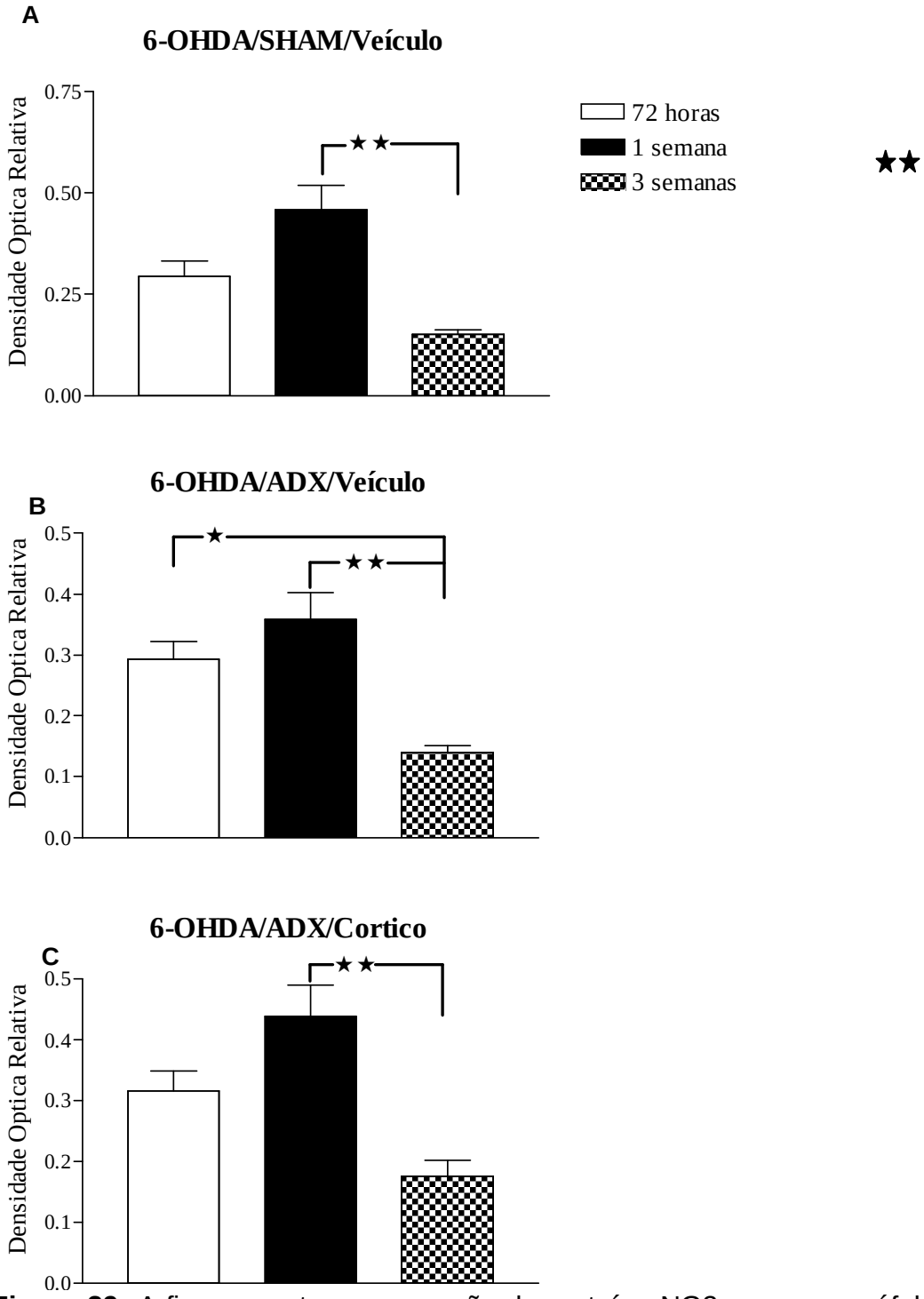


Figura 29: A figura mostra a expressão da proteína NG2, no mesencéfalo ventral através da análise do teste ANOVA de medidas repetidas aplicando o pós teste de Tukey's, observamos uma diferença estatisticamente significante nos grupos 6-OHDA/SHAM/Veículo, 6-OHDA/ADX/Veículo e 6-OHDA/ADX/Cortico ★★ $p<0,01$;

★ $p<0,05$.

4.1.10 Níveis da proteína NG2 no Corpo Estriado

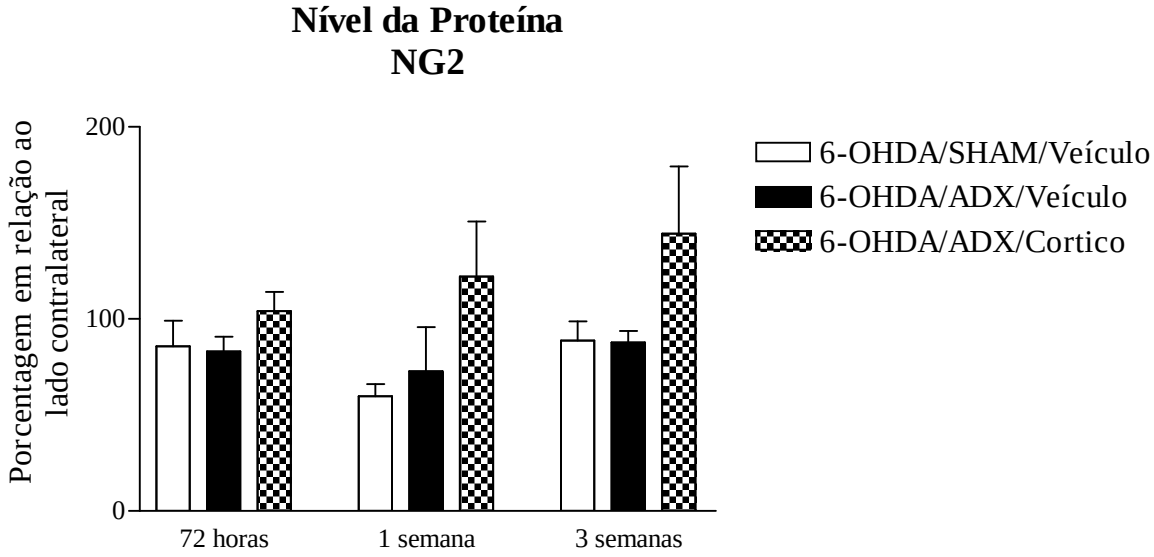
A figura 30A mostra, em porcentagem os níveis de NG2 no lado ipsilateral do corpo estriado dos grupos 6-OHDA/SHAM/Veículo, 6-OHDA/ADX/Veículo e 6-OHDA/ADX/Cortico em relação ao lado contralateral respectivamente, 85,59%, 83,08% e 104,02% em 72 horas; 59,64%, 72,62% e 122,06% em 1 semana; 88,76%, 87,62% e 144,40% em 3 semanas.

Os resultados do teste ANOVA de duas vias que avaliou o efeito do tempo, do tratamento e da interação tratamento x tempo são apresentados na figura 31 e tabela 10 e não mostrou diferença estatisticamente significante.

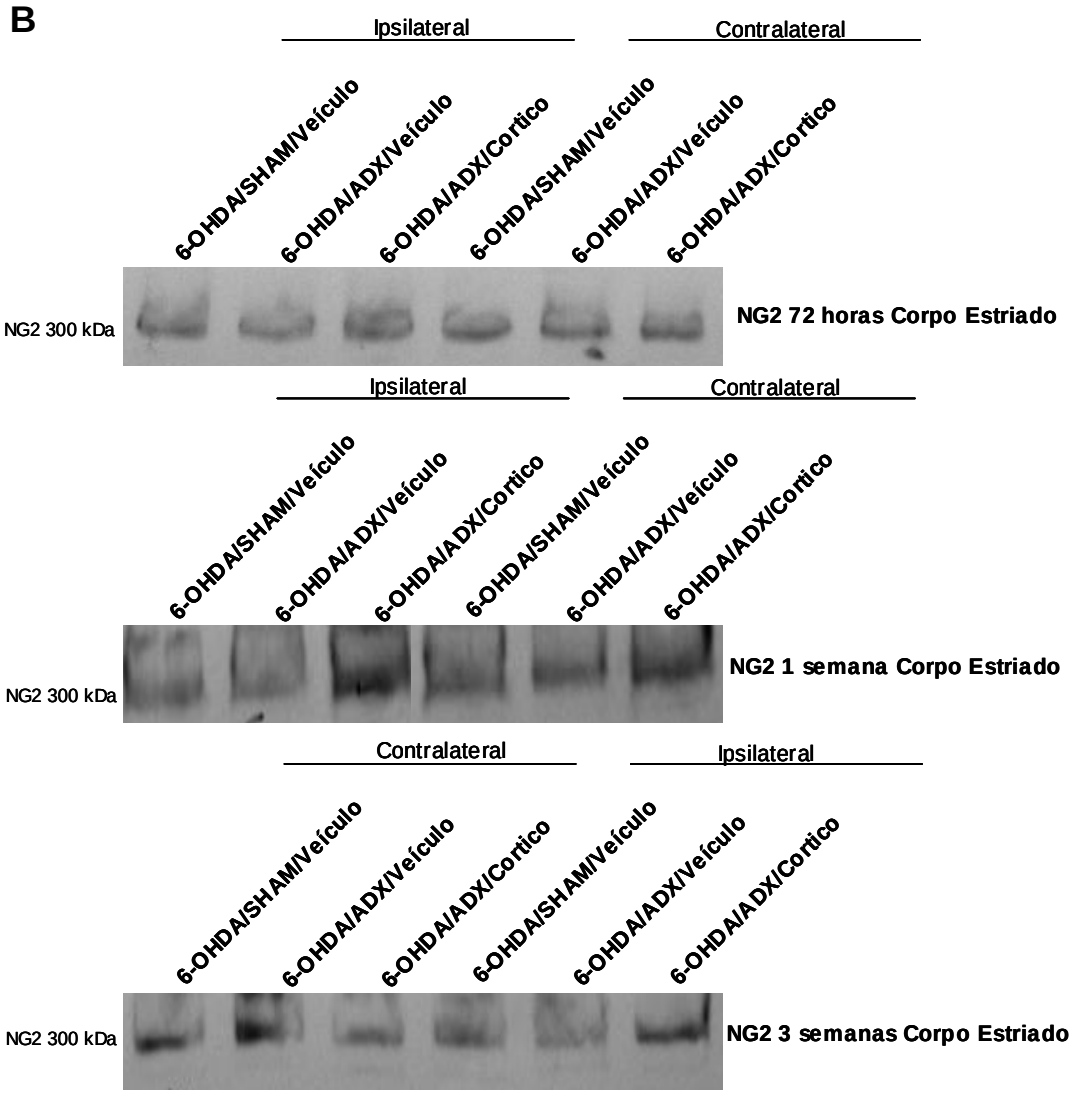
Avaliando os grupos separadamente, também não foi encontrada diferença estatisticamente significante em cada grupo analisado ao longo do tempo, 6-OHDA/SHAM/Veículo (p=0,1235; F=2,59); 6-OHDA/ADX/Veículo (p=0,2899; F=1,405); 6OHDA/ADX/Cortico (p=0,2323; F=1,695) (Fig. 32).

Figura 30: A figura mostra a densidade óptica relativa do nível da proteína NG2 para avaliar o efeito da injeção nigral da 6-OHDA na região do corpo estriado (A e ilustrado na B). Observa-se na figura **A** os grupos estudados, comparando-se o lado ipsilateral com o lado contralateral em valores de porcentagem, onde o lado contralateral corresponde a 100% e os valores do lado ipsilateral estão demonstrados na figura. Não houve diferença estatisticamente significante segundo o teste t pareado. Na figura **B** é ilustrado o nível da proteína NG2 como base de comparação o lado contralateral.

A


Nível da Proteína
NG2
Porcentagem em relação ao lado contralateral
200
100
0
72 horas
1 semana
3 semanas
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico

B


Ipsilateral
Contralateral
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
NG2 300 kDa
NG2 72 horas Corpo Estriado
NG2 1 semana Corpo Estriado
NG2 3 semanas Corpo Estriado

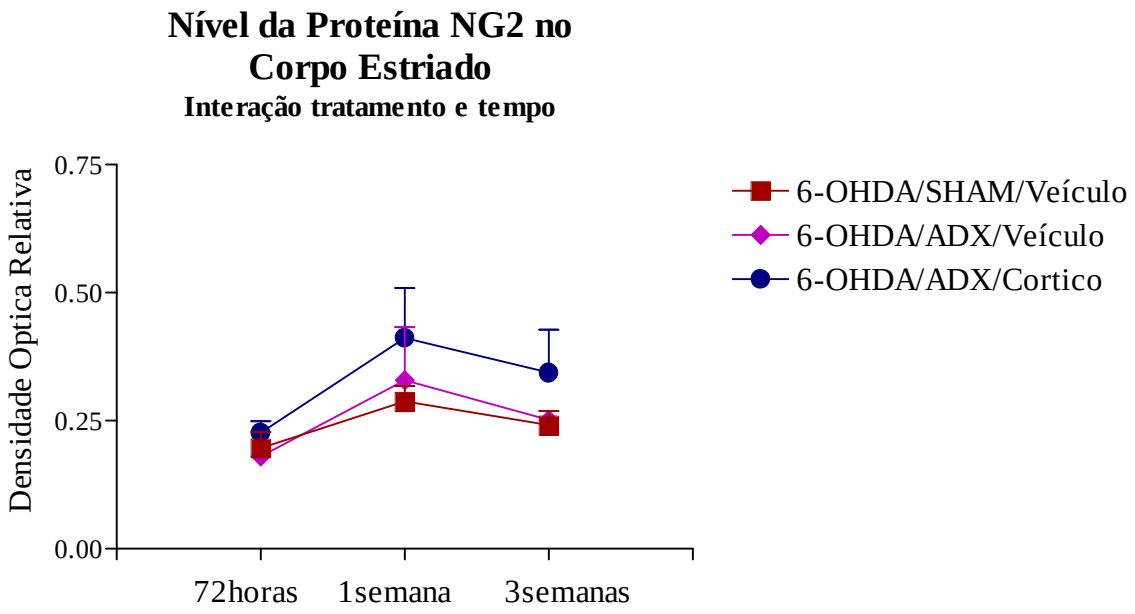


Figura 31: A figura mostra a evolução temporal dos grupos com relação ao nível da proteína NG2, que foi quantificada através de densidade óptica relativa, Não observa-se diferença estatisticamente significante, mas observa-se uma tendência com relação ao tempo nos grupos analisados, como mostra a tabela 10 abaixo.

Tabela 10. Análise realizada pelo teste ANOVA de duas vias para verificar interação entre os grupos mediante o tratamento e o tempo. —— sem significância estatística representado através do pós teste de bonferroni.

Grupos	**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Veículo**	**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**	**6-OHDA/ADX/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**
Tempo	**p=0,0623; F=3,049**	**p=0,0675; F=2,953**	**p=0,0662; F=2,976**
Tratamento	**p=0,7704; F=0,08677**	**p=0,0749; F=3,405**	**p=0,1950; F=1,757**
Interação	**p=0,8353; F=0,1810**	**p=0,6876; F= 0,3793**	**p=0,9379; F= 0,06427**
	72 hs 1 semana 3 semanas	**72 hs 1 semana 3 semanas**	**72 hs 1 semana 3 semanas**
	—— —— ——	—— —— ——	—— —— ——

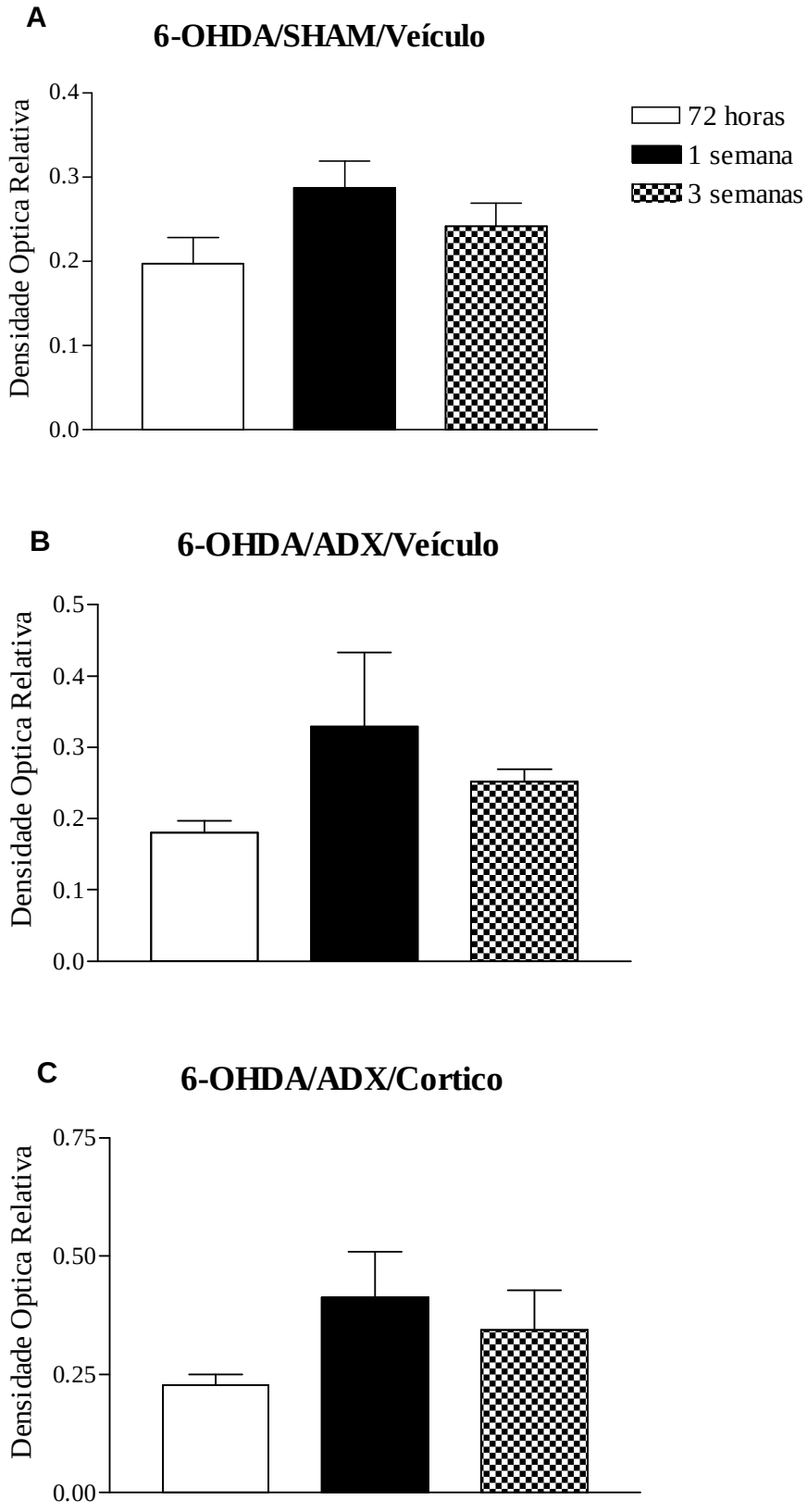


Figura 32: A figura mostra a expressão da proteína NG2, no corpo estriado através da análise do teste ANOVA de medidas repetidas aplicando o pós teste de Tukey's, não observa-se diferença estatisticamente significante nos grupos.

4.1.11 Níveis da Proteína Sulfato de Condroitina no Mesencéfalo Ventral

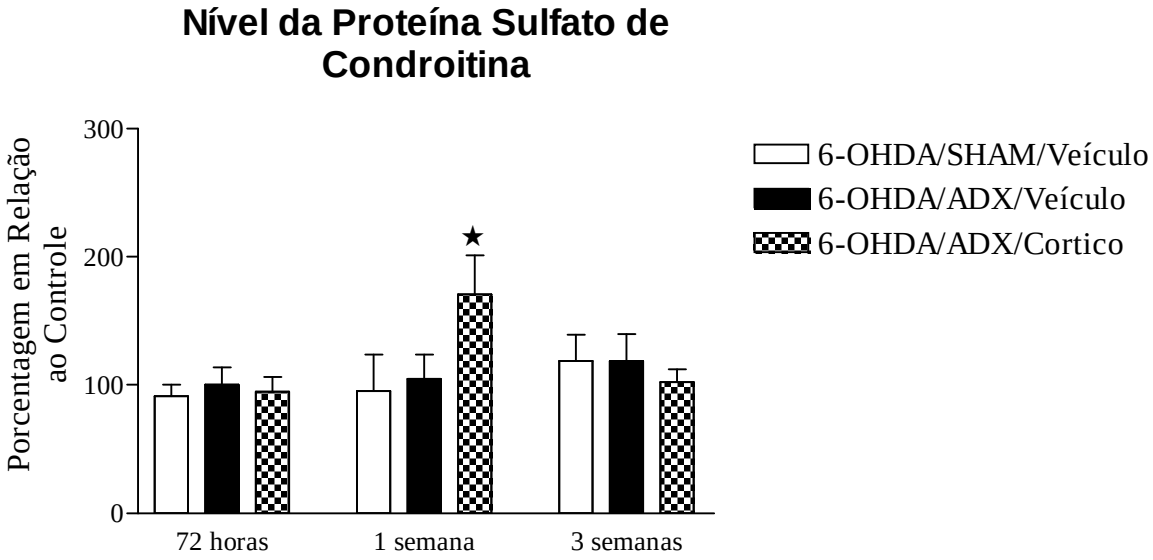
A figura 33A mostra as porcentagens dos níveis do Sulfato de Condroitina no lado ipsilateral do mesencéfalo ventral dos grupos 6-OHDA/SHAM/Veículo, 6-OHDA/ADX/Veículo e 6-OHDA/ADX/Cortico em relação ao lado contralateral respectivamente, 91,71%, 100,00% e 94,75% em 72 horas; 95,50%, 104,55% e 170,98% ($p<0,05$) em 1 semana; 118,61%, 118,54% e 102,23% em 3 semanas.

O teste ANOVA de uma via de medidas repetidas mostrou diferença da evolução temporal nos grupos 6-OHDA/ADX/Veículo ($p=0,0059$; $F=8,937$); 6-OHDA/ADX/Cortico ($p=0,0011$; $F=14,42$); não havendo diferenças na evolução no grupo 6-OHDA/SHAM/Veículo ($p=0,1165$; $F=2,687$) (Fig. 35).

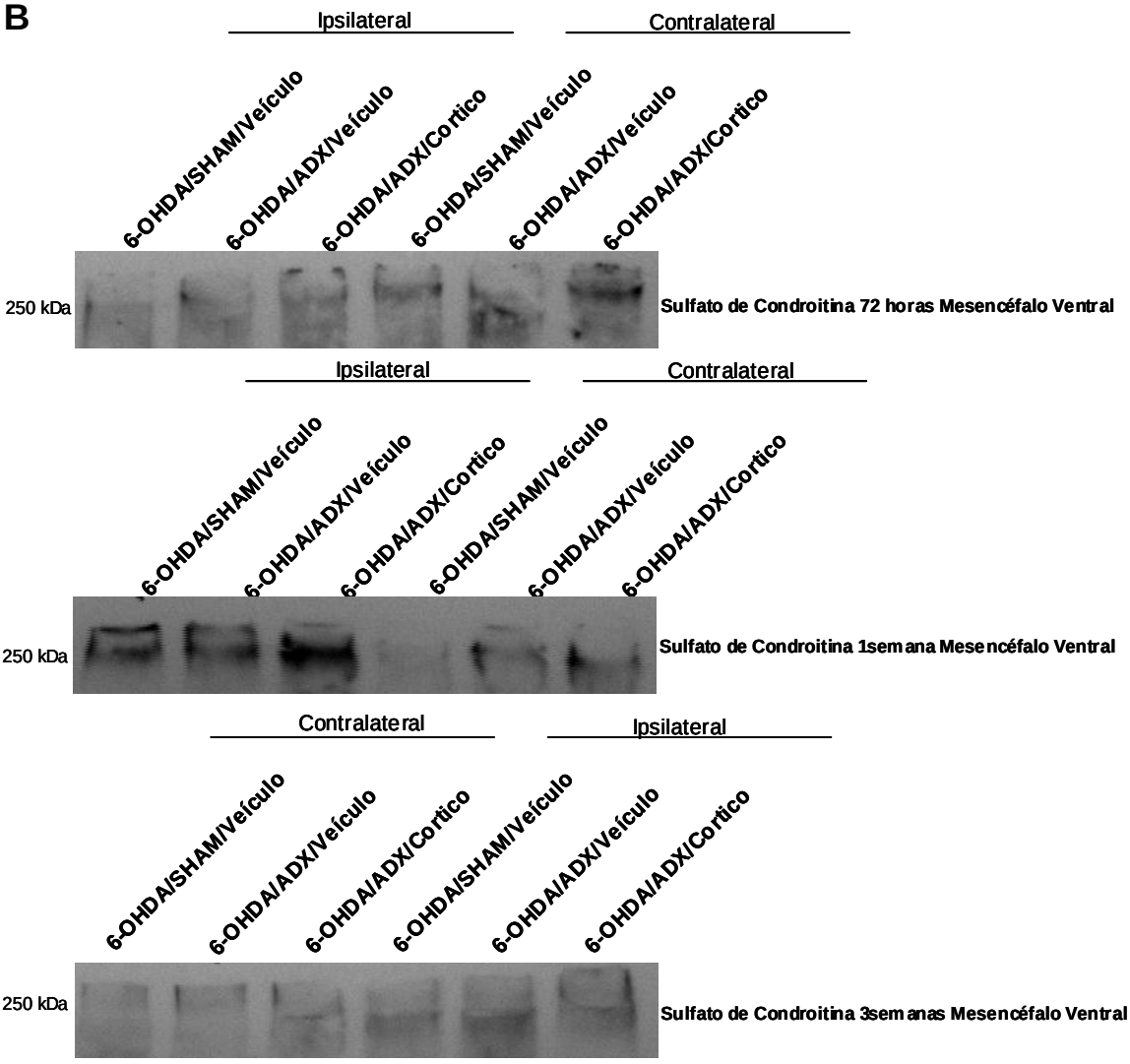
Os resultados do teste ANOVA de duas vias, representados na figura 34, avaliou o efeito do tempo, do tratamento e da interação tratamento x tempo que estão apresentados na tabela 11. Foi observada uma diferença no tempo nos três grupos analisados, não havendo estatística significante para interação tempo x tratamento e nos tratamentos realizados.

Figura 33: A figura mostra a densidade óptica relativa do nível da proteína Sulfato de Condroitina para avaliar o efeito da injeção nigral da 6-OHDA na região do mesencéfalo ventral (A e ilustrado na B). Observa-se na figura **A** os grupos estudados, comparando-se o lado ipsilateral com o lado contralateral em valores de porcentagem, onde o lado contralateral corresponde a 100% e os valores do lado ipsilateral estão demonstrados na figura. ; ★ $p<0,05$, representam diferenças segundo o teste t pareado. Na figura **B** é ilustrado o nível da proteína sulfato de condroitina como base de comparação o lado contralateral.

A


Nível da Proteína Sulfato de Condroitina
Porcentagem em Relação ao Controle
300
200
100
0
72 horas
1 semana
3 semanas
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico

B


Ipsilateral
Contralateral
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
250 kDa
Sulfato de Condroitina 72 horas Mesencéfalo Ventral
Ipsilateral
Contralateral
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
250 kDa
Sulfato de Condroitina 1semana Mesencéfalo Ventral
Contralateral
Ipsilateral
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
250 kDa
Sulfato de Condroitina 3semanas Mesencéfalo Ventral

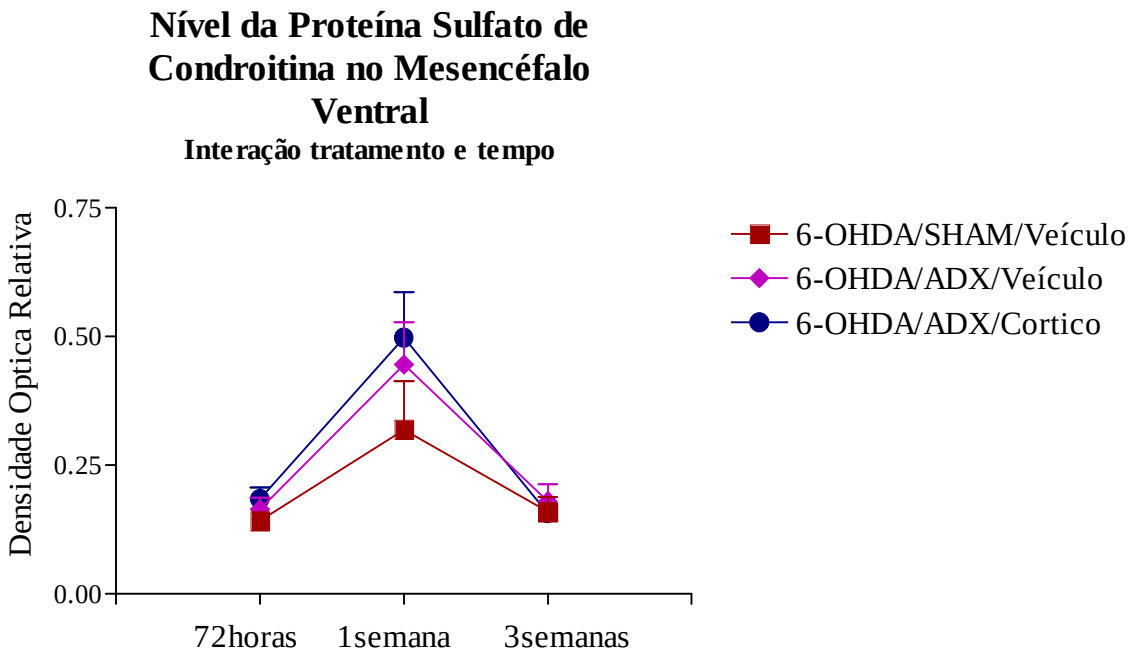


Figura 34: A figura mostra a evolução temporal dos grupos com relação ao nível da proteína sulfato de condroitina, que foi quantificada através de densidade óptica relativa. Observa-se diferença estatisticamente significante no tempo de lesão nos grupos estudados, como mostra a tabela 11 abaixo.

Tabela 11. Análise realizada pelo teste ANOVA de duas vias para verificar interação entre os grupos mediante o tratamento e o tempo. —— sem significância estatística, representado através do pós teste de bonferroni.

Grupos	**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Veículo**	**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**	**6-OHDA/ADX/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**
Tempo	**p=0,0003; F=10,74**	**p=0,0001; F=13,38**	**p=0,0001; F=21,40**
Tratamento	**p=0,2210; F=1,562**	**p=0,1193; F=2,571**	**p=0,7101; F=0,1409**
Interação	**p=0,5527; F=0,6048**	**p=0,2465; F=1,468**	**p=0,7717; F= 0,2614**
	72 hs 1 semana 3 semanas	**72 hs 1 semana 3 semanas**	**72 hs 1 semana 3 semanas**
	—— —— ——	—— —— ——	—— —— ——

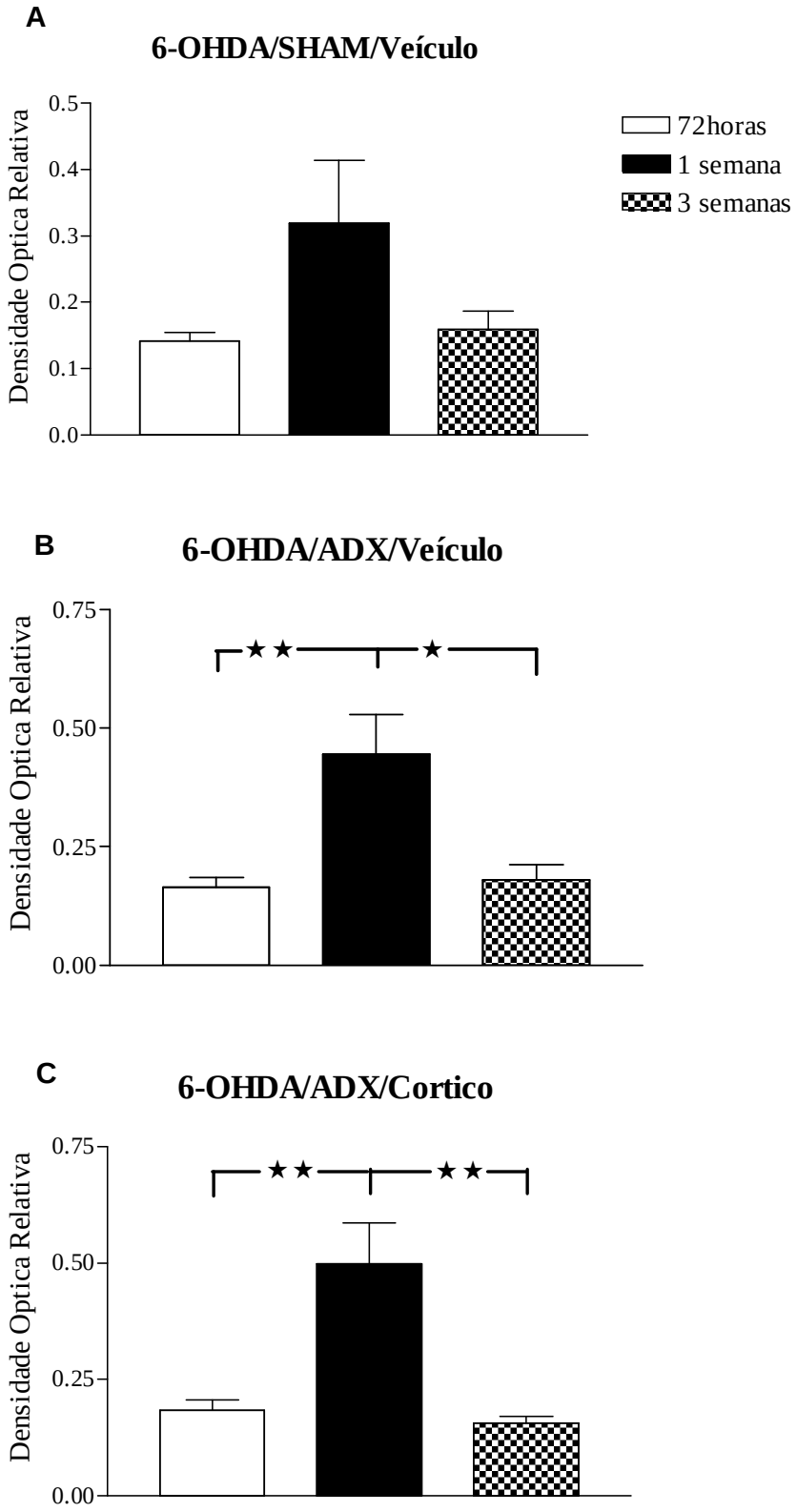


Figura 35: A figura mostra a expressão da proteína sulfato de condroitina,no mesencéfalo ventral através da análise do teste ANOVA de medidas repetidas aplicando o pós teste de Tukey's, observa-se uma diferença estatisticamente significante nos grupos 6-OHDA/ADX/Veículo (**B**) e 6-OHDA/ADX/Cortico(**C**) ★★ p<0,01; ★ p<0,05.

4.1.12 Níveis da Proteína Sulfato de Condroitina no Corpo Estriado

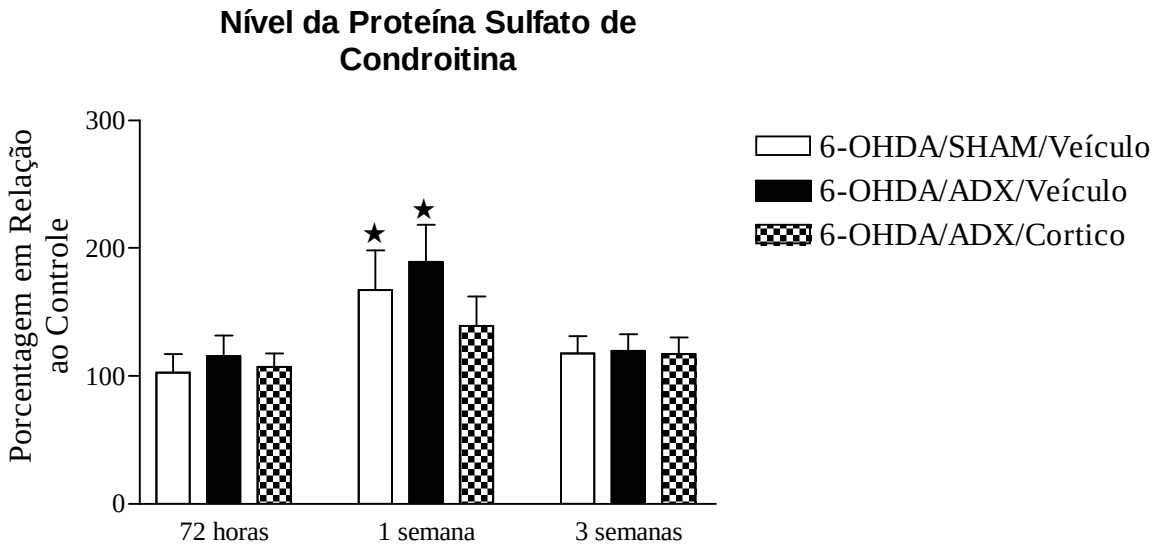
Na figura 36A pode-se observar que há um aumento da expressão do nível da proteína com 1 semana após a lesão nos grupos 6-OHDA/SHAM/Veículo e 6-OHDA/ADX/Veículo quando comparado com o lado contralateral. Os níveis de porcentagem do grupo ipsilateral a lesão dos grupos 6-OHDA/SHAM/Veículo, 6-OHDA/ADX/Veículo e 6-OHDA/ADX/Cortico em relação ao lado contralateral são respectivamente, 102,64%, 115,83%, 107,04% em 72 horas; 167,37%, 189,38%, 139,03% em 1 semana; 117,69%, 119,58%, 117,05% em 3 semanas.

Também observa-se pelo teste ANOVA de uma via de medidas repetidas mostrou diferença da evolução temporal nos grupos 6-OHDA/SHAM/Veículo ($p=0,0230$; $F=6,273$) e 6-OHDA/ADX/Veículo ($p=0,0065$; $F=10,09$). Ainda, o resultado do pós teste de Tukey's das comparações entre os grupos estão apresentados na figura 38.

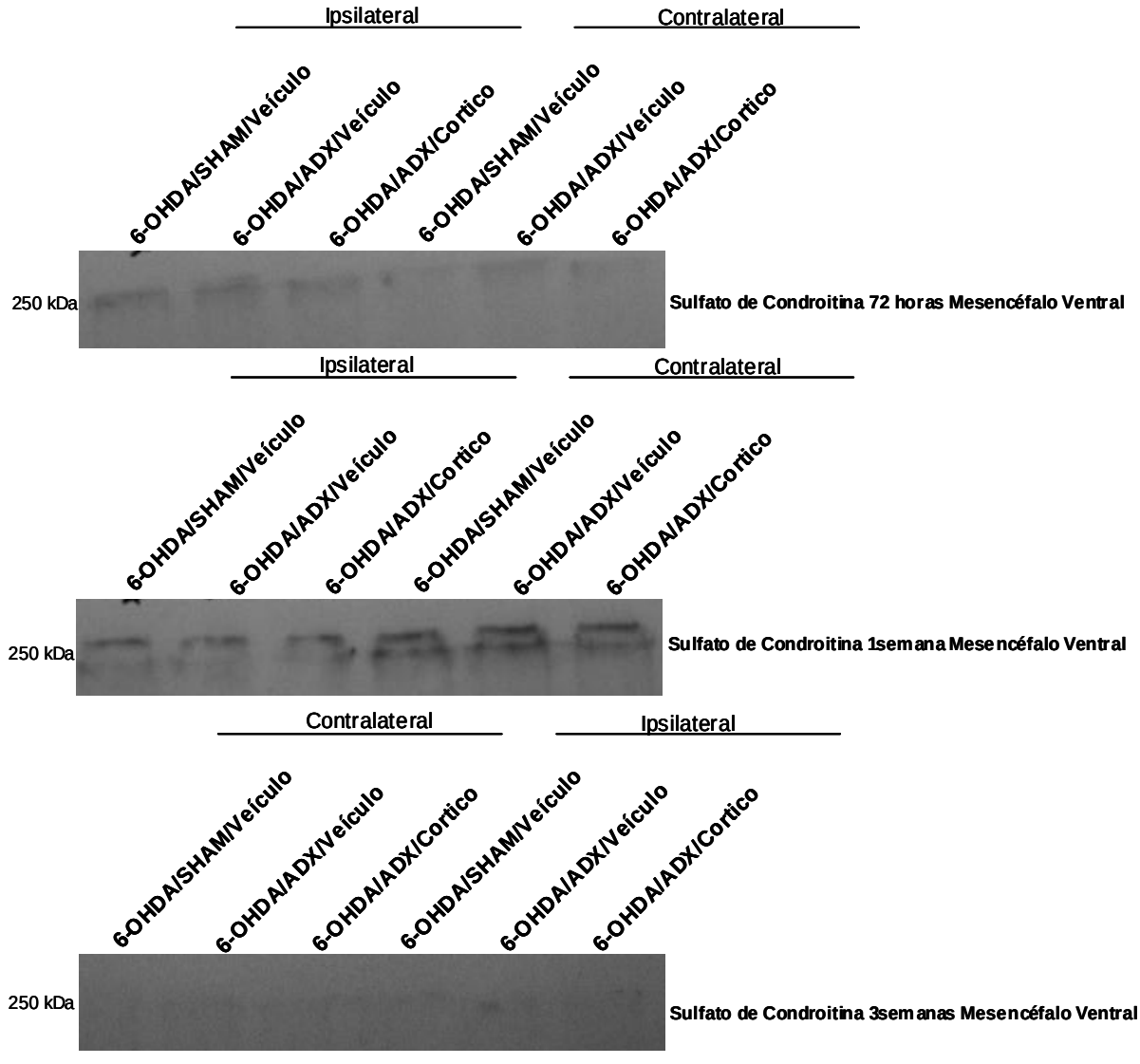
Os resultados do teste ANOVA de duas vias que avaliou o efeito do tempo, do tratamento e da interação tratamento x tempo são apresentados na tabela 12. Maior número de diferenças foi observado entre os três grupos 6-OHDA/ADX/Cortico x 6-OHDA/SHAM/Veículo, 6-OHDA/ADX/Veículo e 6-OHDA/ADX/Cortico no tempo de lesão (Fig. 37 e tabela 12).

Figura 36: A figura mostra a densidade óptica relativa do nível da proteína Sulfato de Condroitina para avaliar o efeito da injeção nigral da 6-OHDA na região do corpo estriado (A e ilustrado na B). Observa-se na figura **A** os grupos estudados, comparando-se o lado ipsilateral com o lado contralateral em valores de porcentagem, onde o lado contralateral corresponde a 100% e os valores do lado ipsilateral estão demonstrados na figura ★ $p<0,05$ representam diferenças segundo o teste t pareado. Na figura **B** é ilustrado o nível da proteína sulfato de condroitina como base de comparação o lado contralateral.

A


Nível da Proteína Sulfato de Condroitina
Porcentagem em Relação ao Controle
300
200
100
0
72 horas
1 semana
3 semanas
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico

B


Ipsilateral
Contralateral
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
250 kDa
Sulfato de Condroitina 72 horas Mesencéfalo Ventral
Ipsilateral
Contralateral
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
250 kDa
Sulfato de Condroitina 1semana Mesencéfalo Ventral
Contralateral
Ipsilateral
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
250 kDa
Sulfato de Condroitina 3semanas Mesencéfalo Ventral

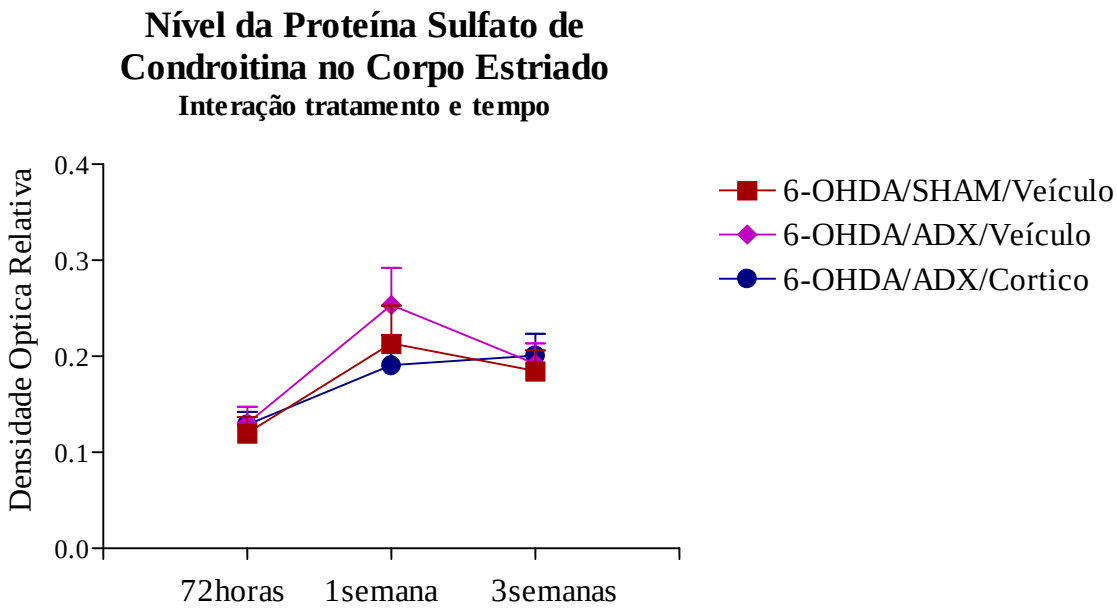


Figura 37: A figura mostra a evolução temporal dos grupos com relação ao nível da proteína Sulfato de Condroitina, que foi quantificada através de densidade óptica relativa. Observa-se diferença estatisticamente significante no tempo de lesão , como mostra a tabela 12 abaixo.

Tabela 12. Análise realizada pelo teste ANOVA de duas vias para verificar interação entre os grupos mediante o tratamento e o tempo. —— sem significância estatística, representado através do pós teste de bonferroni.

Grupos	**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Veículo**	**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**	**6-OHDA/ADX/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**
Tempo	**p=0,0021; F=7,729**	**p=0,0108; F=5,344**	**p=0,0034; F=6,995**
Tratamento	**p=0,4187; F=0,6737**	**p=0,9661; F=0,001836**	**p=0,4030; F=0,7210**
Interação	**p=0,8141; F=0,2072**	**p=0,7379; F=0,3072**	**p=0,3444; F= 1,108**
	72 hs 1 semana 3 semanas	**72 hs 1 semana 3 semanas**	**72 hs 1 semana 3 semanas**
	—— —— ——	—— —— ——	—— —— ——

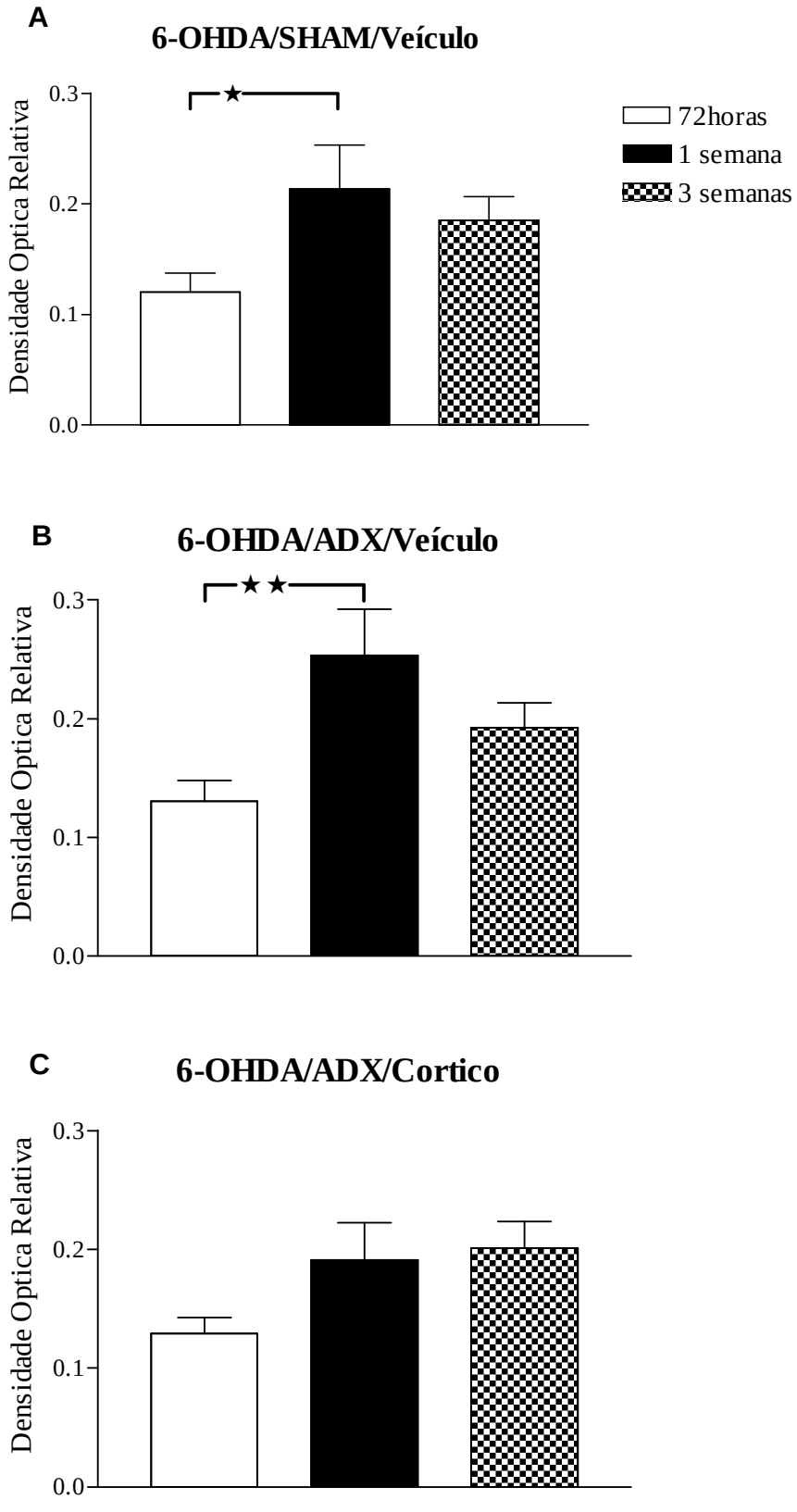


Figura 38: A figura mostra a expressão da proteína sulfato de condroitina, no corpo estriado através da análise do teste ANOVA de medidas repetidas aplicando o pós teste de Tukey's, observa-se uma diferença estatisticamente significante nos grupos 6-OHDA/SHAM/Veículo (**A**) e 6-OHDA/ADX/Veículo(**B**) ★★ p<0,01; ★ p<0,05.

4.1.13 Níveis da Proteína Laminina no Mesencéfalo Ventral

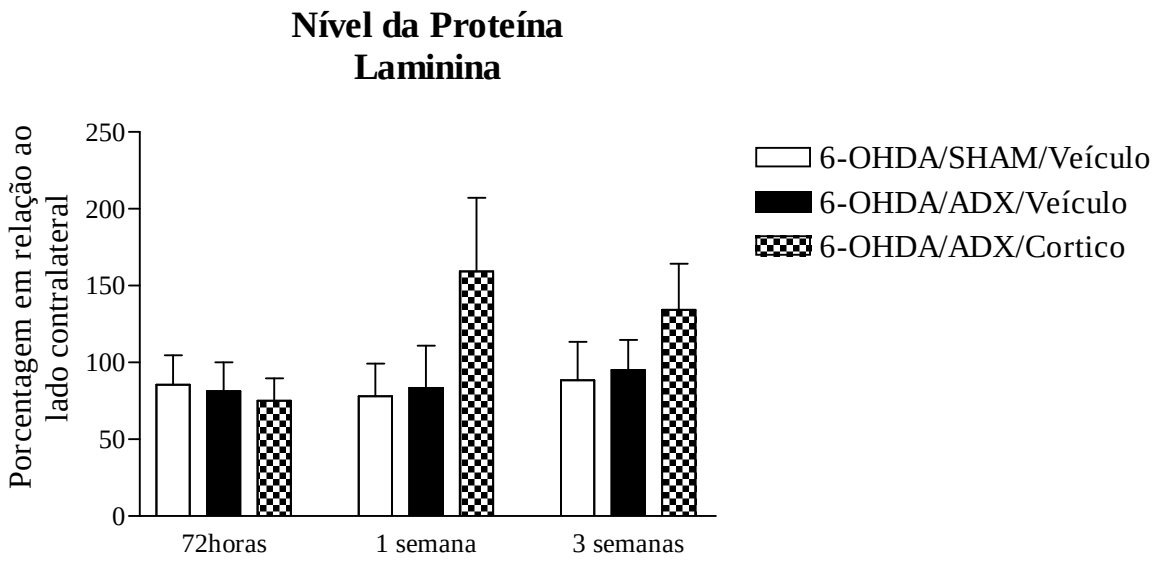
A figura 39A mostra em porcentagens os níveis da proteína Laminina no lado ipsilateral do mesencéfalo ventral dos grupos 6-OHDA/SHAM/Veículo, 6-OHDA/ADX/Veículo e 6-OHDA/ADX/Cortico em relação ao lado contralateral respectivamente, 85,35%, 81,43% e 74,93% em 72 horas; 77,99%, 83,47% e 159,07% em 1 semana; 88,51%, 94,90% e 134,05% em 3 semanas.

O teste ANOVA de uma via de medidas repetidas não mostrou diferença da evolução temporal nos grupos 6-OHDA/SHAM/Veículo (p=0,1266; F=2,705); 6-OHDA/ADX/Veículo (p=0,2590; F=1,551); 6-OHDA/ADX/Cortico (p=0,1936; F=2,031) (Fig.41)

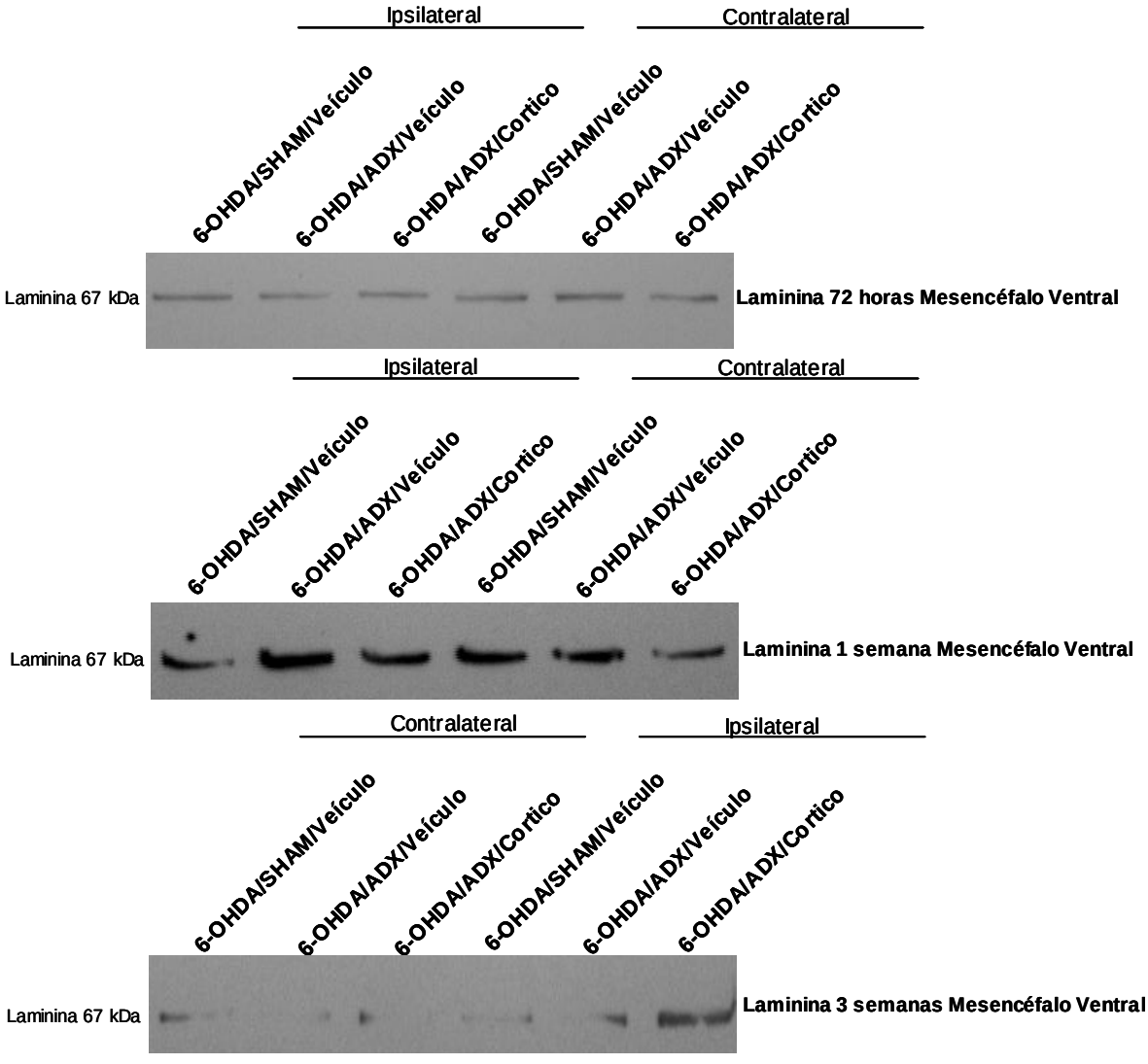
Também não foi encontrada diferença estatisticamente significante quando aplicado o teste ANOVA de duas vias para avaliação do efeito do tempo, do tratamento e da interação tratamento x tempo (Figura 40 e tabela 13).

Figura 39: A figura mostra a densidade óptica relativa do nível da proteína Laminina para avaliar o efeito da injeção nigral da 6-OHDA na região do mesencéfalo ventral (A e ilustrado na B). Observa-se na figura **A** os grupos estudados, comparando-se o lado ipsilateral com o lado contralateral em valores de porcentagem, onde o lado contralateral corresponde a 100% e os valores do lado ipsilateral estão demonstrados na figura. Na figura **B** é ilustrado o nível da proteína laminina como base de comparação o lado contralateral.

A


Nível da Proteína
Laminina
Porcentagem em relação ao lado contralateral
250
200
150
100
50
0
72horas
1 semana
3 semanas
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico

B


Ipsilateral
Contralateral
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
Laminina 67 kDa
Laminina 72 horas Mesencéfalo Ventral
Laminina 1 semana Mesencéfalo Ventral
Laminina 3 semanas Mesencéfalo Ventral

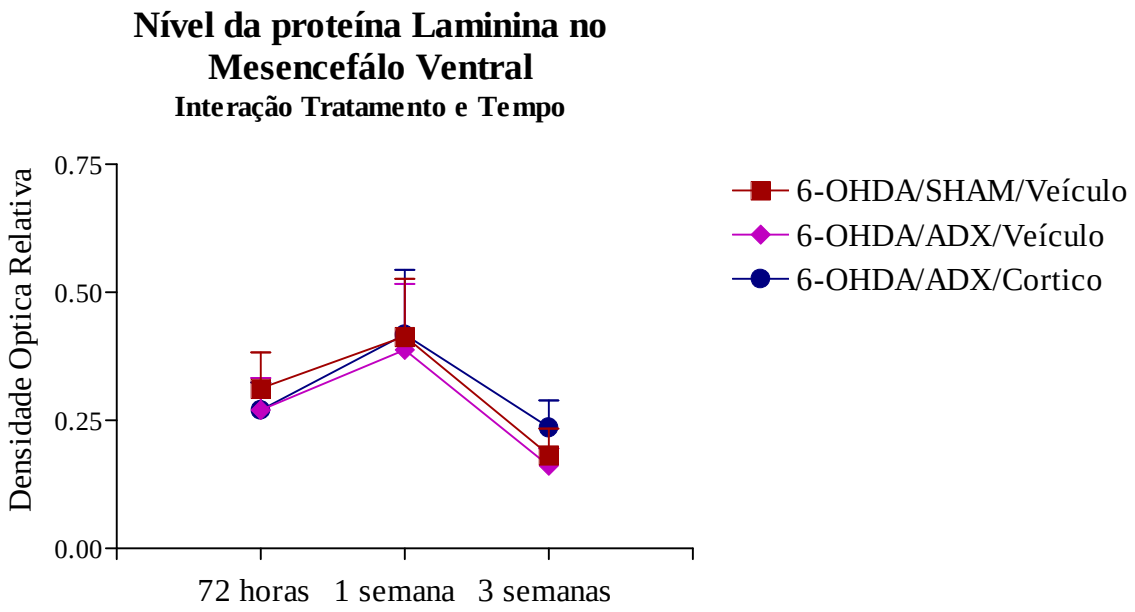


Figura 40: A figura mostra a evolução temporal dos grupos com relação ao nível da proteína Laminina, que foi quantificada através de densidade óptica relativa. Observa-se um diferença estatisticamente significante e uma tendência como mostra a tabela 13 abaixo.

Tabela 13. Análise realizada pelo teste ANOVA de duas vias para verificar interação entre os grupos mediante o tratamento e o tempo. —— sem significância estatística, representado através do pós teste de bonferroni.

Grupos	**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Veículo**	**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**	**6-OHDA/ADX/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**
Tempo	**p=0,0523; F=3,284**	**p=0,0793; F=2,778**	**p=0,0872; F=2,665**
Tratamento	**p=0,6869; F=0,1659**	**p=0,9408; F=0,005624**	**p=0,6383; F=0,2259**
Interação	**p=0,9920; F=0,007998**	**p=0,8659; F= 0,1447**	**p=0,9190; F=0,08468**
	72 hs 1 semana 3 semanas	**72 hs 1 semana 3 semanas**	**72 hs 1 semana 3 semanas**
	—— —— ——	—— —— ——	—— —— ——

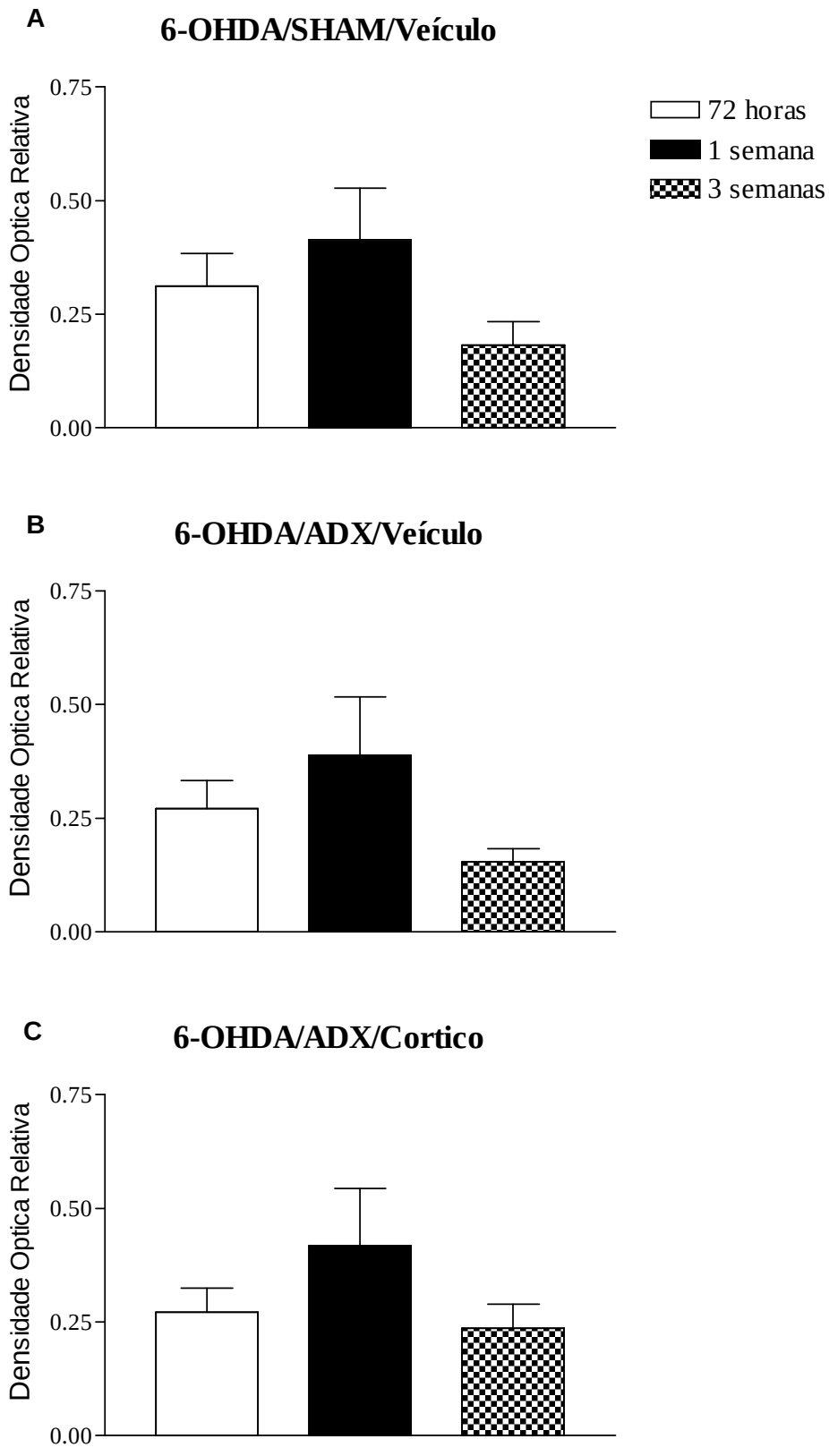


Figura 41: A figura mostra a expressão da proteína Laminina, no mesencéfalo ventral através da análise do teste ANOVA de medidas repetidas aplicando o pós teste de Tukey's, não observa-se diferença estatisticamente significante nos grupos analisados.

4.1.14 Níveis da proteína Laminina no Corpo Estriado

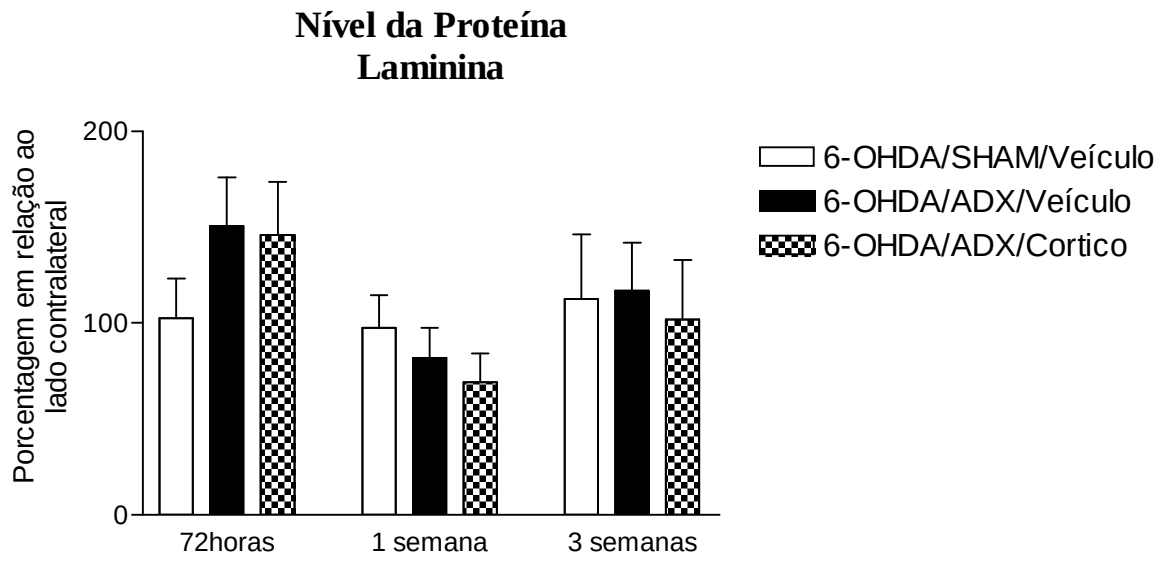
A figura 42A mostra em porcentagens dos níveis da proteína Laminina no lado ipsilateral do corpo estriado dos grupos 6-OHDA/SHAM/Veículo, 6-OHDA/ADX/Veículo e 6-OHDA/ADX/Cortico em relação ao lado contralateral respectivamente, 102,48%, 150,50% e 145,88% em 72 horas; 97,53%, 81,90% e 69,30% em 1 semana; 112,56%, 116,7% e 101,78% em 3 semanas.

O teste ANOVA de uma via de medidas repetidas mostrou diferença da evolução temporal nos períodos de 72 horas e 1 semana nos grupos 6-OHDA/SHAM/Veículo ($p=0,0425$; $F= 4,402$); 6-OHDA/ADX/Veículo ($p= 0,0173$; $F= 6,261$); o que não ocorreu no grupo 6-OHDA/ADX/Cortico ($p= 0,3729$; $F= 1,091$) (Fig. 44). Ainda, o resultado do pós teste de Tukey's das comparações entre os grupos estão apresentados na figura 44.

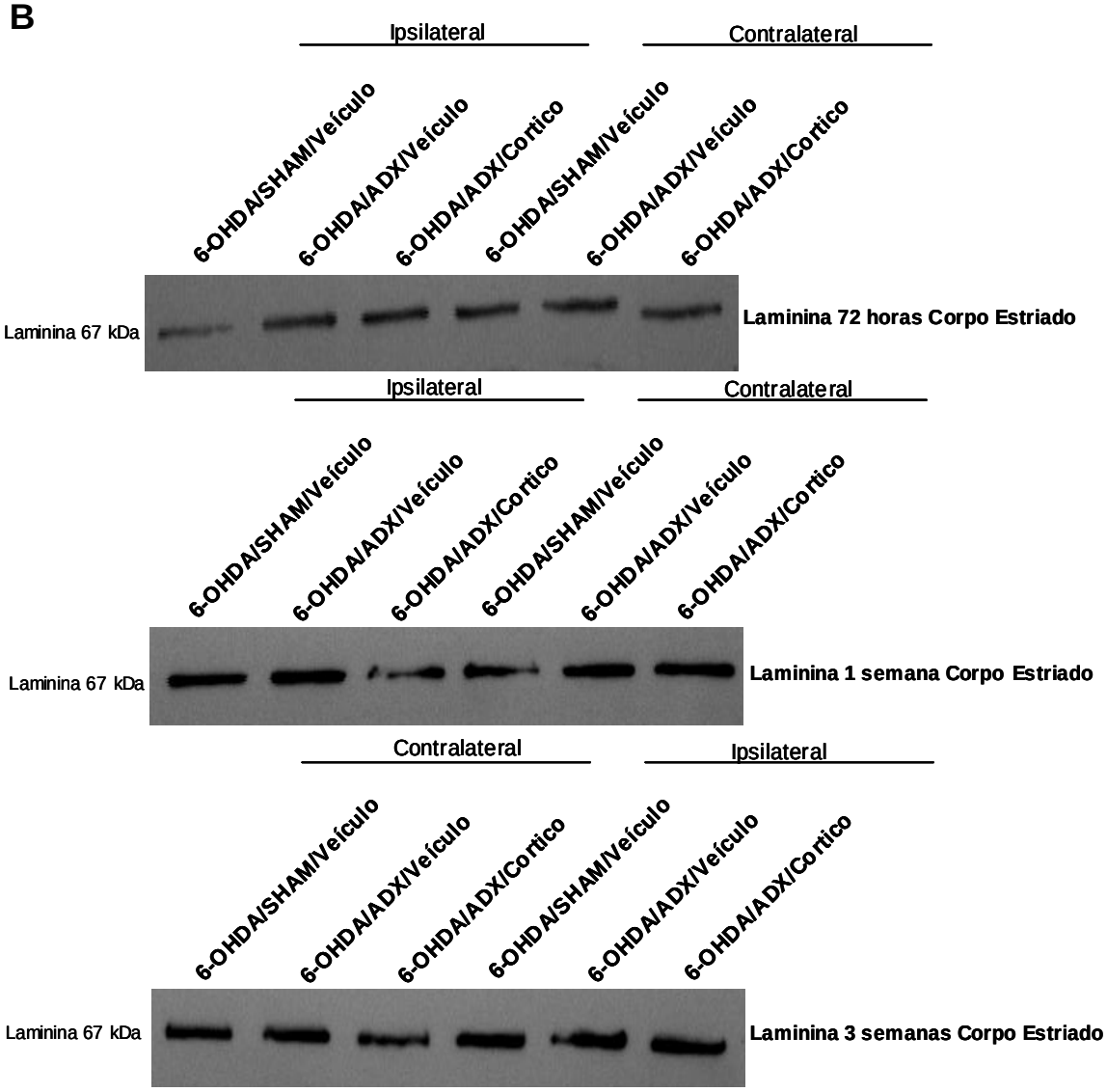
Os resultados dos níveis de Laminina nos grupos experimentais e nos períodos estudados são apresentados na figura 43. Os resultados do teste ANOVA de duas vias que avaliou o efeito do tempo, do tratamento e da interação tratamento x tempo são apresentados na tabela 14. Observa-se que houve diferenças no tempo de tratamento nos três grupos analisados.

Figura 42: A figura mostra a densidade óptica relativa do nível da proteína Laminina para avaliar o efeito da injeção nigral da 6-OHDA na região do corpo estriado (A e ilustrado na B). Observa-se na figura **A** os grupos estudados, comparando-se o lado ipsilateral com o lado contralateral em valores de porcentagem, onde o lado contralateral corresponde a 100% e os valores do lado ipsilateral estão demonstrados na figura. Na figura **B** é ilustrado o nível da proteína laminina como base de comparação o lado contralateral.

A


Nível da Proteína
Laminina
Porcentagem em relação ao lado contralateral
200
100
0
72horas
1 semana
3 semanas
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico

B


Ipsilateral
Contralateral
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
Laminina 67 kDa
Laminina 72 horas Corpo Estriado
Ipsilateral
Contralateral
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
Laminina 67 kDa
Laminina 1 semana Corpo Estriado
Contralateral
Ipsilateral
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
6-OHDA/SHAM/Veículo
6-OHDA/ADX/Veículo
6-OHDA/ADX/Cortico
Laminina 67 kDa
Laminina 3 semanas Corpo Estriado

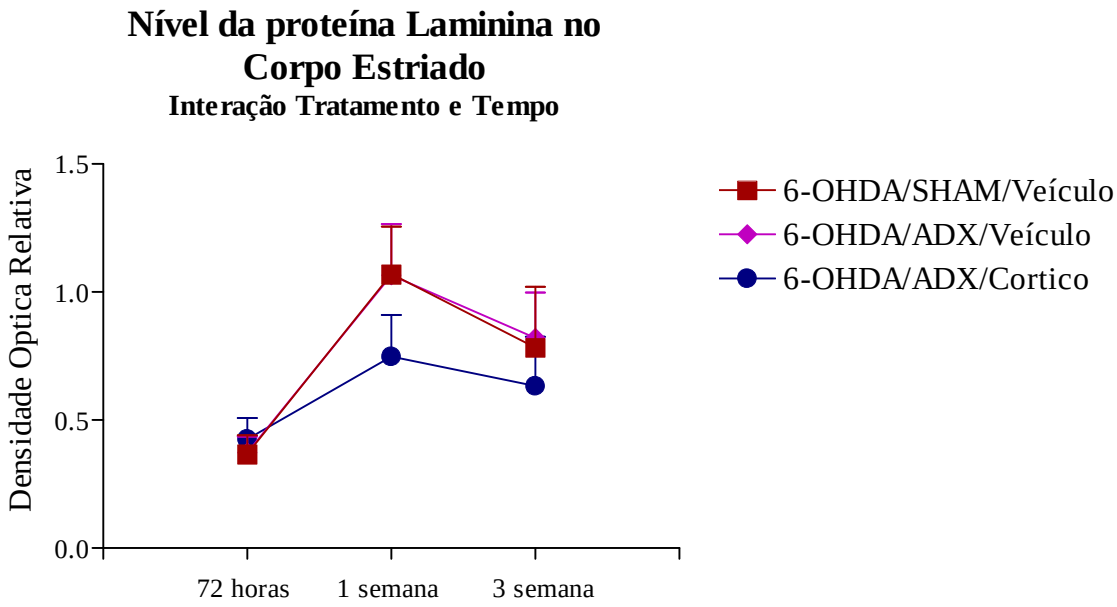


Figura 43: A figura mostra a evolução temporal dos grupos com relação ao nível da proteína Laminina, que foi quantificada através de densidade óptica relativa. Observa-se uma diferença estatisticamente significante com relação ao tempo nos grupos analisados como mostra a tabela 14 abaixo.

Tabela 14. Análise realizada pelo teste ANOVA de duas vias para verificar interação entre os grupos mediante o tratamento e o tempo. —— sem significância estatística, representado através do pós teste de bonferroni.

Grupos	**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Veículo**	**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**	**6-OHDA/ADX/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**
Tempo	**p=0,0011; F=8,683**	**p=0,0151; F=4,838**	**p=0,0097; F=5,438**
Tratamento	**p=0,9324; F=0,007309**	**p=0,3187; F=1,028**	**p=0,2505; F=1,373**
Interação	**p=0,9923; F=0,007755**	**p=0,5247; F=0,6591**	**p=0,4920; F=0,7264**
	72 hs 1 semana 3 semanas	**72 hs 1 semana 3 semanas**	**72 hs 1 semana 3 semanas**
	—— —— ——	—— —— ——	—— —— ——

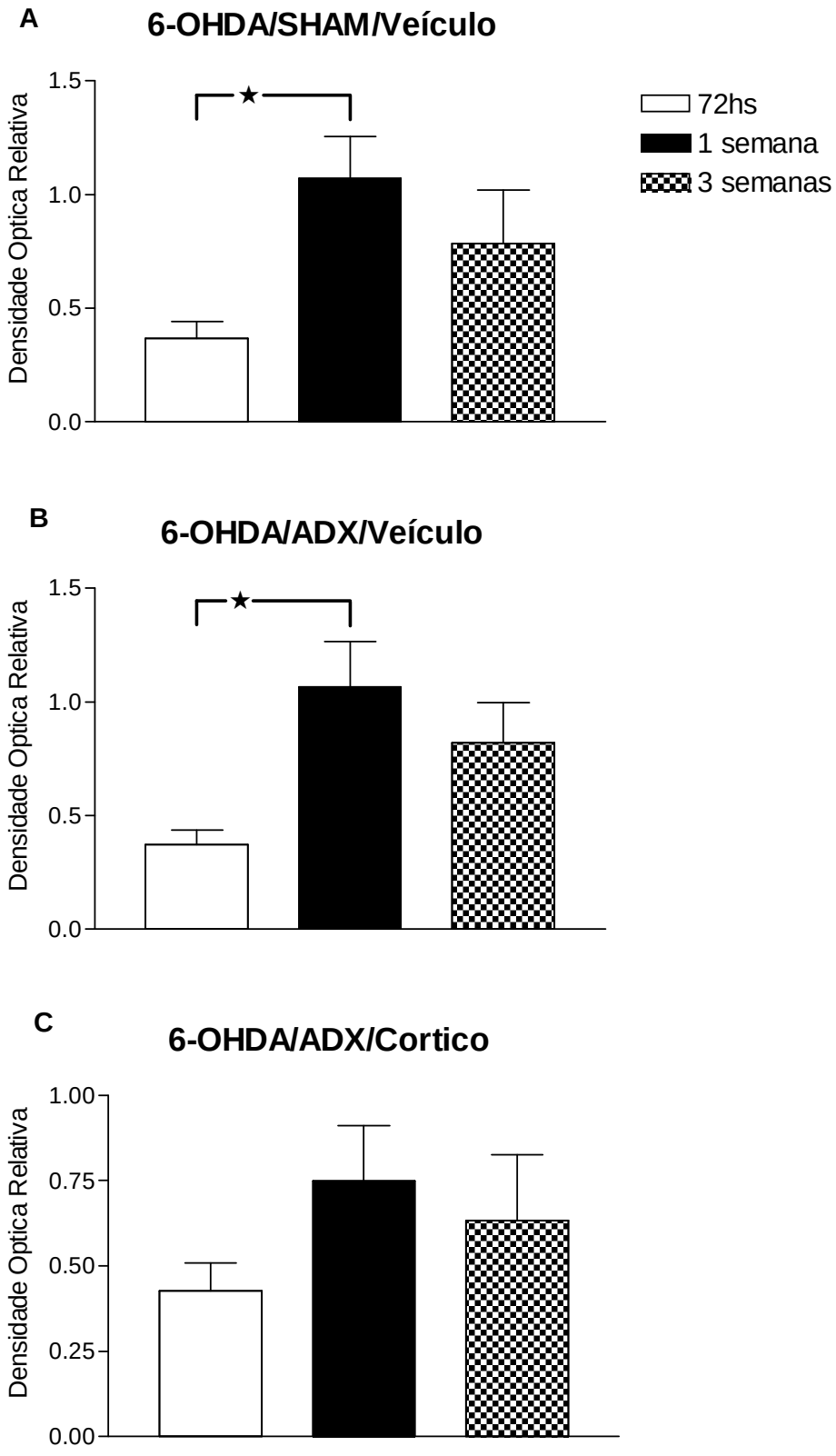


Figura 44: A figura mostra a expressão da proteína Laminina, no corpo estriado através da análise do teste ANOVA de medidas repetidas aplicando o pós teste de Tukey's. Observa-se diferença estatisticamente significante nos grupos 6-OHDA/SHAM/Veículo e 6-OHDA/ADX/Veículo. ★ $p<0,05$.

4.1.15 Nível da proteína FGF-2 no Mesencéfalo Ventral

A figura 45 mostra em porcentagens dos níveis da proteína FGF-2 no lado ipsilateral do mesencéfalo ventral dos grupos 6-OHDA/SHAM/Veículo, 6-OHDA/ADX/Veículo e 6-OHDA/ADX/Cortico em relação ao lado contralateral respectivamente, 45,79%, 91,98% e 100,54% em 72 horas; 129,77%, 87,93% e 94,87% em 1 semana; 74,44%, 85,15% e 88,35% em 3 semanas.

Os resultados dos níveis de FGF-2 nos grupos experimentais e nos períodos estudados são apresentados na figura 46. Os resultados do teste ANOVA de duas vias que avaliou o efeito do tempo, do tratamento e da interação tratamento x tempo são apresentados na tabela 15. Observa-se que não houve diferenças no tempo, no tratamento e na interação dos três grupos analisados.

Observamos uma maior diferença nos animais com 1 semana após a injeção unilateral de 6-OHDA (Fig. 47), o que elevou o nível de FGF-2 (23kDa) no mesencéfalo ventral na região ipsilateral do grupo 6-OHDA/SHAM/Veículo ($p<0,05$) quando comparado com a região contralateral, não ocorrendo o mesmo fenômeno nos demais grupos. Observa-se também que em 1 semana na região ipsilateral houve uma diminuição da expressão de FGF-2 no grupo 6-OHDA/ADX/Veículo (25%) que foi revertida totalmente quando há reposição de corticosterona nesses animais (grupo 6-OHDA/ADX/Cortico). Na região contralateral também observamos uma diferença estatisticamente significante entre o grupo 6-OHDA/SHAM/Veículo x 6-OHDA/ADX/Cortico ($p<0,05$) (Fig. 47 A e B).

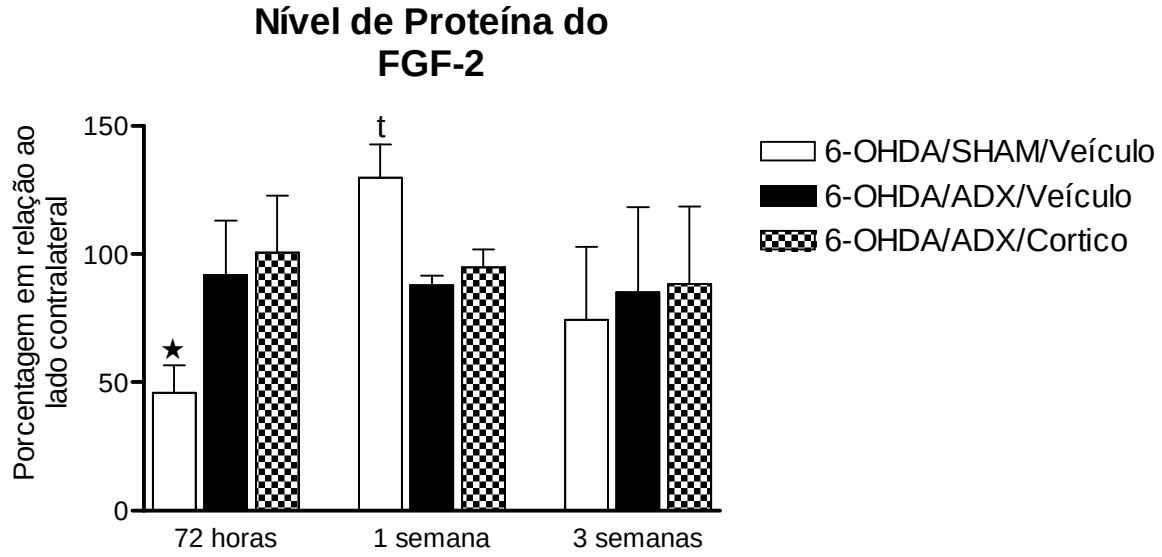


Figura 45: A figura mostra a densidade óptica relativa do nível da proteína FGF-2 23kDa para avaliar o efeito da injeção nigral da 6-OHDA na região do mesencéfalo ventral. Observa-se na figura os grupos estudados, comparando-se o lado ipsilateral com o lado contralateral em valores de porcentagem, onde o lado contralateral corresponde a 100% e os valores do lado ipsilateral estão demonstrados na figura t = 0,0700; ★ $p<0,05$. Na figura **47B** é ilustrado o nível da proteína FGF-2 com 1 semana após a lesão como base de comparação o lado contralateral.

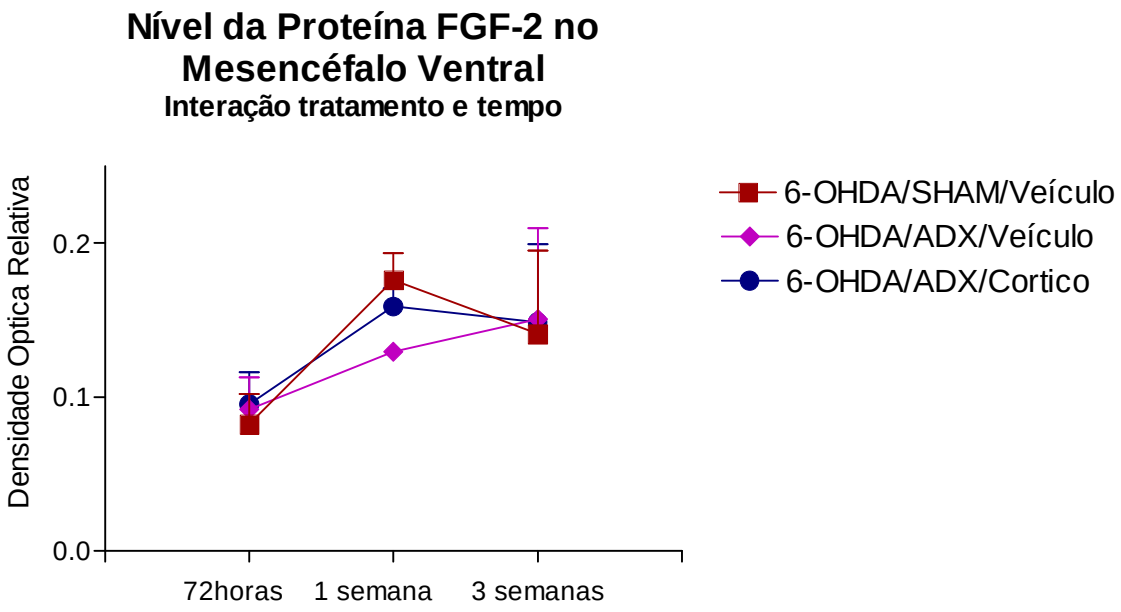
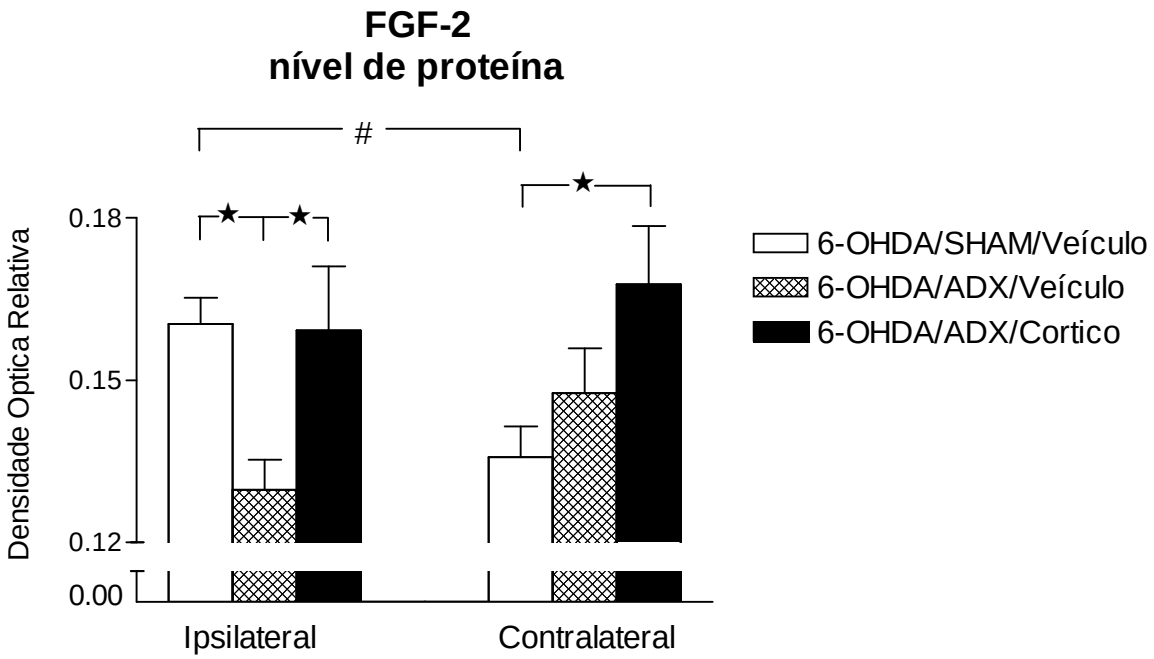


Figura 46: A figura mostra a evolução temporal dos grupos com relação ao nível da proteína FGF-2, que foi quantificada através de densidade óptica relativa.

Tabela 15. Análise realizada pelo teste ANOVA de duas vias para verificar interação entre os grupos mediante o tratamento e o tempo. —— sem significância estatística, representado através do pós teste de bonferroni.

Grupos	**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Veículo**	**6-OHDA/SHAM/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**	**6-OHDA/ADX/Veículo X 6-OHDA/ADX/Cortico**
Tempo	**p=0,1539; F=2,080**	**p=0,0798; F=2,919**	**p=0,2232; F=1,632**
Tratamento	**p=0,7590; F=0,09702**	**p=0,9668; F=0,001780**	**p=0,7212; F=0,1314**
Interação	**p=0,6637; F=0,4194**	**p=0,8943; F=0,1124**	**p=0,8858; F=0,1220**
	72 hs 1 semana 3 semanas	**72 hs 1 semana 3 semanas**	**72 hs 1 semana 3 semanas**
	—— —— ——	—— —— ——	—— —— ——

A



B

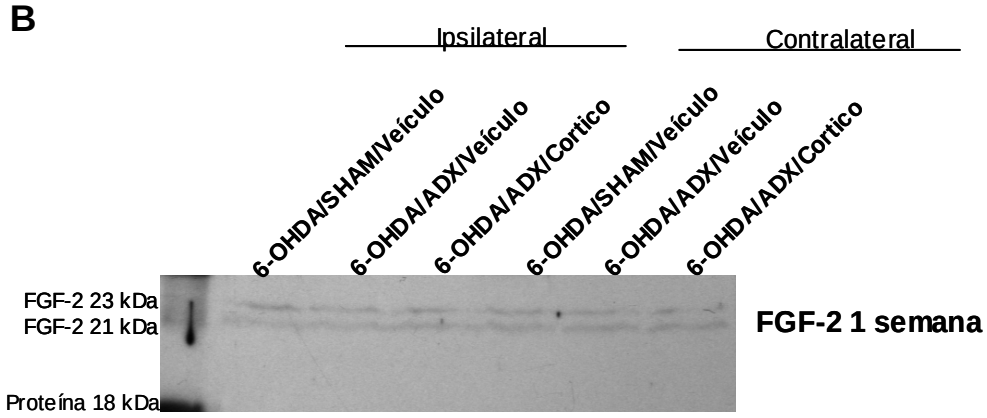


Figura 47: A figura mostra a densidade óptica relativa do nível da proteína do FGF-2 23kDa para avaliar o efeito da ativação da mesma após 1 semana da injeção nigral da 6-OHDA na região do mesencéfalo ventral (A e ilustrado na B). Observa-se na figura **A** os animais da região ipsilateral do mesencéfalo ventral, havendo uma comparação entre os grupos, está analise foi realizada pelo teste test t, ★ $p<0,05$. Foi realizado também o teste ANOVA de uma via, aplicando Dunn's test para comparação entre os grupos na região ipsilateral e contralateral, # $p<0,05$. Na figura **B** é ilustrado o nível da proteína FGF-2 como base de comparação o lado contralateral.

4.2 Análise do desaparecimento dos neurônios dopaminérgicos na substância negra pela imunohistoquímica.

Para uma análise qualitativa, da degeneração neural, pode-se observar a figura48 que ilustra a imunorreatividade da TH na região da substância negra do lado ipsilateral e contralateral a lesão de 6-OHDA, onde se observa uma diminuição da reatividade no lado ipsilateral a lesão.

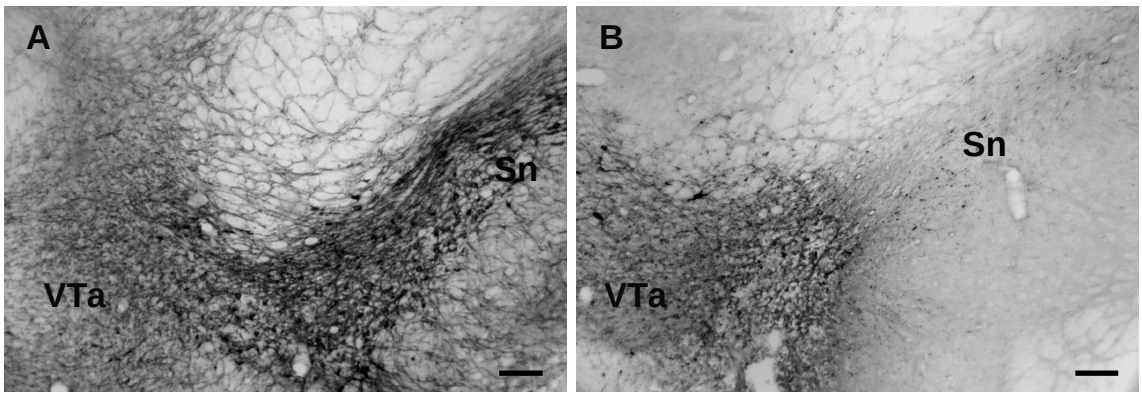


Figure 48: Fotomicrografias de neurônios e fibras imunomarcadas pela tirosina hidroxilase mostrando o efeito da injeção unilateral de 6-hidroxidopamina em ratos Wistar em secções coronais da substancia negra (Sn) e área tegmental ventral (Vta) do lado contralateral (**A**) e ipsilateral (**B**) à lesão. 1 semana após a injeção pela neurotoxina observa-se que a vasta maioria de neurônios dopaminérgicos da Sn e VTa estão diminuídos. Barras: 100µm.

DISCUSSÃO

5. Discussão

Sabe-se que as injeções de 6-OHDA na substância negra induz a uma lesão do sistema nigroestriatal, através de um estresse oxidativo (Kumar et al., 1995), resultando na morte da maioria dos neurônios dopaminérgicos. Não se conhece entretanto se tal evento pode ser modificado pela ação de hormônios adrenoesteróides.

O presente estudo verificou a influência da retirada dos hormônios adrenoesteróides nos processos neurodegenerativos do sistema nigroestriatal dopaminérgico, assim como no processo de reparo e cicatrização. Observou-se primeiramente que os níveis de TH no mesencéfalo ventral nos três grupos analisados (6-OHDA/SHAM/Veículo; 6-OHDA/ADX/Veículo; 6-OHDA/ADX/Cortico) diminuíram em 72 horas, porém no grupo em que foi realizada adrenalectomia e reposição exógena de corticosterona (6-OHDA/ADX/Cortico) essa diminuição foi mais acentuada quando comparada com o grupo que não sofreu adrenalectomia (6-OHDA/SHAM/Veículo).

Alguns estudos demonstraram que com o envelhecimento (Stein-Behrens e Sapolsky, 1992) e após lesões neuronais (Sapolsky, 1990), ocorre uma intensificação da morte neuronal na presença de corticosteróides exogenamente administrados. Assim, essa diminuição dos níveis de TH demonstrada com mais evidencia nos animais adrenalectomizados é indicativo de que a oblação hormonal acelera a perda dopaminérgica. Estes resultados vão de encontro ao trabalho de Masters et al., 1996 que demonstrou maior indução à morte de neurônios maduros granulares com a remoção da glândula adrenal. Porém esse fenômeno pode se mais intensificado com a reposição exógena de corticosterona, como demonstrado também em outros estudos nos quais a reposição exógena de corticosterona induziu maior lesão neuronal em regiões hipocampais (Dinkel et al. 2003).

O entendimento de como respostas inflamatórias e endócrinas em conjunto regulam o desenvolvimento e a diferenciação do neurônio dopaminérgicos antes do nascimento e a sua sobrevivência na vida pós natal é importante para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para a contenção de eventos neurodegenerativos (Nichols, 2005).

Esta regulação, que ocorre através de respostas inflamatórias e endócrinas para o desenvolvimento de novas estratégicas terapêuticas, aquelas que muitas vezes são chamadas de neuroimunohumorais tornam-se cada vez mais importante.

Evidências da interação entre os neurônios dopaminérgicos e os glicocorticóides no SNC, com implicações na DP, vêm de estudos que demonstram que a diminuição da expressão de glicocorticóides cursa com aumento do número de receptores D1 e D2 de dopamina no corpo estriado e uma diminuição no transporte de dopamina na substância negra (Craenenbroeck et al, 2005).

A diminuição da secreção do hormônio glicocorticóide foi constatada em pacientes com doença de Parkinson. Ainda, o glicocorticóide endógeno ou o tratamento exógeno, regulam negativamente sua secreção (Rabey et al., 1990; Pariante et al., 1995; Plocka-Lewandowska et al., 2001).

Já na região do corpo estriado, diminuição dos níveis de TH foi observada em 72 horas nos três grupos analisados, sendo mais acentuada a diminuição nos grupos que sofreram adrenalectomia. Alguns estudos demonstraram que a redução de glicocorticóides diminui a transmissão dopaminérgica no estriado (Piazza e Le Moal, 1996).

Os efeitos da manipulação adrenocortical que ocorreu na região do mesencéfalo ventral, em relação aos níveis de TH, não foram reproduzidos na região do corpo estriado, pois provavelmente é mais rápida a degeneração dos terminais dopaminérgicos do que dos corpos celulares (Chadi et al., 1994).

Esses resultados são importantes e necessitam de uma atenção especial, já que geralmente pacientes portadores da DP recebem tratamentos com corticosteróides o que pode induzir efeitos diferentes no trofismo de neurônios dopaminérgicos e modificar a regulação endógena dos hormônios adrenocorticóides.

Após ocorrer uma lesão no SNC, há a formação de uma cicatriz glial composta por astrócitos, microglia e oligodendrócitos, que de fato, impede a ocorrência de respostas neurodegenerativas com um crescimento axonal (Bovoleta e Fernaud-Espinosa, 2000). Desse modo avaliou-se a regulação dos níveis de GFAP com os tratamentos efetuados, visto que há receptores de glicocorticóides em astrócitos na região da substância negra e hipocampo (Cintra et al., 1994b). O aumento temporal do nível dessa proteína foi observado no mesencéfalo ventral após a lesão nigral pela 6-OHDA, sendo esse aumento pronunciado no período de 1 semana, e maior nos grupos que sofreram a adrenalectomia, assim como vista na expressão da TH, só que com uma auto regulação diminuída.

A reação astrocitária é observada logo após haver uma lesão no SNC (Dahl e Bignami, 1976). Já está estabelecido que os astrócitos exercem múltiplas funções importantes frente a uma lesão no SNC, prevenindo o restabelecimento da circuitaria sináptica (Schauwecker, e Steward, 1997), assim como exercendo ações tróficas parácrinas (Gómez-Pinilla et al., 1992). Deste modo, os astrócitos influenciam as respostas neuronais pós lesionais (Montgomery, 1994).

Os resultados demonstrados do aumento da expressão de GFAP evidenciado pela ADX e amplificado pela reposição de corticosterona, foram de encontro ao aumento da lesão dopaminérgica induzida pela neurotoxina. Esta correlação entre a morte de neurônios dopaminérgicos nigrais e reação astrocitária em função da manipulação dos hormônios glicocorticóides é nova na literatura.

Já os níveis de GFAP no corpo estriado não se mostraram alterados nos três períodos com relação ao lado contralateral à lesão e também não houve modificação

entre os grupos estudos. Possivelmente essa ocorrência se deva ao fato de ter ocorrido uma rápida degeneração de fibras dopaminérgicas nessa região. Muitos estudos demonstram que após uma lesão pela neurotoxina 6-OHDA na substância negra, há um aumento da presença de astrócitos reativos marcados pela imunorreatividade do GFAP no corpo estriado no lado ipsilateral a lesão (Schauwecker, et al., 1997, Gomide et al, 2005). É possível que a regulação da GFAP seja uma ocorrência precoce, porém ficando os astrócitos marcados pela GFAP reativos por um longo período. Segundo Sheng et al., 1993, a lesão pela 6-OHDA na substância negra, produz um aumento significante de astrócitos na região do corpo estriado em 24 horas após a neurotoxina. Por outro lado, após adrenalectomia, não foi observada uma mudança substancial da ativação astrocitária pelo método imunohistoquímico (Chadi et al., 2008).

Além da expressão aumentada de GFAP no local da lesão, pode-se encontrar frente à lesão por 6-OHDA um aumento da expressão de moléculas da matriz extracelular, como o NG2 (Lie et.al., 2002)

Neste estudo a análise dos níveis das moléculas da matriz extracelular como o fosfacan (secretado pelo astrócito), neurocan (secretado por neurônios e astrócitos), NG2 (secretado por células precursoras de astrócitos e olingodendrócitos) e o sulfato de condroitina (secretado pelo astrócito) são importantes, visto que, essas moléculas atuam como inibidores do crescimento axonal frente a uma lesão no SNC e, deste modo, podem interferir no restauro do sistema dopaminérgico nas fases de reparo e cicatrização.

Os níveis da fosfacan não mostraram-se alterados após a lesão nigral pela 6-OHDA, entretanto, a maior quantidade da molécula de peso molecular 175kDa foi detectada ao longo do tempo nos três grupos analisados, muito semelhante ao padrão das respostas da GFAP.

Já as mudanças nos níveis da neurocan, NG2 e sulfato de condroitina na região do mesencéfalo ventral apresentaram-se semelhantes. Observamos que quantidade desses foi maior no período de 1 semana após a lesão com a neurotoxina.

Com relação à neurocan houve uma diferença maior entre os grupos 6-OHDA/SHAM/Veículo e 6-OHDA/ADX/Cortico, o que indica que a regulação do neurocan está relacionada com o tratamento. É possível que a ação da corticosterona administrada exogenamente, em animais adrenalectomizados, aumente a expressão da neurocan. Em relação ao NG2, observa-se que há uma diferença nos níveis da molécula com o passar do tempo da lesão, com considerável aumento em 1 semana. Em ambas as análises da neurocan e NG2 no corpo estriado, não foram constatadas nenhuma diferença estatisticamente significante da expressão das proteínas, demonstrando desse modo que essas moléculas da matriz extracelular atuam especificamente no local da lesão.

A expressão da proteína sulfato de condroitina na região do mesencéfalo ventral e no corpo estriado apresentou diferença nos grupos que sofreram adrenalectomia 6-OHDA/ADX/Veículo e 6-OHDA/ADX/Cortico, no tempo da lesão, com seu pico de expressão em 1 semana, assim como na expressão do GFAP, a expressão da proteína sulfato de condroitina está correlacionada com o tratamento.

Um estudo *in vivo* verificou que há uma integração entre neurônios dopaminérgicos e as moléculas da matriz extracelular quando após um enxerto de neurônios dopaminérgicos pode-se verificar a presença das moléculas da matriz extracelular dentro e ao redor do mesmo (Gates et al., 1996).

Numa lesão por transecção da via nigroestriatal observa-se um aumento da imunoreatividade do NG2, neurocan, fosfacan e sulfato de condroitina (Moon et al., 2002)

Em outros modelos de lesão do SNC, como lesão na medula espinal, o papel do fosfacan, neurocan, NG2 e sulfato de condroitina está melhor estabelecido, demonstrando haver um aumento dessa proteína com o decorrer do tempo, tendo seu pico de expressão

com 1 mês pós lesão e restabelecendo seus níveis normais após 6 meses (Tang et al., 2003; Davies et al, 2004). A marcação por neurocan evidência um aumento já nos primeiros 2 dias após a lesão e a marcação para o NG2 evidencia um aumento em 4 dias no local da lesão (Grimpe e Silver, 2002), já a marcação do fosfacan parece ter uma ação mais tardia com 8 semanas após a lesão (Jones et al., 2003)

Em outro estudo envolvendo a lesão cortical, foi identificado aumento do neurocan e fosfacan até 30 dias após a lesão na região da reação astrocitária na cicatriz glial formada após a lesão (McKeon et al., 1999).

Deste modo é possível que a reação astrocitária, pode diferir da regulação das moléculas da matriz extracelular no que diz respeito ao tipo e a intensidade da lesão no SNC (Mucke e Eddleston, 1993).

A expressão da proteína laminina que é um componente da parede de vasos sanguíneos, foi também analisada. Porém não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes na região do mesencéfalo ventral. Já na região do corpo estriado observou-se que houve uma diferença nos níveis da molécula com o decorrer do tempo de lesão, onde houve um pico de expressão com 1 semana de lesão.

No SNC, a laminina está presente em vasos sanguíneos, no plexo coróide e nas meninges (Patton, 2000) e está associada também em geral com as células de schwann e com células astrocitárias (Menet et al., 2001), mas a expressão da laminina durante a formação da cicatriz glial frente a um quadro de lesão medular ainda não está foi estudada (Grimpe e Silver, 2002). Já num quadro de lesão pela 6-OHDA, através do método imunohistoquímico verificou-se que a laminina é imunorreativa somente na área da lesão, mas não está associada ao processo de regeneração das fibras dopaminérgicas (Ogawa et al., 1989). É possível que alterações da laminina na região do corpo estriado esteja relacionada com processo de neovascularização de reparo durante o processo de cicatrização. É possível também que este fenômeno relacionado a laminina não tenha

sido observado na região do mesencéfalo ventral (substância negra) devido ao pequeno tamanho da região, comparado com o corpo estriado.

Por outro lado, frente à lesão no SNC, além de haver fatores que inibem a regeneração, há fatores que podem auxiliar no reparo e regeneração, já bem demosntrado para o fator neurotrófico FGF-2. Neste estudo, observou-se a diminuição dos níveis de FGF-2 no lado ipsilateral do mesencéfalo ventral 1 semana após a lesão pela 6-OHDA nos animais adrenalectomizados, efeito esse revertido com a reposição hormonal pela corticosterona. Segundo Gómez-Pinilla et al., em 1992, ações parácrinas do FGF-2 astroglial têm sido postuladas depois de uma lesão no SNC. Lesão pela 6-OHDA promove a diminuição de neurônios dopaminérgicos e aumento de FGF-2 RNAm e de astrócitos reativos na região da via ipsilateral lesada (Chadi et al., 1994). Alguns estudos já observaram que a expressão do FGF-2 em células gliais mostrou ter habilidade em promover gliogênese e trofismo neural, participando desse modo diretamente no reparo e regeneração após lesão no SNC (Do Carmo Cunha et al., 2007)

Além dos efeitos tróficos do FGF-2 aos neurônios dopaminérgicos (Chadi et al,1993b), o FGF-2 pode participar dos eventos inflamatórios subseqüentes, por suas ações gliogênicas e vasculogênicas (Monfils et al., 2006) e deste modo interferir com os mecanismos de reparo e cicatrização subseqüentes. Interessante que o glicocorticóide foi capaz de regular a expressão de FGF-2 e seus receptores como descrito por Kruchkova et al., 2001 e também neste estudo. Estas são evidências das possíveis relações da sinalização hormonal e trófica mediada por fatores neurotróficos após lesão no SNC.

É possível que a influência dos hormônios esteróides nos processos de neurorestruturação do SNC lesado seja modulado pela capacidade deles de influenciar na expressão do FGF-2 (Chadi et al, 2008). A síntese do FGF-2 após a lesão dopaminérgica pode ser modulada pelos hormônios glicocorticóides e deste modo influenciar os processos de reparo e cicatrização já que o FGF-2 é um potente agente gliogênico e

angiogênico. Através deste mecanismo, os hormônios glicocorticóides podem também interferir na expressão de moléculas da matriz extracelular pelos astrócitos ativos como conseqüências para o reparo e cicatrização e posterior crescimento de fibras (Chadi et al., 2008)

A compreensão dos mecanismos envolvidos na participação hormonal, em particular dos hormônios esteróides, na lesão do SNC, e em especial na doença de Parkinson, pode ser de grande importância no retardo do avanço do processo neurodegenerativo.

CONCLUSÃO

6. Conclusão

No modelo de lesão dopaminérgica pela injeção nigral de 6-OHDA e adrenalectomia bilateral:

- A reposição de corticosterona potencia a diminuição dos níveis de TH no mesencéfalo ventral.
- A ADX promove aumento dos níveis de GFAP no mesencéfalo ventral independente da reposição de corticosterona.
- O neurocan aumenta principalmente na ocorrência da reposição com corticosterona.
- As moléculas da matriz extracelular nos locais da lesão têm seus níveis alterados em relação ao tempo de lesão. Pode-se evidenciar que a expressão das moléculas neurocan, NG2 e sulfato de condroitina teve seu pico com 1 semana de lesão
- A ADX diminui os níveis de FGF-2, o que foi revertido pela reposição da corticosterona.
- É possível que os hormônios glicocorticóides adrenais modulem os elementos envolvidos na neurodegeneração bem como nos processos de reparo e cicatrização do sistema dopaminérgico. Os benefícios e malefícios desta regulação dependem de vários fatores ainda em análise. Porém, ainda não se sabe se a reposição exógena pela corticosterona pode trazer benefícios ao cenário neurodegenerativo do modelo de parkinsonismo experimental pela injeção nigral de 6-OHDA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências Bibliográficas*

Allen, J. P. e Allen, C. F. Amygdalar participation in tonic ACTH secretion in the rat. Neuroendocrinology, v.19, n.2, p.115-25. 1975.

Bamberger, C. M., Schulte, H. M., *et al.* Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. Endocr Rev, v.17, n.3, Jun, p.245-61. 1996.

Barbany, G. e Persson, H. Adrenalectomy attenuates kainic acid-elicited increases of messenger RNAs for neurotrophins and their receptors in the rat brain. Neuroscience, v.54, n.4, Jun, p.909-22. 1993.

Bovolenta, P. e Fernaud-Espinosa, I. Nervous system proteoglycans as modulators of neurite outgrowth. Prog Neurobiol, v.61, n.2, Jun, p.113-32. 2000.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, v.72, May 7, p.248-54. 1976.

Carulli, D., Laabs, T., *et al.* Chondroitin sulfate proteoglycans in neural development and regeneration. Curr Opin Neurobiol, v.15, n.1, Feb, p.116-20. 2005.

Chadi, G., Cao, Y., *et al.* Temporal and spatial increase of astroglial basic fibroblast growth factor synthesis after 6-hydroxydopamine-induced degeneration of the nigrostriatal dopamine neurons. Neuroscience, v.61, n.4, Aug, p.891-910. 1994.

Chadi, G. e Fuxe, K.. Analysis of trophic responses in lesioned brain: focus on basic fibroblast growth factor mechanisms. Braz J Med Biol Res, v.31, n.2, Feb, p.231-41. 1998.

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

Chadi, G. e Gomide, V. C. FGF-2 and S100beta immunoreactivities increase in reactive astrocytes, but not in microglia, in ascending dopamine pathways following a striatal 6-OHDA-induced partial lesion of the nigrostriatal system. Cell Biol Int, v.28, n.12, p.849-61. 2004.

Chadi, G., Rosen, L.*, et al.* Corticosterone increases FGF-2 (bFGF) immunoreactivity in the substantia nigra of the rat. Neuroreport, v.4, n.6, Jun, p.783-6. 1993a.

Chadi, G., Silva C.*, et al.* Adrenalectomy counteracts the local modulation of astroglial fibroblast growth factor system without interfering with the pattern of 6-OHDA-induced dopamine degeneration in regions of the ventral midbrain. Brain Res, v.1190, Jan 23, p.23-38. 2008.

Chadi, G., Tinner, B.*, et al.* Basic fibroblast growth factor (bFGF, FGF-2) immunoreactivity exists in the noradrenaline, adrenaline and 5-HT nerve cells of the rat brain. Neurosci Lett, v.160, n.2, Oct 1, p.171-6. 1993b.

Chao, H. M. e Mcewen, B. S. Glucocorticoids and the expression of mRNAs for neurotrophins, their receptors and GAP-43 in the rat hippocampus. Brain Res Mol Brain Res, v.26, n.1-2, Oct, p.271-6. 1994.

Chao, H. M., Sakai, R. R.*, et al.* Adrenal steroid regulation of neurotrophic factor expression in the rat hippocampus. Endocrinology, v.139, n.7, Jul, p.3112-8. 1998.

Cintra, A., Lindberg, J.*, et al.* Basic fibroblast growth factor and steroid receptors in the aging hippocampus of the brown Norway rat: immunocytochemical analysis in combination with stereology. Neurochem Int, v.25, n.1, Jul, p.39-45. 1994a.

Cintra, A., Zoli, M., *et al.* Mapping and computer assisted morphometry and microdensitometry of glucocorticoid receptor immunoreactive neurons and glial cells in the rat central nervous system. Neuroscience, v.62, n.3, Oct, p.843-97. 1994b.

Claustre, Y., Rivy, J. P.*, et al.* Pharmacological studies on stress-induced increase in frontal cortical dopamine metabolism in the rat. J Pharmacol Exp Ther, v.238, n.2, Aug, p.693-700. 1986.

Cyr, M., Morissette, M.*, et al.* Dopaminergic activity in transgenic mice underexpressing glucocorticoid receptors: effect of antidepressants. Neuroscience, v.102, n.1, p.151-8. 2001.

Dahl, D. e Bignami, A. Immunogenic properties of the glial fibrillary acidic protein. Brain Res, v.116, n.1, Oct 29, p.150-7. 1976.

Dallman, M. F. Fast glucocorticoid actions on brain: back to the future. Front Neuroendocrinol, v.26, n.3-4, Oct-Dec, p.103-8. 2005.

Davies, J. E., Tang*,* X., *et al.* Decorin suppresses neurocan, brevican, phosphacan and NG2 expression and promotes axon growth across adult rat spinal cord injuries. Eur J Neurosci, v.19, n.5, Mar, p.1226-42. 2004.

De Kloet, E. R., Joels*,* M., *et al.* Stress and the brain: from adaptation to disease. Nat Rev Neurosci, v.6, n.6, Jun, p.463-75. 2005.

De Kloet, E. R., Sutanto*,* W., *et al.* Plasticity and function of brain corticosteroid receptors during aging. Acta Endocrinol (Copenh), v.125 Suppl 1, p.65-72. 1991.

Delong, M. Núcleos da base. In: Kandel, Schwartz, Jh, Jessess, Tm (Ed.). Fundamentos da neurociência e do comportamento. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. Núcleos da base, p.853-867

Deroche, V., Marinelli*,* M., *et al.* Stress-induced sensitization and glucocorticoids. I. Sensitization of dopamine-dependent locomotor effects of amphetamine and morphine depends on stress-induced corticosterone secretion. J Neurosci, v.15, n.11, Nov, p.7181-8. 1995.

Dinkel, K., Macpherson*,* A., *et al.* Novel glucocorticoid effects on acute inflammation in the CNS. J Neurochem, v.84, n.4, Feb, p.705-16. 2003.

Do Carmo Cunha, J., De Freitas Azevedo Levy*,* B., *et al.* Responses of reactive astrocytes containing S100beta protein and fibroblast growth factor-2 in the border and in the

adjacent preserved tissue after a contusion injury of the spinal cord in rats: implications for wound repair and neuroregeneration. Wound Repair Regen, v.15, n.1, Jan-Feb, p.134-46. 2007.

Esko, J. D. Genetic analysis of proteoglycan structure, function and metabolism. Curr Opin Cell Biol, v.3, n.5, Oct, p.805-16. 1991.

Faissner, A. e Steindler, D. Boundaries and inhibitory molecules in developing neural tissues. Glia, v.13, n.4, Apr, p.233-54. 1995.

Fuxe, K., Cintra, A., Chadi, G., Gustaffsson, Ja., Agnati. Lf. Central glucicirticoid receptors and neuronal plasticity. In: De Kloet, Sutanto, W (Ed.). Neuribiology of Steroids. San Diego: Academic Press, 1994b. Central glucicirticoid receptors and neuronal plasticity.

Fuxe, K., Wikstrom, A. C., *et al.* Mapping of glucocorticoid receptor immunoreactive neurons in the rat tel- and diencephalon using a monoclonal antibody against rat liver glucocorticoid receptor. Endocrinology, v.117, n.5, Nov, p.1803-12. 1985.

Gao, H. M., Hong, J. S., *et al.* Synergistic dopaminergic neurotoxicity of the pesticide rotenone and inflammogen lipopolysaccharide: relevance to the etiology of Parkinson's disease. J Neurosci, v.23, n.4, Feb 15, p.1228-36. 2003.

Gates, M. A., Fillmore, H., *et al.* Chondroitin sulfate proteoglycan and tenascin in the wounded adult mouse neostriatum in vitro: dopamine neuron attachment and process outgrowth. J Neurosci, v.16, n.24, Dec 15, p.8005-18. 1996.

Gates, M. A., Thomas, L. B., *et al.* Cell and molecular analysis of the developing and adult mouse subventricular zone of the cerebral hemispheres. J Comp Neurol, v.361, n.2, Oct 16, p.249-66. 1995.

Gomez-Pinilla, F., Lee, J. W., *et al.* Basic FGF in adult rat brain: cellular distribution and response to entorhinal lesion and fimbria-fornix transection. J Neurosci, v.12, n.1, Jan, p.345-55. 1992.

Gomide, V. C., Silveira, G. A., *et al.* Transient and widespread astroglial activation in the brain after a striatal 6-OHDA-induced partial lesion of the nigrostriatal system. Int J Neurosci, v.115, n.1, Jan, p.99-117. 2005.

Gower, W. R., Jr. Mechanism of glucocorticoid action. J Fla Med Assoc, v.80, n.10, Oct, p.697-700. 1993.

Grimpe, B. e Silver. J. The extracellular matrix in axon regeneration. Prog Brain Res, v.137, p.333-49. 2002.

Harfstrand, A., Fuxe, K., *et al.* Glucocorticoid receptor immunoreactivity in monoaminergic neurons of rat brain. Proc Natl Acad Sci U S A, v.83, n.24, Dec, p.9779-83. 1986.

Herman, J. P. e Cullinan, W. E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. Trends Neurosci, v.20, n.2, Feb, p.78-84. 1997.

Hsu, S. M., Raine, L., *et al.* Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J Histochem Cytochem, v.29, n.4, Apr, p.577-80. 1981.

Jones, L. L., Sajed, D., *et al.* Axonal regeneration through regions of chondroitin sulfate proteoglycan deposition after spinal cord injury: a balance of permissiveness and inhibition. J Neurosci, v.23, n.28, Oct 15, p.9276-88. 2003.

Kruchkova, Y., Ben-Dror, I., *et al.* Basic fibroblast growth factor: a potential inhibitor of glutamine synthetase expression in injured neural tissue. J Neurochem, v.77, n.6, Jun, p.1641-9. 2001.

Kumar, R., Agarwal, A. K., *et al.* Free radical-generated neurotoxicity of 6-hydroxydopamine. J Neurochem, v.64, n.4, Apr, p.1703-7. 1995.

Lammers, C. H., D'souza, U. M., *et al.* Regulation of striatal dopamine receptors by corticosterone: an in vivo and in vitro study. Brain Res Mol Brain Res, v.69, n.2, Jun 8, p.281-5. 1999.

Lange, K. W., Robbins, T. W., *et al.* L-dopa withdrawal in Parkinson's disease selectively impairs cognitive performance in tests sensitive to frontal lobe dysfunction. Psychopharmacology (Berl), v.107, n.2-3, p.394-404. 1992.

Lange, K. W., Sahakian, B. J., *et al.* Comparison of executive and visuospatial memory function in Huntington's disease and dementia of Alzheimer type matched for degree of dementia. J Neurol Neurosurg Psychiatry, v.58, n.5, May, p.598-606. 1995.

Laping, N. J., Nichols, N. R., *et al.* Corticosterone differentially regulates the bilateral response of astrocyte mRNAs in the hippocampus to entorhinal cortex lesions in male rats. Brain Res Mol Brain Res, v.10, n.4, Jul, p.291-7. 1991.

Lie, D. C., Dziewczapolski, G., *et al.* The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. J Neurosci, v.22, n.15, Aug 1, p.6639-49. 2002.

Liesi, P. Laminin-immunoreactive glia distinguish regenerative adult CNS systems from non-regenerative ones. Embo J, v.4, n.10, Oct, p.2505-11. 1985.

Marinelli, M. e Piazza, P. V. Interaction between glucocorticoid hormones, stress and psychostimulant drugs. Eur J Neurosci, v.16, n.3, Aug, p.387-94. 2002.

Martin, J. Os núcleos da base. In: Martin (Ed.). Neuroanatomia: Textos e Atlas. Porto Alegre: Artes Médicas, 1998. Os núcleos da base

Masters, J. N., Cotman, S. L., *et al.* Modulation of a novel RNA in brain neurons by glucocorticoid and mineralocorticoid receptors. Neuroendocrinology, v.63, n.1, Jan, p.28-38. 1996.

Matsui, F. e Oohira, A. Proteoglycans and injury of the central nervous system. Congenit Anom (Kyoto), v.44, n.4, Dec, p.181-8. 2004.

Mckeon, R. J., Jurynec, M. J., *et al.* The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar. J Neurosci, v.19, n.24, Dec 15, p.10778-88. 1999.

Menet, V., Gimenez Y Ribotta, M.*, et al.* Inactivation of the glial fibrillary acidic protein gene, but not that of vimentin, improves neuronal survival and neurite growth by modifying adhesion molecule expression. J Neurosci, v.21, n.16, Aug 15, p.6147-58. 2001.

Metz, G. A. Stress as a modulator of motor system function and pathology. Rev Neurosci, v.18, n.3-4, p.209-22. 2007.

Miner, J. H. Laminins and their roles in mammals. Microsc Res Tech, v.71, n.5, May, p.349-56. 2008.

Mizoguchi, K., Ishige, A.*, et al.* Endogenous glucocorticoids are essential for maintaining prefrontal cortical cognitive function. J Neurosci, v.24, n.24, Jun 16, p.5492-9. 2004.

Monfils, M. H., Driscoll, I.*, et al.* FGF-2-induced cell proliferation stimulates anatomical, neurophysiological and functional recovery from neonatal motor cortex injury. Eur J Neurosci, v.24, n.3, Aug, p.739-49. 2006.

Montgomery, D. L. Astrocytes: form, functions, and roles in disease. Vet Pathol, v.31, n.2, Mar, p.145-67. 1994.

Moon, L. D., Asher, R. A.*, et al.* Relationship between sprouting axons, proteoglycans and glial cells following unilateral nigrostriatal axotomy in the adult rat. Neuroscience, v.109, n.1, p.101-17. 2002.

Morale, M. C., Serra, P. A.*, et al.* Glucocorticoid receptor deficiency increases vulnerability of the nigrostriatal dopaminergic system: critical role of glial nitric oxide. Faseb J, v.18, n.1, Jan, p.164-6. 2004.

Morris, M. E. Movement disorders in people with Parkinson disease: a model for physical therapy. Phys Ther, v.80, n.6, Jun, p.578-97. 2000.

Mucke, L. e Eddleston, M. Astrocytes in infectious and immune-mediated diseases of the central nervous system. Faseb J, v.7, n.13, Oct, p.1226-32. 1993.

Nadeau, S. e Rivest, S. Glucocorticoids play a fundamental role in protecting the brain during innate immune response. J Neurosci, v.23, n.13, Jul 2, p.5536-44. 2003.

Nguyen, M. D., Mushynski, W. E.*, et al.* Cycling at the interface between neurodevelopment and neurodegeneration. Cell Death Differ, v.9, n.12, Dec, p.1294-306. 2002.

Nichols, N. R., Agolley, D.*, et al.* Glucocorticoid regulation of glial responses during hippocampal neurodegeneration and regeneration. Brain Res Brain Res Rev, v.48, n.2, Apr, p.287-301. 2005.

Nichols, N. R., Masters, J. N.*, et al.* Changes in gene expression in hippocampus in response to glucocorticoids and stress. Brain Res Bull, v.24, n.5, May, p.659-62. 1990.

Nichols, N. R., Zieba, M.*, et al.* Do glucocorticoids contribute to brain aging? Brain Res Brain Res Rev, v.37, n.1-3, Nov, p.273-86. 2001.

O'donnell, D., Francis, D.*, et al.* Effects of adrenalectomy and corticosterone replacement on glucocorticoid receptor levels in rat brain tissue: a comparison between western blotting and receptor binding assays. Brain Res, v.687, n.1-2, Jul 31, p.133-42. 1995.

Ogawa, M., Araki, M.*, et al.* Astroglial cell alteration caused by neurotoxins: immunohistochemical observations with antibodies to glial fibrillary acidic protein, laminin, and tyrosine hydroxylase. Exp Neurol, v.106, n.2, Nov, p.187-96. 1989.

Pariante, C. M., Nemeroff, C. B.*, et al.* Glucocorticoid receptors in depression. Isr J Med Sci, v.31, n.12, Dec, p.705-12. 1995.

Patton, B. L. Laminins of the neuromuscular system. Microsc Res Tech, v.51, n.3, Nov 1, p.247-61. 2000.

Paxinos, G., Watson, C. The rat brain: in sterotaxic coordinates. San Diego: Harcourt Brace Jovanovich. 1986

Piazza, P. V. e Le Moal, M. L. Pathophysiological basis of vulnerability to drug abuse: role of an interaction between stress, glucocorticoids, and dopaminergic neurons. Annu Rev Pharmacol Toxicol, v.36, p.359-78. 1996.

Piazza, P. V., Rouge-Pont, F.*, et al.* Glucocorticoids have state-dependent stimulant effects on the mesencephalic dopaminergic transmission. Proc Natl Acad Sci U S A, v.93, n.16, Aug 6, p.8716-20. 1996.

Plocka-Lewandowska, Araszkiewicz, M., A.*, et al.* Dexamethasone suppression test and suicide attempts in schizophrenic patients. Eur Psychiatry, v.16, n.7, Nov, p.428-31. 2001.

Pollock, J. D., Krempin, M.*, et al.* Differential effects of NGF, FGF, EGF, cAMP, and dexamethasone on neurite outgrowth and sodium channel expression in PC12 cells. J Neurosci, v.10, n.8, Aug, p.2626-37. 1990.

Rabey, J. M., Scharf, M.*, et al.* Cortisol, ACTH, and beta-endorphin after dexamethasone administration in Parkinson's dementia. Biol Psychiatry, v.27, n.6, Mar 15, p.581-91. 1990.

Rhodes, K. E. e Fawcett, J. W. Chondroitin sulphate proteoglycans: preventing plasticity or protecting the CNS? J Anat, v.204, n.1, Jan, p.33-48. 2004.

Riva, M. A., Fumagalli, F.*, et al.* Adrenalectomy reduces FGF-1 and FGF-2 gene expression in specific rat brain regions and differently affects their induction by seizures. Brain Res Mol Brain Res, v.34, n.2, Dec 28, p.190-6. 1995a.

Riva, M. A., Fumagalli, F.*, et al.* Opposite regulation of basic fibroblast growth factor and nerve growth factor gene expression in rat cortical astrocytes following dexamethasone treatment. J Neurochem, v.64, n.6, Jun, p.2526-33. 1995b.

Rodrigues, R. W., Gomide, V. C.*, et al.* Astroglial and microglial reaction after a partial nigrostriatal degeneration induced by the striatal injection of different doses of 6-hydroxydopamine. Int J Neurosci, v.109, n.1-2, Jul, p.91-126. 2001.

Sapolsky, R. M. Glucocorticoids, hippocampal damage and the glutamatergic synapse. Prog Brain Res, v.86, p.13-23. 1990.

Schauwecker, P. E. e Steward, O. Genetic influences on cellular reactions to brain injury: activation of microglia in denervated neuropil in mice carrying a mutation (Wld(S)) that causes delayed Wallerian degeneration. J Comp Neurol, v.380, n.1, Mar 31, p.82-94. 1997.

Sheng, J. G., Shirabe, S.*, 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.

Smith, M. A., Makino, S.*, et al.* Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. J Neurosci, v.15, n.3 Pt 1, Mar, p.1768-77. 1995.

Smith, Y., Bevan, M. D.*, et al.* Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. Neuroscience, v.86, n.2, Sep, p.353-87. 1998.

Stein-Behrens, B. A. e Sapolsky, R. M. Stress, glucocorticoids, and aging. Aging (Milano), v.4, n.3, Sep, p.197-210. 1992.

Steindler, D. A., O'brien, T. F.*, et al.* Boundaries during normal and abnormal brain development: in vivo and in vitro studies of glia and glycoconjugates. Exp Neurol, v.109, n.1, Jul, p.35-56. 1990.

Tang, X., Davies, J. E.*, et al.* Changes in distribution, cell associations, and protein expression levels of NG2, neurocan, phosphacan, brevican, versican V2, and tenascin-C during acute to chronic maturation of spinal cord scar tissue. J Neurosci Res, v.71, n.3, Feb 1, p.427-44. 2003.

Van Craenenbroeck, K., De Bosscher, K.*, et al.* Role of glucocorticoids in dopamine-related neuropsychiatric disorders. Mol Cell Endocrinol, v.245, n.1-2, Dec 21, p.10-22. 2005.

Wilson, M. E. A. Basal Ganglia. In: Shephered (Ed.). The sinaptic organization of the brain: Oxford Univ. Press, 1998. Basal Ganglia, p.329-375

Young, R. Update on Parkinson's disease. Am Fam Physician, v.59, n.8, Apr 15, p.2155-67, 2169-70. 1999.

Zoli, M., Agnati, L. F.*, et al.* Long-lasting reduction of glucocorticoid receptor immunoreactivity in the hippocampal field CA1 but not in the dentate gyrus after neonatal treatment with corticosterone in the rat. Acta Physiol Scand, v.138, n.4, Apr, p.577-9. 1990.