

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS
NÍVEL MESTRADO**

**ESTRATÉGIAS AMBIENTAIS COMO ALTERNATIVAS PARA
A PREVENÇÃO DE SINTOMAS DE ANSIEDADE E
DEPRESSÃO EM UM MODELO EXPERIMENTAL DA
DOENÇA DE PARKINSON EM RATOS**

ROBSON SAVOLDI

**Florianópolis
2011**

ROBSON SAVOLDI

**ESTRATÉGIAS AMBIENTAIS COMO ALTERNATIVAS PARA
A PREVENÇÃO DE SINTOMAS DE ANSIEDADE E
DEPRESSÃO EM UM MODELO EXPERIMENTAL DA
DOENÇA DE PARKINSON EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Neurociências do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Rui Daniel Schröder Prediger

Co-orientador: Dr. Fabrício Alano Pamplona

**Florianópolis
2011**

L533i SAVOLDI, ROBSON

ESTRATÉGIAS AMBIENTAIS COMO ALTERNATIVAS PARA A PREVENÇÃO DE SINTOMAS DE ANSIEDADE E DEPRESSÃO EM UM MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE PARKINSON EM RATOS [DISSERTAÇÃO] / SAVOLDI, ROBSON, SAVOLDI; orientadora, Rui Daniel Schröder Prediger - Florianópolis, SC, 2011.

84 p.: fig.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas.

Inclui referências

1.Doença de Parkinson, 2.MPTP intranasal, 3.Ambiente enriquecido
Prediger, Rui Daniel Schröder, Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

CDU 37

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Altair e Rose pela força e apoio nas minhas formações e decisões, pelo amor incondicional e por tudo que me ensinaram sobre o que realmente tem valor nessa vida. Por me mostrarem que conhecimento é o que não podem tirar de nós e por todo acompanhamento da minha vida acadêmica, sempre me permitindo ir cada vez mais longe e crescendo como indivíduo.

Ao meu orientador Rui, grande pessoa e cientista que me apoiou, ouviu, concordou e discordou me permitindo levar a cabo as idéias meio malucas, sempre com bons conselhos e dicas, me mantendo na terra numa época que eu queria voar sem asas ainda. Grato pelo equilíbrio, pelas suas atitudes, pelas conversas, pelas orientações em que muitas vezes eu chegava perdido e saía com os pés no chão e principalmente por ter me mostrado que a titulação só faz sentido se você tem algo de bom pra trazer ao mundo

Ao meu co-orientador Fabrício por me lembrar que a vida é feita de etapas e ainda são os primeiros degraus da escada, pelas atitudes e habilidade em me auxiliar desde a iniciação e sem perder o bom humor;

Aos meus colegas de laboratório Daniel, Aderbal, Ju, Julia, Samantha, Andressa, Sandro e Rodrigo pelos momentos no laboratório, cafés, discussões e conclusões aprendidas nesse período. À Vanessa pelos auxílios na perfusão; ao Adalba pelas dissecções dos primeiros experimentos; Ao Filipe pelo apoio e auxílios na administração de MPTP. Ao Eduardo pela ajuda na administração do MPTP, pelos ensinamentos de dissecção, pelas conversas e discussões;

Ao amigos Paulo e George pelo auxílio na perfusão, pelas conversas e apoios nos momentos complicados, pela companhia durante as exposições noturnas ao ambiente e por me mostrarem que eu não era a ovelha negra, apenas que estamos aprendendo no mundo. Obrigado pelas procuras e papos mesmo quando eu me esquivava muitas vezes de todos ao meu redor, valeu mesmo;

À Maria, pelos momentos de companhia, acompanhamento e auxílio nos experimentos comportamentais, que acabei aprendendo bastante a trabalhar em conjunto, mesmo que muitas vezes eu não quisesse, valeu mesmo pois aprendi na marra;

Ao Marcelo, colega da neuro, pelas conversas “psico-etecetera”, pelos auxílios nos primeiros experimentos, por permanecer até o fim de cada um, mesmo tarde da noite. Aos colegas e amigos da PPG em

Neurociências Larissa, Fran, Roberto, Chico, Bira, Marina, Tati, Débora por muitos momentos que me faziam sentir um peixe dentro da água em companhia de peixes grandes

Aos meus grandes professores Vivian Leyser, Magda Ramos, Marcia Grisotti, Laura Leite, que me acompanharam, incentivaram e se tornaram verdadeiramente amigos, fazendo parte da minha história científica e pessoal. À profesora e amiga Eliane Goldfeder pela presença sempre em varios momentos bem difíceis em que nem correr nem se esconder era possível, grato por me centrar, por não me deixar desistir, por me incentivar, e por ter me ensinado tantas coisas que não estão nos livros nem de psicologia, grato pelas conversas e pelo ombro amigo, sempre! Aos professores de graduação Sílvio Botomé e Olga Kubo pelas várias disciplinas que fiz e realmente aprendi sobre as leis da aprendizagem e do comportamento, principalmente por me ensinarem que nem todas as variáveis das quais o comportamento é função precisam ser explicitadas nos processos psicológicos de quem se comporta;

Aos professores da PPG em Neurociências Mariana, Yara, Marino, Nelson, Carla e Rodrigo pelas excelentes aulas e empenho em trazer uma visão de pesquisador conjunta com a de professor. Ao professor Odival por ter me acompanhando e orientado no estágio de docência, experiência imprescindível pra mim que quero ser professor;

Aos meus incríveis amigos Chuma, Fabrício, Ju, Thiago, Gabera e Jordana pelos incontáveis e indescritíveis momentos juntos, por me acompanharem e conseguirem me tirar de casa as vezes, pelos abraços, por ouvirem os meus treinos de apresentações, e o tanto que eu falava em neuro, “o-tempo-todo”. Ao Renato pela companhia, internet, conversas e pelo apoio na finalização do trabalho de dissertação;

Ao Nivaldo, Pedro, Murilo e Redna pela disponibilidade em resolver as pendencias burocráticas sempre que necessário;

À Capes/Reuni pelo apoio financeiro;

Às vezes as pessoas ensinam tanto à nós e elas nem sabem o quanto estão sendo importantes. Quem ensina muitas vezes não lembra, mas quem aprende não esquece, pena que nós só conseguimos exteriorizar isso muitas vezes quando o já tempo passou. Pessoas e fatos fizeram parte deste processo mesmo antes dele começar, meus mais sinceros agradecimentos a todos que direta ou indiretamente participaram da minha formação. Vocês estão todos no meu sistema límbico... e muitos já estão no córtex!

“Nem tudo o que pode ser contado conta, e nem tudo o que conta pode ser contado.”

Albert Einstein

“Para mim, é muito melhor compreender o universo como ele realmente é do que persistir no engano, por mais satisfatório e tranquilizador que possa parecer.”

Carl Sagan

Dedico este trabalho aos meus pais
que sempre me acompanharam e
incentivaram em toda a minha
trajetória acadêmica.

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma doença multifatorial que se caracteriza pela degeneração progressiva de neurônios dopaminérgicos da substância negra parte compacta (SNpc). Apesar de ser reconhecido como um distúrbio do movimento, diversos sintomas psiquiátricos (como transtornos de ansiedade e depressão) são frequentemente observados em estágios iniciais da DP. Evidências da literatura indicam que toxinas e manipulações ambientais podem alterar o curso e a prevalência da DP. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de duas formas de manipulação da complexidade ambiental sobre comportamentos motores e emocionais em um modelo animal da DP induzido pela administração intranasal (i.n.) da toxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). Foram utilizados ratos Wistar machos, que permaneceram continuamente em um ambiente enriquecido – experimento 1 – ou foram expostos a sessões intermitentes em um ambiente complexo – experimento 2 – desde o desmame (21 dias de vida) até atingirem a idade adulta. Após atingirem a idade adulta (10 semanas), os animais receberam a infusão i.n. de MPTP (0,1 mg/narina), sendo em seguida avaliados até 7 dias nos testes do campo aberto, labirinto em cruz elevado (LCE) e nado forçado. Não foram observadas alterações locomotoras significativas em nenhum dos grupos avaliados no campo aberto. No experimento 1, os animais que receberam MPTP e/ou que permaneceram de maneira contínua no ambiente enriquecido apresentaram comportamentos do tipo ansiogênico e depressivo. Por outro lado, no experimento 2, as sessões intermitentes de enriquecimento preveniram a ocorrência de comportamentos do tipo ansiogênico e depressivo induzidos pela administração i.n. de MPTP. Em conjunto, os resultados do presente estudo demonstram que diferentes protocolos de manipulação ambiental podem influenciar de maneiras distintas os sintomas de ansiedade e depressão em ratos submetidos ao modelo da administração i.n. de MPTP. Assim, manipulações ambientais podem apresentar significativas implicações para a prevenção e o tratamento adjuvante da DP, o que representa um interessante campo de investigação.

Palavras-chave: doença de Parkinson, MPTP intranasal, ambiente enriquecido, ansiedade, depressão, rato.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a multifactorial disorder characterized by the progressive degeneration of the dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta (SNpc). Although PD is classically considered to be a motor function disease, diverse psychiatric symptoms (such as anxiety and depression) are frequently observed during the early pre-motor stages of PD. Moreover, there is increasing evidence suggesting that both environmental toxins and manipulations may interfere with the development of PD. Therefore, the aim of the current study was to investigate the effects of two distinct protocols of environmental manipulation in the motor and emotional behaviors of rats infused intranasally with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), an experimental model of PD developed in our laboratory. Male Wistar rats were reared continuously in an enriched environment (EE) - experiment 1 - or were exposed to intermittent sessions in a complex environment - experiment 2 - from the post-natal day 21 until 10 weeks of age (adulthood) when they received a single bilateral intranasal (i.n.) infusion of MPTP (0.1 mg/nosril) and they were evaluated in the open field, elevated plus-maze (EPM) and forced swim test (FST) during a period of 7 days. The results showed no significant locomotor alterations in any group evaluated in the open field. In the experiment 1, the animals that received MPTP and/or were reared continuously in the EE displayed increased anxiety- and depressive-like behaviors. In the experiment 2, the exposure to intermittent EE sessions prevented the increase in the anxiety- and depressive-like behaviors induced by i.n. MPTP administration. Altogether, the findings of the present study indicate that differences in the environmental manipulations may interfere in distinct ways the anxiety- and depressive-like behaviors of rats submitted to the i.n. MPTP model of PD. Therefore, environmental manipulations may have significant implications for the prevention and adjunctive treatment of PD, which represents an interesting field for further studies.

Keywords: Parkinson's disease, intranasal MPTP, environmental enrichment, anxiety, depression, rat.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Foto do ambiente enriquecido contínuo em gaiolas duplas utilizado no presente estudo.....	39
Figura 2. Foto do ambiente enriquecido maior utilizado para as sessões de enriquecimento no presente estudo.....	40
Figura 3. Efeitos do enriquecimento ambiental contínuo e do tratamento intranasal com MPTP sobre a atividade locomotora de ratos.....	46
Figura 4. Efeitos do enriquecimento ambiental contínuo e do tratamento intranasal com MPTP sobre comportamentos do tipo ansiedade em ratos.....	47
Figura 5. Efeitos do enriquecimento ambiental contínuo e do tratamento intranasal com MPTP sobre comportamentos do tipo depressivo em ratos.....	49
Figura 6. Efeitos de sessões intermitentes de enriquecimento ambiental e do tratamento intranasal com MPTP sobre a atividade locomotora de ratos.....	50
Figura 7. Efeitos de sessões intermitentes de enriquecimento ambiental e do tratamento intranasal com MPTP sobre comportamentos do tipo ansiedade em ratos.....	52
Figura 8. Efeitos de sessões intermitentes de enriquecimento ambiental e do tratamento intranasal com MPTP sobre comportamentos do tipo depressivo em ratos.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AE	Ambiente Enriquecido
AEI	Ambiente Enriquecido Intermitente
ANOVA	Análise de Variância
COMT	catecol-O-metiltransferase
DAT	transportadores de dopamina
DP	Doença de Parkinson
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
MAO-B	monoaminoxidase B
MPP+	íon 1-metil-4-fenilpiridina
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NMDA	N-metil-D-aspartato
6-OHDA	6-hidroxi-dopamina
PET	Tomografia por Emissão de Pósitrons
SNC	Sistema Nervoso Central
SNpc	Substância Negra parte compacta
TDAH	Transtorno de Déficit de Atenção e
Hiperatividade	
VMAT2	transportador vesicular de monoaminas

SUMÁRIO

1. Introdução.....	15
1.1. Doença de Parkinson.....	15
1.1.1. Fisiopatologia da doença de Parkinson.....	17
1.1.2. Etiologia da doença de Parkinson: ênfase em toxinas ambientais.....	19
1.1.3. Sintomas motores e pré-motores da doença de Parkinson.....	20
1.1.4. Tratamento farmacológico atual da doença de Parkinson.....	21
1.1.5. Administração intranasal da toxina MPTP como modelo animal da doença de Parkinson.....	24
1.2. Manipulações ambientais e o sistema nervoso central.....	27
1.2.1. Caracterização de enriquecimento ambiental....	28
1.2.2. Efeitos do enriquecimento ambiental em processos neurobiológicos e comportamentais.....	31
2. Objetivos.....	35
2.1. Objetivo Geral.....	35
2.2. Objetivos Específicos.....	35
3. Metodologia.....	37
3.1. Desenho experimental.....	37
3.2. Animais.....	37
3.3. Protocolos de enriquecimento ambiental.....	38
3.3.1. Experimento 1: Protocolo de exposição contínua ao ambiente enriquecido.....	38
3.3.2. Experimento 2: Protocolo de exposição intermitente (em sessões) ao ambiente enriquecido....	39
3.4. Administração intranasal de MPTP.....	40
3.5. Testes Comportamentais.....	41
3.5.1. Atividade locomotora espontânea.....	41
3.5.2. Labirinto em cruz elevado.....	41
3.5.3. Nado forçado.....	42
3.6. Análise estatística.....	43
4. Resultados.....	45
4.1. Experimento 1.....	45

4.1.1. Efeitos do enriquecimento ambiental contínuo e do tratamento intranasal com MPTP sobre a atividade locomotora de ratos.....	45
4.1.2. Efeitos do enriquecimento ambiental contínuo e do tratamento intranasal com MPTP sobre comportamentos do tipo ansiedade em ratos.....	46
4.1.3. Efeitos do enriquecimento ambiental contínuo e do tratamento intranasal com MPTP sobre comportamentos do tipo depressivo em ratos.....	48
4.2. Experimento 2.....	49
4.2.1. Efeitos de sessões intermitentes de enriquecimento ambiental e do tratamento intranasal com MPTP sobre a atividade locomotora de ratos.....	49
4.2.2. Efeitos de sessões intermitentes de enriquecimento ambiental e do tratamento intranasal com MPTP sobre comportamentos do tipo ansiedade em ratos.....	50
4.2.3. Efeitos de sessões intermitentes de enriquecimento ambiental e do tratamento intranasal com MPTP sobre comportamentos do tipo depressivo em ratos.....	53
5. Discussão.....	55
6. Conclusões.....	65
7. Referências bibliográficas.....	67

1. Introdução

1.1. Doença de Parkinson

Desde o início do século passado, mas principalmente nas últimas décadas, a humanidade vem passando por uma grande transição demográfica, sendo que as sociedades estão deixando de ser constituídas por populações predominantemente jovens e adultas dando lugar a sociedades compostas por pessoas com idade cada vez mais avançada. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 1950 existiam cerca de 204 milhões de pessoas com mais de 60 anos de idade no mundo, e em 1998 este contingente alcançava 579 milhões de pessoas, um crescimento de quase 8 milhões de idosos por ano. Seguindo estas projeções, o IBGE estima que em 2050 um quinto da população mundial será formada por idosos, algo em torno de 1,9 bilhões de pessoas (IBGE, 2000). Este fenômeno de envelhecimento populacional é também verificado no Brasil. Com base no censo de 2000, existem no Brasil aproximadamente 14 milhões de idosos, sendo que nos próximos 20 anos, este valor poderá ultrapassar os 30 milhões, vindo a representar cerca de 13% da população brasileira (IBGE, 2000).

O envelhecimento é um processo natural que afeta a atividade de várias áreas do cérebro, sendo que a taxa e suscetibilidade a que este processo ocorre é dependente, dentre outros fatores, do estilo de vida dos indivíduos (MORA, SEGOVIA e DEL ARCO, 2007). Com o aumento da longevidade, ocorre a preocupação também com acometimentos advindos da idade e com alternativas para a prevenção de doenças associadas ao envelhecimento, assim como suas comorbidades. Nesse contexto, a doença de Parkinson (DP), juntamente com a doença de Alzheimer, representam os distúrbios neurodegenerativos relacionados à idade mais comuns em humanos. A DP é uma doença neurodegenerativa crônica progressiva que afeta 1% da população mundial com mais de 65 anos de idade (BEHARI, SRIVASTAVA e PANDEY, 2005). Segundo o IBGE (2000), existem aproximadamente 222 mil parkinsonianos no Brasil, sendo que 2% dos brasileiros acima dos 60 anos são acometidos por este distúrbio.

A DP foi originalmente descrita pelo médico britânico James Parkinson, em seu mais famoso estudo, “*An essay on the shaking palsy*”, de 1817, que a denominou “paralisia agitante”. O neurologista francês Jean-Martin Charcot (1825-1893) desempenhou igualmente um

papel decisivo na definição da doença, descrevendo a rigidez, a micrografia e a disartria, e sugerindo a nomeação da DP em homenagem ao médico inglês que primeiramente descreveu os sintomas (DUVOISIN, 1991). Entretanto, Charcot discordou da descrição inicial de James Parkinson quanto à preservação das funções corticais superiores na doença e da presença de paralisia, contribuindo de maneira muito importante para a primeira caracterização dos sintomas não motores da DP, como a perda da memória (MENESES e TEIVE, 2003).

O estado clínico motor típico da DP se manifesta em decorrência da degeneração neuronal verificada particularmente na região denominada substância negra parte compacta (SNpc), onde se encontram os corpos celulares de neurônios dopaminérgicos que projetam eferências para os núcleos da base, sendo que a degeneração progressiva destes neurônios gera uma depleção de dopamina no estriado (RIEDERER e WUCCHETICH, 1976). O comprometimento funcional da neurotransmissão dopaminérgica leva a mudanças profundas nas estruturas de entrada e saída dos núcleos da base (BERGMAN, WICHMANN e DELONG, 1990), levando aos principais sintomas motores, que se manifestam por tremores de repouso, rigidez muscular, diminuição da velocidade dos movimentos (bradicinesia) e distúrbios do equilíbrio e da marcha. Atualmente se sabe que o acometimento de regiões dopaminérgicas adjacentes, ou mesmo degeneração de outros sistemas de neurotransmissão (como o serotoninérgico, noradrenérgico e colinérgico) pode provocar outros sintomas clínicos, como hiposmia e anosmia, depressão, alterações do sono, prejuízos da memória e distúrbios do sistema nervoso autônomo (BRAAK *et al.*, 2003; MENEZES e TEIVE, 2003).

O diagnóstico provável da DP é baseado na avaliação clínica do paciente e da presença de dois dos três sintomas motores cardinais (bradicinesia, rigidez e tremor de repouso). O diagnóstico definitivo somente é possível através de avaliação *post-mortem*, sendo realizado pela presença de características histopatológicas típicas da DP, como a morte de células dopaminérgicas na SNpc do mesencéfalo (observada pela despigmentação deste núcleo) bem como de núcleos do tronco cerebral (do *locus coeruleus* e da substância *innominata*) com formação de corpos de *Lewy*. Os corpos de *Lewy* são inclusões intracitoplasmáticas contendo um núcleo denso eosinofílico de material filamentar e granular cercada por filamentos orientados radialmente, sendo formados à partir do acúmulo das proteínas ubiquitina e alfa-

sinucleína, dentre outras (SPILLANTINI *et al.*, 1998). Os corpos de *Lewy* podem também ser encontrados no cérebro de indivíduos idosos não acometidos pela DP, todavia, verificou-se a presença destas inclusões em aproximadamente 85% das autópsias de pacientes clinicamente diagnosticados com a DP.

A DP é apenas uma das formas, embora a mais freqüente, de parkinsonismo. O termo parkinsonismo refere-se a um grupo de doenças que apresentam em comum os mesmos sintomas (principalmente os motores), associados ou não a outras manifestações neurológicas. A DP é também chamada de parkinsonismo primário ou idiopático porque é uma doença para a qual nenhuma causa conhecida específica foi identificada até o momento. Por outro lado, diz-se que um parkinsonismo é secundário quando há identificação de causa ou associação a outras doenças neurodegenerativas. Cerca de 2/3 de todas as formas de parkinsonismo correspondem à forma primária (MENEZES e TEIVE, 2003). Considerando que a DP se trata de uma doença crônica e de manifestação clínica complexa, é bastante improvável que um único agente etiológico seja responsável por todos os casos da DP idiopática, sendo mais provável que múltiplas causas estejam envolvidas com a fisiopatologia desta doença (SILVA e SCHAPIRA, 2001). Nos últimos anos, importantes avanços ocorreram em nossa compreensão sobre a etiologia e patogenia da DP. Por exemplo, o estudo do parkinsonismo familiar levou à identificação de diversas proteínas e genes envolvidos na sua fisiopatologia, tais como a alfa-sinucleína e a parkina (VILA e PRZEDBORSKI, 2004). Como resultado destes avanços, a teoria etiológica mais aceita atualmente é a de que existe uma interação entre fatores genéticos e ambientais que seria responsável pelo desenvolvimento da DP (MENEZES e TEIVE, 2003).

1.1.1. Fisiopatologia da doença de Parkinson

Como abordado anteriormente, a DP possui manifestação clínica majoritariamente motora, cuja fisiopatologia está intimamente ligada à degeneração da SNPc e suas projeções aos núcleos da base. Os núcleos da base representam um conjunto de corpos neuronais cujos principais componentes são o núcleo caudado, o putâmen, o globo pálido e o núcleo subtalâmico. O núcleo caudado, o putâmen e o globo pálido, podem ser chamados em seu conjunto como corpo estriado, e estão

intimamente relacionados entre si, participando do controle da postura e do movimento (KANDEL, SCHWARTZ e JESSELL, 2000, pp. 855-856).

O estriado é um núcleo anatômico e funcionalmente heterogêneo, sendo a principal porta de entrada dos núcleos da base e suas eferências são projetadas aos núcleos de saída por uma via direta e outra indireta. Estas vias regulam a atuação das células talâmicas que se projetam ao córtex, a medida que a ativação da via direta desinibe o tálamo facilitando o movimento enquanto a via indireta inibe o tálamo e o movimento. Os neurônios dopaminérgicos da SNpc afetam a via direta e indireta através dos receptores D1 e D2 respectivamente. Em decorrência da degeneração na substância negra, há uma diminuição das concentrações de dopamina no estriado dos parkinsonianos, fazendo com que o corpo estriado torne-se excessivamente ativo, prejudicando o controle dos movimentos. Sendo a dopamina reduzida no estriado aumenta a inibição talâmica pois ocorre uma maior ativação na via direta (que desinibe o tálamo) e uma menor ativação da via indireta que inibe o tálamo, sendo o resultado final um aumento da atividade nos núcleos de saída talamocorticais e consequente dificuldade de iniciar o movimento (KANDEL, SCHWARTZ e JESSELL, 2000, pp. 855-856).

Como resultado, os pacientes parkinsonianos apresentam uma redução da capacidade de controlar os movimentos voluntários, além de apresentarem tremores de repouso, rigidez muscular, acinesia e bradicinesia, com dificuldades na escrita, marcha, fala, mascaramento da expressão facial, lentidão na iniciação e execução de movimentos bem como a postura curvada e instabilidade postural (GOLDMAN *et al.*, 1998).

Existem evidências crescentes de que a morte celular nigroestriatal está associada a diversos mecanismos bioquímicos e moleculares que formam um caminho final comum à outras doenças neurodegenerativas. O estresse oxidativo e geração de radicais livres são aspectos importantes e aliados à relativa baixa eficiência dos sistemas de proteção antioxidante, como o sistema da glutatona, nos núcleos basais de pacientes com DP, permitem a geração de um ciclo crescente de estresse oxidativo (SILVA e SCHAPIRA, 2001). Além disso, a função mitocondrial está comprometida (especialmente o complexo I mitocondrial), levando à diminuição da produção de ATP, excessiva produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, posteriormente, a morte de células neuronais (BEAL, 2003). Alterações inflamatórias

adicionais com a produção de diversos mediadores inflamatórios, predominantemente nas células da glia, aceleram o processo de neurodegeneração estriatal (BEAL, 2003). A questão chave sobre os mecanismos do processo neurodegenerativo é o que desencadeia este caminho final comum na DP. Os dados disponíveis até o momento indicam que a existência de diversos fatores etiológicos é mais provável do que um único fator causal (SILVA e SCHAPIRA, 2001). O avanço no entendimento destes eventos poderá levar à elaboração de estratégias de neuroproteção que retardem a taxa de perda neuronal nos pacientes parkinsonianos, sendo que este representa uma dos maiores desafios atuais no estudo da DP.

1.1.2. Etiologia da DP: ênfase em toxinas ambientais

Uma das teorias que tenta explicar a etiologia da DP é a de que fatores ambientais, como neurotoxinas, poderiam utilizar a cavidade nasal como via de entrada no SNC aonde desencadeariam os processos de estresse oxidativo e neurodegeneração dos núcleos da base, (DOTY, 2008). Diferentes exposições a uma variedade de produtos químicos, metais, tóxicos e solventes foram estudadas e avaliadas em termos de fatores de risco para a DP (DI MONTE, 2003). No início dos anos 80, a constatação de que exposição à pró-toxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) provoca parkinsonismo em humanos (LANGSTON et al., 1983) foi um dos principais eventos que motivou estas investigações. Corroborando a idéia de que toxinas ambientais seriam agentes importantes na etiologia da DP, Gorrel, DiMonte e Graham (1996) descreveram que a infusão intravenosa de cloreto de manganês causa um acúmulo deste metal no putâmen, com um subsequente acúmulo periventricular de ferro e um aumento na quantidade de alumínio no globo palido. Sabe-se ainda que indivíduos com DP têm um aumento nos níveis de ferro na substância negra. O ferro liberado da neuromelanina pode potencializar a formação de toxinas, sendo que a presença de alumínio potencializa a ação do ferro no que tange à liberação de tais toxinas (GORREL, DIMONTE e GRAHAM, 1996). Estes estudos, juntamente com pesquisas epidemiológicas, sugerem que a exposição a toxinas ambientais estão associadas ao aumento do risco de desenvolvimento de uma série de distúrbios neurológicos, incluindo a neurodegeneração dopaminérgica (SPENCER, LUDOLPH e KISBY, 1992; PICCOLI, LA BELLA e

GUARNERI, 1992). Entretanto, mesmo que a exposição repetida ou prolongada a uma toxina ambiental não seja um fator suficiente para determinar a DP por si só, considera-se que um agente ambiental poderia influenciar decisivamente na deflagração da DP em indivíduos geneticamente suscetíveis (MENESES e TEIVE, 2003).

1.1.3. Sintomas motores e pré-motores da doença de Parkinson

O distúrbio motor da DP tem sido extensamente pesquisado, resultando em maior precisão do diagnóstico e desenvolvimento de escalas de avaliação (HUGHES *et al.*, 1992). Contudo, apesar da grande ênfase na ocorrência de sintomatologia motora na DP, vários estudos têm demonstrado que os sintomas não-motores, tais como depressão, psicose, quedas, e distúrbios do sono, provocam uma grande redução na qualidade de vida dos pacientes, considerada em seu aspecto mais amplo (CHAUDHURI, HEALY e SCHAPIRA, 2006; SCHRAG, *et al.*, 2006).

O período em que sintomas cognitivos e emocionais da DP surgem pode ser referido como a fase pré-motora da doença, uma vez que estes se manifestam muitos anos antes do aparecimento dos sintomas motores. Estudos epidemiológicos, patológicos e clínicos fornecem dados a favor da existência desta fase na DP (TOLOSA, COMPTA e GAIG, 2007). Durante esta fase, o processo neuropatológico progride sem necessariamente coincidir com manifestações motoras (SPIEGEL *et al.*, 2006). Os sintomas não motores, como disfunção olfatória, distúrbio comportamental do sono REM (do inglês, *rapid eyes movement*), depressão e sintomas gastrintestinais podem ocorrer no início da doença além de poderem apresentar progressão em paralelo com os sintomas motores (CHAUDHURI, HEALY e SCHAPIRA, 2006; VENDETTE *et al.*, 2007; KROGH *et al.*, 2008). De importância para o presente estudo, são comuns os transtornos de ansiedade na DP. Estes podem ser um fator associado, se apresentando como ataques de pânico, fobias ou transtorno de ansiedade generalizada, e ainda podem estar relacionados com alterações motoras induzidas por fármacos usados no tratamento da DP (SHIBA *et al.*, 2000; WEISSKOPF *et al.*, 2003). Ocasionalmente, a ansiedade e a mania foram relatadas como um efeito colateral do tratamento farmacológico da DP com levodopa em altas doses (SINGH *et al.*, 2005).

Os transtornos de ansiedade são comuns em pacientes com DP, acrescentando maior peso à hipótese de uma base neurobiológica subjacente aos problemas psiquiátricos associados à DP. Um estudo de comorbidade de ansiedade e depressão em pacientes com DP mostrou que 67% dos pacientes com DP que tinham um diagnóstico de transtorno depressivo também apresentavam comorbidade com ansiedade, enquanto 97% dos pacientes com DP com um diagnóstico de transtorno de ansiedade tinham depressão como comorbidade (MENZA, ROBERTSON-HOFFMAN e BONAPACE, 1993). Os transtornos de ansiedade e depressão, na maioria dos casos, não parecem ser reações psicológicas primárias da DP ou efeitos colaterais do uso de levodopa, mas sim, a associação está provavelmente relacionado com as alterações neuroquímicas subjacentes à própria DP (MENZA, ROBERTSON-HOFFMAN e BONAPACE, 1993).

De maneira interessante, um estudo prospectivo estimou que os neurologistas conversam mais de 50% do tempo com os seus pacientes parkinsonianos sobre os sintomas não motores da doença (incluindo depressão, ansiedade, fadiga e distúrbios do sono). Os sintomas não motores associados em pacientes com DP são uma fonte significativa de incapacidades e problemas na qualidade de vida dos pacientes (SHULMAN *et al.*, 2002).

A depressão, juntamente com o comprometimento cognitivo e a disfunção autonômica, está entre as características mais comuns de correlatos não motores da DP (MCDONALD, RICHARD e DELONG, 2003). A prevalência estimada da depressão em pacientes com a DP varia de 10% a 45%, dependendo do critério utilizado (SHULMAN *et al.*, 2002; BURN, 2002; WICHOWICZ *et al.*, 2006). O comprometimento da neurotransmissão serotoninérgica, assim como efeitos sobre o sistema límbico através de mecanismos noradrenérgicos e dopaminérgicos são descritos em pacientes parkinsonianos deprimidos (REMY *et al.*, 2005). Diante do exposto acima, fica evidente que os sintomas psiquiátricos da DP precisam ser melhor investigados, tanto do ponto de vista epidemiológico quanto neurobiológico.

1.1.4. Tratamento farmacológico atual da doença de Parkinson

Os tratamentos farmacológicos disponíveis atualmente para a DP não alteram o curso ou a evolução da doença, representando alternativa meramente paliativa para o controle dos sintomas e melhoria temporária

da qualidade de vida dos pacientes (LANG e LOZANO, 1998). Desde a década de 1960, com a introdução da levodopa, o tratamento farmacológico para a DP é baseado no restabelecimento da neurotransmissão dopaminérgica. Os medicamentos disponíveis atualmente com esta finalidade são numerosos e incluem: a reposição de dopamina através do uso da levodopa (precursor de dopamina), os agonistas dopaminérgicos (ex.: pramipexol e bromocriptina), os inibidores das enzimas de degradação da dopamina - monoaminoxidase B (MAO-B, ex.: selegilina e rasagilina) e da catecol-O-metiltransferase (COMT, ex: tolcapone e entacapone) e a amantadina. Além destes fármacos dopaminérgicos, são também utilizados, embora com menor frequência, alguns fármacos anticolinérgicos (ex: biperideno) no tratamento da DP (para revisão recente ver HAUSER, 2010).

A terapia de reposição de dopamina é realizada principalmente com o uso da levodopa, um precursor de dopamina. A levodopa atravessa a barreira hematoencefálica, levando a um aumento na biossíntese de dopamina, e inicialmente era empregada isoladamente através do uso de altas doses para que uma pequena parte atingisse o SNC (POEWE *et al.*, 2010). Isto porque uma rápida conversão periférica de levodopa em dopamina pela enzima dopa-descarboxilase resultava em desagradáveis efeitos colaterais, como náuseas, vômitos e hipotensão ortostática. Por esta razão, atualmente a levodopa é invariavelmente administrada em combinação com um inibidor da enzima dopa-descarboxilase periférica, como carbidopa ou benserazida. Este procedimento tem o objetivo de inibir a descarboxilação da levodopa por enzimas intestinais e em outros tecidos periféricos, aumentando a sua conversão à dopamina no SNC e ocasionando uma diminuição dos efeitos gastrintestinais decorrentes da descarboxilação periférica (HAUSER, 2010; POEWE *et al.*, 2010). A levodopa exerce um efeito marcante sobre os sinais e sintomas da DP em grande parte dos pacientes, melhorando inicialmente o grau de tremor, a rigidez e a bradicinesia. Com a progressão da doença, é necessário um aumento das doses e frequência de uso da levodopa, o que acarreta também um aumento dos efeitos colaterais, como discinesias, movimentos involuntários muitas vezes tão ou mais incapacitantes que a acinesia e a bradicinesia decorrentes da doença (HAUSER, 2010).

Os agonistas dopaminérgicos ativam os receptores pós-sinápticos para dopamina, sem necessidade de metabolismo pré-sináptico como a levodopa (SINGH, PILLAY e CHOONARA, 2007). Embora menos

potentes do que a levodopa, os agonistas dopaminérgicos são eficazes na fase inicial da DP, permitindo a redução da incidência de complicações de longo prazo associados à reposição de dopamina com levodopa, como as discinesias e as flutuações motoras. São também drogas úteis no tratamento da fase avançada como coadjuvantes da levodopa, minimizando os sintomas adversos (LANG e LOZANO, 1998; HAUSER, 2010).

A selegilina, um inibidor irreversível da enzima MAO-B é muitas vezes usadas por interferir com o catabolismo da dopamina. A MAO-B apresenta maior seletividade pela degradação de dopamina do que por outras monoaminas. Estima-se que inibidores da MAO-B podem apresentar um efeito neuroprotetor visto que a selegilina impede a indução de parkinsonismo em modelos animais da DP, embora este achado careça de comprovação clínica (HAUSER, 2010).

O uso da amantadina é uma outra opção no tratamento dos pacientes nas fases iniciais da DP, apesar de seu mecanismo de ação não estar totalmente esclarecido, mas evidências sugerem que ela aumente a liberação de dopamina para a fenda sináptica. A amantadina apresenta um fraco efeito anticolinérgico, além de bloquear os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) para glutamato, facilitando a transmissão dopaminérgica no estriado. A amantadina apresenta eficácia intermediária e variável sobre os sintomas motores como rigidez, tremor e acinesia, sendo que alguns pacientes experimentam perda da eficácia, além de alguns efeitos colaterais anticolinérgicos como confusão mental e vertigens (LANG e LOZANO, 1998).

Os anticolinérgicos vêm sendo utilizados empiricamente na DP desde longa data e sua atuação pode ser explicada pela preponderância de acetilcolina observada no estriado dos pacientes com diminuição da neurotransmissão dopaminérgica a partir da substância negra (HAUSER, 2010). Estas drogas são razoavelmente eficazes sobre o tremor e a rigidez muscular, mas a atuação sobre a acinesia, que é o sintoma mais debilitante da DP, é desprezível. O uso é limitado pelo aparecimento de efeitos colaterais periféricos (boca seca, obstipação, retenção urinária, turvação visual) e centrais (sonolência, confusão mental, delírios e alucinações) (LANG e LOZANO, 1998).

Deve ser destacado que a melhora dos sintomas da DP em decorrência do uso dos fármacos disponíveis atualmente é apenas transitória, e por esta razão, diversas alternativas não-farmacológicas têm sido investigadas na tentativa de prevenir ou reverter o processo

neurodegenerativo observado na DP, bem como os sintomas associados (FREED *et al.*, 2001)

No caso do tratamento da DP, uma dificuldade adicional é que a maioria dos neurônios dopaminérgicos da SNpc já foram degenerados quando o diagnóstico clínico (baseado nos sintomas motores) é realizado (BRUCKE *et al.*, 1997). Além do mais, visto que a DP se manifesta geralmente na sexta década de vida, torna-se de extrema importância a identificação de fatores e procedimentos capazes de interferir com o desenvolvimento desta doença, sendo que este conhecimento poder levar a práticas a serem adotadas pelo indivíduo durante toda a sua vida com o objetivo de prevenir a DP.

1.1.5. Administração intranasal da toxina MPTP como modelo animal da doença de Parkinson

O aumento do conhecimento acerca da fisiopatologia da DP, suas causas e sintomas, e o desenvolvimento de novas terapias eficazes no alívio dos seus sintomas depende da existência de modelos animais representativos destes comprometimentos. A DP é uma das várias doenças humanas que parece não ocorrer espontaneamente em outros animais. Entretanto, as características desta doença podem ser mimetizadas, em maior ou menor escala, em animais de laboratório (como roedores) através da administração de diferentes compostos: reserpina, 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), MPTP, paraquate, manebe, rotenona e ferro (para revisão ver BEAL, 2001). A grande maioria dos estudos realizados até o presente momento utilizando estes modelos da DP tem focado os efeitos das manipulações sobre a via dopaminérgica nigrostriatal e a indução de comprometimentos motores nos animais. Entretanto, como a DP está associada com alterações em uma variedade de funções, incluindo alterações afetivas (CUMMINGS, 1992), cognitivas (DUBOIS e PILLON, 1997) e olfatórias (DOTY *et al.*, 1988, 1995; HAWKES *et al.*, 1999), parece ser importante avaliar se os modelos animais da DP utilizados são também capazes de reproduzir algumas destas alterações não motoras.

Segundo WILLNER (1986), a validade de um modelo animal pode ser avaliada por três conjuntos de critérios: (I) validade preditiva (“*predictive validity*”), que é avaliada com base na capacidade de diferenciar entre drogas que são, ou não são, clinicamente eficazes na patologia humana que está sendo estudada; (II) validade analógica ou

por semelhança (“*face validity*”), que é avaliada com base nas qualidades comportamentais e farmacológicas cujas semelhanças com o distúrbio humano podem ser demonstradas; (III) validade teórica ou por homologia (“*construct validity*”), onde os mesmos processos psicobiológicos responsáveis pela etiologia e fisiopatologia dos sintomas clínicos estejam atuando no modelo. Embora não exista um modelo animal ideal da DP, que satisfaça todos estes critérios e apresente todas as características associadas à condição clínica, como: (I) fácil detecção das alterações motoras associadas ao parkinsonismo; (II) perda seletiva e gradual dos neurônios dopaminérgicos com o avanço da idade; (III) produção de inclusões citoplasmáticas (corpos de *Lewy*); os modelos disponíveis têm sido de grande valia na elucidação dos mecanismos moleculares relacionados à neurodegeneração verificada na DP e na avaliação de novos agentes terapêuticos (SHIMOHAMA *et al.*, 2003).

Um importante avanço no desenvolvimento dos modelos animais da DP deu-se com a descoberta do MPTP. A capacidade do MPTP em lesar seletivamente neurônios dopaminérgicos foi descoberta de maneira acidental em 1976, na Califórnia, quando um grupo de jovens dependentes de heroína começou a apresentar sintomas típicos da DP. A análise da “heroína” utilizada revelou a existência do MPTP como resíduo contaminante (DAVIS *et al.*, 1979; LANGSTON *et al.*, 1983). A partir deste momento, a administração do MPTP a animais de laboratório (principalmente roedores e primatas) passou a ser utilizado como um modelo para o estudo da DP (BEAL., 2001; DAUER E PRZEDBORSKI, 2003). Além disso, na tentativa de verificar se uma toxina ou agente químico presente no meio ambiente poderia utilizar a cavidade nasal como porta de entrada no organismo e estar relacionado à etiologia da DP, estudos prévios do nosso laboratório e de outros têm administrado o MPTP pela via intranasal (i.n.) em ratos e camundongos, sendo que este tratamento é capaz de induzir alterações comportamentais (prejuízos olfatórios, cognitivos e motores) e neuroquímicas (lesão de neurônios dopaminérgicos e redução de dopamina em diferentes áreas cerebrais) muito semelhantes à aquelas observadas na DP (DLUZEN e KEFALAS, 1996; PREDIGER *et al.*, 2006, 2009, 2010; MOREIRA *et al.*, 2010).

Devido a estas similaridades bioquímicas e histológicas, o modelo do MPTP tem sido muito importante para a compreensão da fisiopatologia da DP (JENNER, 2003; MEREDITH, SONSALLA e

CHESELET, 2008). O MPTP induz a morte dos neurônios dopaminérgicos da SNpc, com conseqüente redução dos níveis de dopamina no estriado e perda dos neurotransmissores noradrenalina e serotonina no *locus coeruleus* e no núcleo dorsal da Rafe, respectivamente (WATANABE, HIMEDA e ARAKI, 2005; MEREDITH, SONSALLA e CHESELET, 2008).

O MPTP é altamente lipofílico, sendo que uma vez administrado ao animal (tanto sistemicamente como pela via i.n.) atravessa facilmente a barreira hematoencefálica sendo convertido rapidamente nas células gliais à MPP⁺, radical livre altamente neurotóxico responsável pelo efeito lesivo do MPTP (JENNER, 2003; KUMAR *et al.*, 2009). A conversão do MPTP no metabólito MPP⁺ é realizada pela enzima MAO-B nas células gliais (principalmente nos astrócitos). O MPP⁺ é transportado para o neurônio pelos transportadores de dopamina (DAT) ocasionando o seu acúmulo no interior das mitocôndrias e inibindo o complexo I da cadeia transportadora de elétrons (SCHULZ e FALKENBURGER, 2004, MATTSON, MARC-CLEICHAMANN e CHENG, 2008; KUMAR *et al.*, 2009). O MPP⁺ inibe a função mitocondrial reduzindo os níveis de ATP e produzindo conseqüente morte neuronal (WATANABE, HIMEDA e ARAKI, 2005). Ainda dentro das células, o íon pode ser sequestrado em vesículas pelo transportador vesicular de monoaminas (VMAT2) conferindo alguma neuroproteção ao neurônio dopaminérgico. Miller *et al.* (1999) argumentam que a proporção entre DAT e VMAT2 é que em última instância irá determinar o grau da morte neuronal causada pelo MPP⁺. Além disso, alguns estudos tem sugerido que os efeitos neurotóxicos do MPP⁺ são mediados, ao menos em parte, através da produção excessiva de óxido nítrico (PRZEDBORSKI *et al.*, 2005).

A sensibilidade ao MPTP varia consideravelmente entre diferentes espécies animais. Diferentemente de primatas, roedores são menos sensíveis à toxicidade do MPTP (SCHMIDT e FERGER, 2001). No caso, a linhagem de camundongos C57BL/6 é mais sensível que outras linhagens de camundongos à administração sistêmica do MPTP no que tange à morte de neurônios dopaminérgicos mesencefálicos (SEDELIS *et al.*, 2000). Contudo, na maioria dos estudos com ratos, estes tem se mostrado resistentes à administração sistêmica do MPTP em grande parte porque as doses comparáveis àquelas utilizadas em camundongos não produzem significativa degeneração dopaminérgica em ratos (GIOVANNI *et al.*, 1994; KALARIA *et al.*, 1987).

Alternativamente, Da Cunha *et al.* (2002) demonstraram uma perda parcial de neurônios dopaminérgicos da SNpc de ratos com a infusão do MPTP diretamente nesta região através de cirurgia estereotáxica. Sendo assim, é possível afirmar que o fígado e a barreira hematoencefálica são amplamente responsáveis pela minimização dos efeitos do MPTP em ratos. Em acordo com esta visão, a administração i.n. de MPTP mostrou-se uma boa opção, visto não ser limitada pelas barreiras citadas, permitindo níveis mais elevados de MPTP no encéfalo (PREDIGER *et al.*, 2006, 2009, 2010). Estudos do nosso grupo de pesquisa têm demonstrado que uma única infusão i.n. bilateral da toxina MPTP reproduz as características de morte neuronal na SNpc tanto em ratos (PREDIGER *et al.*, 2006, 2009; MOREIRA *et al.*, 2010) quanto em camundongos da linhagem C57BL/6 (PREDIGER *et al.*, 2010).

1.2. Manipulações ambientais e o sistema nervoso central

Além das tranformações de ordem social, política, econômica e cultural que o envelhecimento da população traz consigo, há necessidade urgente de avanços científicos que consigam retardar ou combater os acometimentos degenerativos do organismo humano no decorrer dos anos. Nesse contexto, muitas pesquisas tem se dedicado a compreender como os fenômenos fisiológicos e psicológicos interagem a partir da reorganização do comportamento, a fim de propiciar melhores resultados em processos terapêuticos e psicoterapêuticos, assim como manter um melhor equilíbrio homeostático do corpo ao longo do tempo (PINEL, 2005). Pesquisas dedicadas a verificar como os aspectos do ambiente externo e interno retroagem sobre eles mesmos foram desenvolvidas sob vários paradigmas na pesquisa básica e aplicada. Como descrito anteriormente, estudos prévios têm sugerido que fatores ambientais podem alterar a prevalência e evolução das doenças neurodegenerativas. Sendo que no caso da DP, além do fator genético, o ambiente parece exercer grande influência na perda neuronal dopaminérgica verificada na SNpc (TANNER e ASTON 2000).

Durante a última década do século XIX e primeira década do século XX, a Neurociência criou bases mais sólidas nos estudos da morfofisiologia do SNC. Santiago Ramón y Cajal e Camilo Golgi foram provavelmente os dois cientistas que melhor representaram a Neurociência com seu trabalho neste período de tempo. Os pensamentos de Cajal sobre o SNC eram muito avançados para sua época e ele estava

convencido de que a arquitetura neural não era uma estrutura fixa e que mudanças dinâmicas e plásticas na histologia do cérebro estavam relacionadas com os processos e atividades mentais. No Congresso Internacional da Faculdade de Medicina de Roma em 1894 (DEFELIPE, 2006), Cajal sugeriu o termo plasticidade e, em sua hipótese, ele predizia que na ginástica cerebral, como resultado de exercícios mentais, as conexões entre os neurônios poderiam se multiplicar e também ser mudadas. Cajal foi possivelmente o primeiro cientista apontando, a partir de um ponto de vista estrutural, a influência do ambiente no desenvolvimento do cérebro e da função por meio de mudanças nas conexões neurais. Ele escreveu especificamente em um artigo publicado em um jornal espanhol em 1894: "tal plasticidade dos processos celulares, provavelmente, varia em diferentes idades: maior no jovem, a diminuição no adulto e quase desapareceu em idosos" (DEFELIPE, 2006). Essas idéias de Cajal são hoje refletidas nos resultados da pesquisa atual sobre a influência de um ambiente complexo no cérebro, tanto em animais jovens quanto idosos.

Durante a década de 1960, o psicólogo Mark R. Rosenzweig iniciou os estudos de como diferentes tipos de ambientes influenciariam a morfofisiologia do SNC dos animais, organizando situações experimentais que ofereciam oportunidades para a emissão de diversos comportamentos e comparando-as a animais que viviam em ambientes do tipo padrão de laboratório (ROSENZWEIG E BENNETT, 1969). Este paradigma de estudo ficou conhecido como enriquecimento ambiental (AE ou EE, do inglês *environmental enrichment*). A estimulação a partir vários objetos inanimados e a interação em ambiente amplo e socialmente dinâmico mostrou produzir alterações significativas tanto em processos fisiológicos quanto de aprendizagem (KRECH, ROSENZWEIG, BENNETT, 1960; BRUEL-JUNGERMAN, LAROCHE e RAMPON, 2005; LEGGIO *et al.*, 2005; PAMPLONA *et al.*, 2010), em comportamentos emocionais (MESHİ *et al.*, 2006; HATTORI *et al.*, 2007) e danos do SNC (NITHIANANTHARAJAH e HANNAN, 2006; LAVIOLA *et al.*, 2008).

1.2.1. Caracterização de enriquecimento ambiental

Para evitar confusões de terminologia, é importante adotar uma definição de trabalho de enriquecimento ambiental que pode ser aplicada para a discussão geral deste tema, além de fornecer um quadro

comum a partir do qual haja uma base de comparação entre as literaturas de enriquecimento humano e animal. Em geral, o conceito de enriquecimento pode ser definido como a suplementação de experiências que ocorrem naturalmente (HOROWITZ e PADEN, 1973). Além disso, os autores supracitados fornecem uma distinção útil entre o enriquecimento como suplementação e enriquecimento como intervenção. O enriquecimento ambiental como suplementação implica que o desenvolvimento psicológico ocorre independente do enriquecimento, seguindo o curso natural dos eventos; enquanto o enriquecimento como intervenção implica que o ambiente enriquecido é necessário para promover o desenvolvimento psicológico normal e um ambiente não enriquecido reflete em déficits no desenvolvimento do sujeito (HOROWITZ e PADEN, 1973). Esta conceituação inicial, influente nos tratamentos posteriores sobre o tema no que se refere ao desenvolvimento humano, fornece uma base geral para que o termo possa ser examinado em detalhes.

Na verdade, não existe um consenso na definição de enriquecimento na literatura científica específica, sendo que alguns autores inclusive argumentam contra a definição de enriquecimento (YOUNG, 2003). Apesar disso, o enriquecimento ambiental pode ser amplamente considerado como a adição de estímulos ou de possibilidades de escolha que resultem na melhoria do bem-estar animal (AZEVEDO, CIPRESTE e YOUNG, 2007). O enriquecimento é um assunto que nos últimos anos tem atraído muita atenção científica e da mídia, devido à sua ligação evidente com o bem-estar animal. Atualmente, a literatura nesta área alcançou uma massa crítica científica, permitindo a publicação de numerosos artigos, porém, o conteúdo exato da literatura através de revisão sistemática foi apenas recentemente analisado (AZEVEDO, CIPRESTE e YOUNG, 2007).

O enriquecimento ambiental foi e está sendo extensamente testado, tanto em condições de laboratório, em animais de cativeiro e zoológicos, quanto em programas educacionais com humanos (CURTIS e NELSON, 2003). Formas diferenciadas de exposição a ambientes enriquecidos têm gerado dados conflitantes ou reprodutíveis, que parecem ser dependentes das maneiras experimentais com que o ambiente é manipulado. Muitos artigos sobre este tema têm sido produzidos nas duas últimas décadas (AZEVEDO, CIPRESTE e YOUNG, 2007) entretanto poucas sugestões de manipulação ambiental efetiva de análise comportamental têm sido sugerida na literatura

(TAROU E BASHAW, 2007). No caso, a etologia que estuda sistematicamente os comportamentos espécie-específicos dos animais em seu ambiente natural tem encontrado que estes comportamentos variam grandemente entre espécies. Enquanto os etólogos obtiveram uma grande base de dados sobre os animais em ambiente natural, os analistas do comportamento descobriram as regras do aprendizado e de várias outras atividades, caracterizando tanto a filogênese, quanto a ontogênese na seleção do comportamento (SKINNER, 2007). No que tange a aspectos específicos da manipulação ambiental, talvez as variações nos dados possam ser minimizadas com a adição de algumas medidas específicas tanto de cunho etológico, quanto neurocomportamental.

Nesse sentido, grande parte dos experimentos utiliza ambientes enriquecidos durante a permanência dos animais nos biotérios (AZEVEDO, CIPRESTE e YOUNG, 2007), enquanto poucos experimentos com roedores tem sido conduzidos sob condições de complexidade ambiental não contínua (WIDMAN e ROSSELINI, 1990; BENNET *et al.*, 2006)

De maneira geral, quando os ratos são colocados em seu ambiente enriquecido, eles experimentam uma mudança que é extremamente abrangente, em todos os níveis do SNC, impactando desde aspectos moleculares até o seu comportamento. Muitas vezes o ambiente enriquecido é o ambiente único que o animal experimenta, 24 horas por dia, 7 dias por semana. Trabalhos sobre mecanismos de mudança neuronal resultantes do enriquecimento ambiental reportados na literatura indicam que um fator importante de tal mudança é a exposição a um ambiente enriquecido continuamente modificado, evitando assim o processo de habituação comportamental dos animais (TORASDOTTER *et al.*, 1998). Todavia, pouco se sabe sobre o papel da intermitência e esquemas temporais de estimulação enriquecedora, bem como habituação e diferentes formas de suscetibilidade a reforçadores no ambiente enriquecido, existindo ainda diversas divergências conceituais na literatura (TAROU e BASHAW, 2007)

A partir disso, é perceptível que muitos estudos têm sido realizados para avaliar a eficácia de programas de enriquecimento, e é sabido que alguns tipos de enriquecimento alteram o comportamento de maneira mais eficaz do que outros, teoricamente possibilitando o desenho de manipulações ambientais otimizadas para a melhoria de determinado desempenho comportamental. No entanto, deve ser

destacado que nenhuma estrutura teórica única foi acordada para orientar a elaboração e manutenção de programas eficazes de enriquecimento ambiental (TAROU e BASHAW, 2007).

Para efeitos do presente trabalho, o enriquecimento será definido como a inclusão de experiência que complementa o ambiente ao qual o organismo estaria exposto. Assim, no conjunto de terminologia propostas por Horowitz e Paden (1973), os tipos de enriquecimento considerados aqui poderiam ser tanto de suplementação ou intervenção. O termos complexidade e enriquecimento ambiental (AE) serão utilizados alternadamente, até certo ponto ao longo do trabalho, de uma forma consistente com o uso empregados nos trabalhos da literatura.

1.2.2. Efeitos do enriquecimento ambiental em processos neurobiológicos e comportamentais

O importante debate sobre se o enriquecimento ambiental teria influência sobre o número de células no cérebro adulto teve início juntamente com as pesquisas sobre proliferação celular da década de 1960. Em 1964, Joseph Altman (o primeiro pesquisador a descrever a neurogênese adulta no hipocampo) investigou se o enriquecimento poderia afetar a produção de neurônios em ratos. Os resultados deste estudo pioneiro indicaram somente uma gliogênese reforçada. Neste estudo, o foco da análise foi no córtex e não no hipocampo, o que pode representar uma das possíveis explicações para a ausência de novos neurônios observada pelos pesquisadores. Estudos posteriores relataram que o aumento no número de células da glia era atribuível a oligodendrócitos, bem como aumento um pouco menor no número de astrócitos (WALSH *et al.*, 1969) dos animais criados em ambiente enriquecido. Posteriormente, foi demonstrado que tanto o enriquecimento quanto o exercício aumentam o número de novos neurônios no giro dentado do hipocampo de roedores (KEMPERMANN, KUHN e GAGE, 1997; BRUEL-JUNGERMAN, LAROCHE e RAMPON, 2005). O exercício voluntário e o ambiente enriquecido aumentaram significativamente a neurogênese em roedores expostos a essas condições e os sujeitos tiveram melhor desempenho em tarefas de aprendizagem espacial dependentes do hipocampo. Da mesma forma, no bulbo olfatório, a sobrevivência de novos neurônios foi reforçada pela exposição ao enriquecimento de odores (ROCHFORT *et al.*, 2002).

Segundo Leggio *et al.* (2005), os animais estimulados em ambientes enriquecidos processam a informação espacial mais eficientemente do que os animais de ambientes padrão (controles) e empregam mais rapidamente estratégias às circunstâncias ambientais que enfrentam. Ou seja, uma plasticidade no processamento de informação – um processo cognitivo tão fundamental quanto a memória. Neste sentido, o enriquecimento ambiental aumenta significativamente o número de ramificações e o volume celular em neurônios da área CA1 e do giro denteado do hipocampo. Na região CA1, o número de neuritos e o volume celular foi triplicado (RAMPON *et al.*, 2000), e um estudo recente encontrou várias alterações morfológicas dos neurônios piramidais do córtex (GELFO *et al.*, 2009) após a exposição ao enriquecimento ambiental

Nesse contexto, a facilitação da aquisição de memórias de curto e longo prazo e melhora da memória de trabalho pela exposição ao ambiente enriquecido é suportada pelo fato da estimulação ambiental alterar o processamento sensório-motor em relação ao ambiente padrão (DIAMOND *et al.*, 1993; CANCEDDA *et al.*, 2004; CAI *et al.*, 2009). Ocorre um realce das potencialidades em tarefas espaciais e solução de problemas em consequência de um ambiente complexo onde é fácil experimentar a novidade (LEGGIO *et al.*, 2005).

O reforço da aprendizagem e memória pode estar relacionado com efeitos celulares na plasticidade sináptica e neurogênese hipocampal, embora um estudo recente sugira que o aumento da proliferação celular no hipocampo não seja necessário para melhorar o desempenho em tarefas de memória espacial (MESHİ *et al.*, 2006). Estes achados indicam que a geração de novas células estimuladas pelo ambiente não é um fator crítico para alterações e melhora nas estratégias comportamentais (UEDA, SAKAKIBARA e YOSHIMOTO, 2005)

Além da melhora em processos cognitivos, Chapillon e colegas (1999) testaram diferentes linhagens de camundongos no labirinto em cruz elevado (LCE) e encontraram redução de comportamentos de esquivas aos braços abertos em camundongos BALB/c submetidos ao ambiente enriquecido; todavia, não verificaram alterações significativas nos mesmos parâmetros em camundongos da linhagem C57BL/6 submetidos ao ambiente enriquecido. Em outro estudo, ROY *et al.* (2001) verificaram que o número de entradas e o tempo dispendido nos braços abertos do LCE não diferiam significativamente dos seus controles em condição padrão, contrastando com os resultados

apresentados pelo próprio laboratório anteriormente (CHAPILLON *et al.*, 1999). Outro laboratório demonstrou que o enriquecimento ambiental diminuiu os comportamentos relacionadas à ansiedade em comparação com o ambiente padrão, revelando um aumento na exploração dos braços abertos do LCE (BENAROYA-MILSHEIN *et al.*, 2004).

Posteriormente, outros pesquisadores descreveram melhora no processamento de informações contextuais em ratas adultas decorrente de enriquecimento ambiental, além da ocorrência de diminuição do medo condicionado ao contexto, sugerindo uma maior facilidade para lidar com situações estressantes (BARBELIVIEN *et al.*, 2006). Corroborando estes achados, Cui *et al.* (2006) relataram uma reversão dos comportamentos do tipo-depressivo em ratos avaliados no teste do nado forçado após um período de 30 dias de exposição ao ambiente enriquecido. Outro estudo comparando alojamento individual ou em grupo, em ambientes padrão ou enriquecido indicou a necessidade um ambiente enriquecido completo, incluindo a necessidade de objetos inanimados, e não apenas de enriquecimento social para proteger os ratos contra o desamparo aprendido, um modelo animal de depressão (CHOURBAJI *et al.*, 2005). Nos últimos anos têm sido demonstrado que o enriquecimento ambiental é capaz de atenuar ou reverter os prejuízos cognitivos em modelos animais da doença de Alzheimer (JANKOWSKY *et al.*, 2005), síndrome de Down (DIERSSEN *et al.*, 2003), epilepsia (FAVERJON *et al.*, 2002) e autismo (SCHNEIDER *et al.*, 2006). Costa *et al.*, 2007 demonstrou que o enriquecimento ambiental associado a testes comportamentais reduz a formação de placas amilóides, além de atenuar prejuízos de memória em camundongos que receberam a administração do peptídeo beta-amiloide, um modelo da doença de Alzheimer. Nesta pesquisa foi verificado que nem o enriquecimento ambiental, nem treinos comportamentais com labirintos (aquático de Morris, aquático radial de oito braços, em T e em Y) foram suficientes para reduzir a deposição de beta amiloide agregada, apesar de resultados comportamentais descritos como redução do declínio cognitivo dos animais; entretanto quando estes paradigmas eram feitos em paralelo, tanto a redução da beta amiloide, quanto melhora de memória, assim como alteração na expressão de genes de plasticidade eram verificados, demonstrando mecanismos que independentes entre comportamento e mudanças neurobiológicas ocorrem sob condições de complexidade ambiental. Um trabalho recente

do nosso grupo demonstrou que o enriquecimento ambiental contínuo desde o desmame é capaz de prevenir os prejuízos cognitivos de ratos espontaneamente hipertensos, utilizados como um modelo animal do transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (PAMPLONA et al., 2010).

Pelo fato de existirem grandes variações individuais quanto o avanço da doença e os sintomas apresentados pelos pacientes parkinsonianos (FAWCETT, ROSSER e DUNNET, 2001), fatores ambientais e o estilo de vida têm sido sugeridos como sendo capazes de influenciar no desenvolvimento da DP (DOBROSSY e DUNNETT, 2003). Embora ainda não existam resultados clínicos que confirmem esta hipótese, alguns estudos pré-clínicos têm indicado que fatores ambientais podem interferir com o processo neurodegenerativo e o aparecimento de sintomas motores em modelos experimentais da DP. Bezar e colaboradores (2003) observaram que camundongos criados em ambiente enriquecido foram mais resistentes a neurodegeneração da SNpc induzida pela administração sistêmica da pro-toxina MPTP, apresentando uma redução de 40% nos neurônios dopaminérgicos desta região em comparação a uma perda de 75% observadas em animais criados em um ambiente padrão. Além disso, Zu et al. (2005) demonstraram que ratos criados em ambiente enriquecido apresentaram menores níveis e atividade do DAT em contraste a um aumento nos níveis do fator neurotrófico dependente do cérebro (BDNF) no estriado. Mais recentemente, foi demonstrada neuroproteção contra os efeitos tóxicos do MPTP em camundongos SAMP8 expostos ao ambiente enriquecido, com perda menor de células e diminuição da expressão do RNAm do DAT (YUAN *et al.*, 2009). Neste mesmo sentido, existem algumas evidências na literatura de que a incidência da DP poderia ser influenciada pelas possibilidades de escolha de comportamentos em seu repertório, assim como nível educacional do indivíduo (FRIGERIO *et al.*, 2005) e a prática regular de exercícios físicos (CHEN et al., 2005). Entretanto, deve ser destacado que não existe nenhum estudo experimental na literatura, ao menos do nosso conhecimento, buscando avaliar os efeitos da manipulação ambiental sobre os sintomas não motores da DP, sendo este o fator principal que motivou a realização do presente estudo.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

- Investigar os efeitos de diferentes manipulações ambientais em comportamentos relacionados à ansiedade e depressão em ratos submetidos à um modelo experimental da doença de Parkinson.

2.2. Objetivos Específicos

- Investigar os efeitos do enriquecimento ambiental contínuo, de sessões intermitentes de enriquecimento ambiental e do tratamento i.n. com MPTP sobre a atividade locomotora espontânea de ratos avaliada no teste do campo aberto.
- Investigar os efeitos do enriquecimento ambiental contínuo, de sessões intermitentes de enriquecimento ambiental e do tratamento i.n. com MPTP sobre comportamentos de esquiva aos braços abertos em ratos avaliados no teste do labirinto em cruz elevado.
- Investigar os efeitos do enriquecimento ambiental contínuo, de sessões intermitentes de enriquecimento ambiental e do tratamento i.n. com MPTP sobre comportamento de imobilidade em ratos avaliados no teste do nado forçado.

3. Metodologia

3.1. Desenho experimental

Esta dissertação consiste em dois experimentos independentes no qual foram utilizados dois protocolos distintos de enriquecimento ambiental: um deles a partir de caixas de enriquecimento padrão de nosso laboratório num alojamento contínuo no ambiente; e um segundo a partir de exposições descontínuas de uma hora por dia a uma caixa maior de enriquecimento, possibilitando que ocorresse uma maior variação na riqueza dos estímulos. Diante das divergências de dados existentes na literatura com relação aos efeitos do ambiente enriquecido sobre o comportamento de roedores, decidimos testar uma variação do paradigma de enriquecimento ambiental baseado na bibliografia comportamental assim como em experimentos de Widman e Rossellini (1990) sobre os efeitos de ambiente enriquecido descontínuo. A partir disso, planejamos um experimento, levando em conta a aproximação do número de trocas de objetos e manipulação do ambiente, descritas na literatura; contudo expondo os animais a um ambiente com distribuição mais equitativa em uma caixa maior, por um período de tempo menor, no intuito de apresentar uma maior intermitência e aleatoriedade durante a exposição à complexidade ambiental (WIDMAN E ROSSELLINI, 1990; TAROU E BASHAW, 2007). Para efeitos de nomenclatura, utilizamos equivalentemente os termos ambiente enriquecido intermitente e ambiente enriquecido descontínuo, a fim de diferenciar do ambiente enriquecido contínuo no qual os animais eram criados 24 h por dia em contato com a complexidade. Os detalhes dos experimentos são descritos a seguir.

3.2. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos provenientes do biotério central da UFSC. Os animais foram mantidos em grupos de 6-8 animais por caixa em uma biotério com condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo de luz de 12 h (luz acesas às 7:00 h) com livre acesso à água e ração. Todos os testes comportamentais foram realizados entre 13 h e 18 h, enquanto o protocolo de exposição ao ambiente enriquecido intermitente foi realizado durante 1 h no período da noite (entre 22 h e 24 h), em razão da maior atividade dos animais no período noturno

(GELFO et al., 2009). Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (Processo número 23080.003468/2010-99).

3.3. Protocolos de enriquecimento ambiental

Para o enriquecimento ambiental foram utilizados brinquedos como chocalhos, bolas com sininhos, tubos e canos, materiais de ninhos e tocas, ralos, duas rodas de correr e pequenas plataformas com rodas (ver Figuras 1 e 2). Estes objetos foram selecionados tendo em vista as possibilidades de enriquecimento sensorial e cognitivo, seguindo sugestões de autores em revisão sobre efeitos do ambiente em transtornos neurológicos (NITHIANANTHARAJAH, 2006).

Os animais foram submetidos aos respectivos ambientes enriquecidos (contínuo ou intermitente) desde o desmame (21 dias) até completarem 10 semanas de vida. Após este período, os animais foram subdivididos dentro de cada ambiente em mais 2 grupos quanto ao tratamento (controle e MPTP), sendo assim formado os 4 grupos para cada experimento: (1) ambiente padrão/controle; (2) ambiente padrão/MPTP; (3) ambiente enriquecido/controle; (4) ambiente enriquecido/MPTP.

3.3.1. Experimento 1: protocolo de exposição contínua ao ambiente enriquecido

Foram utilizados um total de 32 ratos que foram divididos nos quatro grupos descritos acima (n=8 ratos por grupo). Como ambiente padrão foram utilizadas caixas normais do biotério (gaiolas de plástico com 42 x 34 x 17 cm). As caixas do ambiente enriquecido contínuo são duplas interconectadas por um tubo (10 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento) e maiores (46 x 33 x 23) formando duas caixas (Figura 1). Os animais permaneceram por 24 horas por dia, sete dias por semana nas caixas específicas de cada ambiente, sendo que os objetos utilizados para promover a complexidade ambiental eram trocados e reorganizados durante a limpeza dos ambientes, três vezes por semana (ROZENSWEIG e BENNET, 1996).



Figura 1: Foto do ambiente enriquecido contínuo em gaiolas duplas utilizado no presente estudo.

3.3.2. Experimento 2: protocolo de exposição intermitente (sessões) ao ambiente enriquecido

Nesta versão, os ratos foram divididos nos quatro grupos descritos acima, sendo utilizados um total de 48 animais divididos em grupos de 6 animais por caixa. O ambiente enriquecido incondicionado (AEI) é uma caixa de 100 x 100 x 50 cm e foi constituído de brinquedos (chocalhos, bolas com sininho), rodas de correr, escada e cano (Figura 2). Os animais permaneceram em ambiente padrão durante todo o período dos experimentos, exceto pelo tempo de exposição ao ambiente enriquecido, seis ratos por vez, durante sessões de 1 h (realizadas entre 22 h e 24 h), 3-4 vezes por semana, em dias intercalados (adaptado de WIDMAN e ROSSELINI, 1990; e BENNET et al., 2006).



Figura 2: Foto do ambiente enriquecido maior utilizado para as sessões intermitentes de enriquecimento no presente estudo.

3.4. Administração intranasal de MPTP

A administração i.n. de MPTP foi realizada seguindo o protocolo descrito originalmente por Dluzen e Kefalas (1996) e adaptado por Prediger et al. (2006) para ratos. Os ratos foram anestesiados levemente com isoflurano a 0,96% (0,75 CAM; Abbot Laboratórios do Brasil Ltda, RJ, Brasil.) utilizando um sistema vaporizador (SurgiVet Inc., WI, EUA) e 10-mm de um tubo de polietileno (PE-50) foi inserido nas narinas dos animais. O tubo foi conectado a uma bomba de infusão regulado para administração das soluções na razão de 12,5 μ l/min. O MPTP HCl (Sigma Chemical Co., USA) foi inicialmente dissolvido em etanol 10% e em 0.9% NaCl (salina) em uma concentração de 2 mg/ml, após procedeu-se a infusão por 4 minutos (0,1 mg/narina). A solução controle era constituída de salina. Após este procedimento, os animais tiveram 1 minuto de intervalo para a recuperação respiratória e então receberam a infusão na outra narina. Devido o MPTP ser uma substância altamente tóxica, todo o protocolo de administração i.n. foi realizado com proteção especial lacrada, máscaras, óculos e luvas de proteção, em sala fechada e em capela impedindo o contato do expereimentador com a toxina.

3.5. Testes Comportamentais

Após um tempo variável do tratamento i.n. com MPTP, os animais foram avaliados em testes comportamentais. Na organização da sequência dos testes foi levada em consideração a aversividade dos mesmos, tendo sido realizados os testes na ordem do menos aversivo para o mais aversivo. Desta maneira, o teste do campo aberto, do labirinto em cruz elevado e do nado forçado, foram realizados, respectivamente, 4, 5 e 7 dias após a administração i.n. de MPTP.

3.5.1. Atividade locomotora espontânea

Para examinar os efeitos do MPTP e do ambiente enriquecido na atividade locomotora, os animais foram avaliados por 5 minutos no teste do campo aberto sob baixa iluminação (14 lux). O campo aberto para ratos consiste em uma arena feita de madeira com 100 x 100 cm de base, pintada de cinza e dividida por linhas pretas formando 25 quadrantes de 20 x 20 cm. A base é cercada por paredes brancas de madeira com 50 cm de altura. Cada rato foi colocado no centro do campo aberto e o número de quadrantes atravessados e de comportamentos de levantar foram registrados.

3.5.2. Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE) foi utilizado baseado na sua capacidade de detectar tanto efeitos do tipo-ansiolítico quanto do tipo-ansiógênico em ratos (PELLOW et al., 1985). Este consta de dois braços que se inter cruzam, sendo um aberto e o outro fechado por paredes. O animal é colocado na intersecção dos braços e um observador ou câmera registra o número de entradas e o tempo gasto em cada braço. O modelo possui validade preditiva para drogas ansiolíticas, especialmente para fármacos da classe dos benzodiazepínicos, e validade teórica visto ser sensível a procedimentos aversivos como exposição prévia a odor de gato, natação forçada, além de provocar aumento de corticosteróides e defecação, característicos em resposta a estimulação aversiva (PELLOW et al., 1985)

O aparato, feito de madeira e fórmica, consiste de dois braços abertos (50 x 10 cm), opostos a dois braços fechados (50 x 10 x 10 cm), elevados 50 cm acima do chão. A área de junção dos quatro braços

(plataforma central) mede 10 x 10 cm. Cada rato foi colocado na plataforma central de frente para o um braço fechado e os animais foram observados durante um período de 5 min. Foram avaliados os seguintes parâmetros: o número de entradas nos braços abertos e nos braços fechados, o tempo de permanência nos braços abertos e nos braços fechados (foi considerada uma entrada quando as quatro patas do animal estivessem no interior do braço). Além disso, foi utilizado o número total de entradas nos braços fechados como uma medida de locomoção (CRUZ *et al.*, 1994).

3.5.3. Nado forçado

O teste do nado forçado foi desenvolvido por Porsolt e colaboradores (1977). Este teste é a ferramenta mais utilizada para avaliação pré-clínica da atividade antidepressiva de fármacos. A ampla utilização deste modelo se deve em grande parte à sua facilidade de uso, confiabilidade e a sua capacidade de detectar um amplo espectro de agentes antidepressivos (BORSINI e MELI, 1988). O teste é baseado na observação de que ratos, seguindo os movimentos iniciais de fuga orientada, desenvolvem uma postura imóvel quando colocado em um cilindro com água sem a possibilidade de escapar. Após 24 horas, os animais retomam ao teste. O tempo de imobilidade reflete tanto uma falha de persistência no comportamento de fuga/esquiva dirigida (chamado de desespero comportamental por Porsolt em 1977) ou o desenvolvimento de um comportamento passivo que diminui a forma ativa do animal de lidar com o estresse (LUCKY, 1997). A administração de fármacos antidepressivos entre as duas exposições aumenta o tempo em que os animais persistem ativamente em comportamentos de fuga.

O teste foi realizado em um cilindro de polietileno, medindo 18,5 cm de altura e 12,5 cm de diâmetro e contendo 13,5 cm de água à temperatura de 25 ± 1 °C. Os animais foram colocados no cilindro por 15 minutos no primeiro dia e avaliados por 5 minutos 24 horas após. O tempo que cada animal permaneceu imóvel (tempo de imobilidade) durante os 5 min de teste, no segundo dia foram registrados.

3.6. Análise estatística

Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (e.p.m.). As comparações estatísticas dos resultados foram realizadas por análise de variância (ANOVA) de duas vias com tratamento e ambiente como variáveis independentes. Posteriormente, os grupos foram comparados entre si empregando-se o teste *post-hoc* de Duncan. A probabilidade aceita como indicativo da existência de diferença estatisticamente significativa foi $p \leq 0,05$. Todas as comparações estatísticas foram efetuadas utilizando-se o pacote estatístico *Statistica 8.0*.

4. Resultados

4.1. Experimento 1

4.1.1. Efeitos do enriquecimento ambiental contínuo e do tratamento intranasal com MPTP sobre a atividade locomotora de ratos

Os resultados ilustrados na Figura 3 mostram os efeitos do enriquecimento ambiental contínuo e da administração i.n. de MPTP sobre a atividade locomotora espontânea de ratos avaliada no campo aberto. A ANOVA de duas vias não demonstrou efeito significativo para os fatores ambiente e tratamento no número de cruzamentos [ambiente: $F(3, 28)=0,36$; $p=0,55$; tratamento: $F(3, 28)=0,02$; $p=0,86$] e levantamentos [ambiente: $F(3, 28)=0,60$; $p=0,80$; tratamento: $F(3, 28)=0,87$; $p=0,35$] no campo aberto (Figuras 3A e 3B, respectivamente).

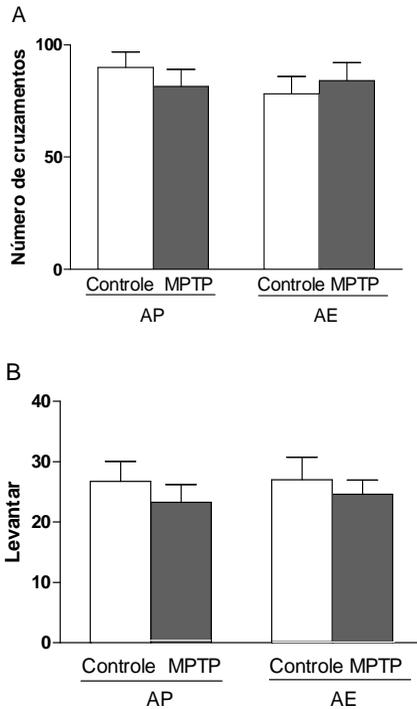


Figura 3: Efeitos do enriquecimento ambiental contínuo e da administração intranasal (i.n.) de MPTP (0,1 mg/narina) sobre a atividade locomotora de ratos avaliada no campo aberto durante 5 minutos. Os valores são expressos pela média \pm erro padrão da média (e.p.m.) do número de cruzamentos (A) e atos de levantar (B) de 8 animais por grupo. ANOVA de duas vias revelou efeitos não significantes para as variáveis ambiente e tratamento. AP = ambiente padrão; AE = ambiente enriquecido.

4.1.2. Efeitos do enriquecimento ambiental contínuo e do tratamento intranasal com MPTP sobre comportamentos do tipo ansiedade em ratos

Os resultados ilustrados na Figura 4 mostram os efeitos do enriquecimento ambiental contínuo e da administração i.n. de MPTP sobre os comportamentos do tipo ansiedade de ratos avaliados no LCE.

A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo do tratamento [$F(3,28)=6,12$; $p \leq 0,05$], e do ambiente [$F(3,28)=1,64$; $p \leq 0,05$], na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do LCE (Figura 4A). Além disso, a ANOVA indicou um efeito significativo do ambiente [$F(3,28)=8,28$; $p \leq 0,01$], mas não do tratamento [$F(3,28)=1,66$; $p=0,21$] na porcentagem de entradas nos braços abertos (Figura 4B). Por fim, nenhum dos fatores (ambiente ou tratamento) alterou de maneira significativa o número de entradas nos braços fechados do LCE (Figura 4C), indicando a ausência de qualquer comprometimento motor dos animais.

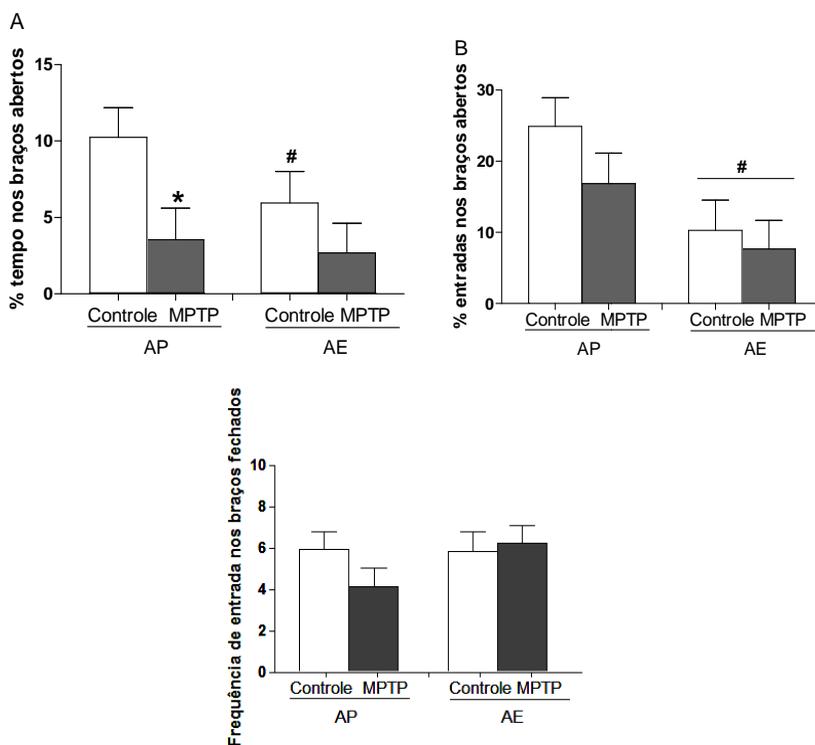


Figura 4: Efeito da administração intranasal de MPTP (0,1 mg/narina) nas respostas do tipo ansiedade avaliadas no labirinto em cruz elevado em ratos que habitavam diferentes ambientes, padrão e enriquecido (n=8 animais por grupo). Os valores são representados pela média \pm erro

padrão da média (e.p.m.) do percentual de tempo gasto nos braços abertos (A), o percentual de entradas nos braços abertos (B) e o número de entradas nos braços fechados (C). * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo que recebeu solução controle do respectivo ambiente; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo que recebeu solução controle do ambiente padrão (teste *post-hoc* de Duncan). AP = ambiente padrão; AE = ambiente enriquecido.

4.1.3. Efeitos do enriquecimento ambiental contínuo e do tratamento intranasal com MPTP sobre comportamentos do tipo depressivo em ratos

A figura 5 ilustra os resultados dos efeitos do enriquecimento ambiental contínuo e da administração i.n. de MPTP sobre os comportamentos do tipo depressivo em ratos avaliados no teste do nado forçado. A ANOVA de 2 vias indicou efeitos significantes dos fatores ambiente [$F(3,28)=7,29$; $p \leq 0,01$] e tratamento [$F(3,28)=18,54$; $p \leq 0,001$] no tempo de imobilidade. Posterior teste *post-hoc* de Duncan demonstrou que tanto a administração i.n. do MPTP (0,1 mg/narina) quanto à exposição ao ambiente enriquecido contínuo aumentaram o tempo de imobilidade dos animais, indicando um aumento do comportamento do tipo depressivo (Figura 5).

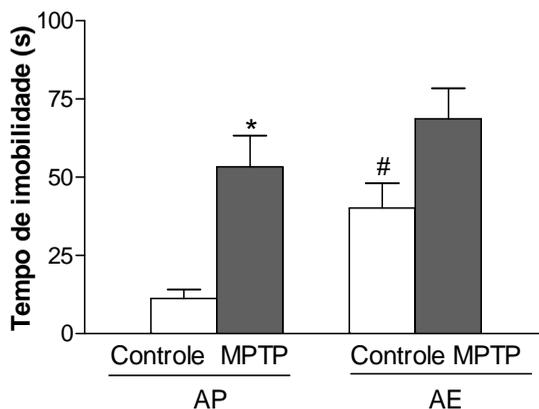


Figura 5: Efeitos do enriquecimento ambiental contínuo e da administração intranasal de MPTP (0,1 mg/narina) sobre o comportamento do tipo depressivo de ratos avaliado no teste do nado forçado durante 5 minutos. Os valores são expressos pela média \pm erro padrão da média (e.p.m.) do tempo de imobilidade dos animais ($n=7-8$ animais por grupo). * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo que recebeu solução controle do respectivo ambiente; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo que recebeu solução controle do ambiente padrão (teste *post-hoc* de Duncan). AP = ambiente padrão; AE = ambiente enriquecido.

4.2. Experimento 2

4.2.1. Efeitos de sessões intermitentes de enriquecimento ambiental e do tratamento intranasal com MPTP sobre a atividade locomotora de ratos

Os resultados apresentados na Figura 6 mostram os efeitos do enriquecimento ambiental intermitente (em sessões) e da administração i.n. de MPTP sobre a atividade locomotora espontânea de ratos avaliada no campo aberto. A ANOVA de duas vias indicou efeitos não significantes para os fatores ambiente e tratamento no número de cruzamentos [ambiente: $F(1, 44)=0,61$, $p=0,43$; e tratamento: $F(1,$

44)=1,27, $p=0,26$] e no número de levantamentos [ambiente: $F(1, 44)=2,68$, $p=0,10$; tratamento: $F(1, 44)=2,99$, $p=0,09$] (Fig. 6A,B).

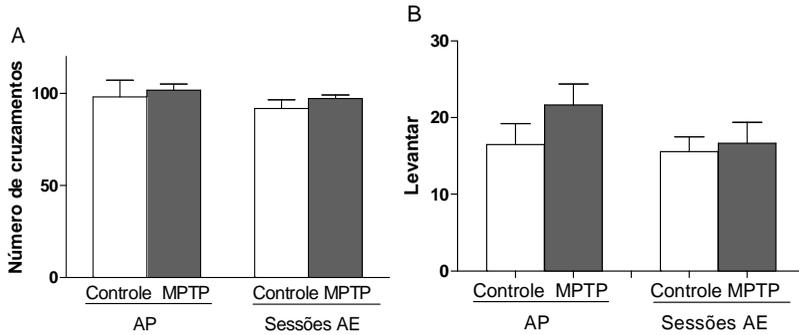


Figura 6: Efeitos do enriquecimento ambiental intermitente (em sessões) e da administração intranasal de MPTP (0,1 mg/narina) sobre a atividade locomotora de ratos avaliada no campo aberto durante 5 minutos. Os valores são expressos pela média \pm erro padrão da média (e.p.m.) do número de cruzamentos (A) e atos de levantar (B) de 12 animais por grupo. ANOVA de duas vias revelou efeitos não significantes para as variáveis ambiente e tratamento. AP = ambiente padrão; Sessões AE = ambiente enriquecido intermitente (em sessões).

4.2.2. Efeitos de sessões intermitentes de enriquecimento ambiental e do tratamento intranasal com MPTP sobre comportamentos do tipo ansiedade em ratos

A Figura 7 ilustra os resultados do tratamento i.n. com MPTP e de sessões intermitentes de ambiente enriquecido em comportamentos do tipo ansiedade em ratos avaliados no teste do LCE. A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo para os fatores ambiente [$F(1, 44)=7,33$, $p\leq 0,01$] e tratamento [$F(1, 44)=5,12$, $p\leq 0,05$] na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do LCE. Comparações post-hoc mostraram que os animais do ambiente padrão que receberam à infusão i.n. de MPTP exploraram por um tempo significativamente menor os braços abertos do LCE, sendo que nos animais expostos às sessões de ambiente enriquecido esta redução no tempo gasto nos braços abertos não foi observada. Além disso, o ambiente enriquecido mostrou elevar significativamente o tempo nos braços abertos em comparação a seus

controles que não foram submetidos a sessões de enriquecimento (Figura 7A).

Com relação ao número de entradas nos braços abertos, a ANOVA de duas vias revelou efeito significativo para o fator ambiente [$F(1, 44)=8,33$, $p\leq 0,01$], mas não para o tratamento [$F(1, 44)=3,16$, $p=0,08$]. Comparações post hoc indicaram que as sessões de enriquecimento ambiental em animais que receberam a infusão i.n. de MPTP promoveu um aumento na porcentagem de entradas dos braços abertos quando comparados com seus controles que não foram submetidos as sessões no ambiente enriquecido (Figura 7B).

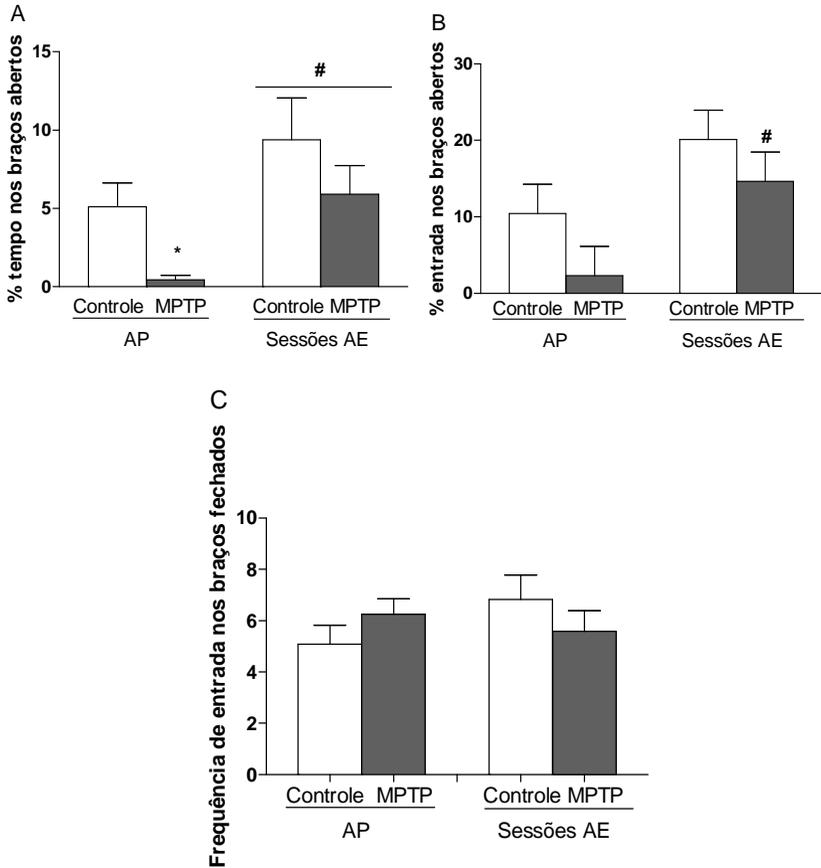


Figura 7: Efeitos do enriquecimento ambiental intermitente (em sessões) e da administração intranasal de MPTP (0,1 mg/narina) nas respostas do tipo ansiedade avaliadas no labirinto em cruz elevado em ratos (n=12 animais por grupo). Os valores são representados pela média \pm erro padrão da média (e.p.m.) do percentual de tempo gasto nos braços abertos (A), o percentual de entradas nos braços abertos (B) e o número de entradas nos braços fechados (C). * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo que recebeu solução controle do respectivo ambiente; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo que recebeu solução controle do ambiente padrão (teste *post-hoc* de Duncan). AP = ambiente padrão; Sessões AE = ambiente enriquecido intermitente (em sessões).

Por fim, nenhum dos fatores (ambiente: $F(1, 44)=0,48$, $p=0,49$; ou tratamento: $F(1, 44)=0,002$, $p=0,96$) alterou de maneira significativa o número de entradas nos braços fechados do LCE (Figura 7C), indicando a ausência de qualquer comprometimento motor dos animais.

4.2.3. Efeitos de sessões intermitentes de enriquecimento ambiental e do tratamento intranasal com MPTP sobre comportamentos do tipo depressivo em ratos

A ANOVA de duas revelou efeitos significantes para os fatores tratamento ($F(1, 44)=5,18$, $p\leq 0,05$) e ambiente ($F(1, 44)=11,02$, $p\leq 0,001$) sobre o tempo de imobilidade dos animais avaliado no teste do nado forçado. Comparações post-hoc com o teste de Duncan revelaram que a administração i.n. de MPTP (0,1 mg/narina) promoveu um aumento significativo no tempo de imobilidade dos animais do ambiente padrão, sendo que as sessões de enriquecimento ambiental preveniram estas alterações induzidas pelo tratamento com MPTP (Figura 8).

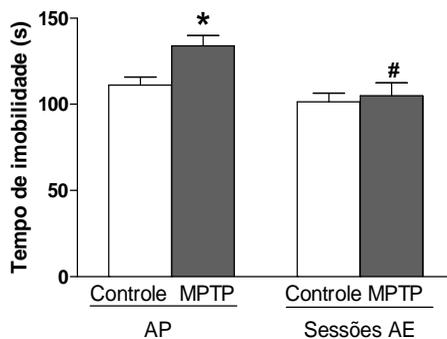


Figura 8: Efeitos do enriquecimento ambiental intermitente (em sessões) e da administração intranasal de MPTP (0,1 mg/narina) nas respostas do tipo depressão avaliadas no teste do nado forçado em ratos durante 5 minutos. Os valores são expressos pela média \pm erro padrão da média (e.p.m.) do tempo de imobilidade dos animais ($n=12$ animais por grupo). * $p\leq 0,05$ comparado ao grupo que recebeu solução controle do respectivo ambiente; # $p\leq 0,05$ comparado ao grupo que recebeu solução controle do ambiente padrão (teste *post-hoc* de Duncan). AP = ambiente padrão; Sessões AE = ambiente enriquecido intermitente (em sessões).

5. Discussão

Uma primeira questão ao se trabalhar com modelos animais é estabelecer o modelo apropriado que mimetize ao máximo possível as condições e variáveis às quais se está avaliando. Avaliamos, neste estudo, comportamentos locomotores e do tipo ansiedade e depressivo em ratos submetidos a um modelo animal da DP, visto a prevalência destes sintomas em pacientes parkinsonianos. Adicionalmente, demonstramos no presente estudo que alterações prévias na complexidade ambiental, sem qualquer outra intervenção farmacológica, podem interferir no desenvolvimento de comportamentos do tipo ansiedade e depressivos em ratos infundidos com a toxina MPTP pela via i.n., um modelo experimental da DP. Os animais foram diferentemente afetados pelo ambiente, demonstrando que alterações que possam parecer mínimas na história do sujeito podem alterar a incidência de comportamentos emocionais associados a esta patologia.

Quatro dias após a administração de MPTP os animais não apresentaram alterações locomotoras significativas no teste do campo aberto, tanto no experimento 1 quanto no experimento 2. De acordo com Prediger *et al.* (2006), a administração i.n. de MPTP não induz alterações locomotoras em ratos nos períodos iniciais (até 7 dias) após a sua administração, sendo que estas somente são observadas na segunda e terceira semana após o tratamento. Nossos resultados vão nesta direção, entretanto, como nosso objetivo não foi determinar estas alterações motoras ao longo do tempo, não verificamos a decorrência dos efeitos do MPTP em outros períodos mais tardios.

Além disso, o ambiente também não provocou alterações significantes nos parâmetros locomotores dos animais em nenhum dos dois experimentos. Estes resultados são contraditórios a alguns achados prévios da literatura, onde o enriquecimento ambiental diminuiu significativamente a locomoção no campo aberto, tanto em ratos (KEMPERMANN e GAGE, 1999; ZIMMERMANN *et al.*, 2001; KOBAYASHI, OHASHI e ANDO, 2002; PIETROPAOLO *et al.*, 2004; ELLIOT e GRUNBERG, 2005) quanto em camundongos (KEMPERMANN e GAGE, 1999; PIETROPAOLO *et al.*, 2004; AMARAL *et al.*, 2008). Por outro lado, resultados similares aos nossos já foram descritos em camundongos, onde a atividade exploratória e locomotora dos animais não foi alterada de maneira significativa pelo ambiente enriquecido (BRANCHI *et al.*, 2006).

Segundo Amaral *et al.* (2008), a diminuição do comportamento exploratório e locomotor é verificada no final das sessões, e nas sessões subsequentes de exposição ao campo aberto, sugerindo que o componente de habituação representa um fator importante para esta ocorrência. De acordo com relatos anteriores (ZIMMERMANN *et al.*, 2001; SCHRIJVER *et al.* 2002; PIETROPAOLO *et al.*, 2004), foi observado que a combinação do enriquecimento social e físico com objetos, apresenta um efeito mais pronunciado sobre o comportamento no campo aberto, quando comparado apenas ao enriquecimento social.

Como descrito na introdução, transtornos de ansiedade são comumente observados em pacientes parkinsonianos (MENZA *et al.*, 1993; POEWE, 2008). Utilizamos o LCE para determinar as alterações comportamentais deste tipo quando animais permaneceram no ambiente enriquecido. Em ambos experimentos do presente estudo, os animais que receberam a infusão i.n. de MPTP e foram submetidos ao LCE após 5 dias permaneceram um tempo significativamente menor nos braços abertos do que seu controle que recebeu salina. Um estudo prévio do nosso grupo revelou que camundongos não apresentaram aumento dos comportamentos do tipo ansiedade avaliados no LCE após o tratamento com i.n. MPTP (PREDIGER *et al.*, 2010). Por outro lado, ratos infundidos bilateralmente com MPTP na SNpc apresentaram uma redução significativa no tempo de exploração dos braços abertos e no número de avaliação de risco no LCE (WANG *et al.*, 2009; SY *et al.*, 2010), indicando aumento dos níveis de ansiedade nestes animais. Ademais, assim como encontrado em nosso estudo, o número de entradas nos braços fechados no teste, que é comumente usado para medir a atividade locomotora, não foi afetada pelo tratamento com MPTP (WANG *et al.*, 2009; SY *et al.*, 2010). Além disso, estudos prévios utilizando outros modelos experimentais da DP, como da 6-OHDA, também relataram um aumento do comportamento do tipo ansiedade (BRANCHI *et al.*, 2008; TADAIESKY *et al.*, 2010), sendo este semelhante ao observado em pacientes parkinsonianos (LANGSTON, 2006).

Embora os distúrbios de ansiedade têm sido comumente encontrados na clínica, Pontone *et al.* (2009) argumenta que apesar disso os transtornos de ansiedade que não cumprem os critérios do DSM tem sido negligenciados na literatura. Em outros estudos clínicos, Mondolo *et al.* (2007) descrevem sintomas como dificuldade de relaxar, inquietação e sentimento de tensão presentes na maioria dos pacientes

com DP. Já foi relatado na literatura que grande parte dos sintomas não motores da DP é subdiagnosticado, apesar de seu impacto na qualidade de vida dos pacientes (SHULMAN *et al.*, 2001; PONTONE *et al.*, 2009). Jaunarajs *et al.* (2011) afirma que os achados sobre prevalência e dados neurobiológicos sugerem que a ansiedade não é apenas decorrente dos sintomas motores, mas reflete um sintoma relacionado ao processo neuropatológico que ocorre na DP. Diagnósticos de ansiedade associados exclusivamente DP são clinicamente úteis como uma referência associada ao impacto da doença sobre este sintoma (PONTONE *et al.*, 2009).

Outro aspecto importante revelado pelo experimento 1 do presente estudo foi que os animais que permaneceram continuamente no ambiente enriquecido, independentemente do tratamento com MPTP, apresentaram um aumento do comportamento de esquiva aos braços abertos no LCE. Em contraste, encontramos que os animais que foram submetidos à complexidade ambiental intermitentemente no experimento 2 exibiram uma maior exploração dos braços abertos do LCE. Além disso, esta estratégia de exposição diária ao ambiente enriquecido em sessões de 1 h preveniu o aumento de esquiva aos braços abertos induzidos pela administração i.n. de MPTP. Nesse sentido, existem diversos estudos na literatura que defendem um efeito ansiolítico do ambiente enriquecido (CHAPILLON *et al.*, 1999; ROY *et al.*, 2001; BENAROYA-MILSHTEIN *et al.*, 2004; FRISKE e GAMMIE, 2005). Por outro lado, existem outros estudos na literatura que descrevem falta de efeito (IMANAKA *et al.*, 2006; BRENES *et al.*, 2009), ou mesmo aumento dos comportamentos do tipo de ansiedade (BRANCHI *et al.* 2006) em roedores expostos ao ambiente enriquecido.

De maneira interessante, Friske e Gammie (2005) verificaram que o enriquecimento ambiental é capaz de promover alterações a longo prazo no comportamento do tipo ansiedade em ratos em roedores, sendo observados efeitos ansiolíticos mesmo após 3 meses de ter cessado o enriquecimento. Neste mesmo estudo, os autores apresentam resultados surpreendentes de que estes efeitos do tipo ansiolítico gerados pelo enriquecimento ambiental são também observados na prole, sugerindo assim que o enriquecimento ambiental pode ter efeitos epigenéticos, transpassando gerações. Em adição, Morley-Fletcher *et al.* (2003) descreveram que o enriquecimento ambiental é capaz de alterar a reatividade do sistema hipófise-adrenal envolvido em respostas a estresse em camundongos, compensando aumento de corticotrofina em

animais submetidos a estresse pré-natal. Além disso, Sztainberg *et al.* (2010) encontraram uma redução do comportamento de esquivas aos braços abertos decorrente de enriquecimento ambiental, e caracterizam o envolvimento do receptor do tipo 1 para corticotrofina neste efeito.

Em humanos, número considerável de subtipos de ansiedade incluindo pânico, ansiedade generalizada, fobia simples e social, tem sido encontrados em pacientes com DP (PONTONE *et al.*, 2009). As taxas de ansiedade em populações com DP foram superiores às taxas em populações não acometidas por esta doença (RICHARD e KURLAN, 1996) e tem sido apontado como um fator predisposição para a DP, uma vez que geralmente se manifesta antes do início dos sintomas motores (SHIBA *et al.*, 2000; POEWE *et al.*, 2010). Este conjunto de sintomas muitas vezes tem sido denominado de “personalidade Parkisoniana”, em que pacientes com a DP são considerados diligentes, com uma moral rígida, estoicistas, não impulsivos, menos falantes e deprimidos (KAASINEN *et al.*, 2001).

Em relação aos transtornos de humor na DP, tem sido descrito que a depressão pode ser um fator de risco para a DP assim como esta ser um fator de risco para depressão (SILBERMAN *et al.*, 2004). É difícil estimar a incidência do transtorno depressivo, qualquer que seja a sua forma, na população em geral, porém autores apontam que a depressão ocorre com frequência em pacientes com DP com uma prevalência alta, estimada em 30-50% (CUMMINGS, 1992; SLAUGHTER *et al.*, 2001). De acordo com Mayeux *et al.* (1986), apenas 20% de todos os pacientes deprimidos com a DP recebem tratamento adequado para o quadro da depressão. A gravidade da depressão, bem como da ansiedade, correlaciona-se com uma redução na qualidade de vida dos portadores da DP e geralmente são subdiagnosticadas na clínica (RICHARD e KURLAN, 1997). Deve ser destacado que se a depressão não for tratada, existe um risco aumentado para maior incapacidade e redução da qualidade de vida dessa população (EDWARDS *et al.*, 2002).

No caso da pesquisa básica, são poucos os estudos descrevendo alterações de comportamentos emocionais em animais submetidos a modelos experimentais da DP. Recentemente, Santiago *et al.*, (2010) avaliaram em ratos os efeitos da administração na substância negra de diferentes neurotoxinas e observaram que o MPTP, a 6-OHDA e a rotenona, mas não o LPS, foram capazes de produzir comportamentos do tipo depressivo avaliados em diferentes testes comportamentais. Com

o intuito de investigar se o tratamento i.n. com MPTP e os diferentes protocolos de exposição ao ambiente enriquecido promovem alterações no comportamento do tipo depressivo em ratos utilizamos em nosso estudo o teste do nado forçado. No experimento 1, observamos que tanto o tratamento i.n. com MPTP quanto o ambiente enriquecido contínuo promoveram um aumento no tempo de imobilidade neste teste, sendo este sugestivo de um aumento do comportamento do tipo depressivo. Este achados estão de acordo com resultados prévios da literatura indicando um aumento do comportamento tipo depressivo em roedores submetidos ao modelo do MPTP (KRYZHANOVSKII, *et al.*, 1995). Entretanto, Santiago e colaboradores (2010) apesar de terem encontrado maior índice de comportamento depressivo em vários testes, não observaram um aumento no tempo de imobilidade de ratos que receberam a administração bilateral de MPTP diretamente na SNpc. Portanto, a via de administração parece representar um fator importante para o desenvolvimento dos sintomas do tipo depressão no modelo do MPTP. Além disso, estudos prévios utilizando o modelo da 6-OHDA em ratos também descrevem um aumento do tempo de imobilidade dos animais no teste do nado forçado (BRANCHI *et al.*, 2008; SANTIAGO *et al.*, 2010; TADAIESKY *et al.*, 2010)

Um maior entendimento da etiologia da depressão na DP pode conduzir ao desenvolvimento e seleção de melhores tratamentos e, conseqüentemente, melhorar a qualidade de vida dos indivíduos (YAMAMOTO, 2001). No presente estudo, observamos no experimento 2, que a exposição intermitente ao ambiente enriquecido foi capaz de prevenir o aparecimento deste comportamento do tipo depressivo nos animais que receberam a administração i.n. de MPTP. Este resultado sugere que o ambiente enriquecido intermitente aumentou a persistência para encontrar um escape em face de uma situação estressante inescapável.

Em acordo com os nossos resultados, neste presente estudo, estudos da literatura reportam que o enriquecimento ambiental produz um efeito do tipo antidepressivo no teste do nado forçado em roedores (BRENES-SÁENZ, *et al.* 2006). Magalhães e colaboradores (2004) verificaram que os animais sob condição de complexidade ambiental apresentaram menor imobilidade no teste do nado forçado. Contudo, no presente estudo, os dados de enriquecimento contínuo encontrados contrastam com os disponíveis na literatura, possivelmente devido o enriquecimento proposto ter sido um fator aversivo, visto o aumento na

reatividade emocional dos animais em ambos os testes utilizados (LCE e nado forçado). No caso do experimento 2, as sessões de enriquecimento, no geral, tornaram os animais relativamente mais persistentes no comportamento de fuga do nado forçado. De acordo com Llorens-Martín *et al.* (2007), camundongos C57BL/6 apresentaram um menor de tempo de imobilidade no nado forçado, em paralelo a um aumento ne neurônios do giro denteado do hipocampo. Brenes, Rodríguez e Fornaguera (2008) verificaram uma redução significativa no tempo de imobilidade no teste do nado forçado em ratos, sendo o efeito já apresentado sete dias após o início do enriquecimento e persistente após 3 meses.

Embora no presente momento não possamos demonstrar os mecanismos bioquímicos e moleculares responsáveis pelos efeitos contrastantes dos dois protocolos de enriquecimento ambiental utilizados, algumas hipóteses especulativas podem ser apresentadas. A estimulação sensorio-motora promovida pelo ambiente enriquecido influencia vários fatores e ajuda a prevenir danos em neurônios remanescentes de danos, bem como atua fornecendo uma compensação de estratégias pós-lesão (MANDOLESI *et al.*, 2008). Os fatores já descritos incluem aumento do fluxo sanguíneo e angiogênese, aumento de neurogênese, sinaptogênese e arborização dendrítica (VAN PRAAG, KEMPERMANN e GAGE, 2000), alterações nos sistemas de neurotransmissão e terminais sinápticos e no caso de modelos da DP, a regulação de genes de ativação imediata (LISTE *et al.*, 1997). Associa-se os efeitos emocionais do AEI a modificações neurobiológicas, como realce da plasticidade neuronal, neurogênese (HATTORI *et al.*, 2007; KOH *et al.*, 2007) e expressão de fatores neurotróficos endógenos e de crescimento celular (MOHAMMED *et al.*, 2002; BEZARD *et al.*, 2003).

O enriquecimento ambiental aumenta o nível de neurotrofinas como o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e o fator de crescimento do nervo (NGF) (BRANCHI *et al.*, 2006), que desempenham um papel importante na sinalização neuronal. Tem sido mostrado que níveis de BDNF possuem grande correlação com comportamentos ansiosos e de medo em camundongos (YEE *et al.*, 2007). Ademais, hipóteses neurotróficas de depressão postulam que o estresse causa uma diminuição de BDNF, enquanto um aumento deste fator é verificado por tratamento crônico com antidepressivos (DUMAN e MONTAGGIA, 2006) e enriquecimento ambiental (BRANCHI *et al.*, 2006).

Uma preocupação grande é que os efeitos da estimulação ambiental geralmente descritos são considerados benéficos, de proteção ou qualquer outro sinônimo que se refere a uma conotação positiva. No entanto, de uma perspectiva parcimoniosa, as formas mais simples de estimulação ambiental em roedores consistem no fornecimento de estimulação social, abrigos e brinquedos. Muitas vezes este tratamento não promovem benefícios ou não alteram o comportamento de maneira positiva, resultando em comportamentos estereotipados (TAROU e BASHAW, 2007). Assim como o enriquecimento ambiental é um instrumento válido para abordar o potencial das capacidades individuais e comportamentos adaptativos, também fornece uma fonte de variação experimental. Além do mais, sendo que o ambiente padrão muitas vezes não reflete o comportamento natural, o enriquecimento poderia até contestar a validade atual de modelos animais de problemas neurológicos, psiquiátricos e comportamentais (YOUNG *et al.*, 2003).

Nossos dados apoiam a idéia de que o enriquecimento ambiental em amplo espaço e intermitente promove comportamentos adequados de enfrentamento, quando os animais são confrontados com uma situação de estresse inevitável, assim como previne o desenvolvimento de desespero comportamental. Com base em nossos resultados, bem como em observações anteriores de menor imobilidade em animais de ambiente enriquecido (MAGALHÃES *et al.*, 2004), sugerimos que as sessões de enriquecimento foram suficientes e mais efetivas no aumento do comportamento de fuga e resistência ao desamparo da situação inevitável.

Um processo que ocorre amplamente no repertório comportamental de organismos é a generalização que se refere ao fato de que a resposta ocorre não só para os estímulos específicos presentes, mas também para outros estímulos semelhantes (CATANIA, 1999). Fato relevante no menor tempo de exposição ao ambiente no segundo experimento, visto a generalização das estratégias desenvolvidas no ambiente para outras situações, no caso os testes comportamentais. No entanto, aspectos relativos à tempos de exposição terapêuticos e esquemas de enriquecimento também carece ser sistematicamente estudado e acrescentado à literatura do enriquecimento (MURPHY *et al.* 2003). Geralmente, as gaiolas enriquecidas são relativamente simples e projetadas tendo em consideração o bem-estar dos animais. Ademais, os aspectos ergonômicos da disposição dos objetos fornecem aos ratos a capacidade de mostrar um repertório mais amplo de comportamentos,

incluindo a criação, escalada, pulo, mordida e forrageamento que são partes essenciais do etograma natural de ratos (BARNETT, 1958; BÜTTNER, 1993). Nestes termos, os objetos de enriquecimento são preferidos pelos roedores quando em gaiolas com maiores dimensões, devido diminuição nos limites de interação entre os animais e os objetos (BRAIN, 1992). O que se verifica na literatura é que o esquema temporal de apresentação de estímulos, duração, magnitude e as relações com o comportamento influenciam largamente na persistência ou habituação no repertório dos animais (TAROU e BASHAW, 2007). O comportamento sob condições de enriquecimento que se apresenta habituado aos estímulos pode reaparecer se o enriquecimento ocorre intercalado por um período de tempo (MURPHY *et al.*, 2003). Este fenômeno é conhecido como recuperação espontânea, e tem sido bem documentado na literatura do enriquecimento.

Faherty *et al.* (2005) reporta que o ambiente enriquecido protege os animais da lesão com MPTP por diminuir os níveis do DAT no estriado, sendo este transportador utilizado pela toxina para entrar na célula. Além disso, o ambiente enriquecido aumenta o nível do transportador vesicular de monoaminas (VMAT), fazendo com que maior quantidade da toxina seja sequestrada, reduzindo a morte de células na SNpc. Segundo os autores da pesquisa, o ambiente enriquecido pode proteger totalmente contra a morte celular induzida pelo MPTP (FAHERTY *et al.*, 2005). Nesse sentido, a morte de células dopaminérgicas da SNpc reduz substancialmente as concentrações de dopamina no cérebro. Dentre as várias funções a dopamina também modula a neurogênese ontogenética, e sua depleção pode afetar precursores neurais na zona subependimal e zona subgranular do cérebro adulto. Höglinger *et al.* (2004) demonstraram que a depleção da dopamina em roedores diminuiu a proliferação de células precursoras tanto na zona do subependimal quanto na zona subgranular sendo completamente restaurada por um agonista seletivo dos receptores D₂ para dopamina. De maneira coerente, o número de células proliferativas e células precursoras neurais nas áreas citadas encontram-se reduzidas em cérebros *post-mortem* de indivíduos com a DP. Estas observações sugerem que a geração de células precursoras neurais está comprometida na DP como consequência da desnervação dopaminérgica (HÖGLINGER *et al.*, 2004). Por outro lado, segundo estudos prévios, um aumento substancial dos níveis de proliferação celular e de sobrevivência de novos neurônios no hipocampo e zona

subventricular foram reportados em decorrência do ambiente enriquecido (ZHAO *et al.*, 2008). É possível que ocorra mecanismos compensatórios e intermediários que determinem efeitos na proliferação celular sob condições enriquecidas (GAGE *et al.*, 2000), bem como as alterações comportamentais (BENNET *et al.*, 2006). Nesse contexto, a possibilidade de manipular a proliferação de células precursoras de dopamina regulada por meios farmacológicos ou ambientais em humanos, abre perspectivas interessantes para a utilização dos recursos endógenos, como progenitores neurais para reparar o dano. No entanto, as consequências neurobiológicas e clínicas de redução crônica de precursores neurais na DP ainda não foram determinadas. Isto levanta a importante questão de se a geração de precursores neurais prejudicada pode ser clinicamente relevante para a DP. A neurogênese tem sido associado experimentalmente com a regulação do humor (SANTARELLI *et al.*, 2003), funções mnemônicas (LEGIO *et al.*, 2005), especialmente a memória espacial (LEGGIO *et al.* 2005, 2008). No entanto, esses estudos utilizaram modelos experimentais bastante agudos, e as consequências crônicas funcionais da geração deficiente dos precursores neurais no cérebro adulto, como parece ocorrer na doença de Parkinson, permanecem desconhecidas (HÖGLINGER, 2004).

Embora a perda de dopamina contribui para o aparecimento dos sintomas motores na DP, a perturbação dos outros sistemas de neurotransmissão também é passível de estar envolvida. Depressão e ansiedade têm sido relacionadas, em particular com as vias de neurotransmissores serotoninérgicos (GRAEFF *et al.*, 1996); a associação destes com as vias dopaminérgicas, direta ou indiretamente, através dos déficits de dopamina podem estar subjacentes ao aumento da prevalência de depressão na DP. Na verdade, além da dopamina, ambos neurotransmissores noradrenalina e serotonina estão implicados no desenvolvimento da depressão e distúrbios do sono que são observadas em pacientes com DP (CHAUDHURI e SCHAPIRA, 2006). Estudos utilizando a tomografia por emissão de pósitrons (PET) demonstram prejuízos claros nos sistemas de noradrenalina e serotonina em pacientes com a DP, apresentando correlação particularmente com depressão (BROOKS, 2007). Em conjunto, estes achados sugerem que a DP não é apenas um distúrbio dopaminérgico, mas também envolve déficits complexo no sistema das monoaminas, relacionados também a aspectos emocionais (LANGSTON, 2006)

Assim, a reavaliação da DP como uma doença que envolve também os sintomas psiquiátricos não só pode melhorar a qualidade de vida dos pacientes (STEFANOVA, 2003; WEINTRAUB *et al*, 2004), mas também refinar as estratégias de pesquisa. É relevante investigar a causa da doença e as abordagens terapêuticas farmacológicas e comportamentais que visam retardar ou interromper a progressão da DP (LANGSTON, 2006). Essa abordagem deve também envolver a reconsideração de modelos animais da DP os quais devem englobar as alterações pré-motoras da doença.

6. Conclusões

Em nosso estudo, o modelo da administração i.n. de MPTP mostrou-se válido para mimetizar os sintomas emocionais não motores da DP em animais, aumentando os comportamentos de esquiva aos braços abertos no LCE e imobilidade no nado forçado (comportamentos relacionados à ansiedade e depressão, respectivamente, em humanos) em animais expostos à toxina, consistente com a manifestação desses sintomas em pacientes parkinsonianos. Além disso, as diferentes formas de exposição a situações complexas do ambiente tiveram diferentes consequências comportamentais nos animais testados no presente estudo. Um aspecto interessante encontrado é que um ambiente enriquecido amplo, sob apresentação descontínua foi suficiente para produzir alterações benéficas nos sintomas emocionais pré-motores de animais tratados com MPTP i.n. Portanto, o modelo do MPTP i.n mimetiza nos testes aplicados mais um aspecto importante da DP, como sintomas emocionais geralmente presentes na doença; assim como situações de complexidade ambiental não contínuas favorecem a resistência a comportamentos de reatividade emocional, segundo os testes verificados.

Assim, manipulações ambientais podem apresentar significativas implicações para a prevenção e o tratamento adjuvante da DP, o que representa um interessante campo de investigação.

7. Referências bibliográficas

AMARAL, O. B., R. S. VARGAS, *et al.* Duration of environmental enrichment influences the magnitude and persistence of its behavioral effects on mice. **Physiol Behav**, v.93, n.1-2, Jan 28, p.388-94. 2008.

AZEVEDO, C. S. de; CIPRESTE, C. F.; YOUNG, R. J. Environmental enrichment: A GAP analysis. *Applied Animal Behaviour Science*, v. 102, n.3-4, pp. 329-343, 2007

BARBELIVIEN, A.; HERBEAUX, K.; OBERLING, P.; KELCHE, C.; GALANI, R.; MAJCHRZAK, M. Environmental enrichment increases responding to contextual cues but decreases overall conditioned fear in the rat. **Behav. Brain Res.** v. 169, n. 2, pp. 231-238, 2006.

BARNETT, S. A. An analysis of social behaviour in wild rats. **Proceedings of the Zoological Society of London.** 130, 107–152, 1958.

BEAL, M.F. Experimental models of Parkinson's disease. **Nat. Rev. Neurosci.**, 2: 325-334, 2001.

BEAL, M.F. Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson's disease. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 991, 120–131, 2003

BEHARI M.; SRIVASTAVA, A.K.; PANDEY, R.M. Quality of life in patients with Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**, 11(4):221–6, 2005.

BENAROYA-MILSHTEIN, N.; HOLLANDER, N.; APTER, A.; KIKILANSKY, T.; RAZ, N.; WILF, A.; YANIV, I.; PICK, C. G. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. **European Journal of Neuroscience**, v. 20, pp. 1341 – 1347, 2004.

BENAROYA-MILSHTEIN, N.; HOLLANDER, N.; APTER, A.; KIKILANSKY, T.; RAZ, N.; WILF, A.; YANIV, I.; PICK, C. G. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. **European Journal of Neuroscience**, v. 20, pp. 1341 – 1347, 2004.

BENNETT, J. C.; MCRAE, P. A.; LEVY, L. J.; FRICK, K. M. Long-term continuous, but not daily, environmental enrichment reduces

spatial memory decline in aged male mice. **Neurobiol. Learn. Mem.** v. 85, 139–152, 2006.

BERGMAN, H.; WICHMANN, T.; DELONG, M.R. Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. **Science**, 249:1436-8, 1990.

BEZARD, E.; DOVERO, S.; BELIN, D.; DUCONGER, S.; *et al.* Enriched environment confers resistance to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and cocaine: involvement of dopamine transporter and trophic factors, **J. Neurosci.** 23, 10999–11007, 2003.

BEZARD, E.; DOVERO, S.; BELIN, D.; DUCONGER, S.; *et al.* Enriched environment confers resistance to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and cocaine: involvement of dopamine transporter and trophic factors. **J. Neurosci.** 23, 10999–11007, 2003.

BORSINI, F.; MELI, A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? **Psychopharmacology**, 94, pp. 147–160.

BRAAK, H.; DEL, TREDICI K; RÜB, U; DE VOS, RA.; JANSEN STEUR EN, BRAAK, E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiol Aging**, 24:197–211, 2003.

BRAIN, P. F. Understanding the behaviours of feral species may facilitate design of optimal living conditions for common laboratory rodents. **Animal Technology**. 43, 99–105, 1992.

BRANCHI I, D'ANDREA I, FIORE M, DI FAUSTO V, ALOE L, ALLEVA E. Early social enrichment shapes social behavior and nerve growth factor and brain derived neurotrophic factor levels in the adult mouse brain. **Biol Psychiatry**. 60:690–6, 2006.

BRANCHI, I.; D'ANDREA, I.; ARMIDA, M.; CASSANO, T.; PÈZZOLA, A.; POTENZA, R.L.; MORGESE, M.G.; POPOLI, P.; ALLEVA, E. Nonmotor symptoms in Parkinson's disease: investigating early-phase onset of behavioral dysfunction in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model. **J Neurosci Res.** 86:2050–2061, 2008.

BRENES, J.C.; RODRÍGUEZ, O.; FORNAGUERA, J. Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine

concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. **Pharmacol Biochem Behav.** 89, pp. 85–93, 2008.

BRENES-SÁENZ, J.C.; RODRÍGUEZ-VILLAGRA AND J. FORNAGUERA-TRÍAS, Factor analysis of forced swimming test, sucrose preference test and open field test on enriched, social and isolated reared rats, *Behav Brain Res* **169** (2006), pp. 57–65.

BROOKS, D.J. Imaging non-dopaminergic function in Parkinson's disease. **Mol Imaging Biol.** 9:217–222, 2007.

BRUCKE, T.; ASENBAUM, S.; PIRKER, W.; DJAMSHIDIAN, S.; WENGER, S.; WOBER, C.; MULLER, C.; PODREKA, I. Measurement of the dopaminergic degeneration in Parkinson's disease with [123I] beta-CIT and SPECT. Correlation with clinical findings and comparison with multiple system atrophy and progressive supranuclear palsy. **J. Neural Transm.** 9–24, 1997.

BRUEL-JUNGERMAN, E.; LAROCHE, S.; RAMPON, C. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, pp. 513–521, 2005

Burn, D.J. Depression in Parkinson's disease. **Eur J Neurol.** 944–54, 2002.

BÜTTNER, D. Upright standing in the laboratory rat: time expenditure and its relation to locomotor activity. **Journal of Experimental Animal Science**, 36, 19–26, 1993.

CAI, R.; GUO, F.; ZHANG, J.; XU, J.; CUI, Y.; SUN, X. Environmental enrichment improves behavioral performance and auditory spatial representation of primary auditory cortical neurons in rat. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 91, n. 4, pp. 366–376, 2009.

CANCEDDA, L.; PUTIGNANO, E.; SALE, A.; VIEGI, A.; BERARDI, N.; MAFFEI, L. Acceleration of visual system development by environmental enrichment. **The Journal of Neuroscience**, v.24 n.20, p. 4840–4848, 2004

CATANIA, A. C. **Aprendizagem: Comportamento, Linguagem e Cognição.** (D.G. Souza, Trad.) Porto Alegre: Artmed, 1999.

CHAPILLON, P.; MANNECHE, C.; BELZUNG, C.; CASTON, J. Rearing environmental enrichment in two inbred strains of mice: Effects on emotional reactivity. **Behav. Genet.** 29, v. pp.41–46, 1999.

CHAUDHURI, K.R.; HEALY, D. G.; SCHAPIRA, A.H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. **Lancet Neurol.** 5: 235–245, 2006.

CHEN, H.; ZHANG, SM.; SCHWARZSCHILD, M.A.; HERNAN, M.A.; ASCHERIO, A. Physical activity and the risk of Parkinson disease. **Neurology**, 2005; 64: 664–669.

CHOURBAJI, S.; ZACHER, C.; SANCHIS-SEGURA, C.; SPANAGEL R.; GASS P. Social and structural housing conditions influence the development of a depressive-like phenotype in the learned helplessness paradigm in male mice, **Behav Brain Res.** 164 , pp. 100–106, 2005.

COSTA D.A.; CRACCHIOLO J.R.; BACHSTETTER A.D.; HUGHES T.F.; BALES K.R.; PAUL S.M.; MERVIS R.F.; (...), POTTER H. Enrichment improves cognition in AD mice by amyloid-related and unrelated mechanisms. **Neurobiology of Aging**, v.28, n.6, pp. 831-844, 2007.

CUI, M.; YANG, Y.; YANG, J.; ZHANG, H.; HAN H.; MA W.; *et al.* Enriched environment experience overcomes the memory deficits and depressive-like behavior induced by early life stress, **Neurosci Lett.** 404, pp. 208–212, 2006.

CUMMINGS, J. L. Depression and Parkinson's disease: A review. **Am. J. Psychiat.** 149, 443-454, 1992.

CURTIS, J. W.; NELSON, C. A. Toward building a better brain: Neurobiological outcomes, mechanisms, and processes of environmental enrichment. In S. Luthar (Ed.), **Resilience and vulnerability: Adaptation in the context of childhood adversities** (pp. 463–488). London: Cambridge University Press 2003.

DA CUNHA, C. et al. The lesion of the rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons as a model for Parkinson's disease memory disabilities. **Cell. Mol. Neurobiol.** 22: 227–237, 2002.

DAVIS, G.C.; WILLIAMS, A.C.; MARKEY, S.P.; EBERT, M.H.; CALNE, E.D.; REICHERT, C.M.; KOPIN, I.J. Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. **Psychiatry Res.**, 1: 249-254, 1979.

DEFELIPE, J. Brain plasticity and mental processes: Cajal again. **Nat Rev Neurosci.** 7:811–817, 2006.

DI MONTE, D.A. The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins? **Lancet Neurol.** 2:531–8, 2003.

DIAMOND M. E.; ARMSTONG-JAMES M.; EBNER F. F. Experience-dependent plasticity in adult rat barrel cortex. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.90, pp. 2082–86, 1993.

DIERSEN, M.; BENAVIDES-PICCIONE, R.; MARTINEZ-CUE, C.; ESTIVILL, X.; FLOREZ, J.; ELSTON, G. N.; DEFLIPE, J. Alterations of neocortical pyramidal cell phenotype in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: effects of environmental enrichment. **Cerebral Cortex**, v. 13, pp. 758-764, 2003.

DLUZEN, D.E.; KEFALAS, G. The effects of intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) upon catecholamine concentrations within olfactory bulbs and corpus striatum of male mice. **Brain Research.** 741: 215-219, 1996.

DOBROSSY, M.D.; DUNNETT, S.B. Motor training effects on recovery of function after striatal lesions and striatal grafts. **Experimental Neurology**, 184: 274–284, 2003.

DOTY, R. L. 2008. The olfactory vector hypothesis of neurodegenerative disease: is it viable? **Ann. Neurol.** 63:7-15, 2008.

DUMAN R.S.; MONTAGGIA, L.M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. **Biol Psychiatry.** 59 , pp. 1116–1127, 2006.

DUVOISIN, R.C. (ed). **Parkinson's disease.** Third Edition. Raven Press, New York, 1991.

ELLIOTT, B.M.; GRUNBERG, N.E. Effects of social and physical enrichment on open field activity differ in male and female Sprague–Dawley rats. **Behav Brain Res.** 165:187–96, 2005.

FAHERTY, C. J., RAVIIE SHEPHERD, K., HERASIMTSCHUK, A., SMEYNE, R. J. Environmental enrichment in adulthood eliminates neuronal death in experimental Parkinsonism. **Brain Res Mol Brain Res.** 134: 170–179, 2005.

FAVERJON, S.; SILVEIRA, D. C.; FU, D. D.; CHA, B. H.; AKMAN, C.; HU, Y.; HOLMES, G. L. Beneficial effects of enriched environment following status epilepticus in immature rats. **Neurology**, v. 59, pp. 1356-1364, 2002.

FAWCETT, J.W.; ROSSER, A.E.; DUNNETT, S. Brain damage, brain repair. **New York: Oxford University Press.** 2001.

FREED, C.R.; GREENE, P.E.; BREEZE, R.E.; TSAI, W.Y.; DUMOUCHEL, W.KAO, R. DILLON, S. WINFIELD, H. CULVER, S. TROJANOWSKI, J.Q. EIDELBERG, D. FAHN, S. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. **N. Engl. J. Med.** 344, 710–719, 2001.

FRIGERIO, R.; ELBAZ, A.; SANFT, K.R.; PETERSON, B.J.; BOWER, J.H.; AHLKOG, J.E.; GROSSARDT, B.R.; DE ANDRADE, M.; MARAGANORE, D.M.; ROCCA, W.A. Education and occupations preceding Parkinson disease: a population-based case-control study. **Neurology.** 65: 1575–1583, 2005.

FRISKE, J. E.; GAMMIE, S. C. Environmental enrichment alters plus maze, but not maternal defense performance in mice, *Physiol Behav*; 85: 187–194, 2005.

GELFO, F.; DE BARTOLO, P.; GIOVINE, A.; PETROSINI, L.; LEGGIO, M. G. Layer and regional effects of environmental enrichment on the pyramidal neuron morphology of the rat. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.91, n.4, pp. 353-365, 2009.

GIOVANNI, A. et al. Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Part 1: systemic administration. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 270: 1000–1007, 1994.

GOLDMAN, W.P.; BATY, J.D.; BUCKLES, V.D.; SAHRMANN, S.; MORRIS, J.C. Cognitive and motor functioning in Parkinson's disease – subjects with and without

questionable dementia. **Arch. Neurol.**, 55: 674–680, 1998.

GORREL, J.; DIMONTE, D. E.; GRAHAM, D. The role of the environment in Parkinson's Disease. **Environmental Health Perspectives**, pp. 653-654, 1996.

HATTORI, S.; HASHIMOTO, R.; MIYAKAWA, T.; YAMANAKA, H.; MAENO, H.; WADA, K.; KUNUGI, H. Enriched environments influence depression-related behavior in adult mice and the survival of newborn cells in their hippocampi. **Behav Brain Res.** 180:69-76, 2007.

HAUSER, R.A. Early pharmacological treatment in Parkinson's disease. **Reports**, 2010.

HÖGLINGER G, RIZK P, MURIEL MP, DUYNCKAERTS C, OERTEL WH, CAILLE I, HIRSCH EC. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. **Nat Neurosci.** 2004;7:726–735.

HOROWITZ, F. D.; PADEN, L. Y. The effectiveness of environmental intervention programs. In B. M. Caldwell & H. N. Ricciuti (Eds.), **Review of child development research**. Vol. 3, pp. 331-402, 1973.

HUGHES, A.J.; DANIEL, S.E.; KILFORD, L.; LEES, A.J. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinicopathological study of 100 cases. **J. Neurol Neurosurg Psychiatry**, 55: 181–4, 1992.

IBGE (Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Censo Demográfico, 2000**. Rio de Janeiro: IBGE.

IMANAKA, A.; MORINOBU, S.; TOKI, S.; YAMAWAKI, S. Importance of early environment in the development of post-traumatic stress disorder-like behaviors, **Behav Brain Res.** 173, pp. 129–137, 2006.

JANKOWSKY, J.L., MELNIKOVA, T., FADALE, D.J., XU, G.M., SLUNT, H.H., GONZALES, V., YOUNKIN, L.H., YOUNKIN, S.G., BORCHELT, D.R., SAVONENKO, A.V. Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, v.25, pp. 5217-5224, 2005.

JAUNARAJ, Karen L. Eskow; ANGOA-PEREZ, Mariana; KUHN, Donald M.; BISHOP, Christopher. Potential mechanisms underlying anxiety and depression in Parkinson's disease: Consequences of l-DOPA

treatment. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. 35:3, pp. 556-564, 2011.

JENNER, P. The contributions of the MPTP-treat primate model to the development of new treatment strategies for Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**. 9: 131-137, 2003.

KAASINEN, V.; NURMI, E.; BERGMAN, J.; *et al.* Personality traits and brain dopaminergic function in Parkinson's disease, **Proc Natl Acad Sci U S A**. 98, pp. 13272–13277, 2001.

KALARIA, R.N. *et al.* Correlation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity with blood-brain barrier monoamineoxidase activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**.84: 3521–3525, 1987.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. **Principles of Neural Science** , McGraw-Hill, New York, ed. 4, 2000.

KEMPERMANN, G.; GAGE, F.H. Experience-dependent regulation of adult hippocampal neurogenesis: effects of long-term stimulation and stimulus withdrawal, **Hippocampus**. 9, pp. 321–332, 1999.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H.G.; GAGE, F.H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, v.386, p. 493–495, 1997.

KOBAYASHI, S.; OHASHI, Y.; ANDO, S. Effects of enriched environments with different durations and starting times on learning capacity during aging in rats assessed by a refined procedure of the Hebb–Williams maze task. **J Neurosci Res**. 70:340–6, 2002.

KOH, S.; MAGID, R.; CHUNG, H.; STINE, C.D.; WILSON, D.N. Depressive behavior and selective downregulation of serotonin receptor expression after early-life seizures: reversal by environmental enrichment. **Epilepsy Behav**.10, pp. 26–31, 2007.

KRECH, D.; ROSENZWEIG, M. R.; BENNETT, E. L. Effects of environmental complexity and training on brain chemistry. **J. Comp. Physiol. Psychol**. v.53, pp. 509-519, 1960.

KROGH, K.; OSTERGAARD, K.; SABROE, S.; LAURBERG, S.; Clinical aspects of bowel symptoms in Parkinson's disease. **Acta Neurol Scand**, 117: 60–64, 2008.

KRYZHANOVSKII, G. N.; KRUPINA, N. A.; KUCHERYANU, V. G. A new model of the depressive syndrome induced by administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in rats. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**. 119:2, pp. 116-119, 1995.

KUMAR, P.; KUNDAL, R. K.; MORE, S.; SHAEMA, S. S.; Beneficial effects of pioglitazone on cognitive impairment in MPTP model of Parkinson's disease. **Behavioral brain research**, 197: 398-403, 2009.

LANG, A.E.; LOZANO, A.M. Medical progress: Parkinson's disease. Part 2. **N Engl J Med**. 339: 1144-1153, 1998.

LANGSTON, J.W. The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg. **Ann Neurol**. 59: 591–596, 2006.

LANGSTON, J.W.; BALLARD, P.; TETRUD, J.W.; IRWIN, I. Chronic Parkinsonism I humans due to a product of meperidine-analog synthesis. **Science**, 219: 979-980,

1983.

LAVIOLA, G.; HANNAN, A.J.; MACRÌ, S.; SOLINAS, M.; JABER, M. Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative disease and psychiatric disorders. **Neurobiol Dis** , 31: 159-68, 2008.

LEGGIO, M. G.; MANDOLESÌ, L.; FEDERICO, F.; SPIRITO, F.; RICCI, B.; GELFO, F.; PETROSINI, L. Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. **Behavioural Brain Research**, v.163, pp. 78–90, 2005

LISTE, I.; GUERRA, M.J.; CARUNCHO, H.J.; LABANDEIRA-GARCIA, J.L. Treadmill running induces striatal Fos expression via NMDA glutamate and dopamine receptors. *Exp. Brain Res.* 115, 458–468, 1997.

MAGALHAES, A., SUMMAVIELLE, T., TAVARES, M. A. & DE SOUSA, L. Effects of postnatal cocaine exposure and environmental enrichment on rat behavior in a forced swim test. **Ann. NY Acad. Sci.** 1025, 619–629, 2004.

MANDOLESI, L.; DE BARTOLO, P.; FOTI, F.; GELFO, F.; FEDERICO, F.; LEGGIO, M.G. et al. Environmental enrichment

provides a cognitive reserve to be spent in the case of brain lesion. **J Alzheimer's Dis**, 15:11–28, 2008.

MATTSON, M. P.; MARC CLEICHAMANN, M.; CHENG, A. Mitochondria in Neuroplasticity and neurological Disorders. **Neuron**, 60:748-766, 2008.

MCDONALD, W.M.; RICHARD, I.H.; DELONG, M.R. Prevalence, etiology and treatment of depression in Parkinson's disease. **Biol Psychiatry**, 54:363-75, 2003.

MENESES, M.S.; TEIVE, H.A.G. **Doença de Parkinson: aspectos clínicos e cirúrgicos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

MENZA, M. A.; ROBERTSON-HOFFMAN, D. E.; BONAPACE, A. S. Parkinson's disease and anxiety: Comorbidity with depression. **Biol. Psychiat**. 34, 465-470, 1993.

MEREDITH, G.E.; SONSALLA P, CHESSELET M-F. Animal Models of Parkinson's Disease Progression. **Acta Neuropathol**. 115(4): 385–398, 2008.

MESHI, M. R.; DREW, M.; SAXE, M. S.; ANSORGE, D.; DAVID, L.; SANTARELLI, C.; MALAPANI, H. et al. Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. **Nat. Neurosci**. v. 9, pp. 729–731, 2006.

MILLER, G.W.; GAINETDINOV, R.R.; LEVEY, A.I.; CARON, M.G. Dopamine transporters and neuronal injury. **TIPS**. 20, 424–429, 1999.

MOHAMMED, A.H., ZHU, S.W., DARMOPIL, S., HJERLING-LEFFLER, J., ERNFORS, P., WINBLAD, B., DIAMOND, M.C., ERIKSSON, P.S., BOGDANOVIC, N. Environmental enrichment and the brain. **Progress in Brain Research**, v.138, pp. 109-133, 2002.

MONDOLO, F.; JAHANSHAHI, M.; GRANÀ, A.; et al: Evaluation of anxiety in Parkinson's disease with some commonly used rating scales. **Neurol Sci**. 28:270–275, 2007.

MORA, F.; SEGOVIA, G.; DEL ARCO A. Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. **Brain Res Rev** 55:78–88, 2007.

MOREIRA, Eduardo Luiz Gasnhar ; RIAL, Daniel ; DUARTE, Filipe S. ; DE CARVALHO, Cristiane Ribeiro ; HORST, Heros ; PIZZOLATTI, Moacir G. ; PREDIGER, Rui D.S. ; RIBEIRO-DO-VALLE, Rosa Maria . Central nervous system activity of the proanthocyanidin-rich fraction obtained from *Croton celtidifolius* in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, p. 1061-1068, 2010

MORLEY-FLETCHER, S.; REA, M.; MACCARI, S.; LAVIOLA, G. Environmental enrichment during adolescence reverses the effects of prenatal stress on play behaviour and HPA axis reactivity in rats. **Eur J Neurosci**. Dec;18(12):3367-74, 2003

MURPHY, E.S.; MCSWEENEY, F.K.; SMITH, R.G.; MCCOMAS, J.J. Dynamic changes in reinforcer effectiveness: theoretical, methodological, and practical implications for applied research. **Psych. Rec.**2003.

NITHIANANTHARAJAH J.; HANNAN A.J. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. **Nat Rev Neurosci** v.7, pp. 697-709, 2006.

PAMPLONA, F. A.; PANDOLFO, P.; SAVOLDI, R., PREDIGER, R. D. S.; TAKAHASHI, R. N. Environmental enrichment improves cognitive deficits in Spontaneously Hypertensive Rats (SHR): Relevance for Attention Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD). **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**. v. 33, n. 7, pp. 1153-1160, 2009.

PARKINSON, J. **An essay on the shaking palsy**. London: Sherwood, Neely and Jones, 1817.

PICCOLI, F.; LA BELLA, V.; GUARNERI R. New insights on the pathogenesis of neurodegenerative disorders, **Acta Neurol**. (Napoli) 14 , 455– 468, 1992.

PIETROPAOLO, S.; BRANCHI, I.; CIRULLI, F.; CHIAROTTI, F.; ALOE, L.; ALLEVA, E. Longterm effects of the periadolescent environment on exploratory activity and aggressive behaviour in mice: social versus physical enrichment. **Physiol Behav**,81:443–53, 2004.

PINEL, J.P. **Biopsicologia**. Porto Alegre:Artmed, 2005.

POEWE, W. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. **Eur. J. Neurol.** 15 Suppl. 1:14-20, 2008.

POEWE, Werner; ANTONINI, Angelo; ZIJLMANS, Jan C.M.; BURKHARD, Pierre R.; VINGERHOETS, François. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: an old drug still going strong. **Clin Interv Aging.** 5: 229–238, 2010

PONTONE, G.M.; WILLIAMS, J.R.; ANDERSON, K.E.; *et al.* Prevalence of anxiety disorders and anxiety subtypes in patients with Parkinson's disease. **Movement Disord** 2009.

PORSOLT, R. D. *et al.*, Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, 266 , pp. 730–732, 1977.

PREDIGER, R.D.S.; BATISTA, L.C.; MEDEIROS, R.; PANDOLFO, P.; FLORIO, J.C.; TAKAHASHI, R.N. The risk is in the air: intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 202, p. 391-403, 2006.

PREDIGER, Rui D. S. ; AGUIAR, Aderbal S. ; ROJAS-MAYORQUIN, Argelia Esperanza ; FIGUEIREDO, Cláudia P. ; MATHEUS, Filipe C. ; GINESTET, Laure ; CHEVARIN, Caroline ; BEL, Elaine Del ; MONGEAU, Raymond ; HAMON, Michel ; LANFUMEY, Laurence ; RAISMAN-VOZARI, Rita . Single Intranasal Administration of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine in C57BL/6 Mice Models Early Preclinical Phase of Parkinson s Disease. **Neurotoxicity Research**, v. 17, p. 114-129, 2010.

PREDIGER, Rui D. S. ; RIAL, Daniel ; MEDEIROS, Rodrigo ; FIGUEIREDO, Cláudia P. ; DOTY, Richard L. ; TAKAHASHI, Reinaldo N. Risk is in the Air. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1170, p. 629-636, 2009.

PRZEDBORSKI, S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders.** 11: S3-S7; 2005.

RAMPON, C.; TANG, Y.P.; GOODHOUSE J.; SHIMIZU, E.; KYIN, M.; TSIEN, J. Z. Enrichment induces structural changes and recovery

from non-spatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. **Nat. Neurosci.** v. 3 pp. 238–244, 2000.

REMY, P.; DODER, M.; LEES, A.; TURJANSKI N.; BROOKS, D. Depression in Parkinson's disease: loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system. **Brain**, 128, pp. 1314–1322, 2005.

RICHARD, I.H.; KURLAN, R. A survey of antidepressant drug use in Parkinson's disease. **Parkinson Study Group. Neurology**; 49: 1168–1170, 1996.

RIEDERER, P.; WUCCHETICH, S. Time course of nigrostriatal degeneration in Parkinson's disease. **J. Neural Transm.**, 38:277-301, 1976.

ROCHEFORT, C. *et al.* Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. **J. Neurosci.** v.22, p. 2679–2689, 2002.

ROSENZWEIG, M. R.; BENNETT, E. L. Effects of differential environments on brain weights and enzyme activities in gerbil, rats and mice. **Developmental Psychobiology**, v.2, n.2, pp. 87-95, 1969.

ROSENZWEIG, M.R.; BENNETT, E.L. Psychobiology of plasticity: Effects of training and experience on brain and behavior. **Behavioural Brain Research**, v.78 v.1, pp. 57-65, 1996.

ROY, V.; BELZUNG, C.; DELARUE, C.; CHAPILLON, P. Environmental enrichment in BALB/c mice: effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor. **Physiol. Behav.** v.74, pp. 313–320, 2001.

SANTARELLI, L. *et al.* Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **Science**. 301, 805–809 , 2003.

SANTIAGO, R.M.; BARBIEIRO, J.; LIMA, M.M.; DOMBROWSKI, P.A; ANDREATINI R.; VITAL M.A. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine, **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. 34, pp. 1104–1114, 2010.

SCHMIDT, N.; B. FERGER. Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. **J. Neural Transm.** 108: 1263–1282, 2001.

SCHNEIDER, T.; TURCZAK, J.; PRZEWLOCKI, R. Environmental enrichment reverses behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: issues for a therapeutic approach in autism. **Neuropsychopharmacology**, v.31, pp. 36-46, 2006.

SCHRAG, A.; HOVRIS, A.; MORLEY, D.; QUINN, N.; JAHANSHAH, M. Caregiver-burden in Parkinson's disease is closely associated with psychiatric symptoms, falls, and disability. **Parkinsonism Relat Disord**, 12:35–41, 2006.

SCHRIJVER, N.C.; BAHR, N.I.; WEISS I.C.; WURBEL, H. Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats, **Pharmacol Biochem Behav.** 73, pp. 209–224, 2002.

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

SEDELIS, M.; HOFELE, K.; AUBURGER, G.W.; MORGAN, S.; HUSTON, J.P.;

SCHWARTING, R.K. MPTP susceptibility in the mouse: behavioral, neurochemical, and histological analysis of gender and strain differences. **Behav. Genet.**, 30: 171-182, 2000.

SHIBA, M.; BOWER, J.H.; MARAGANORE, D.M.; MCDONNELL, S.K.; PETERSON, B.J.; AHLKOG, J.E.; SCHAID D.J.; ROCCA, W.A. Anxiety disorders and depressive disorders preceding Parkinson's disease: a case-control study. **Mov. Disord.** 15 pp. 669–677, 2000.

SHIBA, M.; BOWER, J.H.; MARAGANORE, D.M.; MCDONNELL, S.K.; PETERSON, B.J.; *et al.* Anxiety disorders and depressive disorders preceding Parkinson's disease: a case-control study, **Mov. Disord.** 15, pp. 669–677, 2000.

SHIMOHAMA, S.; SAWADA, H.; KITAMURA, Y.; TANIGUCHI, T. **Trends Mol. Med.** 9-36,2003.

SHULMAN, L.M.; TABACK, R.L.; RABINSTEIN, A.A.; WEINER, W.J. Non-recognition of depression and other non-motor symptoms in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord.** 8:193–197, 2002.

SILBERMAN, C. D.; LAKS, J.; RODRIGUES, C. S.; ENGELHARDT, E. Uma revisão sobre depressão como fator de risco na Doença de Parkinson e seu impacto na cognição. **Revista de Psiquiatria RS.** 25 (1): 52-60, 2004.

SILVA, M.T.; SCHAPIRA, A.H.V. Parkinson's disease. *In: Mattson, MP, ed. Pathogenesis of Neurodegenerative Disorders.* New Jersey: Humana Press Inc, pp. 53–79, 2001

SINGH, A.; ALTHOFF, R.; MARTINEAU, J.; JACOBSON, J. Pramipexole, ropinirole, and mania in Parkinson's disease, **Am J Psychiatry,** 162, pp. 814–815, 2005.

SINGH, N.; PILLAY, V.; CHOONARA, Y.E. Advances in the treatment of Parkinson's disease. **Prog Neurobiol.** 81:29–44, 2007.

SKINNER, B. F. Seleção por conseqüências. **Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva,** IX, 129-137, 2007.

SLAUGHTER, J.R.; SLAUGHTER, K.A.; NICHOLS, D.; HOLMES, S.E.; MARTENS, M.P. Prevalence, clinical manifestations, etiology, and treatment of depression in Parkinson's disease. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci,** 2001.

SPENCER, P.S.; LUDOLPH, A.C.; KISBY, G.E. Are human neurodegenerative

disorders linked to environmental chemicals with excitotoxic properties? **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 648, 154– 160, 1992.

SPIEGEL, J.; STORCH, A.; JOST, W. H. Early diagnosis of Parkinson's disease. **J Neurol.** 253, 2006.

SPILLANTINI, M. G.; CROWTHER, R. A.; JAKES, R.; HASEGAWA, M. e GOEDERT, M. a-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 95, 6469-6473 , 1998.

STEFANOVA, E. Depression in Parkinson's disease. **Ann Gen Hosp Psychiatry.** 2: 12, 2003.

SY, H; *et al.* MPTP-induced dopaminergic degeneration and deficits in object recognition in rats are accompanied by neuroinflammation in the hippocampus. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. 95(2): 158-165, 2010.

SZTAINBERG, Y.; KUPERMAN, Y.; TSOORY, M.; LEBOW, M.; CHEN, A. The anxiolytic effect of environmental enrichment is mediated via amygdalar CRF receptor type 1. **Molecular Psychiatry**, 15, 905-917, 2010.

TADAIESKY, M.T.; DOMBROWSKI, P.A.; FIGUEIREDO, C.P.; CARGNIN-FERREIRA, E. DA CUNHA, C.; TAKAHASHI, R.N. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, 156:830-840, 2008.

TANNER, C.M.; ASTON, D.A. Epidemiology of Parkinson's disease and akinetic syndromes. **Curr. Opin. Neurol.** 13, 427-430, 2000.

TAROU L. R.; BASHAW M. J. Maximizing the effectiveness of environmental enrichment: Suggestions from the experimental analysis of behavior. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 102, pp. 189-204, 2007.

TOLOSA, E. COMPTA, Y. GAIG, C. The premotor phase of Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**. 13, pp. S2-S7, 2007.

TORASDOTTER, M., METSIS, M., HENRIKSSON, B. G., WINBLAD, B., & MOHAMMED, A. H. Environmental enrichment results in higher levels of nerve growth factor mRNA in the rat visual cortex and hippocampus. **Behavioural Brain Research**, 93, 83-90, 1998.

UEDA, S.; SAKAKIBARA, S.; YOSHIMOTO, K. Effect of long-lasting serotonin depletion on environmental enrichment-induced neurogenesis in adult rat hippocampus and spatial learning. **Neuroscience** 135, 395-402 (2005).

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F.H. Neural consequences of environmental enrichment. **Nat. Rev. Neurosci.** v.1, pp.191-198, 2000.

VENDETTE, M.; GAGNON, J. F.; DECARY, A.; MASSICOTTE-MARQUEZ, J.; POSTUMA, R. B.; DOYON, J.; *et al.* REM sleep

behavior disorder predicts cognitive impairment in Parkinson disease without dementia. **Neurology**, 69(19), 1843–1849, 2007.

VILA, Miguel; PRZEDBORSKI, Serge. Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. **Nature Medicine**, vol. 10, págs. S58-S62, julho de 2004.

WALSH, R. N., BUDTZ-OLSEN, O. E., PENNY, J. E. e CUMMINS, R. A. The effects of environmental complexity on the histology of the rat hippocampus. **J. Comp. Neurol.** 137, 361–366, 1969.

WANG, W.F.; WU, S.L.; LIOU, Y.M.; WANG, A.L.; PAWLAK, C.R.; HO, Y.J. MPTP lesion causes neuroinflammation and deficits in object recognition in Wistar rats. **Behav. Neurosci.**123:1261–70, 2009.

WATANABE, YU; HIMEDA, TOSHIKI; ARAKI, TSUTOMU. Mechanism of MPTP toxicity and their implications for therapy of Parkinson's disease. **Medical Science Monitor.** 11:1, 17-23, 2005.

WEINTRAUB, D.; MOBERG, P.J.; DUDA, J.E.; KATZ, I.R.; STERN, M.B. Effect of psychiatric and other nonmotor symptoms on disability in Parkinson's disease. **J Am Geriatr Soc.** 52: 784–788, 2004.

WEISSKOPF M.; CHEN H.; SCHWARZSCHILD, M.; KAWACHI, I.; ASCHERIO, A. Prospective study of phobic anxiety and risk of Parkinson's disease. **Mov Disord** 18:646–651, 2003

WICHOWICZ, H.M.; SLAWEK, J.; DEREJKO, M.; CUBALA, W.J. Factors associated with depression in Parkinson's disease: a cross-sectional study in a Polish population. **Eur Psychiatry.**21(8):516-20, 2006.

WIDMAN, D.R.; ROSELLINI, R.A. Restricted daily exposure to environmental enrichment increases the diversity of exploration. **Physiol Behav.** 47:57-62, 1990.

WILLNER, P. Validation criterion for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, 10: 677–609, 1986.

YAMAMOTO, M. Depression in Parkinson's disease: its prevalence, diagnosis, and neurochemical background. **J Neurol** . 248:3, 5–11, 2001.

YEE, B.K.; ZHU, S.W.; MOHAMMED A.H.; FELDON J. Levels of neurotrophic factors in the hippocampus and amygdala correlate with anxiety- and fear-related behaviour in C57BL6 mice. **J Neural Transm.** 114:4, pp. 431–444, 2007.

YOUNG, R. J. Environmental enrichment for captive animals. **Universities Federation for Animal Welfare (UFAW)**. 2003.

YUAN, Z.Y.; *et al.* Neuroprotective effects of enriched environment in MPTP-treated SAMP8 mice. **Neurosci Lett.** Apr 17;454(1):6-10, 2009.

ZHAO C.; DENG W.; GAGE F.H. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. **Cell.** v. 132, n.4, p. 645-660, 2008.

ZIMMERMANN, A.; STAUFFACHER, M.; LANGHANS, W.; WURBEL, H. Enrichment dependent differences in novelty exploration in rats can be explained by habituation. **Behav Brain Res.**121:11–20, 2001.