



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Prejuízo no processamento olfatório emocional em um modelo animal de doença de Parkinson e o ambiente de criação como estratégia protetora

Sanmara de Lima França

Florianópolis – SC

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Prejuízo no processamento olfatório emocional em um modelo animal de doença de Parkinson e o ambiente de criação como estratégia protetora

Sanmara de Lima França

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

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi

Florianópolis – SC

2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

F814p França, Sanmara de Lima

Prejuízo no processamento olfatório emocional em um modelo animal de doença de Parkinson e o ambiente de criação como estratégia protetora [dissertação] / Sanmara de Lima França ; orientador, Reinaldo Naoto Takahashi. - Florianópolis, SC, 2011.

93 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Parkinson, Doença de. 3. Reserpina. 4. Semiologia - (Medicina). 5. Reflexos condicionados. 6. Animais de laboratório. I. Takahashi, Reinaldo Naoto. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

Existirá, e toda raça então experimentará
Para todo mal, A cura!

(Lulu Santos / Nelson Motta)

Dedico este trabalho à minha família,
principalmente minha mãe, por toda
dedicação, amor, carinho e exemplos
ao longo desses anos.

AGRADECIMENTOS

A DEUS que tem guiado meu caminho diariamente e que me torna, propriamente, “Protegida de Deus” (significado de Sanmara).

À minha família, minha mãe Maria, exemplo de força, bondade e coragem e por ser uma pessoa tão admirável me faz querer ser uma pessoa melhor. Ao meu irmão Nilton, por ser um exemplo de inteligência e estar sempre presente em todos os momentos importantes desde que nasci.

À minha madrinha Isaura, tradução do que é amizade.

Ao Professor Dr. Reinaldo Naoto Takahashi, pela ótima recepção, pelo constante acompanhamento, cuidado, incentivo e orientação durante estes anos.

Aos meus colaboradores, Rimenez Souza, Marília Bessa e Cristiane de Carvalho por compartilharem uma importante conquista, pelo envolvimento, dedicação e parceria.

Ao Professor Dr. Ricardo Souza e à Elisabete Lepera pela ajuda nas análises de HPLC.

À banca de Professores Dr. Antônio de Pádua Carobrez, Dr. Leandro Bertoglio e Dra. Monique Gevaerd, por disporem tempo para avaliação e contribuição a este trabalho.

Aos meus colegas de laboratório: Carina, Fabrício Assini, Fabrício Pamplona, Pablo, Rafael, Cristiane, Marília e Thiago, pela ótima convivência, amizade, ajudas, confraternizações e contribuições intelectuais, que me proporcionaram crescimento científico e pessoal. Em especial, agradeço ao Rafael, pela fraternidade diária, apoio, parceria e ajuda. Amizade que, com certeza, permanecerá.

Às minhas amigas, que posso contar sempre, Fernanda, Ana, Virginia, Débora, Tatiana, Kamila, por terem se tornado a minha família em Florianópolis, sem vocês, essa jornada teria sido muito mais árdua.

As amigas (os) de São Paulo que ficaram um pouco distantes, mas sempre presentes no coração, pelo apoio, visitas, motivação e por me receberem tão calorosamente em cada volta para minha terra natal.

Finalmente, a todos os membros do Departamento de Farmacologia, que, de alguma forma, contribuíram para esse trabalho, fosse com aulas, sugestões, cuidado com os animais ou pelos períodos de distração e confraternização.

À Capes e à FAPESC pelo apoio financeiro.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS	xi
LISTA DE FIGURAS e TABELAS	xii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença de Parkinson	1
1.2 Sintomas não-motores	3
1.3 Modelos animais da DP	7
1.4 Ambiente enriquecido	11
2 OBJETIVOS e JUSTIFICATIVA	13
2.1 Objetivos específicos	13
3 MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1 Animais	14
3.2 Drogas e soluções	14
3.3 Ambientes de criação	14
3.4 Testes comportamentais	15
3.4.1 Testes motores e emocionais	15
3.4.1.1 Campo aberto	15
3.4.1.2 Labirinto em Cruz elevado	16
3.4.1.3 Consumo de Sacarose	17

3.4.1.4 Nado Forçado	18
3.4.2 Avaliação da capacidade olfatória	19
3.4.2.1 Discriminação olfatória	19
3.4.3 Testes cognitivos	20
3.4.3.1 Esquiva Inibitória	21
3.4.6.2 Condicionamento olfatório de medo	21
3.5 Análise Estatística	25
3.6 Delineamento experimental.....	25
4. RESULTADOS	27
4.1 Ambiente Padrão	27
4.1.1 Testes motores e emocionais	27
4.1.1.1 Campo aberto	27
4.1.1.2 Labirinto em Cruz elevado	27
4.1.1.3 Consumo de Sacarose	28
4.1.1.4 Nado Forçado	29
4.1.2 Capacidade olfatória	30
4.1.2.1 Discriminação olfatória	30
4.1.3 Testes cognitivos	31
4.1.3.1 Esquiva Inibitória	31
4.1.3.2 Condicionamento olfatório de medo	32
4.2 Ambiente Enriquecido	35
4.2.1 Testes motores e emocionais	35

4.2.1.1 Consumo de Sacarose	35
4.2.1.2 Nado Forçado	36
4.2.2 Capacidade olfatória	36
4.2.2.1 Discriminação olfatória	36
4.2.3 Testes cognitivos	37
4.2.3.1 Condicionamento olfatório de medo	37
4.3 Resumo dos resultados	39
5 DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÃO	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HIAA 5-hidroxiindolacético

5-HT Serotonina

6-OHDA 6-hidroxidopamina

ABL Amígdala basolateral

Ach Acetilcolina

ANOVA Análise de variância

AE Ambiente enriquecido

AP Ambiente padrão

CA Campo aberto

COM Condicionamento olfatório de medo

CPF Córtex pré-frontal

DA Dopamina

DP Doença de Parkinson

EI Estímulo incondicionado

EC Estímulo condicionado

ERO's Espécies reativas de oxigênio

i.p. Intraperitoneal

LC Locus coeruleus

LCE Labirinto em cruz elevado

MPTP 1-metil 4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

NA Noradrenalina

SHR Ratos espontaneamente hipertensos

SNPc Substância nigra parte compacta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração do ambiente enriquecido	11
Figura 2. Ilustração do campo aberto.....	16
Figura 3. Ilustração do Labirinto em cruz elevado	17
Figura 4. Ilustração do Consumo de sacarose	18
Figura 5. Ilustração Nado forçado	19
Figura 6. Ilustração Discriminação olfatória.....	20
Figura 7. Foto esquiva inibitória	21
Figura 8. Ilustração do COM	24
Figura 9. Ilustração Parâmetros de avaliação do COM	24
Figura 10. Efeito da reserpina no CA	27
Figura 11. Efeitos da reserpina no LCE	28
Figura 11. Efeitos da reserpina no consumo de sacarose	29
Figura 12. Efeitos da reserpina no nado forçado	30
Figura 14. Efeitos da reserpina na discriminação olfatória	31
Figura 15. Efeitos da reserpina na esquiva inibitória.....	32
Figura 16. Efeitos da reserpina no COM	34
Figura 17. Efeitos da reserpina no consumo de sacarose em animais submetidos ao AE.....	35
Figura 18. Efeitos da reserpina no nado forçado em animais submetidos ao AE	36
Figura 19. Efeitos da reserpina na discriminação olfatória em animais submetidos ao AE	37

**Figura 20. Efeitos da reserpina no COM em animais submetidos ao
AE 38**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo dos resultados 39

Resumo

Os sintomas pré-motores da doença de Parkinson (DP) englobam diversas alterações emocionais, olfatórias e cognitivas, podendo ser observados anos antes das alterações motoras. O desenvolvimento de terapias neuroprotetoras nos estágios iniciais da doença pode ser determinante na sua evolução, neste aspecto o enriquecimento ambiental tem demonstrado efeitos significantes em diversas doenças degenerativas. O objetivo do trabalho foi avaliar se baixas doses de reserpina em ratos poderiam constituir um modelo pré-motor da DP induzindo déficits cognitivos e/ou emocionais, bem como avaliar o efeito protetor do ambiente enriquecido nesses prejuízos. Foram avaliadas as alterações cognitivas, emocionais, olfatórias e motoras induzidas pela reserpina nas doses de 0,5 e 1,0 mg/Kg, administrada por via intraperitoneal, em ratos Wistar adultos machos. Na maior dose, os animais apresentaram comportamento tipo-depressivo, nos testes de nado forçado e consumo de sacarose, prejuízos olfatórios, no teste da discriminação olfatória, enquanto na menor dose os animais tiveram prejuízo no condicionamento olfatório de medo, apesar de manter a capacidade de discriminar odores. Estes resultados sugerem que o prejuízo no condicionamento olfatório, relacionado à doença de Parkinson, pode ser uma alteração inicial dessa patologia e a sua avaliação pode contribuir para a determinação de modelos pré-motores da DP. Adicionalmente, foram avaliados os efeitos da exposição de ratos ao enriquecimento ambiental, durante 10 semanas, sobre os testes onde os animais do ambiente padrão apresentaram prejuízos induzidos pela reserpina. Com exceção do consumo de sacarose, o enriquecimento ambiental protegeu os danos olfatórios, emocionais e cognitivos induzidos pela droga. Esses resultados sugerem que o meio de criação tem papel importante na progressão da doença de Parkinson, podendo ser visto como uma estratégia neuroprotetora.

Abstract

Non-motor dysfunctions in Parkinson's disease (PD) such as emotional, olfactory and cognitive abnormalities are common and may precede motor impairment for years. The development of neuroprotective therapies in early stages of PD can be decisive in its evolution. In this aspect the environment enrichment (EE) has demonstrated significant effects in several neurodegenerative diseases. The object of this work was assess whether the treatment with reserpine in low doses could induce deficits in olfactory emotional processing, as well as to evaluate the protective effect of EE on these impairments. We evaluated the cognitive, emotional, olfactory and motor damages induced by reserpine in doses of 0.5 and 1.0 mg/kg in adult male Wistar rats. At the highest dose, the animals showed depressed-like behavior in the forced swim test and sucrose intake, olfactory loss in the olfactory discrimination test, whereas the lowest dose induced impaired olfactory fear conditioning, despite having the ability to discriminate odors. These results suggest that the impairment in olfactory conditioning related to Parkinson's disease could be considered a good test to evaluate preclinical models of DP. Additionally, we assessed the effects of exposure to EE, by 10 weeks, on the damage induced by reserpine in animals raised in standard environment. Except the sucrose intake test, the environmental enrichment protected olfactory, emotional and cognitive changes drug-induced. These results suggest that the life experiences are important for the progression of Parkinson's disease and may be seen as a neuroprotective tool.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa de elevada prevalência na população mundial, atingindo 1% dos indivíduos com mais de 65 anos (Stoof *et al.*, 1999; Mayeux, 2003). No Brasil, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2000), existem aproximadamente 222 mil parkinsonianos, sendo que 2% dos brasileiros acima dos 60 anos são acometidos por esta síndrome.

A DP foi descrita pela primeira vez por James Parkinson em 1817. Naquela ocasião apenas os sintomas motores clássicos, tais como rigidez muscular, tremores e bradicinesia foram incluídos em sua definição (Parkinson, 2002). Os sintomas mais descritos na DP provêm do déficit motor, os quais são determinantes para confirmação do diagnóstico clínico da doença. Ela é progressiva e esses sintomas aparecem até 18 anos após o início da doença (Halliday *et al.*, 2006), onde 70% dos neurônios dopaminérgicos se apresentam degenerados (Bezard *et al.*, 2001).

O envelhecimento é um importante fator relacionado com o aparecimento dessa patologia, porém já foram identificados outros fatores externos que podem aumentar a incidência da doença, tais como: traumatismos cranianos (Stern *et al.*, 1993; Vanitallie, 2008), disfunções mitocondriais, produção de radicais livres (Langston, 1996), e estilo de vida (Frigerio *et al.*, 2005). O componente genético também pode ser um fator de risco para o desenvolvimento da DP. Na busca por possíveis genes envolvidos na DP, foram relatadas diferentes mutações nos genes da α -sinucleína (Polymeropoulos *et al.*, 1997; Zarranz *et al.*, 2004), da proteína parkina (Kitada *et al.*, 1998) e DJ1 (Hague *et al.*, 2003). Estas mutações podem aumentar a deposição de corpos de Lewy ou inclusões de poliglutaminas nas células neurais (Hardy, 2010).

A DP deve ser diferenciada do parkinsonismo secundário, que ocorre devido a processos que danificam os gânglios da base e suas conexões ou, prejudicam suas funções, podendo ser por drogas, tais como, neurolépticos e antieméticos (Ahlskog, 2001; Frigerio *et al.*, 2005), após infecções virais, por doenças imunes, vasculares, e através de toxinas como o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), o manganês, e o cianeto (Hagan *et al.*, 1997).

Anatômica e neuroquimicamente, a DP é caracterizada por uma progressiva degeneração de neurônios dopaminérgicos da substância nigra e a depleção de dopamina no estriado (Spillantini *et al.*, 1997), bem como a degeneração dos neurônios dopaminérgicos no *locus coeruleus (LC)* e na área tegmentar ventral (Agid *et al.*, 1990; Greenamyre e Hastings, 2004), devido à projeção dos neurônios dopaminérgicos para esta estrutura a partir da substância nigra. (Maguire-Zeiss e Federoff, 2003).

A patogênese da DP sugere que a degeneração de neurônios dopaminérgicos é o principal contribuinte para o desenvolvimento da doença, porém é plausível que as demais monoaminas (noradrenalina e serotonina) também contribuam para o estabelecimento da patologia, já que compartilham semelhanças estruturais e são suscetíveis a oxidação dentro da célula, resultando em morte celular (Guillot e Miller, 2009). Nos pacientes parkinsonianos, pode ocorrer redução dos níveis de serotonina (5-HT) nos núcleos da rafe e de acetilcolina (Ach) no núcleo basal de Meynert, bem como degeneração do LC, o qual é o principal centro noradrenérgico do cérebro (Antelman *et al.*, 1997; Rommelfanger e Weinshenker, 2007).

Um dos mecanismos básicos propostos para o dano celular da via nigro-estriatal na DP é o estresse oxidativo resultante da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) que excede a capacidade antioxidante celular (Calne, 1992). Esses eventos podem ser resultado da produção aumentada e remoção insuficiente das ERO's, culminando na indução de apoptose dos neurônios dopaminérgicos nigrais. Essas alterações são causadas por disfunções mitocondriais (Schapira *et al.*, 1989), excitotoxicidade com excesso de formação de óxido nítrico ou por processos gliais e inflamatórios (Hunot *et al.*, 1997). Esses fatores oxidativos podem estar presentes em todos os neurônios monoaminérgicos em graus variados (Taylor *et al.*, 2009). Embora a causa dos sintomas não-motores associados à DP ainda não esteja totalmente elucidada, é evidente que eles não são causados apenas por déficits dopaminérgicos (Obeso *et al.*, 2010).

Outra característica da doença são os corpúsculos de Lewy, decorrentes da agregação anormal da proteína α -sinucleína (Braak *et al.*, 2003), que quando associada a outros componentes como neurofilamentos fosforilados e ubiquitina, transformam-se gradualmente

em corpúsculos de Lewy insolúveis (Braak e Braak, 2000). Inicialmente, eles são vistos em diversas áreas relacionadas à olfação, como o tubérculo olfatório, o córtex piriforme, o córtex periamigdalóide e o córtex entorrinal (Daniel e Hawkes, 1992; Savica *et al.*, 2010) tendo uma progressão caudorrostral, iniciando na parte inferior do tronco encefálico até áreas corticais, tais como neocortex, ínsula, giro cingulado, além de áreas pré-frontais (Braak *et al.*, 2006b; Obeso *et al.*, 2010).

Essa progressão promove sintomas de acordo com as áreas afetadas, por ex. áreas caudais (tronco, bulbo) são afetadas primeiramente, observando-se manifestações clínicas que antecedem o quadro motor clássico (estágio inicial ou pré-motor) (Braak *et al.*, 2003; Savica *et al.*, 2010). Esses estágios neuropatológicos comprometem vários neurotransmissores (dopamina, acetilcolina, serotonina, noradrenalina, entre outros) e levam a múltiplas manifestações clínicas (motoras, sensitivo-sensoriais, autonômicas, afetivas, cognitivas, comportamentais e do sono) (Halliday e Mccann, 2010).

O reconhecimento dos sintomas iniciais poderia contribuir para o diagnóstico precoce da DP e, assim, retardar sua evolução ou estabilizar o estágio da doença, por meio de drogas ou estratégias neuroprotetoras (Morgan et al, 2010). De maneira geral, a baixa efetividade clínica de diversas drogas testadas no tratamento desta doença se deve ao fato de que o processo neurodegenerativo, geralmente, se encontra bastante avançado quando o diagnóstico é estabelecido (Chen, 2010b).

1.2 Sintomas não-motores

Os sintomas motores são os principais marcadores para o diagnóstico clínico da DP, entretanto, os pacientes parkinsonianos somente manifestam estes critérios clínicos quando aproximadamente 60-70% dos neurônios da parte compacta da substância nigra encontram-se degenerados e os níveis estriatais de dopamina DA são reduzidos 70-80% (Riederer e Wuketich, 1976; Gaig e Tolosa, 2009).

Os mecanismos do desenvolvimento clínico dos sintomas não-motores ainda são discutíveis, uma vez que, diversas regiões são afetadas, podendo ser relacionadas com as alterações presentes na patologia. Nos estágios finais da DP ocorre uma perda de, aproximadamente, 30-50% de células não-dopaminérgicas, tais como neurônios noradrenérgicos, serotonérgicos, gabaérgicos e colinérgicos. Neste sentido, a teoria da progressão caudorrostral de deposição de corpos de Lewy (Braak *et al.*, 2003) suporta o aparecimento dos sintomas, porém, ele não é um marcador exclusivo da DP, o que sugere a presença de outros fatores nessa progressão (Obeso *et al.*, 2010).

A DP manifesta-se, inicialmente, através da depressão (Fukunishi *et al.*, 1991), ansiedade (Starkstein e Leiguarda, 1993; Bolluk *et al.*, 2010) e disfunção olfatória (Ansari e Johnson, 1975) e há crescentes evidências de que alterações do sono (Friedman, 1980), denervação simpática cardíaca (Den e Bethlem, 1960), constipação (Singaram *et al.*, 1995) e dor (Defazio *et al.*, 2008) também podem surgir antes do aparecimento dos sintomas motores.

A depressão é o sintoma neuropsiquiátrico mais comum em indivíduos com DP, estima-se que esteja presente em mais de 45% desses indivíduos (Chaudhuri e Schapira, 2009). Além disso, em diversos pacientes com DP a depressão precede os sintomas motores (Mandell *et al.*, 1961; Fukunishi *et al.*, 1991). Adicionalmente, tem sido observada a presença de anedonia, uma manifestação específica da depressão caracterizada por uma perda de interesse em atividades que costumavam ser prazerosas-(Lemke *et al.*, 2006). Embora a base fisiopatológica da depressão na DP não seja bem compreendida, ela parece ser predominantemente causada pela degeneração dopaminérgica da área tegmental ventral, bem como a redução das neurotransmissões monoaminérgicas (Ziemssen e Reichmann, 2007). Estudos em humanos têm demonstrado alterações dopaminérgicas e noradrenérgicas, além de níveis reduzidos de ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), um metabólito da serotonina, no líquido cerebrospinal e redução na ligação da 5-HT aos seus receptores 5-HT1A em regiões corticais (Remy *et al.*, 2005).

Outro transtorno presente em indivíduos com DP é a ansiedade. Estudos estimam que mais de 40% desses pacientes apresentam

sintomas relacionados à ansiedade (Richard, 2005). Ela vem sendo relacionada com as alterações na neurotransmissão de monoaminas (5-HT, DA, NA) (Goetz, 2010). Os ataques de pânico são amplamente documentados, sendo mais frequentes em parkinsonianos quando comparados com a população em geral (Nutti *et al.*, 2004). Os casos mais severos são altamente relacionados aos sintomas motores (Weisskopf *et al.*, 2003), porém ela não está apenas relacionada a esse prejuízo, podendo se manifestar anteriormente aos sintomas motores (Shiba *et al.*, 2000).

A disfunção olfatória ocorre precocemente na DP, precedendo as alterações motoras por anos. Sua associação com a DP foi descrita há 30 anos (Ansari e Johnson, 1975) e desde então, vem se estabelecendo que o prejuízo olfatório seja um dos sintomas mais comuns em parkinsonianos. Dados recentes indicam que mais de 95% dos pacientes com DP apresentam perda olfatória significativa (Ziemssen e Reichmann, 2007). Esse sintoma pode ser explicado pelos danos na parte inicial da via olfatória, uma vez que as alterações histopatológicas (deposição de corpos de Lewy) são observadas no bulbo olfatório e no núcleo olfatório anterior. Eles também são vistos em áreas correlatas próximas, como o tubérculo olfatório, o córtex piriforme, o córtex periamigdalóide e o córtex entorrinal (Daniel e Hawkes, 1992; Savica *et al.*, 2010). Dessa maneira, pacientes com DP frequentemente são acometidos por um prejuízo olfatório anos antes do desenvolvimento das alterações motoras (Hawkes *et al.*, 1997; 1999). Além disso, há evidências que a identificação do odor e a discriminação possam ser prejudicadas, independentemente da sensibilidade da detecção olfatória (Boesveldt *et al.*, 2009), o que sugere déficits também na transmissão de estímulos olfatórios.

Outro sintoma prevalente na DP, descrito mais tardiamente (Dubois e Pillon, 1997), é a demência, sendo considerada a principal causa de incapacidade em portadores dessa patologia (Reuelta e Lippa, 2009). Ela pode ser encontrada entre 30-80% dos indivíduos afetados (Park e Stacy, 2009). A nível celular, a demência se apresenta sob forma de denervação progressiva de vias colinérgicas (Shimada *et al.*, 2009) e deposição de corpos de Lewy em áreas corticais (Braak *et al.*, 2006a), embora também existam evidências de que a perda noradrenérgica,

serotonérgica e dopaminérgica estaria relacionada com esse déficit (Emre, 2003; Lewis *et al.*, 2003).

A degeneração de neurônios dopaminérgicos na SNPc também pode ser responsável por alguns déficits cognitivos leves observados no início da doença, refletidos de mudanças no circuito dos gânglios basais e áreas corticais (Rinne *et al.*, 2000; Dirnberger *et al.*, 2005), porém não é suficiente para causar demência (Emre, 2003). Essa hipofunção frontoestriatal pode contribuir para os prejuízos na memória estratégica e de trabalho observados nos portadores de DP (Poliakoff e Smith-Spark, 2008). O aprendizado temporal também está prejudicado na DP, mesmo em indivíduos sem demência, sugerindo que a formação de traços de memória não ocorre (Dalrymple-Alford *et al.*, 2011). Esse achado remete às dificuldades da formação de memórias relacionadas à dicas e estratégias e memórias associativas (Emre, 2003).

Embora existam divergências quanto aos tipos de memórias comprometidas na DP, diversos estudos têm demonstrado que tanto as memórias implícitas (Bondi e Kaszniak, 1991; Roncacci *et al.*, 1996) quanto às memórias operacionais (Dubois e Pillon, 1997; Crucian e Okun, 2003) mostram-se prejudicadas em pacientes parkinsonianos. Por outro lado, tem sido demonstrado que as memórias declarativas, normalmente associadas ao hipocampo e o córtex entorrinal, encontram-se preservadas na DP (Flowers *et al.*, 1984; Dubois e Pillon, 1997; Riekkinen *et al.*, 1998).

O aprendizado associativo emocional também está prejudicado no início da DP (Miller *et al.*, 2009). Basicamente, o aprendizado aversivo ocorre pela associação ou pareamento entre um estímulo incondicionado a um estímulo neutro, que se torna um estímulo condicionado, sendo então capaz de gerar respostas de emocionais por si só (Kim e Jung, 2006). Esse prejuízo pode estar relacionado às falhas nos processos de atenção e memória de trabalho que são exigidos nesse tipo de aprendizado (Assogna *et al.*, 2008), porém há um componente emocional, que parece ser prejudicado antes mesmo do prejuízo cognitivo na DP (Van Tricht *et al.*, 2010).

Tem sido descrito que a redução da ativação amigdalár, nos estágios iniciais da DP, é associada a prejuízos na percepção do estímulo emocional (Westermann *et al.*, 2008). A percepção do estímulo

olfatório também está reduzida nos pacientes de DP, sendo acompanhada de hipofunção amigdalár, hipocampal e do córtex orbitofrontal, quando comparados aos indivíduos saudáveis (Kawamura e Kobayakawa, 2009).

Em roedores, tem sido mostrado que duas vias anatômicas distintas seriam responsáveis pelo processamento olfatório (Restrepo *et al.*, 2004). O sistema olfatório principal tem um papel complexo na discriminação de uma grande variedade de odores presente no ambiente e é capaz de associar esses odores com uma resposta comportamental adequada (Brennan e Keverne, 1997). Por outro lado, o sistema olfatório acessório reconhece uma variedade limitada de moléculas envolvidas na comunicação intra e interespecífica, transmitindo essas informações para centros superiores que dão início às respostas endócrinas ou comportamentais apropriadas (Brennan e Keverne, 1997).

Embora haja diferenças em regiões anatômicas e respostas emocionais entre humanos e roedores, os modelos animais são uma importante ferramenta para o estudo do aprendizado associativo com pistas olfatórias, uma vez que para estas espécies o olfato é tido como o principal sentido utilizado em sua interação com o meio (Apfelbach *et al.*, 2005). O estudo e o desenvolvimento de modelos que reproduzam as alterações pré-motoras da DP incluem o propósito de entender os aspectos fisiológicos da doença, bem como auxiliar no desenvolvimento de terapias neuroprotetoras nos estágios iniciais da doença (Chen, 2010a)

1.3 Modelos animais da Doença de Parkinson

Idealmente, um modelo animal deve possuir uma etiologia e características similares ao equivalente humano (Potashkin *et al.*, 2010). Ainda não existe um modelo animal ideal da DP, que seja capaz de mimetizar todas as características associadas à condição clínica, como a fácil detecção das alterações motoras associadas ao parkinsonismo, perda seletiva e gradual dos neurônios dopaminérgicos, e a produção dos corpos de Lewy (Dauer e Przedborski, 2003). Desta forma, é

necessário que o maior número possível de aspectos da doença sejam replicados (Falkenburger e Schulz, 2006).

Os modelos de DP podem mimetizar farmacologicamente alguns sintomas, induzindo os distúrbios funcionais na neurotransmissão dopaminérgica, como o modelo da reserpina, induzindo catalepsia por neurolépticos e também acinesia e bradicinesia com haloperidol (Menzaghi *et al.*, 1997). Outros modelos promovem a degeneração dopaminérgica da via nigroestriatal, através da alteração da cadeia respiratória, promovendo o estresse oxidativo e a agregação protéica anormal (Dauer e Przedborski, 2003). Essas alterações podem ser promovidas por toxinas, como a 1-metil 4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Langston, 1996), a rotenona (Talpade *et al.*, 2000), paraquat (Liou *et al.*, 1997) e a 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Ungerste, 1968).

A 6-OHDA reduz os níveis estriatais de DA e produz uma perda massiva de neurônios dopaminérgicos. Apesar de bem caracterizada e poder ser utilizada em ratos e camundongos, ela não ultrapassa a barreira hemato-encefálica e necessita de administração intracerebral, o que aumenta a variabilidade de resultados, além de promover degeneração rapidamente (Dauer e Przedborski, 2003). O MPTP possui características semelhantes a 6-OHDA e com a vantagem de formar agregados semelhantes aos corpos de Lewy quando administrado cronicamente, porém, é altamente tóxico para humanos e tem sua confiabilidade reduzida. As demais neurotoxinas não são bem caracterizadas, além de serem tóxicas para todo o organismo (Terzioglu e Galter, 2008).

Recentemente, modelos genéticos vêm sendo utilizados nos estudos envolvendo a DP. Esses modelos são baseados na deleção de genes, tais como Parkina, DJ-1, PINK1, na inserção de alguns genes, como é o caso dos genes produtores de sinucleína (Plaas *et al.*, 2008) ou na alteração dos genes que foram relacionados à patologia. A maioria deles promove degeneração mais lenta, como observado na doença, porém, não mimetiza os principais sintomas, como a perda de neurônios dopaminérgicos estriatais, além de não responderem bem às drogas utilizadas para o tratamento da doença (Terzioglu e Galter, 2008).

O modelo de escolha no presente trabalho é simples e bastante utilizado. Ele consiste na injeção sistêmica de reserpina, uma droga hipotensora e sedativa do SNC, antigamente prescrita no tratamento da hipertensão (Healy e Savage, 1998). Molecularmente, a reserpina age a nível intraneuronal impedindo o armazenamento de monoaminas nas vesículas sinápticas, por um mecanismo magnésio ATP-dependente, conseqüentemente, ocorre depleção temporária desses neurotransmissores (DA, NA e 5-HT). Além disso, ela possui alta afinidade pelo transportador vesicular de monoaminas, que tem como função transportá-las do citoplasma para dentro da vesícula sináptica, pois impede a ligação das monoaminas no seu transportador, resultando no acúmulo das mesmas no meio extravesicular (Carlsson, 1975).

Diversas drogas antiparkinsonianas utilizadas clinicamente (agonistas dopaminérgicos, levodopa, amantadina) demonstraram ser capazes de causar reversão das alterações locomotoras induzidas pela reserpina (Menzaghi *et al.*, 1997). Esse fato sugere que o modelo da reserpina demonstra boa validade preditiva.

Ela falha em simular os mesmos processos psicobiológicos responsáveis pela etiologia e fisiopatologia dos sintomas clínicos (não apresenta validade teórica ou por homologia), pois a administração de reserpina induz uma redução nos níveis de monoaminas de maneira inespecífica e não reproduz o avanço gradual do processo neurodegenerativo (Gerlach e Riederer, 1996). Da mesma maneira, a maioria dos modelos animais para DP não é capaz de reproduzir a progressão do processo neurodegenerativo da doença tal qual o modelo da reserpina. Cabe ressaltar que, embora a depleção de dopamina seja a maior responsável pelas alterações motoras características da DP, outros neurotransmissores como a noradrenalina (NA), serotonina (5-HT) e acetilcolina também podem estar associados ao amplo espectro de sintomas motores e não-motores em pacientes com DP (Remy *et al.*, 2005).

Apesar das vulnerabilidades anteriormente descritas, este modelo é capaz de mimetizar alguns sintomas clássicos desta patologia em roedores. Estudos, utilizando ratos e camundongos, mostram que a administração de baixas doses de reserpina pode produzir sintomas não-motores, como o efeito tipo-depressivo (Bourin, 1990; Skalisz *et al.*, 2002) enquanto doses mais altas são capazes de induzir hipocinesia,

redução da atividade locomotora, tremor e rigidez muscular (Aguiar *et al.*, 2009), o que confere validade analógica ao modelo.

A maioria dos estudos que utilizam modelos animais de DP é voltada à investigação de alterações motoras (Aguiar *et al.*, 2009; Silvestrin *et al.*, 2009) enquanto que os estudos que investigam as alterações não-motoras da doença são ainda escassos. Entre estes, as alterações de memória têm recebido maior atenção (Da Cunha *et al.*, 2001; Ferro *et al.*, 2005; Prediger *et al.*, 2005b), porém poucos têm investigado a ocorrência de alterações emocionais como depressão e ansiedade, cognitivas, bem como as disfunções olfatórias inicialmente citadas na DP (Taylor *et al.*, 2010).

Neste sentido, estudos pré-clínicos puderam detectar, em ratos, uma perda parcial de células e de dopamina estriatais, semelhante ao observado nos estágios iniciais da doença, utilizando diferentes modelos da DP. Eles também demonstraram que essa depleção é capaz de induzir alterações emocionais e cognitivas, sem observar prejuízos motores em modelos da DP como a 6-OHDA (Lindner *et al.*, 1999; Tadaiesky *et al.*, 2008). Outros trabalhos demonstraram prejuízos não-motores relacionados à DP em animais tratados com reserpina, tendo identificado prejuízos cognitivos e discinesia oral (Silva *et al.*, 2002) efeito tipo depressivo (Skalisz *et al.*, 2002), prejuízos em memórias aversivas (Fernandes *et al.*, 2008), prejuízos olfatórios e memória social (Bellissimo *et al.*, 2004; Prediger *et al.*, 2005b).

Dessa maneira, o modelo da reserpina pode ser uma boa estratégia para avaliar o potencial terapêutico de drogas neuroprotetoras, uma vez que a manipulação de doses pode mimetizar alguns sintomas relacionados à DP. Nota-se que com o aumento progressivo das doses é observado o surgimento de sinais relacionados a estágios mais tardios da doença, como os sintomas motores (Skalisz *et al.*, 2002; Prediger *et al.*, 2005a; Prediger *et al.*, 2005b; Prediger e Takahashi, 2005; Carvalho *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2008; Aguiar *et al.*, 2009).

O reconhecimento das alterações comportamentais promovidas pelos modelos animais da DP e sua possível relação com o grau de degeneração é de grande importância. O estudo de um fenótipo de comportamento mais amplo pode contribuir para a melhor compreensão da etiologia da doença. Além disso, esse estudo pode possibilitar um

diagnóstico antecipado, o desenvolvimento de melhores estratégias terapêuticas, uma vez que o processo neurodegenerativo encontra-se menos avançado, quando comparado a modelos que mimetizam os sintomas motores (Taylor *et al.*, 2010).

Sabendo-se que as terapias atuais são, em sua maioria, destinadas a minimizar as alterações motoras, sem alterar a evolução da doença e que as terapias neuroprotetoras testadas até o momento não demonstraram eficácia convincente na clínica, faz-se necessário o desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas (Hauser, 2010). Nesse aspecto, vem sendo proposto, experimentalmente, o enriquecimento ambiental de animais como uma estratégia de proteção frente a danos neuronais (Nithianantharajah e Hannan, 2010).

1.4 Ambiente enriquecido

O paradigma experimental do ambiente enriquecimento, foi descrito pela primeira vez por Donald Hebb, quando comparou ratos “de estimulação” mantidos em sua casa com aqueles que tinham sido deixados em gaiolas de laboratório (Hebb, 1955). Embora haja pouco controle do ambiente experimental, a chave para o enriquecimento é um ambiente com maior novidade e complexidade relativa às condições normais (Nithianantharajah e Hannan, 2006).

A utilização desse novo paradigma na DP é justificada pela sua etiologia, pois embora ela não esteja relacionada, exclusivamente, com um único fator, sabe-se que modificações ambientais e o estilo de vida podem influenciar o aparecimento e a progressão dos processos neurodegenerativos (Young *et al.*, 1999; Dobrossy e Dunnett, 2004). A incidência de Parkinson pode ser influenciada pelo desempenho educacional (Frigerio *et al.*, 2005) e o exercício físico (Chen *et al.*, 2005), o que sugere que as experiências podem modular o processo patológico da doença de Parkinson.

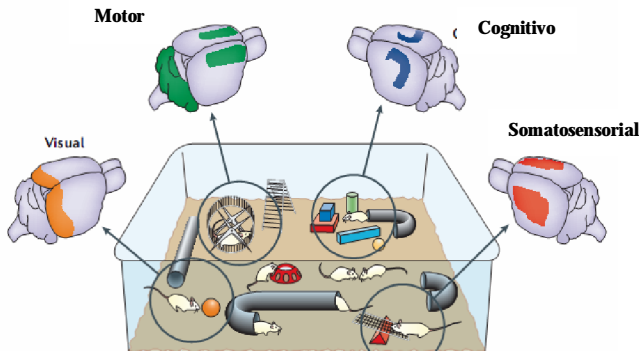


Figura 1. Ilustração de um ambiente enriquecido. Adaptado de (Nithianantharajah e Hannan, 2006).

O enriquecimento ambiental se refere às condições de moradia que aumentam a estimulação sensorial, cognitiva e motora dos animais. Diversos estudos moleculares, comportamentais e celulares demonstraram a relevância de seus resultados. Ele induz várias alterações na estrutura e função cerebral, inclusive promovendo o desenvolvimento e a maturação de novos neurônios em circuitos funcionais (Greenough et al, 1975), aumentando a expressão de moléculas envolvidas na sinalização neuronal e na plasticidade sináptica (Faherty *et al.*, 2005), além de estimular a expressão de fatores tróficos (Leggio et al, 2005) e modificar a população celular de astrócitos (Diamond et al, 1996) Essas alterações podem ser responsáveis pelo efeito neuroprotetor conferido pelo ambiente enriquecido. Dessa maneira, ele induz um reforço na conectividade neuronal, fornecendo redes neurais alternativas, o que pode representar uma adaptação funcional em caso de transtornos ou danos (Petrosini et al, 2009).

Uma gama de modelos de distúrbios do cérebro, incluindo as doenças de Alzheimer (Hamm *et al.*, 1996; Arendash *et al.*, 2004; Spires *et al.*, 2004) e de Parkinson (Faherty *et al.*, 2005), síndrome de Huntington (Spires *et al.*, 2004), bem como várias formas de lesão cerebral (Hamm *et al.*, 1996), epilepsias (Young *et al.*, 1999) já foram submetidos ao enriquecimento ambiental e em todos os casos este modelo apresentou algum benefício quando comparados às condições de habitação padrão (Nithianantharajah e Hannan, 2006).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Trabalhos recentes vêm demonstrando que os sintomas emocionais e olfatórios da doença de Parkinson precedem os motores por anos (Obeso *et al.*, 2010), tornando estes sintomas uma importante ferramenta para o diagnóstico. A necessidade de biomarcadores e de novas estratégias farmacológicas para o diagnóstico e tratamento da doença impulsiona pesquisas com abordagem no estado inicial da doença (Morgan et al, 2010)

Apesar de muitos estudos, a alteração que desencadeia a DP ainda é desconhecida, porém, sabe-se que ela é uma síndrome multifatorial (Langston, 1996) e as experiências de cada indivíduo constituem fatores que podem alterar a manifestação dessa patologia (Anastasia *et al.*, 2009) e também modificar a evolução dessa doença (Jadavji *et al.*, 2006).

Com isso, o trabalho tem o objetivo de investigar as alterações olfatórias, emocionais e cognitivas relacionados aos estágios iniciais da DP, estabelecendo um modelo pré-motor. Bem como, avaliar possíveis efeitos protetores do enriquecimento ambiental sobre os danos induzidos neste modelo de DP.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos motores da administração de reserpina, por via intraperitoneal, nas doses de 0,5 e 1,0 mg/Kg no teste do campo aberto;
- Avaliar os efeitos emocionais da administração de reserpina, por via intraperitoneal, nas doses de 0,5 e 1,0 mg/Kg no teste do Labirinto em cruz elevado, nado forçado e consumo de sacarose;
- Avaliar os prejuízos olfatórios decorrentes da administração de reserpina, por via intraperitoneal, nas doses de 0,5 e 1,0 mg/Kg no teste do da discriminação olfatória;
- Avaliar as alterações no aprendizado decorrentes da administração de reserpina, por via intraperitoneal, nas doses de

0,5 e 1,0 mg/Kg no teste da esquiva inibitória e no condicionamento olfatório de medo.

- Avaliar os prejuízos promovidos pela reserpina, nos testes anteriores, em ratos submetidos ao enriquecimento ambiental.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com idade de três meses, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em caixas de moradia, em grupos de 5-7, em ambiente com temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e ciclo de claro/escuro (12/12 h) controlados. Os animais tiveram livre acesso a alimentação e água. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA/UFSC), protocolo: PP00280.

3.2 Drogas e Soluções

A sacarose (Vetec, Brasil) foi diluída com água, em uma concentração de 0,8%. A reserpina (ácido ester metil reserpato 3,4,5-trimetotoxicinamico-Sigma) foi diluída em solução salina adicionada de 50 uL de ácido acético glacial. O controle consistiu na mesma solução de diluição da reserpina (salina + 50 uL de ácido acético glacial). As soluções foram administradas por via intraperitoneal (ip), 24 horas antes dos testes, num volume de 1 ml/Kg de peso corporal. As doses (0,5 e 1,0 mg/Kg) foram determinadas a partir de estudos prévios de nosso laboratório (Prediger *et al.*, 2005b).

3.3 Ambiente de criação

Após o desmame (21 dias), os animais foram colocados no ambiente enriquecido (AE). O AE consistia de duas gaiolas de polietileno idênticas (43 x 33 x 23 cm) interconectadas por um tubo de

PVC, contendo uma variedade de estímulos sensoriais, por exemplo: uma roda de correr, um túnel contorcido, escadas, chocalhos e brinquedos como bolas de diversas cores e texturas, peças de lego conforme previamente estabelecido em nosso laboratório (Pamplona *et al.*, 2009; De Carvalho *et al.*, 2010). Estes objetos eram lavados e alternados entre os ambientes e as suas posições eram trocadas de lugar, mudando a configuração espacial do AE e a composição dos objetos duas vezes por semana. Os animais foram mantidos em grupos de 5-7 animais nos dois tipos de ambientes de criação (ambiente padrão e ambiente enriquecido) 24 horas por dia até o início dos experimentos (3 meses), onde os animais eram retirados do AE e colocados em caixas semelhantes ao ambiente padrão (AP), que consistia em gaiolas comuns de polietileno (42 x 34 x 17 cm).

3.4 Testes Comportamentais

3.4.1 Testes que avaliam a capacidade motora e alterações emocionais dos animais

3.4.1.1 Campo aberto

Para avaliar possíveis alterações motoras (Walsh e Cummins, 1976) induzidas pela administração de reserpina, os animais foram testados no campo aberto (CA). Esse teste permite avaliar a emocionalidade (Hall, 1934), e também é amplamente utilizado para verificar a ação de drogas nos parâmetros motores. O aparato é feito de madeira e fórmica, formado por uma caixa de cor branca (100 × 100 cm), com 40 cm de altura, dividido por linhas pretas em 25 quadrantes de 20 x 20 cm. Durante os experimentos, cada rato foi colocado no centro do campo aberto, sendo registrado o número de quadrantes centrais e periféricos cruzados. Os animais foram expostos ao aparato durante 5 minutos, 24 horas após a administração de reserpina, por via intraperitoneal, nas doses de 0,5 e 1,0 mg/Kg ou controle. O teste foi realizado com luz clara, em ambiente com iluminação.

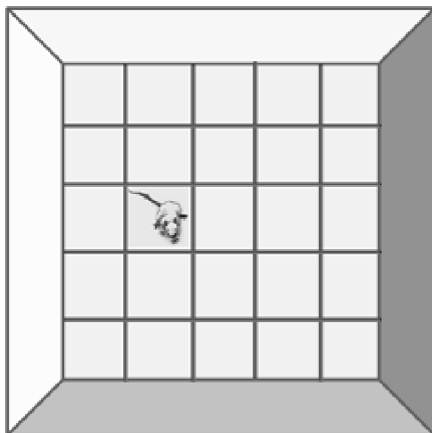


Figura 2. Ilustração do teste do Campo aberto.
Adaptado de (Tadaiesky, 2010).

3.4.1.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

Para avaliar se as variáveis como o tratamento ou o ambiente promoveriam um efeito tipo-ansiosgênico nos animais utilizou-se o labirinto em cruz elevado. Ele é um dos testes mais descritos na pesquisa da ansiedade em ratos e camundongos, que é baseado em respostas incondicionadas a ambientes potencialmente perigosos. A premissa básica é que ambientes novos evocam curiosidade e medo, criando desta forma, um típico conflito de aproximação/esquiva (Rodgers *et al.*, 1997; Carobrez e Bertoglio, 2005).

O labirinto em cruz elevado (LCE) consiste em dois braços abertos (50 x 10 x 0,75 cm) e dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm), arranjados de forma que os braços idênticos ficassem dispostos em posição oposta. Os braços emergiam de uma plataforma central (10 x 10 cm) e o aparato ficava suspenso a uma altura de 50 cm acima do nível do chão.

O teste foi conduzido em luz baixa, onde a iluminação da sala ficava por volta de 10 lux, 24 horas após a administração de reserpina

(0,5 ou 1,0 mg/kg) ou controle. Os animais foram ambientados por 30 minutos em uma sala experimental e em seguida foram submetidos ao teste, onde são colocados no aparato por 5 minutos. As porcentagens de tempo de permanência nos braços abertos (TA) e nos braços fechados (TF) foram calculadas pelas seguintes fórmulas: $TA = [TA / (TA+TF)] * 100$ e $TF = [TF / (TA+TF)] * 100$.



Figura 3. Ilustração do Labirinto em cruz elevado.
(<http://www.bilaneyconsultants.co.uk>)

3.4.1.3 Teste do Consumo de Sacarose

O consumo de sacarose é frequentemente utilizado como uma medida de anedonia em roedores (Moreau *et al.*, 1992; Craft e Devries, 2006). Os animais foram isolados em caixas de moradia individuais com acesso livre à alimentação. Cada rato tinha acesso a duas garrafas com água durante a fase de habituação por 24 horas. Antes da habituação, os animais recebiam o tratamento com reserpina 0,5, 1,0 mg/kg ou controle, por via intraperitoneal, e passavam por 24 horas de habituação, com objetivo de adaptá-los à ingestão de líquidos de duas garrafas.

Após a fase de habituação (24 horas após a administração da reserpina ou controle), a água de uma das garrafas foi substituída por uma solução de sacarose a 0,8%, conforme descrito previamente (Slattery *et al.*, 2007) e 24 horas depois as garrafas foram invertidas de sua posição inicial de forma a evitar vieses relacionados à posição das garrafas. O consumo de água e solução de sacarose foi estimado através da pesagem das garrafas (Tadaiesky *et al.*, 2008). A estimativa do

consumo de água é um controle motor do teste, uma vez, que a redução do consumo de sacarose acompanhada da redução do consumo de água poderia inferir uma incapacidade locomotora do animal.

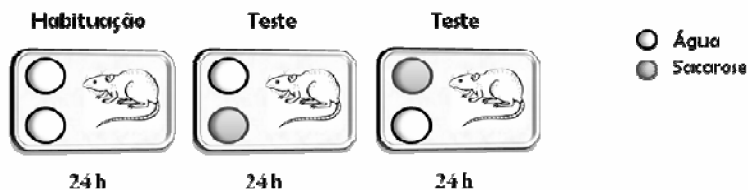


Figura 4. Ilustração do Consumo de sacarose.
Adaptado de (Tadaiesky, 2010)

3.4.1.4 Teste do Nado Forçado

O teste do nado forçado é um dos modelos mais utilizados para avaliar o efeito do tipo-depressivo de drogas, bem como a atividade de drogas antidepressivas, sendo baseado no paradigma do desamparo aprendido. O procedimento foi descrito previamente por Porsolt et al. (1977). Após um período inicial de nado intenso, o animal passa a executar apenas movimento para manter a cabeça fora da água, o que é considerado imobilidade.

A reserpina (0,5 ou 1,0 mg/kg) ou controle foi administrada 24 horas antes do treino. Durante o treino e teste os animais são ambientados 30 minutos antes na sala experimental e em seguida são colocados em cilindros individuais (60 cm de altura e 30 cm de diâmetro) contendo água (profundidade da água: 45 cm; temperatura: 25 ± 1 °C). Foram realizadas duas sessões (o treino de 15 minutos e o teste 24 h depois por 5 minutos). O treino tem como objetivo a aquisição do desamparo aprendido, o que gera um desespero comportamental, medido através na imobilidade durante o teste.

O tempo total de imobilidade foi registrado manualmente durante treino. A imobilidade foi definida como flutuação sem movimento, exceto aqueles necessários para manter a cabeça do rato acima da água. Após os testes, cada rato foi cuidadosamente envolto

numa toalha, e exposto a uma luz incandescente, sendo devolvido à sua caixa totalmente seco.



Figura 5. Ilustração do nado forçado. Adaptado de (Tadaiesky, 2010)

3.4.2 Testes para avaliação da capacidade olfatória

3.4.2.1 Teste de discriminação olfatória

Uma alteração amplamente descrita na DP é a perda da capacidade olfatória, chegando a acometer 95% e parece ser um dos sintomas mais iniciais da doença (Ziemssen e Reichmann, 2007). A fim de avaliar possíveis alterações na capacidade olfatória dos animais foi realizado o teste da discriminação olfatória. O procedimento adaptado de Dluzen & Kefalas (1996) e padronizado em nosso laboratório (Carr *et al.*, 1976; Prediger *et al.*, 2005a).

Os animais foram mantidos em caixas isoladas durante as 48 horas prévias ao teste. A reserpina (0,5 ou 1,0 mg/kg) ou controle foi injetada 24 horas antes do teste, que consistiu em colocar cada rato durante 5 minutos em um aparato dividido em dois compartimentos idênticos (30 × 30 × 20 cm) separados por uma porta aberta, de forma que o animal poderia escolher entre um compartimento contendo serragem nova e outro com serragem retirada da caixa previamente ocupada pelo animal (compartimento familiar).

Cada animal foi colocado inicialmente no centro do compartimento não-familiar e o tempo gasto pelo rato em cada

compartimento (familiar x não familiar) foi registrado. Em geral, ratos machos adultos são capazes de discriminar entre o compartimento familiar e o não familiar, ficando mais tempo no compartimento familiar, uma vez que eles têm preferência por seu próprio odor em relação a um odor neutro (Prediger *et al*, 2005, 2006). As porcentagens de permanência são calculadas através da permanência em um dos compartimentos dividido pela soma do tempo de permanência nos dois compartimentos, em seguida, multiplica-se por 100.



Figura 6. Ilustração do teste da discriminação olfatória.
Adaptado de (Tadaiesky, 2010).

3.4.3 Testes cognitivos

3.4.3.1 Teste da Esquiva Inibitória do tipo “step-down”

A fim de detectar alterações cognitivas nos ratos, a memória de referência foi avaliada através do modelo de esquiva inibitória. O animal recebe uma punição (choque leve nas patas) ao descer da plataforma, assim, ele passa a relacionar a descida de uma plataforma com um estímulo aversivo. Com isso, numa segunda exposição à caixa de esquiva, o mesmo evita descer da plataforma para explorar a caixa. O aprendizado da esquiva envolve vários estímulos, incluindo percepção espacial e visual (Gold, 1986).

O aparelho é constituído por uma caixa medindo 50 cm de comprimento 25 cm de largura e 25 cm de altura, conforme figura 7. A parte do chão é formada por barras paralelas de metal (1 mm de diâmetro). Os espaços entre as barras medem 1 cm e possui uma plataforma com 8 cm de largura e 4,0 cm de comprimento colocada junto à parede esquerda do aparelho (Izquierdo *et al*, 1991).



Figura 7. Foto esquiva inibitória.
(<http://www.ufjf.br/neurofisiologia/atividades>)

Durante o treino, o animal foi colocado sobre a plataforma e sua latência para descer sobre a grade (com as quatro patas) foi registrada e o animal foi estimulado com um leve choque nas patas (0.4 mA) durante 3 segundos (Izquierdo et al, 1998). A reserpina foi administrada 24 horas antes do treino, com a finalidade de prejudicar o aprendizado. Cada animal foi re-exposto duas vezes: 1 h 30 min após o treino para verificar aquisição de memória de curta duração, e 24 h após o treino para avaliação da memória de longa duração, realizando-se o mesmo procedimento, mas omitindo-se o choque, sendo apenas registrada a latência para a descida da plataforma. Considera-se que o animal aprendeu, quando ele permanece na plataforma ou demanda de um período significativamente maior para descer, quando comparado ao treino.

3.4.6.2 Condicionamento olfatório de medo

A performance de um animal no modelo do condicionamento olfatório de medo (COM), previamente padronizado em 2008 por (Kroon e Carobrez), depende de diversos fatores, tais como, ansiedade, capacidade olfatória e cognição, permitindo a avaliação desses parâmetros de forma sinérgica.

No condicionamento, um estímulo inicialmente não-aversivo adquire propriedades aversivas, mediante a um pareamento do componente neutro com um evento aversivo (Kim e Jung, 2006), tornando-o um estímulo condicionado, que passa a desencadear o comportamento defensivo, geralmente apresentado em situações de

perigo. Esses comportamentos são apresentados por meio de respostas como imobilização, alterações autonômicas, endócrinas e na expressão de reflexos (respostas de sobressalto potencializado pelo medo) (Ledoux, 2000).

A aquisição do COM poderia ser prejudicada pela alteração de alguns parâmetros, tais como: prejuízos olfatórios (Herzog e Otto, 1997), drogas que impeçam o aprendizado (Kroon e Carobrez, 2008) ou ansiolíticos (Kroon e Carobrez, 2008). A sensibilidade à dor também deve ser considerada, assim, os testes anteriores foram utilizados como controle para avaliação dos fatores interferentes de maneira isolada. Além disso, como na maioria dos testes utilizados, o prejuízo motor dos animais poderia alterar a resposta comportamental, utilizamos o número de cruzamentos como um controle locomotor.

Esse teste é baseado no condicionamento Pavloviano, onde a aquisição das respostas de medo condicionado implica num aprendizado inicial da associação estímulo neutro/Estímulo incondicionado (EI), seguido por um período de consolidação, onde a associação é estabelecida através da memória de longo prazo (Mcgaugh, 2004). Na padronização também foi demonstrado que a exposição do odor pareado, o estímulo condicionado (EC-I), em diferentes contextos é capaz de gerar um novo condicionamento (EC-II), onde o novo ambiente passa a gerar um comportamento defensivo (Kroon e Carobrez, 2008), esse novo pareamento é denominado condicionamento de segunda ordem (Gewirtz e Davis, 2000).

No teste do condicionamento olfatório de medo, os animais, no primeiro dia (Dia 1), foram colocados na caixa de condicionamento (choque) para exploração do ambiente, numa sessão denominada familiarização 1 por 4 minutos e 20 segundos. A exposição à caixa de odor, por 10 minutos, ocorreu 2 horas após a primeira familiarização, sendo denominada familiarização 2. A reserpina foi administrada 1 hora após a familiarização 2, as doses utilizadas foram 0,5, 1,0 mg/Kg ou controle. Essa etapa tem como objetivo a habituação dos animais às caixas. As 2 familiarizações ocorreram antes da administração da reserpina para não sofrerem influência da droga, que possui um longo tempo de meia vida.

Caixa de condicionamento: caixa (Ugo Basile) medindo 22 x 26 x 22 cm, com paredes de acrílico cinza, com exceção da tampa

confeccionada em acrílico transparente. O assoalho da caixa é composto de grades eletrificadas distanciadas 1 cm entre si. A habituação foi realizada num ambiente com som atenuado, temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) e intensidade alta de luz de 300 lux. O grupo não-pareado foi exposto ao odor nesta sessão.

Caixa de odor: instalada em uma sala, com luminosidade atenuada (10 lux), diferente da utilizada para o condicionamento. Este aparato, inteiramente construído em madeira, com tampas frontais em vidro, foi dividido em dois compartimentos, um aberto (40 x 26 x 40 cm) e um fechado (20 x 26 x 40 cm) com cobertura. Uma pequena abertura (6 x 6 cm), situada na parede divisória, permitiu o livre acesso do animal a ambos compartimentos. Na parede lateral do compartimento aberto, uma caixa contendo um pedaço de papel filtro, que nas sessões posteriores é embebido com 0,1 mL do odor condicionado (acetato de amila). No piso da caixa, uma marcação localizada a 7 cm da parede, serviu como referência para delimitar a área proximal à flanela.

No dia seguinte (Dia 2), 24 horas após o tratamento, na sessão de condicionamento, os animais foram re-expostos à caixa de choque, onde foram emitidos 5 choques elétricos nas patas (EI) por 2 segundos numa intensidade de 0,5 mA e pareados com um estímulo olfatório neutro acetato de amila (semelhante ao odor de banana), que se tornou o estímulo condicionado (EC). Os choques foram emitidos dentro de um intervalo de 40 segundos (Kroon e Carobrez, 2008). O odor foi colocado em um papel filtro (0,1 mL de acetato de amila) localizado abaixo das grades eletrificadas. O condicionamento foi realizado num ambiente com som atenuado, temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) e intensidade alta de luz de 300 lux.

Para a avaliação do medo condicionado, no Dia 3, todos os animais foram submetidos à caixa de odor, com a finalidade de minimizar as influências contextuais. Na caixa, os animais foram submetidos ao odor (EC-I), colocado em um papel filtro localizado na parede do compartimento aberto, sendo que a quantidade de acetato de amila é semelhante a da sessão de condicionamento. Essa sessão foi realizada num ambiente com som atenuado, temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) e intensidade baixa de luz de 10 lux

No Dia 4, com o propósito de avaliar o medo condicionado ao contexto, através do estabelecimento do condicionamento de segunda

ordem, todos os sujeitos foram re-expostos à caixa de teste sem odor (EC-II). Essa sessão foi realizada num ambiente com som atenuado, temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) e intensidade baixa de luz de 10 lux.

Com a finalidade de validar o protocolo nas caixas do nosso laboratório, inserimos os animais controles não-pareados no teste. Eles são expostos ao odor apenas na sessão de familiarização, porém durante a sessão de condicionamento, esses animais apenas receberam o choque, sem a presença do odor (grupo não-pareado). Devido ao número limitado de animais do ambiente enriquecido, esse grupo não foi repetido, uma vez que já havíamos padronizado com o ambiente padrão.



Figura 8. Ilustração do condicionamento olfatório de medo.
Adaptado de (Kroon e Carobrez, 2009).

Os parâmetros avaliados no teste são:

- 1- Tempo de aproximação: tempo em que o animal permanece com pelo menos a cabeça dentro de uma área retangular (7 x 26 cm) que contém a flanela. Uma marcação localizada a 7 cm da parede lateral facilita esta medida.
- 2- Tempo de avaliação de risco, que é caracterizado pelo período de permanência do animal no compartimento fechado, com a cabeça para fora direcionada para o odor, com ou sem as patas dianteiras para fora deste compartimento.
- 3- O tempo escondido, que se dá pelo tempo que o animal permanece dentro do compartimento fechado da caixa.
- 4- Frequência de cruzamentos que é o número de vezes que o animal se aproxima da flanela somada com o número de entradas no compartimento fechado, esse parâmetro pode ser considerado um controle motor do teste.

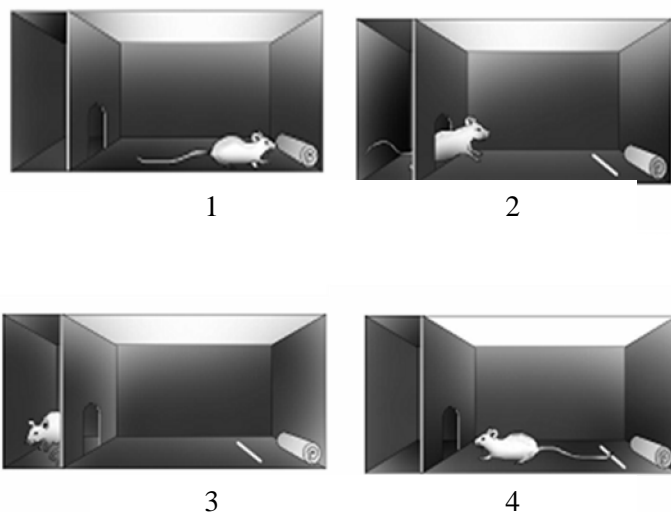


Figura 9. Parâmetros de avaliação no COM.
Adaptado de (Kroon e Carobrez, 2009)

3.5 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 uma via, seguidas pelo pós-teste de Newman-Keuls. Em testes realizados com apenas uma dose de reserpina (1,0 mg/Kg) o teste t de Student foi empregado.

No teste de esquiwa inibitória, tratando-se de dados não-paramétricos (não possuem distribuição normal), a análise estatística comparou as medianas e os intervalos interquartis dos grupos, utilizando o teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn. Para comparação do tempo de latência de descida entre treino e teste do mesmo grupo, a análise estatística foi feita através do teste de Friedman para medidas não-paramétricas e pareadas.

A probabilidade aceita como indicativo da existência de diferença estatisticamente significativa foi de $P < 0.05$. Todas as

comparações estatísticas foram efetuadas utilizando-se o pacote estatístico GraphPad Prism 5.0.

3.6 Delineamento experimental

Em um primeiro momento, avaliamos as possíveis alterações motoras, emocionais, olfatórias e cognitivas induzidas pela reserpina em animais criados em AP. A utilização de animais do AE para triagem é dificultada pelo tempo demandado para criação (por volta de 3 meses para 24 animais). Os testes e as doses de reserpina onde os animais do AP apresentaram prejuízos foram repetidos em animais submetidos ao enriquecimento ambiental.

Os experimentos foram realizados de forma independente, com exceção da discriminação olfatória e nado forçado, que foram realizados nos mesmos animais, sendo que o treino do nado forçado foi realizado imediatamente depois da discriminação olfatória e o teste 24 horas depois. Da mesma maneira, o campo aberto e labirinto em cruz elevado (LCE) foram realizados nos mesmo animais, onde o LCE foi realizado primeiro sendo seguido, imediatamente, do Campo aberto.

O primeiro teste realizado foi o campo aberto, onde foram avaliadas possíveis alterações emocionais e motoras induzidas pela reserpina, já que o objetivo do trabalho foi de utilizar uma dose onde não fossem observados prejuízos motores.

As alterações emocionais mais descritas clinicamente na DP, a ansiedade e a depressão, foram avaliadas por meio de testes já descritos na literatura, tais como, o LCE, o nado forçado, o consumo de sacarose e o CA, com o objetivo de verificar a validade de semelhança do modelo. Da mesma maneira, as possíveis alterações olfatórias e cognitivas foram analisadas em diferentes modelos. Essas alterações também poderiam interferir no teste do condicionamento olfatório de medo (COM), dessa maneira, essa bateria de testes nos fornece um maior embasamento para discussão do perfil obtido no COM com a administração de reserpina, bem como a validação da reserpina em baixas doses como um modelo pré-motor.

4. RESULTADOS

4.1. Ambiente Padrão

4.1.1 Testes que avaliam a capacidade motora e alterações emocionais dos animais

4.1.1.1 Campo aberto (CA)

Conforme a figura 10, os ratos tratados com reserpina nas doses de 0,5 e 1,0 mg/kg (i.p) não apresentaram diferenças no número de cruzamentos totais quando comparados com o controle. Além da performance locomotora, medida pelos cruzamentos totais, foram avaliados os cruzamentos centrais, como uma medida de emocionalidade. Nenhuma das doses de reserpina alterou significativamente esse parâmetro, utilizando ANOVA de uma via.

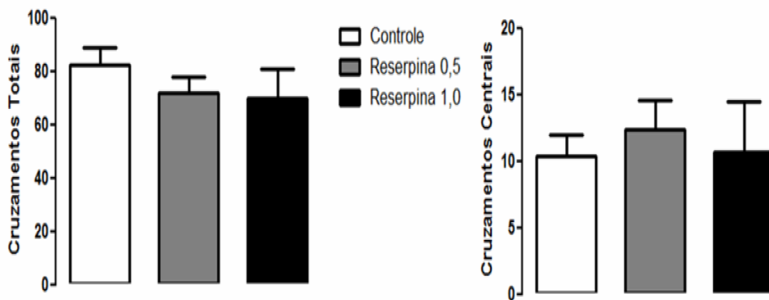


Figura 10. Efeito da reserpina (0,5 ou 1,0 mg/Kg) no campo aberto. Resultados estão expressos em média + E.P.M, utilizando ANOVA de uma via. (N= 8-10/grupo).

4.1.1.2 Labirinto em cruz elevado

A partir da figura 11, viu-se que o tratamento com reserpina, em ambas as doses, não alterou o número de entrada nos braços abertos nem o tempo de permanência nos mesmos comparados aos animais do grupo controle. O número de entradas nos braços fechados, um controle

locomotor do teste, também foi semelhante para ambos os grupos, utilizando ANOVA de uma via.

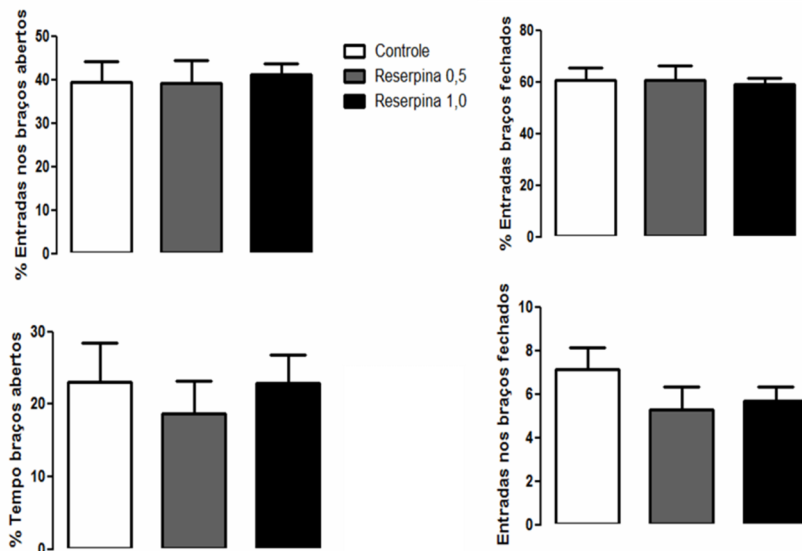


Figura 11. Efeitos da reserpina (0,5 ou 1,0 mg/Kg) no labirinto em cruz elevado. Resultados estão expressos em média + E.P.M, utilizando ANOVA de uma via. (N= 9-10/grupo).

4.1.1.3 Consumo de sacarose

O teste do consumo de sacarose foi utilizado para avaliar a anedonia dos animais. Durante a fase inicial de adaptação, na qual os ratos foram habituados a beber das duas garrafas (ambas preenchidas com água), não foram observadas diferenças significativas no consumo entre os ratos tratados com reserpina nas doses de 0,5 e 1,0 mg/kg quando comparados ao controle. Conforme a figura 12. A comparação por ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Newman Keuls demonstrou que os ratos do grupo reserpina 1,0 mg/kg consumiram, significativamente, menos sacarose do que o grupo controle [$F(2,27) = 4,4$, $P < 0,05$]. Além disso, não foram observadas diferenças no consumo total de água durante esse período.

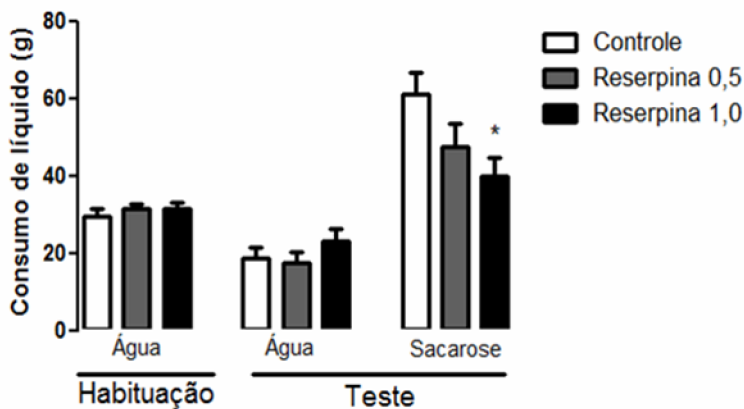


Figura 12. Efeitos da administração de reserpina (0,5 ou 1,0 mg/Kg) no teste do consumo de sacarose. Os valores são expressos em média + E.P.M, utilizando ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Newman Keuls * $P < 0,05$ (em comparação ao grupo controle). (N= 10/grupo)

4.1.1.4 Teste do Nado forçado

O teste do nado forçado foi utilizado para avaliar o comportamento do tipo desamparo aprendido, refletido através do aumento no tempo de imobilidade. A partir da figura 13 observa-se que o tratamento com reserpina na dose de 1,0 mg/Kg, 48 h antes do teste, induziu aumento significativo no tempo de imobilidade em comparação ao controle. Análise realizada através de ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman Keuls [$F(2,27) = 4,6, p < 0,05$] A dose de 0,5 não foi capaz de aumentar, significativamente, a imobilidade dos animais.

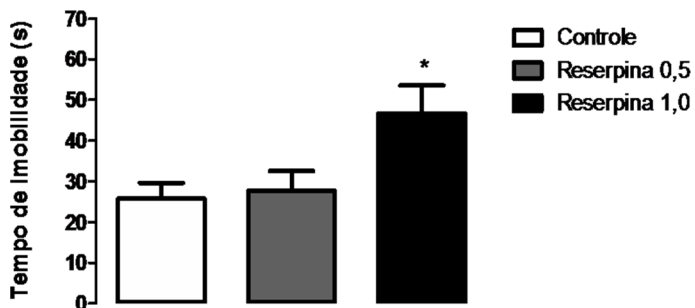


Figura 13. Efeitos da administração de Reserpina (0,5 ou 1,0 mg/Kg) no teste do nado forçado. Os valores são expressos como média + E.P.M, onde * $p < 0,05$, utilizando ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Newman Keuls. (N= 10/grupo).

4.1.2 Efeito da reserpina na capacidade olfatória dos animais tratados com reserpina

4.1.2.1 Discriminação olfatória

Para avaliar um possível efeito deletério na capacidade de discriminação olfatória dos ratos tratados com reserpina, como controle de outros testes dependentes dessa capacidade, o teste de discriminação olfatória foi realizado 24 horas após a administração de reserpina. Os resultados representados na figura 14 demonstram a preferência do grupo controle pelo compartimento familiar, o grupo de ratos tratados com a dose de 0,5 mg/Kg de reserpina apresentou o mesmo padrão, não ocorrendo prejuízo na discriminação olfativa. Enquanto que os animais tratados com reserpina 1,0 mg/Kg tiveram uma diminuição do tempo de permanência no compartimento familiar, não apresentando diferença estatística entre os dois compartimentos. Dados analisados através de ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Newman-Keuls $F [(5,45)= 4,14; p < 0,01]$.

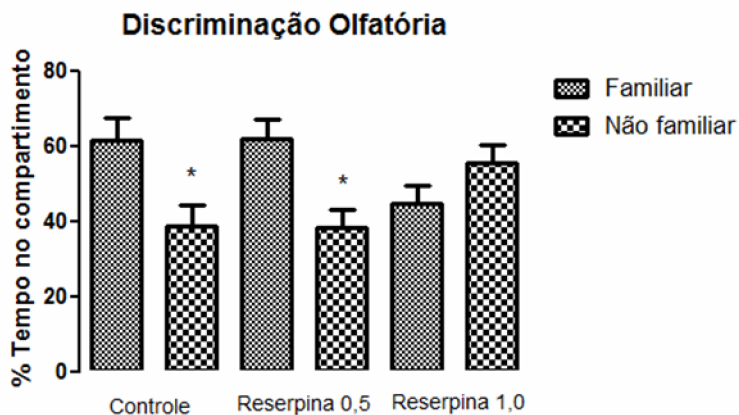


Figura 14. Efeitos da administração de reserpina (0,5 ou 1,0 mg/Kg) no teste da discriminação olfatória. Valores representados em média + E.P.M, onde $*p < 0,05$, utilizando ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Newman-Keuls, comparando com seu respectivo controle (N=8-9/grupo).

4.1.3 Efeito da reserpina na performance cognitiva dos animais

4.1.3.1 Teste da Esquiva inibitória (Step Down)

A figura 15 demonstra que os animais submetidos ao teste da esquiva inibitória não apresentaram prejuízos no teste da esquiva inibitória. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos no tempo de latência para descer da plataforma entre os grupos, tanto para memória de curto prazo, quanto para memória de longo prazo (1,5 e 24 horas após o treino, respectivamente). Ambos os grupos aprenderam a tarefa, apresentando um aumento significativo na latência de descida durante os testes em relação ao dia do treino, quando comparado ao seu respectivo teste.

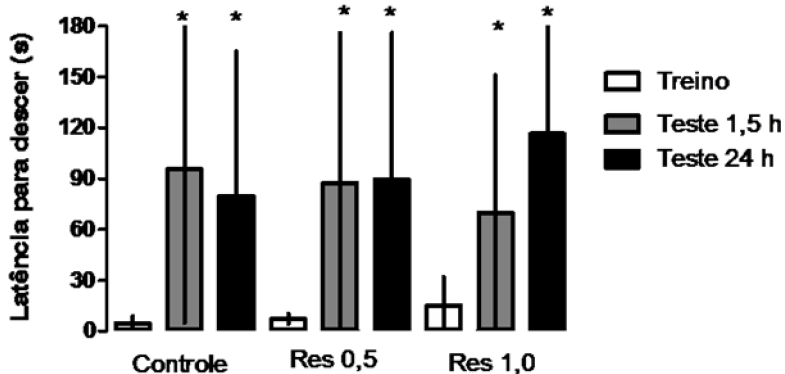


Figura 15. Efeitos da administração de reserpina (0,5 ou 1,0 mg/Kg) no teste da esquiiva inibitória. Valores representados em mediana e intervalo interquartil. Análises feitas através do teste de Kruskal–Wallis seguidas pelo pós-teste de Friedman, as comparações entre treino e teste foram analisadas pelo teste de Wilcoxon. * $P < 0,05$ comparado as sessões de treino e teste no mesmo grupo (N=12/grupo).

4.1.3.2 Teste de condicionamento olfatório de medo

O teste do COM de medo avalia a influência do tratamento com reserpina 0,5 e 1,0 mg/kg ou controle na aquisição do aprendizado associativo. O EC-I (estímulo condicionado I) corresponde ao condicionamento de primeira ordem, avaliando se o animal condicionou o odor ao choque e passou a ter aversão ao odor. No dia seguinte, os animais foram expostos novamente a caixa, porém sem o odor, avaliando a aquisição do condicionamento de segunda ordem, onde os animais associam o odor ao novo contexto, passando a ter aversão a caixa, estímulo condicionado II (EC-II).

De acordo com a figura 16, em EC-I, os animais pareados, tratados com controle, tiveram um aumento no tempo escondido [$F(3, 32) = 3,187$; $p = 0,0369$] e na avaliação de risco [$F(3, 32) = 4,274$; $p = 0,0120$] quando comparados aos animais não pareados # $p < 0,05$,

enquanto que os animais pareados tratados com reserpina, em ambas as doses, não apresentaram diferença significativa quando comparados a este mesmo grupo de animais não pareados. Porém, na comparação com seu respectivo controle, os animais pareados que receberam controle, eles apresentaram diferença estatística * $p < 0,05$, utilizando ANOVA de duas vias (tratamento x pareamento) seguido de pós-teste de Newman Keuls. Na avaliação do tempo de aproximação, os animais não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados aos controles pareados e não-pareados. No número de cruzamentos, um controle locomotor do teste, todos os grupos foram semelhantes.

Em EC-II, representado na figura 15, todos os grupos analisados apresentaram o mesmo perfil de respostas aos parâmetros avaliados do dia anterior, avaliação de risco $F(3, 32) = 8,206$; $p = 0,0003$]. Apenas a porcentagem de no tempo escondido, os animais tratados com reserpina na dose de 0,5 mg/kg, não foi diferente estatisticamente do grupo pareado $F(3, 32) = 3,678$; $p = 0,022$], onde # $p < 0,05$ comparando ao grupo não pareado e * $p < 0,05$ quando comparado ao controle pareado. No número de cruzamentos, um controle locomotor do teste, todos os grupos foram semelhantes.

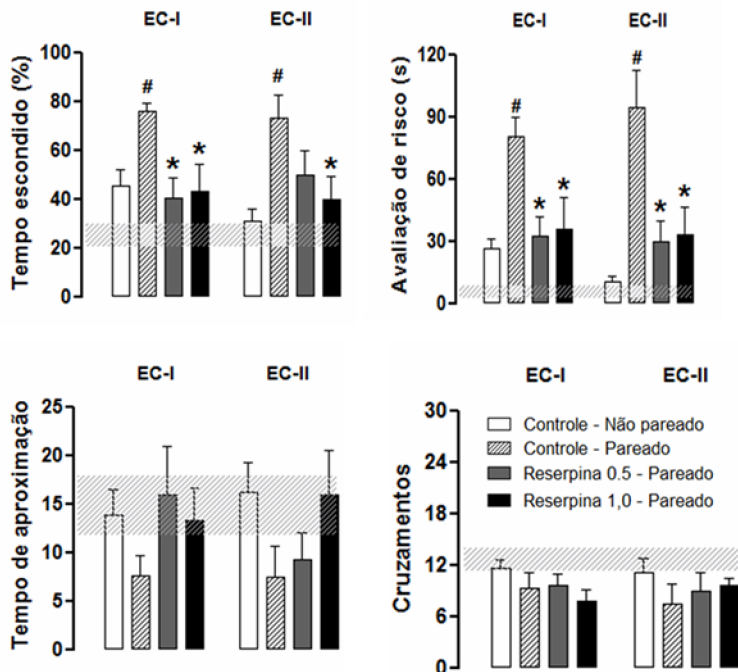


Figura 16. Efeitos da administração de reserpina (0,5 ou 1,0 mg/Kg) no condicionamento olfatório. Valores representados em média + E.P.M. Onde “*” representa diferença significativa, $p < 0,05$, quando comparado aos animais pareados e # $p < 0,05$, quando comparado aos animais não- pareados, utilizando ANOVA de 2 vias seguido de Pós-teste de Newman Keuls. A tarja hachurada representa a média de todos os animais durante a familiarização (N=8-10/grupo).

4.2 Ambiente enriquecido

Com a finalidade de avaliar o efeito protetor do AE, os experimentos foram selecionados de acordo com os resultados estatisticamente significantes em animais testados no AP.

4.2.1 Avaliação das alterações emocionais

4.2.1.1 Consumo de sacarose

Durante a fase inicial de adaptação, na qual os ratos foram habituados a beber das duas garrafas (ambas preenchidas com água). No dia 2, uma das garrafas foi substituída por sacarina (teste) e no dia 3 a posição das garrafas foram invertidas (teste). Os ratos do grupo reserpina 1,0 mg/kg consumiram, significativamente, menos sacarose que o grupo controle $*p < 0,05$, $T_{14} = (2,752, p = 0,02)$, utilizando o teste t de Student. Além disso, não foram observadas diferenças no consumo total de água durante esse período.

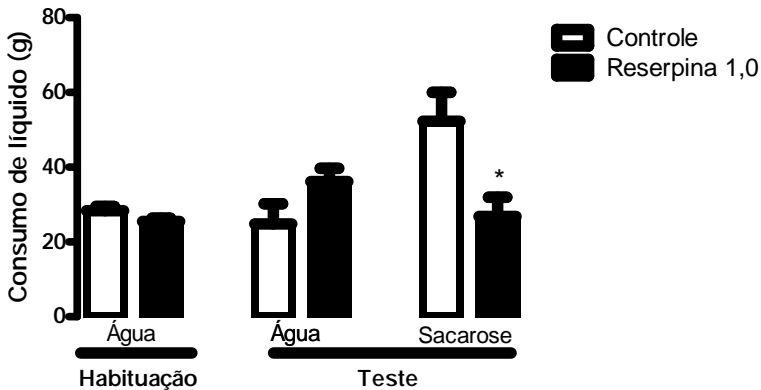


Figura 17. Efeitos da administração de reserpina (1,0 mg/Kg) no teste do consumo de sacarose em animais expostos ao ambiente enriquecido. Os valores são expressos como média + E.P.M, onde $*P < 0,05$ (em comparação com o grupo controle pelo teste t de Student (N=8/grupo).

4.2.1.2 Teste do Nado forçado

O teste do nado forçado foi utilizado para monitorar o comportamento tipo-depressivo dos animais. A partir da figura 19, observa-se que os animais do ambiente enriquecido, tratados com reserpina na dose de 1,0 mg/Kg ou controle, não apresentaram diferenças estatísticas no tempo de imobilidade quando comparados ao controle, utilizando teste t de Student.

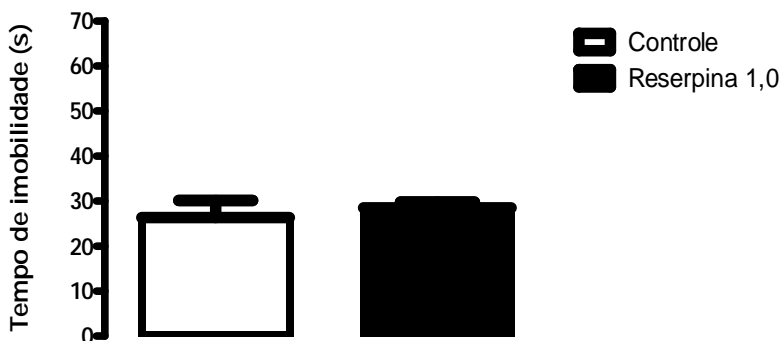


Figura 18. Efeitos da administração de Reserpina (1,0 mg/Kg) no teste do nado forçado em animais submetidos ao enriquecimento ambiental. Os valores são expressos como média +/- epm (N=6/grupo), utilizando teste t de Student.

4.2.2 Testes que avaliam a capacidade olfatória

4.2.2.1 Discriminação olfatória

Os animais criados no ambiente enriquecido, tratados com reserpina 1,0 mg/Kg ou controle, foram submetidos ao teste da discriminação olfatória, representado na figura 20. O grupo controle não apresentou preferência por nenhum dos compartimentos, sendo que o tempo de permanência nos compartimentos familiar e não-familiar não apresentou diferenças estatísticas, utilizando ANOVA de uma via. Os

animais tratados com reserpina na dose de 1,0 mg/Kg apresentaram resposta semelhante ao grupo controle $F[(3,18)= 0,98; p=0,4]$.

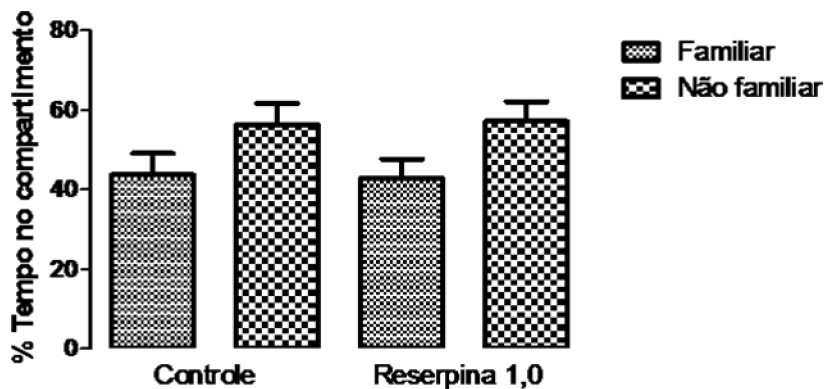


Figura 19. Efeitos da administração de reserpina (1,0 mg/Kg) no teste da discriminação olfatória nos animais criados em ambiente enriquecido. Valores representados em média + E.P.M, utilizando ANOVA de uma via (N=6/grupo).

4.2.3 Teste que avaliam o desempenho cognitivo dos animais

4.2.3.1 Teste do Condicionamento olfatório de medo

Os animais criados no ambiente enriquecido foram submetido ao condicionamento de medo olfatório, nas doses de 1,0 e 0,5 mg/Kg de reserpina. A figura 21 demonstra que em EC-I, os animais tratados com reserpina, submetidos ao pareamento, tiveram uma resposta semelhante ao seu controle pareado, nos parâmetros tempo de avaliação de risco, e no tempo escondido, utilizando ANOVA de uma via. A avaliação do número de cruzamentos, controle locomotor do teste, também não apresentou diferenças entre os grupos .

Em EC-II, os grupos analisados apresentaram o mesmo perfil de respostas aos parâmetros avaliados do dia anterior, onde todos os grupos avaliados não apresentaram diferenças, na avaliação de risco, no tempo

escondido, no tempo de aproximação e no número de cruzamentos no utilizando ANOVA de uma via.

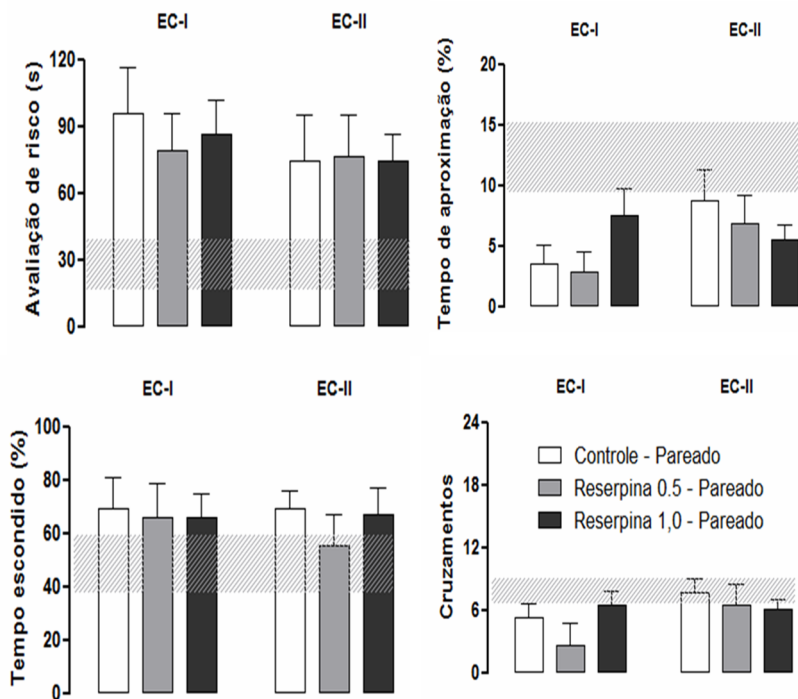


Figura 20. Efeitos da administração de reserpina (0,5 e 1,0 mg/Kg) no condicionamento olfatório em animais submetidos ao enriquecimento ambiental. Valores representados em média + E.P.M, utilizando ANOVA de uma via N=8/grupo.

4.3 Resumo dos resultados

Testes	Ambiente Padrão		Ambiente Enriquecido	
	Reserpina		Reserpina	
	0,5	1,0	0,5	1,0
<u>Campo aberto</u>	X	X	--	--
<u>Labirinto em cruz elevado</u>	X	X	--	--
<u>Nado forçado</u>	X	X	--	X
<u>Consumo de sacarose</u>	X	↓	--	↓
<u>Discriminação olfatória</u>	X	↓	--	X
<u>Esquiva inibitória</u>	X	X	--	--
<u>Condicionamento olfatório de medo</u>	↓	↓	X	X

X: Não foi diferente do controle

↓: Apresentou prejuízo comparando com controle

--: Dose não avaliada

Tabela 1: Resumo dos resultados do tratamento com reserpina nos ratos criados em ambiente padrão e ratos submetidos ao enriquecimento ambiental.

5. DISCUSSÃO

Conforme descrito na introdução, a doença de Parkinson se manifesta, inicialmente, por prejuízos olfativos (Doty *et al.*, 1988; Doty, 2007), emocionais (Fukunishi et al, 1991; Starkstein et al, 1993) e cognitivos (Emre, 2003), antes mesmo das alterações motoras serem percebidas (Faglioni *et al.*, 1997; Chaudhuri e Schapira, 2009). Assim, o estudo de modelos que reproduzam as alterações pré-motoras da DP contribui para o entendimento dos processos neuropatológicos, bem como auxilia o desenvolvimento de terapias neuroprotetoras nos estágios iniciais da doença (Chen, 2010a).

O presente estudo procurou investigar um modelo de sintomas pré-motores da doença de Parkinson. Os resultados da avaliação locomotora, por meio do teste do campo aberto, demonstraram que os ratos tratados com reserpina não apresentaram hipolocomoção em nenhuma dose avaliada (0,5 e 1,0 mg/Kg). Esses achados corroboram dados anteriores nos quais a dose de 1,0 mg/kg de reserpina não alterou a locomoção dos animais no teste do campo aberto (Prediger *et al.*, 2005b). Desta forma, as duas doses foram selecionadas para avaliação dos efeitos emocionais, olfatórios e cognitivos.

Os resultados mais relevantes observados foram a indução de efeitos tipo-depressivos no consumo de sacarose e no teste da natação forçada e prejuízo no condicionamento olfatório de medo (COM), mesmo na ausência de prejuízos na discriminação olfatória. Em etapa subsequente foi verificado que em ratos expostos ao ambiente enriquecido (AE), os efeitos comportamentais iniciais observados em ratos mantidos em ambiente padrão foram revertidos. Digno de destaque o efeito protetor do AE no COM que integra num único teste diferentes aspectos da emocionalidade.

Na avaliação dos possíveis efeitos tipo-depressivos, induzidos pela reserpina, observou-se um efeito anedônico através da redução do consumo de sacarose induzido pela administração de reserpina na dose de 1,0 mg/Kg. A avaliação do consumo de água pelos animais é um importante controle motor neste modelo, sendo que a redução desse comportamento pode inferir uma dificuldade locomotora. Como descrito nos resultados, não houve diferença significativa entre os grupos

avaliados no consumo de água, corroborando nossos resultados de locomoção no campo aberto e no LCE. Outro modelo comportamental que avalia o potencial de drogas antidepressivas foi utilizado, o nado forçado. A reserpina promoveu um aumento significativo no tempo de imobilidade na dose de 1,0 mg/Kg, semelhante ao perfil observado no teste do consumo de sacarose, reforçando um efeito pró-depressivo induzido pela reserpina..

Esses achados confirmam estudos prévios, onde a administração de reserpina, em baixas doses, reduziu o consumo de sacarose em camundongos (Skalisz *et al.*, 2002). Os efeitos depressivos da reserpina já são relatados há mais de 50 anos, tanto em humanos quanto em roedores (Porsolt *et al.*, 1979; Healy e Savage, 1998; Devadoss *et al.*, 2010).

Esses resultados demonstram que a reserpina mimetiza sintomas observados nos diferentes estágios da DP. Semelhante a outros modelos pré-motores da DP (Branchi *et al.*, 2008; Tadaiesky *et al.*, 2008; Branchi *et al.*, 2010), onde a lesão de neurônios dopaminérgicos promovida pela 6-OHDA induziu prejuízos semelhantes aos resultados encontrados em nossos resultados.

Clinicamente, na DP a depressão e a ansiedade costumam ser relatadas pelos pacientes como um único sintoma ou como disforia (Nissenbaum *et al.*, 1987). Já à nível central, a diminuição pós-sináptica dos receptores dopaminérgicos do tipo 2 no núcleo accumbens também é observada (Cantello *et al.*, 1989), acompanhada de alterações em outros substratos neuronais, tais como, os receptores noradrenérgicos no LC (Chan-Palay e Asan, 1989) e os receptores serotoninérgicos nos núcleos da rafe (Mayeux *et al.*, 1984). A anedonia também é uma característica importante da depressão clínica, e uma vez que as projeções dopaminérgicas mesolímbica e mesocortical possam estar degeneradas na DP, sugere-se que os danos nessas vias relacionadas à recompensa poderiam contribuir diretamente para a alta incidência de depressão relatada na doença (Fibiger, 1984).

Na avaliação da capacidade olfatória dos ratos, a administração aguda de reserpina (1 mg/kg) induziu um prejuízo significativo na discriminação olfativa dos animais. Eles passaram a explorar os dois compartimentos (familiar e não-familiar) de maneira semelhante, confirmando estudo anterior em nosso laboratório (Prediger *et al.*, 2005b).

Estudos utilizando modelos de estágios iniciais da DP já avaliaram esse parâmetro. A lesão parcial de neurônios dopaminérgicos, induzida pela administração intranasal de MPTP, promoveu prejuízo na capacidade olfatória de ratos (Prediger *et al.*, 2006). Em uma abordagem genética, camundongos com redução na expressão dos transportadores de monoaminas tiveram prejuízos na discriminação olfatória (Taylor *et al.*, 2009). Outro modelo animal, utilizando a toxina 6-OHDA em ratos, a lesão parcial dos neurônios dopaminérgicos estriatais não induziu prejuízos na discriminação olfatória (Fernandez-Ruiz *et al.*, 1993; Tadaiesky *et al.*, 2008). Tais diferenças podem ocorrer pelos distintos níveis de lesão ou depleção dopaminérgica promovidos por cada modelo e pelas diferentes espécies utilizadas.

Clinicamente, déficits na função olfatória na DP, em humanos, foram descritos na identificação, detecção, reconhecimento e discriminação de odores (Ansari e Johnson, 1975; Doty *et al.*, 1988; Meshulam *et al.*, 1998; Tissingh *et al.*, 2001; Doty, 2007).

Cabe destacar agora a avaliação do efeito da reserpina no condicionamento olfatório de medo (COM), que examinou se os prejuízos emocionais, olfatórios e cognitivos seriam diferenciados quando testados num único modelo, uma vez que, clinicamente, esses transtornos se apresentam interligadas na DP (Marsh *et al.*, 2004; Chaudhuri e Schapira, 2009). Adicionalmente sabe-se que algumas estruturas comprometidas no início da DP (Braak *et al.*, 1994; Braak *et al.*, 2006b; Braak e Del Tredici, 2010), correspondem às áreas importantes para aquisição do COM, tais como, amígdala basolateral (ABL) e outros núcleos, áreas corticais, o córtex perirrinal anterior (Herzog e Otto, 1997; Cousins e Otto, 1998) e o hipotálamo medial (Canteras *et al.*, 2008; Pavesi *et al.*, 2011).

Neste teste, os animais pareados foram expostos ao odor (estímulo neutro) e ao estímulo aversivo (estímulo incondicionado) paralelamente, estabelecendo um condicionamento, onde o odor passa a ser um estímulo condicionado (EC-I). Quando esse pareamento ocorre, há um aumento nos parâmetros de ansiedade, o tempo escondido, tempo de aproximação e da avaliação de risco, quando comparados aos animais não pareados expostos aos EC-I. Neste modelo, trabalhos anteriores demonstraram que a exposição do odor (EC-I) em um novo contexto estabelece um segundo pareamento, onde o novo contexto se torna o estímulo condicionado II (EC-II). Tal processo associativo é

denominado condicionamento de segunda ordem, sendo avaliado de maneira semelhante ao EC-I. Quando o EC-I não acontece, o condicionamento de segunda ordem também não ocorre, uma vez que são dependentes (Paschall e Davis, 2002).

O pré-tratamento com reserpina, nas doses de 0,5 e 1,0 mg/Kg 24 horas antes da sessão de condicionamento, prejudicou a aquisição do condicionamento, avaliado em EC-I, onde os parâmetros de ansiedade foram diferentes do controle. Com a ausência do primeiro condicionamento, o condicionamento de segunda ordem também não ocorreu (EC-II). Em um dos parâmetros em EC-II, o tempo escondido, a dose de 0,5 mg/kg não foi diferente estatisticamente do grupo controle pareado. Da mesma maneira, o tempo de aproximação não apresentou o mesmo padrão dos demais comportamentos, porém, essa avaliação não se baseia apenas em um parâmetro, sendo necessário analisá-los de uma forma conjunta.

Os animais não-pareados constituem um controle negativo do experimento e não devem apresentar respostas aversivas quando expostos ao odor em EC-I e, conseqüentemente, ao contexto em EC-II. Esse grupo avalia se o contexto ou o odor podem gerar respostas aversivas por si só. Cabe ressaltar que neste teste os animais não-pareados apresentaram performance motora semelhante aos demais grupos. Como na maioria dos testes utilizados, o prejuízo motor dos animais poderia alterar a resposta comportamental, utilizamos o número de cruzamentos como um controle locomotor.

Diferente dos testes anteriores, esse teste foi o mais sensível, onde a dose de 0,5 mg/kg alterou o desempenho dos animais. O prejuízo no COM observado na maior dose (1,0 mg/Kg) pode ser justificado pela perda da capacidade discriminativa observada no teste de discriminação olfatória, portanto, a discussão será baseada na menor dose.

A reserpina não foi previamente testada no COM, porém, um estudo utilizando o condicionamento contextual de medo, em ratos, com baixas doses de reserpina (inclusive 0,5 mg/kg) demonstrou que os animais tratados apresentavam redução no tempo de congelamento (Fernandes *et al.*, 2008), enquanto outras memórias sem componentes emocionais, avaliadas no reconhecimento de objeto, por exemplo, não se encontravam prejudicadas nessas doses (Fernandes *et al.*, 2008).

Outros modelos animais de sintomas não-motores da DP ainda não foram testados na avaliação do aprendizado com pistas aversivas, porém, um trabalho demonstrou que a lesão dopaminérgica com 6-OHDA na amígdala, bilateralmente, prejudicou a resposta aversiva a odores, sem prejudicar a discriminação olfatória, assim como em nossos resultados. Ainda nesse estudo, observou-se que o aumento dos níveis de catecolaminas reverteu esse prejuízo (Fernandez-Ruiz *et al.*, 1993).

Conforme citado anteriormente, acredita-se que a amígdala seja responsável pelo processamento de odores com intensidade emocional (Aggleton, 1993; Adolphs *et al.*, 1994; Ledoux, 2000), sendo que a inibição dessa região resultou no prejuízo do COM (Baba *et al.*, 2011), enquanto o córtex entorrinal pré-processa a informação para o hipocampo, que está intimamente relacionado com memória e aprendizado.

Farmacologicamente, a redução de monoaminas, em diferentes estruturas, pode alterar as respostas condicionadas de medo. A transmissão noradrenérgica já foi previamente testada nesse paradigma, Kroon e Carobrez (2009) demonstraram que a administração do beta-bloqueador propranolol, atenuou respostas defensivas dos animais. A dopamina também exerce um importante papel nesse tipo de condicionamento (Royer *et al.*, 1999), além da sua participação no processamento e aprendizado olfatório (Brennan e Keverne, 1997). O bloqueio do receptor dopaminérgico 1, prejudica a evocação da resposta de medo condicionada (Nader e Ledoux, 1999). Além disso, o aumento dos níveis de serotonina na amígdala basolateral promove uma redução da resposta de freezing.

Nos demais testes comportamentais, utilizando ratos mantidos em ambiente padrão, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes. Conforme já antecipado, no teste do campo aberto não houve diferença significativa na locomoção central entre os grupos.

Pelo fato dessa medida, avaliada no campo aberto, poder ser influenciada por outros fatores, além da ansiedade, como atividade locomotora, exploração e a novidade, podendo gerar imobilidade ou aumento da locomoção na periferia do aparato, esta análise tem sido criticada (File, 2001). Outros estudos relatam diferenças no comportamento emocional, com respostas distintas entre o teste do campo aberto e do labirinto em cruz elevado, como foi observado no

trabalho de Ramos e Mormede (1998). O efeito da administração de baixas doses de reserpina também foi avaliado no LCE. Sua premissa inicial associa a aversão dos braços abertos à altura e a tendência dos roedores a se esquivarem de áreas abertas, desconhecidas e potencialmente perigosas, como os principais fatores geradores de conflito (Treit *et al.*, 1993; Carobrez e Bertoglio, 2005).

Foi possível observar que os ratos tratados com reserpina em ambas as doses, não demonstraram alteração no número de entradas ou permanência nos braços abertos, demonstrando que a droga não exerceu efeito ansiolítico ou ansiogênico nos ratos. Da mesma maneira, ela não alterou o número de entradas nos braços fechados, sugerindo que não houve efeito hiperlocomotor ou sedativo. Esses achados são concordantes aos resultados obtidos no teste do campo aberto.

Outros estudos utilizando a reserpina já avaliaram parâmetros similares. Labuda e Fuchs, (2002), utilizando ratos, demonstraram que a dose de 1,0 mg/kg no modelo do LCE não apresentou alterações no tempo de permanência nos braços abertos, nem no número de entradas nos braços fechados, assim, como demonstrado nos resultados do presente estudo. Em camundongos, outro estudo, utilizando doses menores (0,1, 0,25 e 0,5 mg/Kg), também não encontrou alterações no tempo de permanência nos braços abertos (Tolardo *et al.*, 2010)

Nossos resultados demonstraram ainda que os ratos tratados com reserpina não apresentaram alterações no aprendizado medido na esQUIVA passiva, em ambas as doses. Este resultado confirma trabalhos prévios da literatura demonstrando que camundongos submetidos a este teste não apresentaram amnésia quando a reserpina (4 mg/Kg) foi administrada 24 horas antes do treino (Walsh e Palfai, 1978). De maneira oposta, um trabalho utilizando a dose de 1,0 mg/Kg de reserpina em camundongos, administrada imediatamente após o treino, prejudicou a performance dos animais durante o teste (Alves *et al.*, 2000). A diferença de protocolos e espécies poderia justificar as respostas obtidas. A reserpina age em diversas regiões cerebrais em roedores, apresentando níveis distintos de depleção de monoaminas em cada região (Yoshitake *et al.*, 2004). Embora seu período de ação seja extenso, aproximadamente 120-180 horas (Boulton *et al.*, 1977), ela parece apresentar diferentes padrões temporais, dependendo da dose utilizada ou espécie animal avaliada (Penev *et al.*, 1994).

O conjunto desses resultados sugere uma disfunção entre o processamento do estímulo aversivo e a geração de uma resposta apropriada. Além do prejuízo emocional e olfatório, a função cognitiva também está afetada. Na DP. Esses prejuízos vêm sendo associados primariamente com uma disfunção cortical e da atividade amigdalár (Kawamura e Kobayakawa, 2009).

Como parte de extrema relevância deste trabalho, encontra-se a avaliação dos efeitos protetores da exposição ao AE frente aos possíveis danos induzidos pela reserpina e discutidos anteriormente. Sabe-se que o estilo de vida é considerado um importante fator no desenvolvimento dos processos neurodegenerativos (Dobrossy e Dunnett, 2004). Dessa maneira, o AE poderia ser eficaz na redução do processo patológico da DP, tanto como estratégia preventiva (Anastasia *et al.*, 2009), como durante a progressão dessa patologia (Jadavji *et al.*, 2006), melhorando a capacidade adaptativa funcional causada por danos, traumas ou envelhecimento (Mora *et al.*, 2007).

Outros modelos da DP, abordando apenas os prejuízos motores, já foram anteriormente testados no AE (Nithianantharajah e Hannan, 2006; 2010). Essa modificação ambiental apresentou efeitos benéficos, tais como: a diminuição da perda dopaminérgica estriatal e de seus transportadores, aumento da expressão do fator neurotrófico derivado de célula glial, além de aumentar a resistência ao MPTP e reduzir seus prejuízos motores (Bezard *et al.*, 2003). Em outro modelo animal de DP, o AE protegeu o sistema nigroestriatal da lesão induzida por 6-OHDA (Anastasia *et al.*, 2009).

Assim, a necessidade do estudo da interação entre o enriquecimento ambiental e modelos animais pré-motores da DP se dá pela escassez de trabalhos na literatura abordando esses temas em conjunto. Da mesma maneira, a baixa efetividade nos tratamentos neuroprotetores, parece ocorrer pelo fato de que as lesões neuronais já se encontram estabelecidas e em grau avançado quando o diagnóstico é feito a partir dos sintomas motores (Chen, 2010b).

Apenas um recente estudo aborda esse tema, onde lesões parciais foram induzidas pelo MPTP nos neurônios dopaminérgicos da SNPc. Porém, os sintomas comportamentais pré-motores não foram avaliados, e os animais lesionados apresentaram leves prejuízos motores. Além disso, os animais foram submetidos ao AE pós-lesão,

não avaliando a capacidade neuroprotetora dessa estratégia ambiental. A regeneração de neurônios dopaminérgicos apenas foi observada em animais adultos jovens, demonstrando a importância da intervenção ambiental no início da degeneração (Goldberg *et al.*, 2011).

Na avaliação da influência ambiental nos parâmetros emocionais, utilizamos a dose de 1,0 mg/Kg, onde observou-se comportamento depressivo nos animais do AP. Assim, no teste do consumo de sacarose, o tratamento com reserpina, 1,0 mg/Kg, promoveu uma diminuição no consumo em animais mantidos em AE. Esse efeito pode ser atribuído a uma perda do prazer ou motivação na presença de um estímulo recompensador (anedonia), avaliado como um comportamento do tipo depressivo. Contudo, verificou-se que a mesma dose de reserpina utilizada no teste do nado forçado, não induziu o aumento do tempo de imobilidade.

Embora os dados pareçam controversos, em um estudo previamente realizado em nosso laboratório, de Carvalho *et al.* (2010) apresentou o mesmo padrão de resultados no teste de consumo de sacarina, onde os animais criados em AE apresentaram uma diminuição no consumo desse adoçante. Neste trabalho, além da redução do consumo de sacarina, o AE reduziu o consumo de etanol, sugerindo uma diminuição do interesse por estímulos reforçadores naturais ou drogas de abuso (De Carvalho *et al.*, 2010).

Além disso, outro trabalho utilizando o consumo de sacarose, o teste do nado forçado e os níveis de dopamina no estriado, em ratos Sprague-Dawley criados em AE, demonstrou dados semelhantes (Brenes e Fornaguera, 2008; Brenes *et al.*, 2008). Foi observada uma correlação negativa entre o teste do consumo de sacarina e o tempo de imobilidade no nado forçado nos animais criados em AE, enquanto que nos animais do AP a correlação foi positiva. Esse perfil de resposta dos animais expostos ao AE, não foi acompanhado de alteração nos níveis de dopamina estriatal quando comparado ao AP, o que sugere uma maior capacidade adaptativa funcional do AE (Brenes e Fornaguera, 2008; Brenes *et al.*, 2008).

Em paralelo, estudos demonstram que animais submetidos ao enriquecimento ambiental apresentam uma diminuição de receptores D1 na região pré-frontal do córtex, acompanhada de uma diminuição do transportador desse neurotransmissor (Del Arco *et al.*, 2007a).

As alterações dopaminérgicas são controversas no que diz respeito ao enriquecimento ambiental. Embora alguns estudos demonstrem uma redução dopaminérgica (Del Arco *et al.*, 2007b), outros sugerem que AE é capaz de proteger a lesão de neurônios dopaminérgicos induzida pela toxina MPTP (Faherty *et al.*, 2005). Da mesma forma, outro estudo demonstrou que os animais submetidos ao AE são 200% mais resistentes às lesões causadas por essa toxina (Bezard *et al.*, 2003).

A serotonina é um importante neurotransmissor relacionado à depressão, e o possível aumento deste, promovido pelo AE (Fernandez-Teruel *et al.*, 2002), pode ser um mecanismo fundamental para as alterações comportamentais obtidas. Esses animais seriam menos sensíveis à depleção de catecolaminas promovidas pela reserpina (Ueda *et al.*, 2005). Uma explicação plausível para essa alteração seria a interação social, uma vez que animais isolados possuem uma diminuição nesse neurotransmissor quando comparados com o ambiente padrão (Brenes *et al.*, 2008).

Embora, por problemas técnicos, os experimentos com a dosagem de monoaminas não tenham sido incluídos no presente trabalho, estudos anteriores já dosaram os níveis de monoaminas em algumas áreas cerebrais de ratos após a administração intraperitoneal de reserpina (Boulton *et al.*, 1977; Penev *et al.*, 1994; Kannari *et al.*, 2000). No núcleo caudado, a reserpina na dose de 0,4 mg/Kg depleta quase 50% dos níveis dopaminérgicos, 24 horas após a administração, enquanto a administração de 1,0 mg/Kg reduz cerca de 90% dos níveis de DA nessa estrutura. As quantidades de NA foram mensuradas no tálamo, onde a menor dose apresentou uma redução superior a 50%, enquanto a maior dose depletou 70% dessa amina. Da mesma maneira, os níveis de serotonina foram avaliados no tronco cerebral, onde a menor dose reduziu por volta de 30% a concentração desse neurotransmissor enquanto a maior dose reduziu 70%. Em todas as dosagens, esses perfis foram analisados novamente 96 horas após a administração da droga, onde foi obtido o mesmo padrão de concentrações (Boulton *et al.*, 1977).

Outros trabalhos também se propuseram a estudar os modelos animais pré-motores da DP e avaliar os níveis de monoaminas. A administração intranasal de MPTP promoveu uma redução de 25% e 50% dos níveis de DA na substância negra e bulbo olfatório,

respectivamente (Prediger *et al.*, 2006). Em um modelo genético, utilizando camundongos nocaute para o transportador de monoaminas, houve uma redução de aproximadamente 80-90% dos níveis de monoaminas no estriado, córtex pré-frontal e hipocampo (Taylor *et al.*, 2009). Em outro modelo previamente utilizado em nosso laboratório, a 6-OHDA, administrada no estriado de ratos, promoveu uma redução de 60% da DA estriatal, além de reduzir 30% de 5-HT no estriado e de NA no córtex pré-frontal (Tadaiesky *et al.*, 2008).

Os níveis dessas monoaminas têm grande relação com o aparecimento das alterações emocionais, olfatórias e cognitivas na DP. Clinicamente, a via nigroestriatal é a mais atingida pela neurodegeneração na DP (Nieoullon e Amalric, 2002), porém outras vias também parecem estar afetadas. Em estágios avançados, os níveis estriatais de dopamina são reduzidos em 70-80% (Riederer e Wuketich, 1976; Lindner *et al.*, 1999), porém também ocorre perda de aproximadamente 30-50% de neurônios não-dopaminérgicos (Braak *et al.*, 2003).

No teste da discriminação olfatória, os animais submetidos ao AE apresentaram um padrão de respostas distintas às observadas em animais do AP. Eles não apresentaram preferência por nenhum compartimento (familiar ou não-familiar), tanto em animais controle, quanto em animais tratados com reserpina na dose de 1,0 mg/Kg.

Esses resultados não parecem estar relacionados à dificuldade na identificação de odores, já que um estudo demonstrou que essa modificação ambiental não altera a neurogênese nem a proliferação celular de células tronco no bulbo olfatório (Brown et al, 2003). Porém, foi observado melhora na discriminação de odores que exijam um aprendizado, tais como os odores com cargas emocionais (Roy *et al.*, 2001). Além disto, outros autores demonstraram que o enriquecimento ambiental não prejudica a discriminação social (Peña *et al.*, 2006).

Um achado que poderia justificar os resultados obtidos é o fato de que o enriquecimento ambiental reduz a atividade locomotora e o impacto à novidade, promovendo uma habituação mais rápida a novos ambientes (Van Waas e Soffie, 1996), o que aumentaria o tempo de exploração no compartimento não-familiar. De acordo com esses resultados, De Carvalho e colaboradores (2010) demonstraram que ratas da linhagem espontaneamente hipertensa (SHR), submetidas ao

enriquecimento ambiental, apresentaram redução na atividade locomotora e exploratória em relação às ratas criadas em AP.

Em relação aos efeitos do AE no condicionamento olfatório de medo (COM), deve ser ressaltado que o tratamento com reserpina nas doses de 0,5 e 1,0 mg/Kg não induziu diferenças quando comparados aos animais controle. Eles adquiriram o aprendizado associativo tanto de primeira ordem, quanto o de segunda ordem. No parâmetro locomotor, o número de cruzamentos, os animais tratados com reserpina não apresentaram diferenças quando comparados ao seu controle. Esses resultados sugerem um efeito protetor do AE, frente às alterações promovidas pelo tratamento com reserpina.

Como é a primeira vez que o efeito do AE é testado no COM, cabe aqui discutir as alterações observadas. Ao serem expostos à caixa de condicionamento, durante a familiarização, os animais permaneceram escondidos por mais tempo. A avaliação de risco, durante a familiarização, também foi diferente, sendo mais elevado nos animais submetidos ao AE. A atividade locomotora também foi reduzida, refletida no número de cruzamentos diminuídos.

Esses parâmetros parecem demonstrar um aumento das respostas aversivas dos animais submetidos ao AE ambiente enriquecido. Porém, a diminuição na atividade exploratória poderia resultar no aumento dos demais comportamentos. No AE a reatividade ao estresse é diminuída, principalmente por alterações no sistema colinérgico (Del Arco *et al.*, 2007b). Nesse ambiente o aumento da acetilcolina promovido pela dopamina durante essas situações é menor, quando comparados ao AP (Del Arco *et al.*, 2007a). Os níveis de adrenalina e de noradrenalina, dos animais criados em AE são significativamente mais baixos em resposta ao aumento de manipulação quando comparados ao AP (Moncek *et al.*, 2004). De acordo com esses achados, um trabalho relacionando o odor da urina de gatos com AE demonstrou uma diminuição no comportamento defensivo quando comparado ao AP (Klein *et al.*, 1994).

A melhora do aprendizado associativo observada nesse paradigma pode ser justificada pela neurogênese hipocampal (Brown *et al.*, 2003), promovida por essa estratégia ambiental. O AE já demonstrou melhora cognitiva (Nithianantharajah e Hannan, 2010), podendo restaurar memórias de longo prazo e perdas neuronais

resultantes de injúrias cerebrais. O AE pode reduzir a depleção de dopamina relacionada ao prejuízo da memória de trabalho observada em danos cerebrais e no envelhecimento (Okuda *et al.*, 2009). Esse efeito neuroprotetor poderia ser responsável pelos resultados obtidos no COM.

A diminuição na depleção serotoninérgica pode também contribuir para a melhora no condicionamento. O aumento dos níveis de serotonina na ABL (Fernandez-Teruel *et al.*, 2002), previamente observados, promove redução nas respostas aversivas, uma vez que esse neurotransmissor pode alterar os estágios iniciais do processamento do odor (Petzold *et al.*, 2009). A ABL é conhecida por processar esses estímulos e gerar uma resposta aversiva, sendo que a inibição dessa região resulta em prejuízo do COM (Desgranges *et al.*, 2008). O AE também pode estimular proliferação celular nessa estrutura (Okuda *et al.*, 2009).

Neste sentido, um recente estudo, relacionando ansiedade e estresse como um modelo de transtorno de estresse pós-traumático, avaliou o efeito da exposição ao AE nas respostas aversivas em roedores, demonstrando que esses animais se recuperaram mais rápido de um episódio traumático, acompanhado de redução da ansiedade e um aumento da proliferação celular hipocampal (Hendriksen *et al.*, 2010). Uma vez que, clinicamente, a incidência desse transtorno vem sendo relacionada com a atrofia hipocampal e, por conseqüência, prejuízos na memória de curta duração (Yaffe *et al.*, 2010). Os efeitos do AE, anteriormente citados, poderiam justificar a eficácia do AE nesse modelo (Yaffe *et al.*, 2010).

Avaliando os resultados comportamentais e as regiões neuroanatômicas relacionadas ao processamento do COM e afetadas na DP descritas na literatura, sugere-se que esse teste poderia ser uma importante ferramenta para avaliar a validade analógica de modelos pré-motores da DP.

De maneira geral, no presente estudo a reserpina induziu prejuízos em parâmetros comportamentais semelhantes aos demais modelos induzidos por neurotoxinas para o estudo dos estágios iniciais da DP. Nesta patologia, conforme descrito anteriormente, muitos dos sintomas iniciais são atribuídos às alterações de monoaminas. Dessa maneira, a utilização de reserpina, em baixas doses, pode representar um bom modelo animal para os estágios pré-motores da DP, sendo que sua

facilidade na administração sistêmica, seu reduzido custo e o baixo risco para o manipulador podem apresentar grandes vantagens na utilização desse modelo.

Finalmente, a modificação ambiental parece proteger os prejuízos emocionais, olfatórios e cognitivos, induzidos pela reserpina, observados nos ratos criados em ambiente padrão. Os animais submetidos ao AE parecem apresentar melhor capacidade de adaptação funcional frente a danos, bem como a agentes estressores. Essas observações podem estar associadas aos efeitos benéficos do AE apresentados nesse trabalho, bem como às alterações basais observadas nos parâmetros avaliados. Esse estudo demonstra a importância da intervenção ambiental durante os estágios iniciais da DP, abordando sintomas não-motores e o ambiente de criação como estratégia protetora.

6. CONCLUSÃO

Corroborando os dados da literatura, as alterações emocionais e olfatórias promovidas pela administração de reserpina podem ser detectadas mesmo na ausência dos sintomas motores. Dessa maneira, a administração aguda de reserpina, em baixas doses, pode constituir um modelo animal simples e útil para indução dos sintomas pré-motores da DP.

O tratamento com reserpina alterou a aquisição do aprendizado associativo, particularmente quando envolvia processamentos emocionais. Esses prejuízos foram observados mesmo na ausência de déficits na discriminação olfatória e em outras tarefas de aprendizado associativo, mimetizando os prejuízos nas respostas emocionais observados na DP. Assim, o condicionamento olfatório de medo pode ser utilizado como teste para avaliação e busca por novas terapias nessa patologia, uma vez que prejuízos nesse teste foram observados em baixas doses de reserpina, enquanto os demais modelos testados não apresentaram alteração.

Este trabalho é o primeiro a explorar o paradigma do enriquecimento ambiental com as alterações comportamentais iniciais da doença de Parkinson. Ele sugere que a exposição a estímulos cognitivos, sensoriais e motores, durante os estágios iniciais de vida, induz mudanças neuronais duradouras. Essas alterações foram capazes de promover um efeito protetor, sugerindo que o AE pode ser uma estratégia de intervenção nas doenças neurodegenerativas. Cabe ressaltar, devido às diferenças entre espécies e a vulnerabilidade do modelo experimental, a extrapolação do estudo para condições humanas deve ser cautelosa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADOLPHS, R.; TRANEL, D. *et al.* Impaired Recognition of Emotion in Facial Expressions Following Bilateral Damage to the Human Amygdala. *Nature*, v. 372, n. 6507, p. 669-672, Dec 15 1994.

AGGLETON, J. P. The Contribution of the Amygdala to Normal and Abnormal Emotional States. *Trends in Neurosciences*, v. 16, n. 8, p. 328-333, Aug 1993.

AGID, Y.; GRAYBIEL, A. M. *et al.* The efficacy of levodopa treatment declines in the course of Parkinson's disease: do nondopaminergic lesions play a role? *Advanced Neurology*, v. 53, p. 83-100, 1990.

AGUIAR, A. S., JR.; ARAUJO, A. L. *et al.* Physical exercise improves motor and short-term social memory deficits in reserpinized rats. *Brain Research Bulletin*, v. 79, n. 6, p. 452-7, Aug 14 2009.

AHLSKOG, J. E. Parkinson's disease: medical and surgical treatment. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, v. 19, n. 3, p. 579-605, vi, Aug 2001.

ALVES, C. S.; ANDREATINI, R. *et al.* Phosphatidylserine reverses reserpine-induced amnesia. *European Journal of Pharmacology*, v. 404, n. 1-2, p. 161-7, Sep 15 2000.

ANASTASIA, A.; TORRE, L. *et al.* Enriched environment protects the nigrostriatal dopaminergic system and induces astroglial reaction in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, v. 109, n. 3, p. 755-65, May 2009.

ANSARI, K. A.; JOHNSON, A. Olfactory function in patients with Parkinson's disease. *Journal of chronic diseases*, v. 28, n. 9, p. 493-7, Oct 1975.

ANTELMAN, S. M.; CAGGIULA, A. R. *et al.* Stressor-induced oscillation. A possible model of the bidirectional symptoms in PTSD. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 821, p. 296-304, Jun 21 1997.

APFELBACH, R.; BLANCHARD, C. D. *et al.* The effects of predator odors in mammalian prey species: A review of field and laboratory studies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 29, n. 8, p. 1123-1144, 2005.

ARENDASH, G. W.; GARCIA, M. F. *et al.* Environmental enrichment improves cognition in aged Alzheimer's transgenic mice despite stable beta-amyloid deposition. *Neuroreport*, v. 15, n. 11, p. 1751-4, Aug 6 2004.

ASSOGNA, F.; PONTIERI, F. E. *et al.* The recognition of facial emotion expressions in Parkinson's disease. *European Neuropsychopharmacology*, v. 18, n. 11, p. 835-48, Nov 2008.

BABA, T.; TAKEDA, A. *et al.* Association of olfactory dysfunction and brain. Metabolism in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, v., Jan 31 2011.

BELLISSIMO, M. I.; KOUZMINE, I. *et al.* Is the unilateral lesion of the left substantia nigra pars compacta sufficient to induce working memory impairment in rats? *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 82, n. 2, p. 150-8, Sep 2004.

BEZARD, E.; DOVERO, S. *et al.* Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience*, v. 21, n. 17, p. 6853-61, Sep 1 2001.

BOESVELDT, S.; KEIZER, R. J. O. D. *et al.* Odor recognition memory is not independently impaired in Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*, v. 116, n. 5, p. 575-578, May 2009.

BOLLUK, B.; OZEL-KIZIL, E. T. *et al.* Social anxiety in patients with Parkinson's disease. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, v. 22, n. 4, p. 390-4, Fall 2010.

BONDI, M. W.; KASZNIAK, A. W. Implicit and explicit memory in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*, v. 13, n. 2, p. 339-58, Mar 1991.

BOULTON, A. A.; JUORIO, A. V. *et al.* The effects of reserpine and 6-hydroxydopamine on the concentrations of some arylalkylamines in rat brain. *British Journal of Pharmacology*, v. 59, n. 1, p. 209-14, Jan 1977.

BOURIN, M. Is it possible to predict the activity of a new antidepressant in animals with simple psychopharmacological tests? *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v. 4, n. 1, p. 49-64, 1990.

BRAAK, H.; BOHL, J. R. *et al.* Stanley Fahn Lecture 2005: The staging procedure for the inclusion body pathology associated with sporadic Parkinson's disease reconsidered. *Movement Disorders*, v. 21, n. 12, p. 2042-51, Dec 2006a.

BRAAK, H.; BRAAK, E. Pathoanatomy of Parkinson's disease. *Journal of Neurology*, v. 247 Suppl 2, p. II3-10, Apr 2000.

BRAAK, H.; BRAAK, E. *et al.* Amygdala pathology in Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica*, v. 88, n. 6, p. 493-500, 1994.

BRAAK, H.; DEL TREDICI, K. [Pathophysiology of sporadic Parkinson's disease]. *FORTSCHRITTE DER NEUROLOGIE PSYCHIATRIE*, v. 78 Suppl 1, p. S2-4, Mar 2010.

BRAAK, H.; DEL TREDICI, K. *et al.* Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, v. 24, n. 2, p. 197-211, Mar-Apr 2003.

BRAAK, H.; RUB, U. *et al.* Cognitive decline correlates with neuropathological stage in Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 248, n. 1-2, p. 255-8, Oct 25 2006b.

BRANCHI, I.; D'ANDREA, I. *et al.* Striatal 6-OHDA lesion in mice: Investigating early neurochemical changes underlying Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research*, v. 208, n. 1, p. 137-143, 2010.

BRANCHI, I.; D'ANDREA, I. *et al.* Nonmotor symptoms in Parkinson's disease: investigating early-phase onset of behavioral dysfunction in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model. *Journal of Neuroscience Research*, v. 86, n. 9, p. 2050-61, Jul 2008.

BRENES, J. C.; FORNAGUERA, J. Effects of environmental enrichment and social isolation on sucrose consumption and preference: associations with depressive-like behavior and ventral striatum dopamine. *Neuroscience Letters*, v. 436, n. 2, p. 278-82, May 9 2008.

BRENES, J. C.; RODRIGUEZ, O. *et al.* 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. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, v. 89, n. 1, p. 85-93, Mar 2008.

BRENNAN, P. A.; KEVERNE, E. B. Neural mechanisms of mammalian olfactory learning. *Progress in Neurobiology*, v. 51, n. 4, p. 457-81, Mar 1997.

CALNE, D. B. The free radical hypothesis in idiopathic parkinsonism: evidence against it. *Annals of Neurology's*, v. 32, n. 6, p. 799-803, Dec 1992.

CANTELLO, R.; AGUGGIA, M. *et al.* Major depression in Parkinson's disease and the mood response to intravenous methylphenidate: possible role of the "hedonic" dopamine synapse. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, v. 52, n. 6, p. 724-31, Jun 1989.

CANTERAS, N. S.; KROON, J. A. *et al.* Sensing danger through the olfactory system: the role of the hypothalamic dorsal premammillary nucleus. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 32, n. 7, p. 1228-35, Sep 2008.

CARLSSON, A. Monoamine-depleting drugs. *Pharmacology & therapeutics B*, v. 1, n. 3, p. 393-400, 1975.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 29, n. 8, p. 1193-1205, 2005.

CARR, W. J.; YEE, L. *et al.* Olfactory recognition of conspecifics by domestic Norway rats. *Journal of Comparative & Physiological Psychology*, v. 90, n. 9, p. 821-8, Sep 1976.

CARVALHO, R. C.; PATTI, C. C. *et al.* Effects of reserpine on the plus-maze discriminative avoidance task: Dissociation between memory and motor impairments. *Brain Research*, v. 1122, p. 179-183, Nov 29 2006.

CHAN-PALAY, V.; ASAN, E. Quantitation of catecholamine neurons in the locus coeruleus in human brains of normal young and older adults and in depression. *Journal of Comparative Neurology*, v. 287, n. 3, p. 357-72, Sep 15 1989.

CHAUDHURI, K. R.; SCHAPIRA, A. H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *The Lancet Neurology*, v. 8, n. 5, p. 464-74, May 2009.

CHEN, H.; ZHANG, S. M. *et al.* Physical activity and the risk of Parkinson disease. *Neurology*, v. 64, n. 4, p. 664-9, Feb 22 2005.

CHEN, J. J. Parkinson's disease and other movement disorders. *American Journal of Geriatric Pharmacotherapy*, v. 8, n. 4, p. 293, Aug 2010a.

_____. Parkinson's disease: health-related quality of life, economic cost, and implications of early treatment. *American Journal of Managed Care*, v. 16 Suppl Implications, p. S87-93, Mar 2010b.

COUSENS, G.; OTTO, T. Both pre- and posttraining excitotoxic lesions of the basolateral amygdala abolish the expression of olfactory and contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, v. 112, n. 5, p. 1092-103, Oct 1998.

CRAFT, T. K.; DEVRIES, A. C. Role of IL-1 in poststroke depressive-like behavior in mice. *Biological Psychiatry*, v. 60, n. 8, p. 812-8, Oct 15 2006.

CRUCIAN, G. P.; OKUN, M. S. Visual-spatial ability in Parkinson's disease. *Frontiers in Bioscience*, v. 8, p. s992-7, Sep 1 2003.

DA CUNHA, C.; GEVAERD, M. S. *et al.* Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. *Behavioural Brain Research*, v. 124, n. 1, p. 9-18, Sep 28 2001.

DALRYMPLE-ALFORD, J. C.; LIVINGSTON, L. *et al.* Characterizing mild cognitive impairment in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, v., Feb 1 2011.

DANIEL, S. E.; HAWKES, C. H. Preliminary diagnosis of Parkinson's disease by olfactory bulb pathology. *Lancet*, v. 340, n. 8812, p. 186, Jul 18 1992.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, v. 39, n. 6, p. 889-909, Sep 11 2003.

DE CARVALHO, C. R.; PANDOLFO, P. *et al.* Environmental enrichment reduces the impact of novelty and motivational properties of ethanol in spontaneously hypertensive rats. *Behavioural Brain Research*, v. 208, n. 1, p. 231-236, 2010.

DEFAZIO, G.; BERARDELLI, A. *et al.* Pain as a nonmotor symptom of Parkinson disease: evidence from a case-control study. *Archives of Neurology*, v. 65, n. 9, p. 1191-4, Sep 2008.

DEL ARCO, A.; SEGOVIA, G. *et al.* Environmental enrichment reduces the function of D1 dopamine receptors in the prefrontal cortex of the rat. *Journal of Neural Transmission*, v. 114, n. 1, p. 43-8, Jan 2007a.

DEL ARCO, A.; SEGOVIA, G. *et al.* Stress, prefrontal cortex and environmental enrichment: studies on dopamine and acetylcholine release and working memory performance in rats. *Behavioural Brain Research*, v. 176, n. 2, p. 267-73, Jan 25 2007b.

DEN, H. J. W.; BETHLEM, J. The distribution of Lewy bodies in the central and autonomic nervous systems in idiopathic paralysis agitans. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, v. 23, p. 283-90, Nov 1960.

DESGRANGES, B.; LEVY, F. *et al.* Anisomycin infusion in amygdala impairs consolidation of odor aversion memory. *Brain Research*, v. 1236, p. 166-75, Oct 21 2008.

DEVADOSS, T.; PANDEY, D. K. *et al.* Effect of acute and chronic treatment with QCF-3 (4-benzylpiperazin-1-yl) (quinoxalin-2-yl) methanone, a novel 5-HT(3) receptor antagonist, in animal models of depression. *Pharmacological Reports*, v. 62, n. 2, p. 245-57, Mar-Apr 2010.

DIRNBERGER, G.; FRITH, C. D. *et al.* Executive dysfunction in Parkinson's disease is associated with altered pallidal-frontal processing. *Neuroimage*, v. 25, n. 2, p. 588-99, Apr 1 2005.

DOBROSSY, M. D.; DUNNETT, S. B. Environmental enrichment affects striatal graft morphology and functional recovery. *European Journal of Neuroscience*, v. 19, n. 1, p. 159-68, Jan 2004.

DOTY, R. L. Olfaction in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, v. 13 Suppl 3, p. S225-8, 2007.

DOTY, R. L.; DEEMS, D. A. *et al.* Olfactory dysfunction in parkinsonism: a general deficit unrelated to neurologic signs, disease stage, or disease duration. *Neurology*, v. 38, n. 8, p. 1237-44, Aug 1988.

DUBOIS, B.; PILLON, B. Cognitive deficits in Parkinson's disease. *Journal of Neurology*, v. 244, n. 1, p. 2-8, Jan 1997.

EMRE, M. Dementia associated with Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, v. 2, n. 4, p. 229-237, 2003.

FAGLIONI, P.; BOTTI, C. *et al.* Learning and forgetting processes in Parkinson's disease: a model-based approach to disentangling storage, retention and retrieval contributions. *Neuropsychologia*, v. 35, n. 6, p. 767-79, Jun 1997.

FAHERTY, C. J.; RAVIIE SHEPHERD, K. *et al.* Environmental enrichment in adulthood eliminates neuronal death in experimental

Parkinsonism. *Molecular Brain Research*, v. 134, n. 1, p. 170-179, 2005.

FALKENBURGER, B. H.; SCHULZ, J. B. Limitations of cellular models in Parkinson's disease research. *Journal of Neural Transmission-Supplement*, v., n. 70, p. 261-268, 2006.

FERNANDES, V. S.; RIBEIRO, A. M. *et al.* Memory impairment induced by low doses of reserpine in rats: Possible relationship with emotional processing deficits in Parkinson disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 32, n. 6, p. 1479-1483, Aug 1 2008.

FERNANDEZ-RUIZ, J.; MIRANDA, M. I. *et al.* Effects of catecholaminergic depletion of the amygdala and insular cortex on the potentiation of odor by taste aversions. *Behavioral and Neural Biology*, v. 60, n. 3, p. 189-91, Nov 1993.

FERNANDEZ-TERUEL, A.; GIMENEZ-LLORT, L. *et al.* Early-life handling stimulation and environmental enrichment: are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, v. 73, n. 1, p. 233-45, Aug 2002.

FERRO, M. M.; BELLISSIMO, M. I. *et al.* Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 148, n. 1, p. 78-87, Oct 15 2005.

FIBIGER, H. C. The neurobiological substrates of depression in Parkinson's disease: a hypothesis. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, v. 11, n. 1 Suppl, p. 105-7, Feb 1984.

FILE, S. E. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behavioural Brain Research*, v. 125, n. 1-2, p. 151-7, Nov 1 2001.

FLOWERS, K. A.; PEARCE, I. *et al.* Recognition memory in Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, v. 47, n. 11, p. 1174-81, Nov 1984.

FRIEDMAN, A. Sleep pattern in Parkinson's disease. *Acta medica Polona*, v. 21, n. 2, p. 193-9, 1980.

FRIGERIO, R.; ELBAZ, A. *et al.* Education and occupations preceding Parkinson disease: a population-based case-control study. *Neurology*, v. 65, n. 10, p. 1575-83, Nov 22 2005.

FUKUNISHI, I.; HOSOKAWA, K. *et al.* Depression antedating the onset of Parkinson's disease. *Japanese Journal of Psychiatry & Neurology*, v. 45, n. 1, p. 7-11, Mar 1991.

GAIG, C.; TOLOSA, E. When does Parkinson's disease begin? *Movement Disorders*, v. 24 Suppl 2, p. S656-64, 2009.

GERLACH, M.; RIEDERER, P. Animal models of Parkinson's disease: An empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *Journal of Neural Transmission*, v. 103, n. 8-9, p. 987-1041, 1996.

GEWIRTZ, J. C.; DAVIS, M. Using pavlovian higher-order conditioning paradigms to investigate the neural substrates of emotional learning and memory. *Learning and Memory*, v. 7, n. 5, p. 257-66, Sep-Oct 2000.

GOETZ, C. G. New developments in depression, anxiety, compulsiveness, and hallucinations in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, v. 25 Suppl 1, p. S104-9, 2010.

GOLD, P. E. The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. *Behavioral and Neural Biology*, v. 46, n. 1, p. 87-98, Jul 1986.

GOLDBERG, N. R.; HAACK, A. K. *et al.* Enriched environment promotes similar neuronal and behavioral recovery in a young and aged mouse model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, v. 172, p. 443-52, Jan 13 2011.

GREENAMYRE, J. T.; HASTINGS, T. G. Biomedicine. Parkinson's--divergent causes, convergent mechanisms. *Science*, v. 304, n. 5674, p. 1120-2, May 21 2004.

GUILLOT, T. S.; MILLER, G. W. Protective actions of the vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) in monoaminergic neurons. *Molecular Neurobiology*, v. 39, n. 2, p. 149-70, Apr 2009.

HAGAN, J. J.; MIDDLEMISS, D. N. *et al.* Parkinson's disease: prospects for improved drug therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 18, n. 5, p. 156-63, May 1997.

HAGUE, S.; ROGAEVA, E. *et al.* Early-onset Parkinson's disease caused by a compound heterozygous DJ-1 mutation. *Annals of Neurology's*, v. 54, n. 2, p. 271-4, Aug 2003.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, v. 18, n. 3, p. 385-403, 1934.

HALLIDAY, G. M.; DEL TREDICI, K. *et al.* Critical appraisal of brain pathology staging related to presymptomatic and symptomatic cases of sporadic Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission Supplement*, v., n. 70, p. 99-103, 2006.

HALLIDAY, G. M.; MCCANN, H. The progression of pathology in Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1184, p. 188-95, Jan 2010.

HAMM, R. J.; TEMPLE, M. D. *et al.* Exposure to environmental complexity promotes recovery of cognitive function after traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*, v. 13, n. 1, p. 41-7, Jan 1996.

HARDY, J. Genetic analysis of pathways to Parkinson disease. *Neuron*, v. 68, n. 2, p. 201-6, Oct 21 2010.

HAUSER, R. A. Early pharmacologic treatment in Parkinson's disease. *American Journal of Managed Care*, v. 16 Suppl Implications, p. S100-7, Mar 2010.

HAWKES, C. H.; SHEPHARD, B. C. *et al.* Olfactory dysfunction in Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, v. 62, n. 5, p. 436-46, May 1997.

_____. Is Parkinson's disease a primary olfactory disorder? *QJM*, v. 92, n. 8, p. 473-80, Aug 1999.

HEALY, D.; SAVAGE, M. Reserpine exhumed. *British Journal of Psychiatry*, v. 172, p. 376-8, May 1998.

HEBB, D. O. The mammal and his environment. *American Journal of Psychiatry*, v. 111, n. 11, p. 826-31, May 1955.

HENDRIKSEN, H.; PRINS, J. *et al.* Environmental enrichment induces behavioral recovery and enhanced hippocampal cell proliferation in an antidepressant-resistant animal model for PTSD. *PLoS One*, v. 5, n. 8, p. e11943, 2010.

HERZOG, C.; OTTO, T. Odor-guided fear conditioning in rats: 2. Lesions of the anterior perirhinal cortex disrupt fear conditioned to the explicit conditioned stimulus but not to the training context. *Behavioral Neuroscience*, v. 111, n. 6, p. 1265-72, Dec 1997.

HUNOT, S.; BRUGG, B. *et al.* Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease. *PNAS*, v. 94, n. 14, p. 7531-6, Jul 8 1997.

IBGE. Censo demográfico. In: ESTATÍSTICA, I. B. D. G. E. (Ed.). Rio de Janeiro 2000.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. *et al.* Memory modulation by brain benzodiazepines. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 24, n. 9, p. 865-81, 1991.

JADAVJI, N. M.; KOLB, B. *et al.* Enriched environment improves motor function in intact and unilateral dopamine-depleted rats. *Neuroscience*, v. 140, n. 4, p. 1127-38, Jul 21 2006.

KANNARI, K.; TANAKA, H. *et al.* Reserpine pretreatment prevents increases in extracellular striatal dopamine following L-DOPA

administration in rats with nigrostriatal denervation. *Journal of Neurochemistry*, v. 74, n. 1, p. 263-9, Jan 2000.

KAWAMURA, M.; KOBAYAKAWA, M. Emotional impairment in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, v. 15, n. Supplement 1, p. S47-S52, 2009.

KIM, J. J.; JUNG, M. W. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: A critical review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 30, n. 2, p. 188-202, 2006.

KITADA, T.; ASAKAWA, S. *et al.* Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, v. 392, n. 6676, p. 605-8, Apr 9 1998.

KLEIN, S. L.; LAMBERT, K. G. *et al.* Influence of environmental enrichment and sex on predator stress response in rats. *Physiology & Behavior*, v. 56, n. 2, p. 291-7, Aug 1994.

KROON, J. A. V.; CAROBREZ, A. P. Effects of midazolam, propranolol or scopolamine treatment in rats submitted to an olfactory fear conditioning paradigm. *European Neuropsychopharmacology*, v. 18, p. S491-S491, Aug 2008.

_____. Olfactory fear conditioning paradigm in rats: Effects of midazolam, propranolol or scopolamine. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 91, n. 1, p. 32-40, Jan 2009.

LABUDA, C. J.; FUCHS, P. N. Catecholamine depletion by reserpine blocks the anxiolytic actions of ethanol in the rat. *Alcohol*, v. 26, n. 1, p. 55-9, Jan 2002.

LANGSTON, J. W. The etiology of Parkinson's disease with emphasis on the MPTP story. *Neurology*, v. 47, n. 6 Suppl 3, p. S153-60, Dec 1996.

LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. *Annual Review of Neuroscience*, v. 23, p. 155-184, 2000.

- LEMKE, M. R.; BRECHT, H. M. *et al.* Effects of the dopamine agonist pramipexole on depression, anhedonia and motor functioning in Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences* v. 248, n. 1-2, p. 266-70, Oct 25 2006.
- LEWIS, S. J.; DOVE, A. *et al.* Cognitive impairments in early Parkinson's disease are accompanied by reductions in activity in frontostriatal neural circuitry. *Journal of Neuroscience*, v. 23, n. 15, p. 6351-6, Jul 16 2003.
- LINDNER, M. D.; CAIN, C. K. *et al.* Incomplete nigrostriatal dopaminergic cell loss and partial reductions in striatal dopamine produce akinesia, rigidity, tremor and cognitive deficits in middle-aged rats. *Behavioural Brain Research*, v. 102, n. 1-2, p. 1-16, Jul 1999.
- LIOU, H. H.; TSAI, M. C. *et al.* Environmental risk factors and Parkinson's disease: A case-control study in Taiwan. *Neurology*, v. 48, n. 6, p. 1583-1588, Jun 1997.
- MAGUIRE-ZEISS, K. A.; FEDEROFF, H. J. Convergent pathobiologic model of Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 991, p. 152-66, Jun 2003.
- MANDELL, A. J.; MARKHAM, C. *et al.* Parkinson's syndrome, depression and imipramine. A preliminary report. *California Medicine*, v. 95, p. 12-4, Jul 1961.
- MARSH, L.; WILLIAMS, J. R. *et al.* Psychiatric comorbidities in patients with Parkinson disease and psychosis. *Neurology*, v. 63, n. 2, p. 293-300, Jul 27 2004.
- MAYEUX, R. Epidemiology of neurodegeneration. *Annual Review of Neuroscience*, v. 26, p. 81-104, 2003.
- MAYEUX, R.; STERN, Y. *et al.* Altered serotonin metabolism in depressed patients with parkinson's disease. *Neurology*, v. 34, n. 5, p. 642-6, May 1984.

MCGAUGH, J. L. Memory reconsolidation hypothesis revived but restrained: theoretical comment on Biedenkapp and Rudy (2004). *Behavioral Neuroscience*, v. 118, n. 5, p. 1140-2, Oct 2004.

MENZAGHI, F.; WHELAN, K. T. *et al.* Interactions between a novel cholinergic ion channel agonist, SIB-1765F and L-DOPA in the reserpine model of Parkinson's disease in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 280, n. 1, p. 393-401, Jan 1997.

MILLER, K. M.; OKUN, M. S. *et al.* Startle reflex hyporeactivity in Parkinson's disease: An emotion-specific or arousal-modulated deficit? *Neuropsychologia*, v. 47, n. 8-9, p. 1917-1927, 2009.

MONCEK, F.; DUNCKO, R. *et al.* Effect of environmental enrichment on stress related systems in rats. *Journal of Neuroendocrinology*, v. 16, n. 5, p. 423-31, May 2004.

MORA, F.; SEGOVIA, G. *et al.* Aging, plasticity and environmental enrichment: Structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain Research Reviews*, v. 55, n. 1, p. 78-88, 2007.

MOREAU, J. L.; JENCK, F. *et al.* Antidepressant treatment prevents chronic unpredictable mild stress-induced anhedonia as assessed by ventral tegmentum self-stimulation behavior in rats. *European Neuropsychopharmacology*, v. 2, n. 1, p. 43-9, Mar 1992.

NADER, K.; LEDOUX, J. The dopaminergic modulation of fear: quinpirole impairs the recall of emotional memories in rats. *Behavioral Neuroscience*, v. 113, n. 1, p. 152-65, Feb 1999.

NIEOULLON, A.; AMALRIC, M. [Dopaminergic receptors: structural features and functional implications]. *Revue neurologique (Paris)*, v. 158 Spec no 1, p. S59-68, Dec 2002.

NISSENBAUM, H.; QUINN, N. P. *et al.* Mood swings associated with the 'on-off' phenomenon in Parkinson's disease. *Psychology Medicine*, v. 17, n. 4, p. 899-904, Nov 1987.

NITHIANANTHARAJAH, J.; HANNAN, A. J. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 7, n. 9, p. 697-709, Sep 2006.

_____. Mechanisms mediating brain and cognitive reserve: Experience-dependent neuroprotection and functional compensation in animal models of neurodegenerative diseases. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v., Nov 26 2010.

NUTI, A.; CERAVOLO, R. *et al.* Psychiatric comorbidity in a population of Parkinson's disease patients. *European Journal of Neurology*, v. 11, n. 5, p. 315-20, May 2004.

OBESO, J. A.; RODRIGUEZ-OROZ, M. C. *et al.* Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nature Medicine*, v. 16, n. 6, p. 653-61, Jun 2010.

OKUDA, H.; TATSUMI, K. *et al.* Environmental enrichment stimulates progenitor cell proliferation in the amygdala. *Journal of Neuroscience Research*, v. 87, n. 16, p. 3546-53, Dec 2009.

PAMPLONA, F. A.; PANDOLFO, P. *et al.* Environmental enrichment improves cognitive deficits in Spontaneously Hypertensive Rats (SHR): relevance for Attention Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD). *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 33, n. 7, p. 1153-60, Oct 1 2009.

PARKINSON, J. An essay on the shaking palsy. 1817. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, v. 14, n. 2, p. 223-36; discussion 222, Spring 2002.

PASCHALL, G. Y.; DAVIS, M. Second-order olfactory-mediated fear-potentiated startle. *Learning and Memory*, v. 9, n. 6, p. 395-401, Nov-Dec 2002.

PAVESI, E.; CANTERAS, N. S. *et al.* Acquisition of Pavlovian Fear Conditioning Using beta-Adrenoceptor Activation of the Dorsal Premammillary Nucleus as an Unconditioned Stimulus to Mimic Live Predator-Threat Exposure. *Neuropsychopharmacology*, v., Jan 5 2011.

- PEÑA, Y.; PRUNELL, M. *et al.* Environmental enrichment effects in social investigation in rats are gender dependent. *Behavioural Brain Research*, v. 174, n. 1, p. 181-187, 2006.
- PENEV, P. D.; ZEE, P. C. *et al.* Monoamine depletion blocks triazolam-induced phase advances of the circadian clock in hamsters. *Brain Research*, v. 637, n. 1-2, p. 255-61, Feb 21 1994.
- PETZOLD, G. C.; HAGIWARA, A. *et al.* Serotonergic modulation of odor input to the mammalian olfactory bulb. *Nature Neuroscience*, v. 12, n. 6, p. 784-91, Jun 2009.
- PLAAS, M.; KARIS, A. *et al.* Alpha-synuclein A30P point-mutation generates age-dependent nigrostriatal deficiency in mice. *Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 59, n. 2, p. 205-16, Jun 2008.
- POLIAKOFF, E.; SMITH-SPARK, J. H. Everyday cognitive failures and memory problems in Parkinson's patients without dementia. *Brain and Cognition*, v. 67, n. 3, p. 340-350, 2008.
- POLYMEROPOULOS, M. H.; LAVEDAN, C. *et al.* Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, v. 276, n. 5321, p. 2045-7, Jun 27 1997.
- PORSOLT, R. D.; DENIEL, M. *et al.* Forced swimming in rats: hypothermia, immobility and the effects of imipramine. *European Journal of Pharmacology*, v. 57, n. 4, p. 431-6, Aug 15 1979.
- POTASHKIN, J. A.; BLUME, S. R. *et al.* Limitations of animal models of Parkinson's disease. *Parkinsons Disease*, v. 2011, p. 658083, 2010.
- PREDIGER, R. D.; BATISTA, L. C. *et al.* The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, v. 202, n. 2, p. 391-403, Dec 2006.
- PREDIGER, R. D.; BATISTA, L. C. *et al.* Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. *Neurobiology of Aging*, v. 26, n. 6, p. 957-64, Jun 2005a.

- PREDIGER, R. D.; DA CUNHA, C. *et al.* Antagonistic interaction between adenosine A2A and dopamine D2 receptors modulates the social recognition memory in reserpine-treated rats. *Behavioral Pharmacology*, v. 16, n. 4, p. 209-18, Jul 2005b.
- PREDIGER, R. D.; TAKAHASHI, R. N. Modulation of short-term social memory in rats by adenosine A1 and A(2A) receptors. *Neuroscience Letters*, v. 376, n. 3, p. 160-5, Mar 16 2005.
- RAMOS, A.; MORMEDE, P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 22, n. 1, p. 33-57, 1998.
- REMY, P.; DODER, M. *et al.* Depression in Parkinson's disease: loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system. *Brain*, v. 128, n. Pt 6, p. 1314-22, Jun 2005.
- RESTREPO, D.; ARELLANO, J. *et al.* Emerging views on the distinct but related roles of the main and accessory olfactory systems in responsiveness to chemosensory signals in mice. *Hormones and Behavior*, v. 46, n. 3, p. 247-256, Sep 2004.
- REVUELTA, G. J.; LIPPA, C. F. Dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease dementia may best be viewed as two distinct entities. *International Psychogeriatric*, v. 21, n. 2, p. 213-6, Apr 2009.
- RICHARD, I. H. Anxiety disorders in Parkinson's disease. *Advanced Neurology*, v. 96, p. 42-55, 2005.
- RIEDERER, P.; WUKETICH, S. Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson's disease. A detailed study of influential factors in human brain amine analysis. *Journal of Neural Transmission*, v. 38, n. 3-4, p. 277-301, 1976.
- RIEKKINEN, P., JR.; KEJONEN, K. *et al.* Hippocampal atrophy is related to impaired memory, but not frontal functions in non-demented Parkinson's disease patients. *Neuroreport*, v. 9, n. 7, p. 1507-11, May 11 1998.

RINNE, J. O.; PORTIN, R. *et al.* Cognitive impairment and the brain dopaminergic system in Parkinson disease: [18F]fluorodopa positron emission tomographic study. *Archives of Neurology*, v. 57, n. 4, p. 470-5, Apr 2000.

RODGERS, R. J.; CAO, B. J. *et al.* Animal models of anxiety: An ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 30, n. 3, p. 289-304, 1997.

ROMMELFANGER, K. S.; WEINSHENKER, D. Norepinephrine: The redheaded stepchild of Parkinson's disease. *Biochemistry Pharmacology*, v. 74, n. 2, p. 177-90, Jul 15 2007.

RONCACCI, S.; TROISI, E. *et al.* Implicit memory in parkinsonian patients: evidence for deficient skill learning. *European Neurology*, v. 36, n. 3, p. 154-9, 1996.

ROY, V.; BELZUNG, C. *et al.* Environmental enrichment in BALB/c mice: effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor. *Physiology & Behavior*, v. 74, n. 3, p. 313-20, Oct 2001.

ROYER, S.; MARTINA, M. *et al.* An inhibitory interface gates impulse traffic between the input and output stations of the amygdala. *Journal of Neuroscience*, v. 19, n. 23, p. 10575-83, Dec 1 1999.

SAVICA, R.; ROCCA, W. A. *et al.* When does Parkinson disease start? *Archives of Neurology*, v. 67, n. 7, p. 798-801, Jul 2010.

SCHAPIRA, A. H.; COOPER, J. M. *et al.* Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet*, v. 1, n. 8649, p. 1269, Jun 3 1989.

SHIBA, M.; BOWER, J. H. *et al.* Anxiety disorders and depressive disorders preceding Parkinson's disease: a case-control study. *Movement Disorders*, v. 15, n. 4, p. 669-77, Jul 2000.

SHIMADA, H.; HIRANO, S. *et al.* Mapping of brain acetylcholinesterase alterations in Lewy body disease by PET. *Neurology*, v. 73, n. 4, p. 273-8, Jul 28 2009.

SILVA, R. H.; ABILIO, V. C. *et al.* Concomitant development of oral dyskinesia and memory deficits in reserpine-treated male and female mice. *Behavioural Brain Research*, v. 132, n. 2, p. 171-177, May 14 2002.

SILVESTRI, R. B.; DE OLIVEIRA, L. F. *et al.* The footfault test as a screening tool in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 177, n. 2, p. 317-21, Mar 15 2009.

SINGARAM, C.; ASHRAF, W. *et al.* Dopaminergic defect of enteric nervous system in Parkinson's disease patients with chronic constipation. *Lancet*, v. 346, n. 8979, p. 861-4, Sep 30 1995.

SKALISZ, L. L.; BEIJAMINI, V. *et al.* Evaluation of the face validity of reserpine administration as an animal model of depression-Parkinson's disease association. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 26, n. 5, p. 879-883, Jun 2002.

SLATTERY, D. A.; MARKOU, A. *et al.* Evaluation of reward processes in an animal model of depression. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 190, n. 4, p. 555-68, Mar 2007.

SPILLANTINI, M. G.; SCHMIDT, M. L. *et al.* Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, v. 388, n. 6645, p. 839-40, Aug 28 1997.

SPIRES, T. L.; GROTE, H. E. *et al.* Environmental enrichment rescues protein deficits in a mouse model of Huntington's disease, indicating a possible disease mechanism. *Journal of Neuroscience*, v. 24, n. 9, p. 2270-6, Mar 3 2004.

STARKSTEIN, S. E.; LEIGUARDA, R. Neuropsychological correlates of brain atrophy in Parkinson's disease: a CT-scan study. *Movement Disorders*, v. 8, n. 1, p. 51-5, 1993.

STERN, Y.; MARDER, K. *et al.* Antecedent clinical features associated with dementia in Parkinson's disease. *Neurology*, v. 43, n. 9, p. 1690-2, Sep 1993.

STOOF, J. C.; WINOGRODZKA, A. *et al.* Leads for the development of neuroprotective treatment in Parkinson's disease and brain imaging methods for estimating treatment efficacy. *European Journal of Pharmacology*, v. 375, n. 1-3, p. 75-86, Jun 30 1999.

TADAIESKY, M. T. *A LESÃO DOPAMINÉRGICA COMO MODELO DE ESTÁGIO PRÉ-MOTOR DA DOENÇA DE PARKINSON: Efeitos do antagonismo do receptor CBI.* . (2010). (Doutorado) - Departamento de Farmacologia, UFSC, Florianópolis, 2010.

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

TALPADE, D. J.; GREENE, J. G. *et al.* In vivo labeling of mitochondrial complex I (NADH : ubiquinone oxidoreductase) in rat brain using [H-3]dihydrorotenone. *Journal of Neurochemistry*, v. 75, n. 6, p. 2611-2621, Dec 2000.

TAYLOR, T. N.; CAUDLE, W. M. *et al.* Nonmotor symptoms of Parkinson's disease revealed in an animal model with reduced monoamine storage capacity. *Journal of Neuroscience*, v. 29, n. 25, p. 8103-13, Jun 24 2009.

TAYLOR, T. N.; GREENE, J. G. *et al.* Behavioral phenotyping of mouse models of Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research*, v. 211, n. 1, p. 1-10, Jul 29 2010.

TERZIOGLU, M.; GALTER, D. Parkinson's disease: genetic versus toxin-induced rodent models. *FEBS Journal*, v. 275, n. 7, p. 1384-91, Apr 2008.

TOLARDO, R.; ZETTERMAN, L. *et al.* Evaluation of behavioral and pharmacological effects of Hedyosmum brasiliense and isolated sesquiterpene lactones in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 128, n. 1, p. 63-70, Mar 2 2010.

TREIT, D.; MENARD, J. *et al.* Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, v. 44, n. 2, p. 463-9, Feb 1993.

UEDA, S.; SAKAKIBARA, S. *et al* Effect of long-lasting serotonin depletion on environmental enrichment-induced neurogenesis in adult rat hippocampus and spatial learning. *Neuroscience*, v. 135, n. 2, p. 395-402, 2005.

UNGERSTE.U. 6-Hydroxy-Dopamine Induced Degeneration of Central Monoamine Neurons. *European Journal of Pharmacology*, v. 5, n. 1, p. 107-&, 1968.

VAN TRICHT, M. J.; SMEDING, H. M. M. *et al*. Impaired emotion recognition in music in Parkinson's disease. *Brain and Cognition*, v. 74, n. 1, p. 58-65, 2010.

VAN WAAS, M.; SOFFIE, M. Differential environmental modulations on locomotor activity, exploration and spatial behaviour in young and old rats. *Physiology & Behavior*, v. 59, n. 2, p. 265-71, Feb 1996.

VANITALLIE, T. B. Parkinson disease: primacy of age as a risk factor for mitochondrial dysfunction. *Metabolism*, v. 57 Suppl 2, p. S50-5, Oct 2008.

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

WALSH, T. J.; PALFAI, T. Time-dependent effects of reserpine on retention of passive avoidance. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 8, n. 2, p. 103-5, Feb 1978.

WEISSKOPF, M. G.; CHEN, H. *et al* Prospective study of phobic anxiety and risk of Parkinson's disease. *Movement Disorders*, v. 18, n. 6, p. 646-51, Jun 2003.

WESTERMANN, B.; WATTENDORF, E. *et al* Functional imaging of the cerebral olfactory system in patients with Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, v. 79, n. 1, p. 19-24, Jan 2008.

YAFFE, K.; VITTINGHOFF, E. *et al.* Posttraumatic stress disorder and risk of dementia among US veterans. *Arch Gen Psychiatry*, v. 67, n. 6, p. 608-13, Jun 2010.

YOSHITAKE, T.; YOSHITAKE, S. *et al.* High-sensitive liquid chromatographic method for determination of neuronal release of serotonin, noradrenaline and dopamine monitored by microdialysis in the rat prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 140, n. 1-2, p. 163-8, Dec 30 2004.

YOUNG, D.; LAWLOR, P. A. *et al.* Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nature Medicine*, v. 5, n. 4, p. 448-53, Apr 1999.

ZARRANZ, J. J.; ALEGRE, J. *et al.* The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Annals of Neurology's*, v. 55, n. 2, p. 164-73, Feb 2004.

ZIEMSSSEN, T.; REICHMANN, H. Non-motor dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, v. 13, n. 6, p. 323-32, Aug 2007.