

RUI DANIEL SCHRÖDER PREDIGER

**"PREJUÍZOS OLFATIVOS E COGNITIVOS EM
MODELOS DA DOENÇA DE PARKINSON EM RATOS.
PARTICIPAÇÃO DE MECANISMOS ADENOSINÉRGICO
E DOPAMINÉRGICO".**

**Florianópolis – SC
2005**

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

**"PREJUÍZOS OLFATIVOS E COGNITIVOS EM
MODELOS DA DOENÇA DE PARKINSON EM RATOS.
PARTICIPAÇÃO DE MECANISMOS ADENOSINÉRGICO
E DOPAMINÉRGICO".**

RUI DANIEL SCHRÖDER PREDIGER

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Farmacologia como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em Farmacologia.
Orientador: Prof. Dr. Reinaldo N. Takahashi

**Florianópolis – SC
Outubro/2005**

"Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo impeça de tentar. Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu."

(Luiz Fernando Veríssimo)

Aos meus pais, Rui e Lori, exemplos de caráter, bondade e inteligência que guiam o meu caminho; ao André, um irmão no sentido verdadeiro; ao meu filho Rafael, que embora ainda tão pequeno seja capaz de me ensinar todos os dias as verdadeiras lições e valores da vida.

Agradecimentos

√ A DEUS, Fonte de luz e amor, Pai bondoso que continua a guiar minha jornada mesmo diante de tantos erros cometidos.

√ Ao professor Reinaldo, pela honra de ter usufruído da sua sabedoria e amizade ao longo destes anos do Mestrado e Doutorado, e por vir guiando com segurança este início da minha caminhada científica.

√ A todos os professores do Departamento de Farmacologia, que, com sua alegria e competência, muito me motivaram para o ingresso na pesquisa em Farmacologia.

√ Aos professores João Batista Calixto, Antônio de Pádua Carobrez, Cláudio da Cunha, Alcir Luiz Dafré e Jorge Camilo Flório, e aos pós-graduandos Luciano da Conceição Batista, Pablo Pandolfo, Rodrigo Medeiros e Jéferson Franco, pela colaboração na realização de parte dos experimentos contidos na presente tese.

√ Aos colegas de laboratório Leandro, Luciano, Pamplona, Pablo, Vanessa, e aos ex-colegas George, Fabrício, Kênia, Edmar, Marcelo, Rubens e Monique, pelos agradáveis momentos de trabalho e distração que tornaram a realização desta tarefa muito mais prazerosa.

√ Aos colegas Rodrigo, Nelson, Filipe, Danielle, Emerson, Daniel, Rafael, Geison, Jarbas, Juliano, Maria, Leandro, Gustavo e todos os alunos do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia pelo companheirismo e apoio.

√ Aos funcionários Pedro, Rita e Sandra, e todos os demais funcionários do Departamento de Farmacologia, que desde o primeiro dia, nunca mediram esforços em me auxiliar no que fosse possível, possibilitando a realização desta tese.

√ Finalmente, a todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

√ Ao CNPq e a FAPESC pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E FIGURAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
1- INTRODUÇÃO	1
1.1 – Etiologia da Doença de Parkinson	3
1.2 – Sintomas Cognitivos da Doença de Parkinson	5
1.3 – Sintomas Olfativos da Doença de Parkinson	11
1.4 – Modelos Animais da Doença de Parkinson	13
1.5 – Interação entre os Sistemas Dopaminérgico e Adenosinérgico	23
2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3- MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1 – ANIMAIS	29
3.2 – DROGAS	29
3.3 – ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE MPTP	31
3.4 – MODELOS COMPORTAMENTAIS	
3.4.1 – Campo aberto	31
3.4.2 – Teste de discriminação olfativa	32
3.4.3 – Teste de reconhecimento social	33
3.4.4 – Teste do labirinto aquático de Morris	34
3.5 – DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS CEREBRAIS DE DOPAMINA – HPLC	37
3.6 – DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ENZIMA TIROSINA HIDROXILASE (TH) E DA ATIVAÇÃO DA PROTEÍNA QUINASE DE C-Jun N-TERMINAL (JNK) – (“western blot”)	39
3.7 – DETERMINAÇÃO DE MARCADORES DO ESTRESSE	

OXIDATIVO – PARÂMETROS ANTIOXIDANTES	41
3.8 – ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4 – RESULTADOS	
4.1 – Efeito do tratamento com reserpina na discriminação olfativa e memória social de ratos	45
4.2 – Efeito da administração de agonistas dopaminérgicos sobre os prejuízos na discriminação olfativa e memória social induzidos pela reserpina em ratos	47
4.3 – Efeitos da administração de antagonistas adenosinérgicos sobre os prejuízos na discriminação olfativa e memória social induzidos pela reserpina em ratos	53
4.4 – Interação entre os receptores A_{2A} para adenosina e D_2 para dopamina no prejuízo da memória social induzido pela reserpina em ratos	59
4.5 – Efeito da administração intranasal de MPTP sobre as funções olfativa e motora de ratos	61
4.6 – Efeito da administração intranasal de MPTP sobre os processos de aprendizado e memória em ratos	64
4.7 – Efeito da administração intranasal de MPTP sobre os níveis cerebrais de dopamina e seus metabólitos	68
4.8 – Efeito da administração intranasal de MPTP sobre a expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) no bulbo olfatório e substância negra de ratos	73
4.9 – Efeito da administração intranasal de MPTP sobre os níveis de marcadores do estresse oxidativo – parâmetros antioxidantes	74
4.10 – Efeito da administração intranasal de MPTP sobre a expressão da proteína quinase de C-Jun N-terminal (JNK)	78
5 – DISCUSSÃO	80
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Efeito do tratamento com reserpina nos parâmetros comportamentais de ratos testados no campo aberto	47
Table 2. Efeito da administração dos agonistas dopaminérgicos nos parâmetros comportamentais de ratos tratados com reserpina e testados no campo aberto	52
Table 3. Efeito da administração dos antagonistas adenosinérgicos nos parâmetros comportamentais de ratos tratados com reserpina e testados no campo aberto	58
Table 4. Efeito da administração intranasal de MPTP nos parâmetros comportamentais de ratos testados no campo aberto	63
Figura 1. Representação esquemática da interação dos receptores adenosinérgicos e dopaminérgicos circuito cortiço-gânglio basal-talâmico-cortical	25
Figura 2. Efeito do tratamento com reserpina na discriminação olfativa de ratos	46
Figura 3. Efeito do tratamento com reserpina na memória social de ratos	46
Figura 4. Efeito do tratamento com os agonistas dopaminérgicos na discriminação olfativa de ratos previamente tratados com reserpina	48
Figura 5. Efeito do tratamento com os agonistas dopaminérgicos na memória social de ratos previamente tratados com reserpina (mesmo jovem)	50
Figura 6. Efeito do tratamento com os agonistas dopaminérgicos na memória social de ratos previamente tratados com reserpina (jovem diferente)	51
Figura 7. Efeito do tratamento com os antagonistas adenosinérgicos na discriminação olfativa de ratos previamente tratados com reserpina	54
Figura 8. Efeito do tratamento com os antagonistas adenosinérgicos na memória social de ratos previamente tratados com reserpina (mesmo jovem)	56
Figura 9. Efeito do tratamento com os antagonistas adenosinérgicos na memória social	

de ratos previamente tratados com reserpina (jovem diferente)	57
Figura 10. Efeito da co-administração de ZM241385 e SKF 38393 na memória social de ratos previamente tratados com reserpina	60
Figura 11. Efeito da administração intranasal de MPTP sobre a discriminação olfativa de ratos	62
Figura 12. Efeito da administração intranasal de MPTP sobre a memória social de ratos	65
Figura 13. Efeito da administração intranasal de MPTP sobre as três versões do labirinto aquático	67
Figura 14. Efeito da administração intranasal de MPTP sobre os níveis de DA no bulbo olfatório de ratos	69
Figura 15. Efeito da administração intranasal de MPTP sobre os níveis de DA, DOPAC e HVA no estriado de ratos	70
Figura 16. Efeito da administração intranasal de MPTP sobre os níveis de DA, DOPAC e HVA no cortex pré-frontal de ratos	71
Figura 17. Efeito da administração intranasal de MPTP sobre os níveis de DA no hipocampo de ratos	72
Figura 18. Efeito da administração intranasal de MPTP sobre a expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) no bulbo olfatório e substância negra de ratos	73
Figura 19. Efeito da administração intranasal de MPTP sobre os níveis de glutatona total (GSH-t) no bulbo olfatório, estriado, substância negra e hipocampo de ratos	75
Figura 20. Efeito da administração intranasal de MPTP sobre a atividade da enzima glutatona redutase (GR) no bulbo olfatório, estriado, substância negra e hipocampo de ratos	77

Figura 21. Efeito da administração intranasal de MPTP sobre a atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx) no bulbo olfatório, estriado, substância negra e hipocampo de ratos	77
Figura 22. Efeito da administração intranasal de MPTP sobre a ativação da proteína quinase de c-Jun N-terminal (JNK) no bulbo olfatório e substância negra de ratos	79

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPC	Adenosina mono-fosfato cíclico
ATP	Adenosina tri-fosfato
DA	Dopamina
DOPAC	Ácido 3,4-dihidroxi-fenilacético
DP	Doença de Parkinson
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GLU	Glutamato
GPe	Globo pálido externo
GPi	Globo pálido interno
GPx	Enzima glutaciona peroxidase
GR	Enzima glutaciona redutase
GSH	Glutaciona forma reduzida
GSH-t	Glutaciona total
GSSG	Glutaciona forma oxidada
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
HVA	Ácido homovanílico
i.p.	Via intraperitoneal
JNK	Proteína quinase de <i>c-Jun N-terminal</i>
L-dopa	Levodopa
LTD	Depressão de longa duração
LTP	Potenciação de longa duração
MAO-B	Enzima monomina oxidase – B
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NST	Núcleo subtalâmico
6-OHDA	6-hidroxi-dopamina
SNc	Substância negra parte compacta
SNr	Substância negra parte reticulada
TH	Enzima tirosina hidroxilase

RESUMO

Embora a Doença de Parkinson (DP) seja caracterizada como um distúrbio do movimento, muitos estudos têm demonstrado que prejuízos olfativos e cognitivos antecedem os sintomas motores clássicos, e que testes olfativos podem representar uma importante ferramenta no diagnóstico precoce desta doença. Embora a causa primária da DP seja ainda desconhecida, estudos epidemiológicos têm revelado que a sua incidência é aumentada em decorrência da exposição a algumas toxinas presentes no ambiente. O presente estudo teve como objetivo avaliar possíveis alterações nas funções olfativas e cognitivas de ratos tratados com reserpina (i.p.) e MPTP (intranasal), utilizados como modelos experimentais da DP; bem como o envolvimento dos sistemas adenosinérgico e dopaminérgico nestes efeitos. Os resultados demonstram a presença de prejuízos olfativos e cognitivos nos dois modelos utilizados, sendo que estes antecedem o comprometimento da função motora dos animais. Estes resultados confirmam e estendem evidências da importância do desenvolvimento de testes olfativos específicos como uma importante ferramenta no diagnóstico precoce da DP. Além disso, os nossos resultados sugerem o envolvimento dos sistemas adenosinérgico e dopaminérgico nos comprometimentos olfativos e cognitivos verificados no modelo da reserpina, reforçando o potencial terapêutico da cafeína e de antagonistas seletivos dos receptores A_{2A} para adenosina na DP. O presente estudo demonstra ainda que a administração intranasal de MPTP é capaz de induzir alterações neuroquímicas semelhantes as observadas na DP, reforçando a hipótese de que um vírus ou agente químico, presente no meio ambiente, poderia utilizar a cavidade nasal como porta de entrada no organismo e estar relacionado à etiologia da DP. Finalmente, os nossos resultados sugerem que a morte de neurônios dopaminérgicos induzidos pela administração intranasal de MPTP pode estar associada à geração de estresse oxidativo e processo de apoptose mediado por JNK.

ABSTRACT

Many studies have shown that deficits in olfactory and cognitive functions precede the classical motor symptoms seen in Parkinson's disease (PD) and that olfactory testing may contribute to the early diagnosis of this disorder. Although the primary cause of PD is still unknown, epidemiologic studies have revealed that its incidence is increased in consequence of the exposition to some environmental toxins. The aim of the present study was to evaluate a possible alteration in olfactory and cognitive functions in rats treated with reserpine (i.p.) and MPTP (intranasal), that were utilized as animal models of PD, as well as the involvement of the adenosinergic and dopaminergic systems in these effects. The present results demonstrate the presence of olfactory and cognitive deficits in both models utilized, and that these alterations precede the motor dysfunction in the animals. These results confirm and extend the importance of developing specific olfactory tests as a tool in the early diagnosis of PD. Moreover, our results suggest the involvement of adenosinergic and dopaminergic systems in the olfactory and cognitive impairments verified in the reserpine model, reinforcing the therapeutic potential of caffeine and selective adenosine A_{2A} receptor antagonists for PD. Furthermore, the present study demonstrates that the intranasal administration of MPTP promotes neurochemical alterations very similar to that observed in PD, reinforcing the hypothesis that an environmental toxin can pass through the nasal cavity into the organism and be related to the etiology of PD. Finally, our results indicate that the dopaminergic neurodegeneration induced by intranasal administration of MPTP may be associated to generation of oxidative stress and an apoptotic process mediated by JNK.

Parte desses resultados está publicada em:

- PREDIGER, R.D.S.; Takahashi, R.N. Modulation of short-term social memory in rats by adenosine A₁ and A_{2A} receptors. *Neuroscience Letters* 376: 160-165, 2005.
- PREDIGER, R.D.S.; Da Cunha, C.; Takahashi, R.N. Antagonistic interaction between adenosine A_{2A} and dopamine D₂ receptors modulates the social recognition memory in reserpine-treated rats. *Behavioural Pharmacology* 16: 209-218, 2005.

Outros trabalhos desenvolvidos durante o período:

- PREDIGER, R.D.S.; Batista, L.C.; Takahashi, R.N. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A₁ and A_{2A} receptors. *Neurobiology of Aging* 26: 957-964, 2005.
- Batista, L.C.; PREDIGER, R.D.S.; Morato, G.S.; Takahashi, R.N. Blockade of adenosine and dopamine receptors inhibits the development of rapid tolerance to ethanol in mice. *Psychopharmacology* Jun 28: 1-8, 2005.
- PREDIGER, R.D.S.; Pamplona, F.A.; Fernandes, D.; Takahashi, R.N. Caffeine improves spatial learning deficits in an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) – the spontaneously hypertensive rat (SHR). *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 8: 1-12, 2005.
- PREDIGER, R.D.S.; Fernandes, D.; Takahashi, R.N. Blockade of adenosine A_{2A} receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. *Behavioural Brain Research* 159: 197-205, 2005.
- PREDIGER, R.D.S.; Batista, L.C.; Takahashi, R.N. Adenosine A₁ receptors modulate the anxiolytic-like effect of ethanol in the elevated plus-maze in mice. *European Journal of Pharmacology* 499: 147-154, 2004.
- PREDIGER, R.D.S.; Batista, L.C.; Takahashi, R.N. Caffeine reverses the olfactory memory impairment in spontaneously hypertensive rats. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 7 (Suppl 1): S387, 2004.

- PREDIGER, R.D.S.; Batista, L.C.; Miyoshi, E.; Takahashi, R.N. Facilitation of short-term social memory by ethanol in rats is mediated by dopaminergic receptors. *Behavioural Brain Research* 153: 149-157, 2004.
- PREDIGER, R.D.S.; Da Silva, G.E.; Batista, L.C.; Bittencourt, A.L.; Takahashi, R.N. Activation of adenosine A₁ receptors reduces anxiety-like behavior during acute ethanol withdrawal (hangover) in mice. *Neuropsychopharmacology*, 2005 (no prelo).
- PREDIGER, R.D.S.; Pamplona, F.A.; Pandolfo, P.; Duarte, F.S.; Ferreira, J.B.; Calixto, R.N.; Takahashi, R.N. Emotional component alters pain response in β -amyloid model of Alzheimer's disease in mice. *European Neuropsychopharmacology* 15 (Suppl 3): S375, 2005.
- PREDIGER, R.D.S.; De-Mello, N.; Takahashi, R.N. Pilocarpine improves olfactory discrimination and social recognition memory deficits in 24 month-old rats. *European Journal of Pharmacology*, 2005 (submetido).
- Pamplona, F.A.; PREDIGER, R.D.S.; Pandolfo, P.; Takahashi, R.N. The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 facilitates the extinction of contextual fear-memory and spatial memory in rats. *European Neuropsychopharmacology*, 2005 (submetido).

1. INTRODUÇÃO

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

Embora estes números reflitam um claro avanço na qualidade de vida de parte da população, eles também alertam para a possibilidade de que num futuro próximo, cresça significativamente o número de pessoas acometidas pelos chamados “males da idade”. A doença de Parkinson (DP), juntamente com a doença de Alzheimer, representam os distúrbios neurodegenerativos relacionados à idade mais comuns em humanos. A prevalência desta doença é de aproximadamente 0,15% da população total mundial, crescendo para 0,5% em pessoas com mais de 50 anos de idade (STOOF et al., 1999).

Segundo o IBGE (2000), existem aproximadamente 222 mil parkinsonianos no Brasil, sendo que 2% dos brasileiros acima dos 60 anos são acometidos por este distúrbio.

A DP tem como principal característica neuropatológica a lesão dos neurônios dopaminérgicos, localizados na substância negra parte compacta (SNc), que enviam projeções para os gânglios da base, ocasionando uma redução nos níveis de dopamina (DA) no estriado (JELLINGER, 1988; LINDNER et al., 1999; BLANDINI et al., 2000; ARAKI et al., 2001b). A segunda característica neuropatológica da DP é o aparecimento de inclusões eosinofílicas citoplasmáticas denominadas corpos de *Lewy*, compostas principalmente pelo acúmulo das proteínas α -sinucleína e ubiquitina (KORCZYN, 1995; HAGAN et al., 1997; BLANDINI et al., 2000). Estas inclusões parecem se acumular em neurônios que se encontram em processo de degeneração, particularmente em neurônios dopaminérgicos da SNc, sendo por esta razão utilizadas como um marcador da DP (KORCZYN, 1995; HAGAN et al., 1997). Os corpos de *Lewy* podem também ser encontrados no cérebro de idosos normais, todavia verificou-se a presença destas inclusões em aproximadamente 85% das autópsias de pacientes clinicamente diagnosticados como portadores da DP.

Desde a sua descrição inicial, feita pelo médico inglês James Parkinson (1817) em seu estudo "*Essay on the shaking palsy*" (Paralisia Agitante), a DP vem sendo caracterizada como um distúrbio do movimento, sendo o seu diagnóstico baseado na presença de dois ou mais sintomas motores (ex: rigidez, bradicinesia, tremor e perda do reflexo postural). Entretanto, os pacientes parkinsonianos somente desenvolvem estes critérios clínicos quando aproximadamente 60-70% dos neurônios da SNc encontram-se degenerados e os níveis estriatais de DA são reduzidos 70-80% (RIEDERER e

WUKETICH, 1976; JELLINGER, 1991; BARRIO ET AL., 1997; LINDNER et al., 1999). O fato do processo neurodegenerativo já encontrar-se bastante avançado quando o diagnóstico é estabelecido, pode ser responsável pela baixa efetividade clínica de diversas drogas e agentes neuroprotetores testados no tratamento desta doença. Portanto, a identificação dos pacientes nos estágios iniciais da DP parece ser essencial para o sucesso de qualquer farmacoterapia.

Posteriormente, Jean Marie Charcot, um dos fundadores da neurologia moderna, sugeriu a mudança de nome da enfermidade, de Paralisia Agitante, para doença de Parkinson (*“la maladie de Parkinson”*), em homenagem à descrição clássica de James Parkinson. Além disso, Charcot acrescentou outras informações à descrição do quadro clínico (como a presença de alteração postural, micrografia, rigidez muscular e bradicinesia), no diagnóstico diferencial e no tratamento da doença (DUVOISIN, 1991). Charcot também discordou da descrição inicial de James Parkinson, quanto à preservação das funções corticais superiores na doença. Ele caracterizou a presença de perda da memória e disfunção cognitiva (MENESES e TEIVE, 1996).

1.1. ETIOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON

A natureza do processo neurodegenerativo verificado na DP não está completamente esclarecida, entretanto, descobertas recentes sugerem que esta poderia estar associada a um estado de estresse oxidativo desencadeado por um ou mais fatores, dentre os quais se destacam: envelhecimento cerebral, predisposição genética, anomalias

mitocondriais, produção de radicais livres e toxinas ambientais (LANGSTON, 1996; OLANOW et al., 1998). Atualmente, a explicação mais atraente é que a DP seja uma doença multifatorial decorrente da combinação de fatores genéticos e ambientais (LANGSTON, 1996).

Além da prevalência da DP ser influenciada pelo avanço da idade (HAGAN et al., 1997), a presença de um componente genético tem sido sugerida por diversos estudos. Levantamentos epidemiológicos verificaram uma taxa de concordância de 45% entre gêmeos monozigóticos e de 29% entre gêmeos dizigóticos (DUVOISAN, 1987; BURN et al., 1992; TANNER et al., 1997). Verificou-se também que 15 a 20% dos pacientes parkinsonianos apresentam uma história familiar desta doença (BANDMANN, 1998). Na avaliação de possíveis genes envolvidos na DP, foram identificadas diferentes mutações nos genes da α -sinucleína (POLYMEROPOULOS et al., 1997; KRUGER et al., 1998; SINGLETON et al., 2003; ZARRANZ et al., 2004), parkin (KITADA et al., 1998) e DJ1 (BONIFATI et al., 2003), em pacientes com história familiar.

Por outro lado, tem crescido nos últimos anos o número de estudos (clínicos e básicos) buscando identificar os diferentes fatores ambientais que podem estar envolvidos na etiologia da DP. Neste sentido, diferentes linhas de evidência sugerem que a exposição a certos agentes ambientais, como: **metais** (TANNER, 1989; HIRSCH et al., 1991; GOOD et al., 1992; YASUI et al., 1992; HERTZMAN et al., 1994; ALTSCHULER, 1999; GORELL et al., 1999), **solventes** (UITTI et al. 1994; PEZZOLI et al., 1996; SEIDLER et al., 1996; DAVIS e ADAIR, 1999; HAGEMAN et al., 1999), **monóxido de carbono** (KLAWANS et al., 1982), e **1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP)** (LANGSTON e BALLARD, 1983 LANGSTON et al., 1983); pode induzir

lesões nigrostriatais e estar associada ao desenvolvimento da DP. Além disso, estudos epidemiológicos têm destacado alguns fatores ambientais que podem estar associados a um aumento nos riscos do desenvolvimento da DP, tais como: **a residência em áreas rurais** (SEMCHUK et al., 1993; LIOU et al., 1997; GORELL et al., 1998; MARDER et al., 1998; FALL et al., 1999), **beber água de poço** (MORANO et al., 1994; MARDER et al., 1998), e **exposição a alguns tipos de herbicidas e pesticidas** (SEMCHUK et al., 1993; LIOU et al., 1997; GORELL et al., 1998; FALL et al., 1999; VANACORE et al., 2002).

A exposição repetida ou prolongada a determinada toxina ambiental parece não ser suficiente para causar a DP, uma vez que o índice de concordância para a doença em indivíduos que vivem em uma mesma área durante longos períodos é baixo. Por outro lado, um agente ambiental poderia influenciar decisivamente nos resultados de indivíduos geneticamente susceptíveis (MENESES e TEIVE, 1996).

1.2. SINTOMAS COGNITIVOS DA DOENÇA DE PARKINSON

Embora a DP seja definida e caracterizada como uma doença do movimento, e contrariando a descrição inicial feita por James Parkinson (1817), atualmente é amplamente aceito que os pacientes parkinsonianos manifestem também prejuízos cognitivos. A deficiência cognitiva é um sintoma comum em pacientes com a DP e tem sido freqüentemente descrito nos estágios iniciais da doença, antes mesmo do aparecimento dos sintomas motores clássicos, sendo que, com o avanço da doença, a

magnitude desses sintomas aumenta (DUBOIS e PILLON, 1997; FAGLIONI et al., 1997; PILLON et al., 1998). Antes de apresentar os principais prejuízos cognitivos observados na DP, faz-se necessário uma breve descrição dos conceitos básicos referentes aos processos de aprendizado e memória.

“Memória” é a aquisição (adquirir, aprender), consolidação (armazenar, guardar) e a evocação (lembrar, recordar, recuperar) de informações (IZQUIERDO, 2002). A *aquisição* abrange a condução da informação ao cérebro via órgãos sensoriais e córtex sensorial primário. Esta etapa depende da atenção e da percepção. Fatores como fadiga, ansiedade e preocupação podem interferir neste processo. A *consolidação* ou *retenção* consiste na conservação do conhecimento através de uma representação significativa no cérebro. Esta etapa é reforçada pela repetição ou pela associação com outros dados já armazenados na memória (IZQUIERDO, 1992). Já a *evocação* ou *recordação* refere-se ao acesso à informação armazenada. Este processo pode ser espontâneo ou ocorrer pela busca voluntária, sendo influenciada por fatores internos (humor, motivação, interesse, etc) e externos (local, ambiente, etc). Além disso, a memória implica na mudança do comportamento, somente podendo ser avaliada através desta mudança. Assim, somente teremos certeza de que determinados conhecimentos ou habilidades foram adquiridos satisfatoriamente, no momento em que termos que utilizá-los e, portanto, recordá-los para a realização de uma tarefa ou atividade. Se não é possível medir a evocação, isto é, a alteração do comportamento, não é possível detectar a existência da memória (SQUIRE, 1986; IZQUIERDO, 1988).

Pelo fato das memórias, tanto dos homens quanto dos demais animais, serem provenientes das suas experiências, é mais sensato falar em “memórias” ou processos de

memória do que simplesmente em “memória”, uma vez que podem existir tantas memórias quanto o número de experiências possíveis (IZQUIERDO, 2002). Como a natureza das experiências vivenciadas é a mais variada possível, é de se esperar que existam diferentes tipos de memórias e que as mesmas estejam relacionadas a diferentes áreas cerebrais.

Atualmente, existem dezenas de diferentes classificações para os processos de aprendizado e memória, que sofrem grande variação conforme o enfoque utilizado pelo autor. De maneira geral, os tipos de memória podem ser classificados de acordo com o seu **tempo de retenção e sua natureza ou conteúdo**.

As memórias podem ser classificadas quanto ao seu **tempo de retenção (ou duração)** em: memórias de longa duração, memórias de curta duração e memórias de trabalho (do inglês “*working memory*”) (McGAUGH, 1966, 1968; GOLD e McGAUGH, 1975; LENT, 2001). A **memória de trabalho** ou **operacional** é muito breve e fugaz e serve para o armazenamento temporário (segundos ou poucos minutos) de informações que serão úteis apenas para o raciocínio imediato e resolução de problemas, podendo ser descartadas (esquecidas) logo a seguir (BADDELEY, 1986; IZQUIERDO e MEDINA, 1991). Ao contrário dos demais tipos de memória, a memória operacional não deixa traços e não produz arquivos. Usamos a memória operacional, por exemplo, para gravarmos números de telefones e para realizarmos contas matemáticas.

Em paralelo, formam-se as **memórias de curta duração**, que duram minutos ou horas e servem para proporcionar a continuidade do nosso sentido do presente. As memórias de curta duração utilizam circuitos neurais que envolvem, entre outras estruturas cerebrais, o *hipocampo* e o *córtex entorrinal*. A principal importância da

memória de curta duração é manter as informações “vivas” no cérebro, permitindo que elas sejam requisitadas (evocadas), durante o período (poucas horas) em que estas informações ainda não foram armazenadas na sua forma definitiva (IZQUIERDO et al., 1998, 1999). Uma vez que estas memórias apresentem relevância para a vida do indivíduo, utilizando os mesmos circuitos neurais (*hipocampo e córtex entorrinal*), bem como outros circuitos ativados posteriormente (ex.: *córtex temporal de associação*), elas poderão formar as **memórias de longa duração**, que são armazenadas durante períodos duradouros (dias, meses ou anos). A formação das memórias de longa duração requer um processo chamado de consolidação, que consiste na alteração da atividade dos circuitos envolvidos através de plasticidade neural. A título de exemplificação, dentre os mecanismos propostos para os fenômenos de plasticidade neural que suportam a formação de memórias estão a potenciação de longa duração (LTP, do inglês “*long-term potentiation*”) e a depressão de longa duração (LTD, do inglês “*long-term depression*”) (BLISS e COLLINGRIDGE, 1993; IZQUIERDO e McGAUGH, 2000).

Por outro lado, as memórias de longa duração podem ser divididas, quanto a sua **natureza ou conteúdo**, em memórias explícitas ou declarativas e memórias implícitas ou não-declarativas (ver LENT, 2001). As **memórias explícitas ou declarativas** são aquelas que registram fatos, eventos ou conhecimentos, sendo chamadas declarativas pelo fato de nós, seres humanos, podermos declará-las e relatá-las como as adquirimos (evocadas conscientemente). Entre elas, as referentes a eventos datados (na maioria das vezes autobiográficos) são denominadas **episódicas** (ex.: recordações do nosso primeiro beijo, do nosso aniversário de 15 anos); já as de conhecimentos gerais, não relacionadas ao tempo (conhecimentos de português, medicina, etc), são chamadas **semânticas**.

Já as **memórias implícitas ou não-declarativas** não são descritas através de palavras e muitas vezes somente percebemos que as possuímos quando somos requisitados a executar determinada ação ou demonstrarmos uma habilidade. Um subtipo de memória implícita é a **memória de procedimento (ou procedural)** que corresponde aquelas capacidades ou habilidades motoras ou sensorias, que são corriqueiramente chamadas de “hábitos”.

Atualmente, existem muitas evidências na literatura de que os diferentes tipos de memória são organizados e controlados por sistemas neuroanatômicos distintos (PACKARD et al., 1989; PACKARD e McGAUGH, 1992; MOSCOVITCH, 1994; MILNER et al., 1998; WHITE e McDONALD, 2002; DA CUNHA et al., 2003). Segundo MOSCOVITCH (1994), a memória teria quatro componentes essenciais: (I) um componente neocortical não-frontal que modula a percepção e a semântica na realização dos testes de memórias implícitas; (II) um componente dos gânglios da base que interfere nos testes de memórias procedurais sensoriomotoras; (III) um componente temporal medial/hipocampal que mediará a aquisição, retenção e evocação de memórias explícitas; (IV) um componente do lobo frontal que controla as memórias operacionais ou de trabalho.

Esta noção de que diferentes tipos de memória seriam controlados por áreas cerebrais distintas tem sido reforçada por estudos utilizando lesões ou administração de drogas em áreas específicas do cérebro de ratos submetidos a diferentes versões dos labirintos aquático e/ou radial. Por exemplo, a lesão do sistema hipocampal prejudica seletivamente o desempenho dos animais nos testes em que a memória espacial é necessária para a sua realização, enquanto que a lesão do caudado-putamen (estriado)

prejudica seletivamente o desempenho nos testes em que se avalia a memória implícita/procedural (ex.: versão do labirinto aquático em que a plataforma é sinalizada por uma pista visual) (PACKARD et al., 1989; PACKARD e MCGAUGH, 1992, 1996; MIYOSHI et al., 2002; DA CUNHA et al., 2003). Além disso, estudos clínicos reforçam a idéia de que lesões hipocampais prejudicam a formação de certos tipos de memória (ex.: memórias episódicas), todavia, não interferem com a formação de memórias implícitas (hábitos) (DUBBOIS e PILLON, 1997; MILNER et al., 1998).

Seguindo esta hipótese, pelo fato dos pacientes parkinsonianos apresentarem uma depleção nos níveis de DA nos gânglios da base (GERLACH e RIEDERER, 1996; BARRIO et al., 1997; BEZARD et al., 1997; LINDNER et al., 1999) e em outras áreas cerebrais, como o córtex pré-frontal (STEBBINS et al., 1999; MARIÉ et al., 1999), seria esperado um prejuízo específico nas memórias implícitas e operacionais, respectivamente. Apesar de existirem divergências na literatura quanto aos tipos de memória que estariam comprometidos na DP, a hipótese mencionada acima parece ser verdadeira. Desta forma, tanto as memórias implícitas (BONDI e KASZNIAK, 1991; FERRARO et al., 1993; RONCACCI et al., 1996) quanto às memórias operacionais (DUBOIS e PILLON, 1997; STEBBINS et al., 1999; COSTA et al., 2003; 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 mais preservadas na DP (FLOWERS et al., 1984; KNOWLTON et al., 1996; DUBOIS e PILLON, 1997; RIEKKINEN et al., 1998).

1.3. SINTOMAS OLFATIVOS DA DOENÇA DE PARKINSON

Além dos prejuízos nos processos de aprendizado e memória já descritos, uma outra função que é extensamente comprometida em pacientes com a DP é a olfação. Embora já venham sendo relatados há mais de 30 anos os prejuízos apresentados por pacientes parkinsonianos na percepção, discriminação e reconhecimento de odores, o sintoma olfativo tem sido praticamente ignorado por pesquisadores e clínicos envolvidos com esta doença. A relativa escassez dos trabalhos nesta área deve-se, em parte, à falta de técnicas e procedimentos capazes de mensurar este comprometimento olfativo em humanos, somado à inexistência de modelos animais que reproduzam tais prejuízos (HAWKES et al., 1999).

O comprometimento da olfação parece não ser um sintoma exclusivo da DP, sendo que indivíduos portadores de outras doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, Coréia de Huntington e a atrofia de múltiplos sistemas, também apresentam tal comprometimento (MOBERG et al., 1987; DOTY et al., 1988; WENNING et al., 1995; MARTZKE et al., 1997; HAWKES et al., 1998, 1999; MESHOLAM et al., 1998).

HAWKES e colaboradores (1999) revisaram uma série de evidências patológicas, fisiopatológicas, neurofisiológicas e genéticas que relacionam alterações olfativas presentes em pacientes parkinsonianos com outras alterações clássicas desta doença. Através da análise “*post-mortem*” do cérebro de oito pacientes clinicamente diagnosticados como portadores da DP, verificou-se uma grande quantidade de *corpos de Lewy* no bulbo olfatório, principalmente no núcleo olfatório anterior, mas estes também

foram encontrados em células mitrais (DANIEL e HAWKES, 1992). Posteriormente, demonstrou-se que havia uma correlação positiva entre a morte neuronal em áreas olfativas com o tempo que o paciente apresentava a doença (PEARCE et al., 1995).

Embora não seja consenso entre os pesquisadores, os prejuízos olfativos apresentados pelos pacientes parkinsonianos parecem não estar relacionados a um único odor específico, e ao contrário dos demais sintomas motores e cognitivos, não progridem com o avanço da doença (DOTY et al., 1984, 1988, 1995; QUINN et al., 1987; HAWKES et al., 1997). Outra característica interessante é que o comprometimento olfativo apresentado pelos pacientes com a DP não é alterado pelo tratamento com drogas anti-parkinsonianas, como a levodopa (L-dopa) (DOTY et al., 1992).

Uma das hipóteses que tem sido utilizada para explicar estes prejuízos olfativos é o de que uma toxina ou agente químico causador da DP (ver anteriormente) poderia usar a cavidade nasal como porta de entrada no organismo (ROBERTS, 1986; HARRISON e PERSON, 1989; HAWKES et al., 1999). Desta forma, em virtude do epitélio olfativo encontrar-se diretamente exposto ao meio ambiente, este poderia representar o primeiro alvo para este suposto agente causador externo, sendo afetado antes mesmo que as alterações nos gânglios da base, que caracterizam a DP, se desenvolvessem (HAWKES et al., 1999).

Em acordo com esta hipótese, estudos clínicos existentes nesta área descrevem que os prejuízos olfativos apresentados por pacientes parkinsonianos podem ser detectados antes mesmo do aparecimento dos sintomas clássicos motores (DANIEL e HAWKES, 1992; DOTY et al., 1995; BERENDSE et al., 2001). BRAAK e colaboradores (2004) revisaram recentemente o progresso temporal/espacial do processo

neurodegenerativo verificado na DP, demonstrando que áreas olfativas, juntamente com o tronco cerebral, são as primeiras áreas acometidas (estágios pré-sintomáticos 1-2) na DP. Em seguida, o processo avança para a SNc e outros núcleos do mesencéfalo e prosencéfalo (estágios 3-4), dando início a fase sintomática clássica (comprometimento motor) da DP. Nos estágios 5-6, o processo neurodegenerativo alcança o neocórtex, fazendo com que a DP se manifeste clinicamente em toda a sua dimensão (BRAAK et al., 2004). Por esta razão, o desenvolvimento de técnicas mais precisas, que permitam mensurar este prejuízo olfativo precocemente, pode vir a representar uma importante ferramenta para o diagnóstico da DP em seus estágios iniciais, melhorando a eficácia do tratamento (DOTY et al., 1984, 1995; DANIEL e HAWKES, 1992; BECKER et al., 2002).

1.4. MODELOS ANIMAIS DA DOENÇA DE PARKINSON

O aumento do conhecimento acerca da fisiopatologia da DP, suas causas, e o desenvolvimento de novas terapias eficazes no alívio dos seus sintomas depende da existência de modelos animais representativos, que permitam a avaliação de novos agentes farmacológicos e estratégias terapêuticas antes que estes sejam aplicados em testes clínicos. A DP é uma das várias doenças humanas que parece não ocorrer espontaneamente em outros animais. Entretanto, as características desta doença podem ser mimetizadas, em maior ou menor escala, em animais de laboratório (como roedores) através da administração de diferentes compostos: reserpina, 6-hidroxidopamina (6-

OHDA), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), paraquate, manebe, rotenona e ferro (para revisão ver GERLACH e RIEDERER, 1996; DAWSON, 2000; BEAL, 2001; SHIMOHAMA et al., 2003).

Segundo WILLNER (1986), a validade de um modelo animal pode ser avaliada por três conjuntos de critérios: **(I) validade preditiva** (“*predictive validity*”), que é avaliada com base na sua capacidade de diferenciar entre drogas que são, ou não são, clinicamente eficazes na patologia humana que está sendo estudada; **(II) validade analógica ou por semelhança** (“*face validity*”), que é avaliada com base nas qualidades comportamentais e farmacológicas cujas semelhanças com o distúrbio humano podem ser demonstradas; **(III) validade teórica ou por homologia** (“*construct validity*”), onde os mesmos processos psicobiológicos responsáveis pela etiologia e fisiopatologia dos sintomas clínicos estejam atuando no modelo.

Embora não exista um modelo animal ideal da DP, que satisfaça todos estes critérios e apresente todas as características associadas à condição clínica, como: (I) fácil detecção das alterações motoras associadas ao parkinsonismo; (II) perda seletiva e gradual dos neurônios dopaminérgicos com o avanço da idade; (III) produção de inclusões citoplasmáticas (corpos de *Lewy*); eles têm sido de grande valia na elucidação dos mecanismos moleculares relacionados à neurodegeneração verificada na DP e na avaliação de novos agentes terapêuticos (SHIMOHAMA et al., 2003).

Por outro lado, grande parte dos estudos realizados até o presente momento utilizando estes modelos animais da DP tem sido focada em seus efeitos sobre a via dopaminérgica nigrostriatal e a indução de comprometimentos motores nos animais. Entretanto, como a DP está associada com alterações em uma variedade de funções,

incluindo alterações afetivas (SANTAMARIA et al., 1986; CUMMINGS, 1992); cognitivas (OWEN et al., 1995; DUBOIS e PILLON, 1997; GOLDMAN et al., 1998) e olfativas (DOTY et al., 1988,1995; HAWKES et al., 1998,1999), torna-se importante avaliar se estes modelos animais são também capazes de reproduzir algumas destas alterações.

Não nos aprofundaremos na descrição dos diferentes modelos animais da DP, em virtude deste não ser o objetivo do presente trabalho (para revisão ver GERLACH e RIEDERER, 1996; DAWSON, 2000; BEAL, 2001; DAUER e PRZEDBORSKI, 2003; SHIMOHAMA et al., 2003). Entretanto, faremos uma breve descrição dos modelos da administração de reserpina e do MPTP, em razão destes terem sido utilizados ao longo dos protocolos experimentais que compõem esta tese.

A administração sistêmica de reserpina (por via subcutânea ou intraperitoneal) tem sido utilizada como um modelo farmacológico para o estudo da DP em roedores, uma vez que esta interfere com o armazenamento vesicular de monoaminas, levando a uma depleção temporária nos níveis de monoaminas nas terminações nervosas, induzindo, conseqüentemente, hipolocomoção e rigidez muscular nos animais (CARLSSON, 1975; COLPAERT, 1987; GERLACH e RIEDERER, 1996; MENZAGHI et al., 1997; DAWSON et al., 2000). Mais recentemente, o uso de doses mais baixas de reserpina (0,5 – 1,0 mg/kg) tem sido proposto como um modelo válido para o estudo dos prejuízos cognitivos (ALVES et al., 2000) e sintomas depressivos (SKALISZ et al., 2002) associados à DP. Entretanto, até o presente momento nenhum estudo havia avaliado o potencial da administração de reserpina como um modelo experimental para o estudo dos prejuízos olfativos associados à DP.

A administração de reserpina parece não representar um bom modelo da DP no critério da validade teórica (“*construct validity*”), uma vez que esta induz uma redução nos níveis de monoaminas de maneira inespecífica e não reproduz o avanço gradual do processo neurodegenerativo (GERLACH e RIEDER, 1996). Entretanto, é interessante notar que este modelo tem sido utilizado freqüentemente para o estudo das alterações motoras associadas à DP (COLPAERT, 1987; KAUR e STARR, 1995; MENZAGHI et al., 1997; MOO-PUC et al., 2004), sendo que várias drogas anti-parkinsonianas utilizadas na clínica (ex.: agonistas dopaminérgicos, associação de levodopa e benzerazida, amantadina, etc) têm se mostrado capazes de melhorarem estas alterações motoras induzidas pela administração de reserpina (MENZAGHI et al., 1997). Isto sugere que a administração sistêmica de reserpina representa um bom modelo para o estudo da DP segundo os critérios de validade preditiva (“*predictive validity*”) e validade por analogia ou semelhança (“*face validity*”).

Um importante avanço no desenvolvimento dos modelos animais da DP, bem como do conhecimento acerca dos mecanismos relacionados ao processo neurodegenerativo desta doença, deu-se com a descoberta do 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). De maneira interessante, o uso do MPTP foi um dos raros casos em que os efeitos da neurotoxina foram descobertos primeiro em humanos, sendo posteriormente desenvolvido o modelo animal. A capacidade do MPTP em lesar seletivamente neurônios dopaminérgicos foi descoberta de maneira acidental em 1976, na Califórnia, quando um grupo de jovens dependentes de heroína começou a apresentar sintomas típicos da DP. A análise da “heroína” utilizada revelou a existência do MPTP como resíduo contaminante (DAVIS et al., 1979; LANGSTON et al., 1983; BALLARD

et al., 1985). A partir deste momento, a administração do MPTP a animais de laboratório (principalmente roedores e primatas) passou a ser utilizado como um modelo para o estudo da DP (para revisão ver GERLACH e RIEDERER, 1996; DAWSON, 2000; BEAL, 2001; DAUER e PRZEDBORSKI, 2003; SHIMOHAMA et al., 2003).

O mecanismo da neurotoxicidade induzida pelo MPTP envolve, inicialmente, sua fácil passagem pela barreira hemato-encefálica em virtude da sua elevada lipofilicidade (MARKEY et al., 1984). No cérebro, o MPTP é convertido no íon 1-metil-4-fenil piperidínio (MPP^+) pela ação da enzima monoamina oxidase B (MAO-B), sendo esta conversão realizada principalmente nas células da glia. O MPP^+ é então captado pelo sistema de transporte da dopamina nos terminais dopaminérgicos nigroestriatais, sendo este o fator determinante para a relativa seletividade do MPTP sobre neurônios dopaminérgicos. No citosol do neurônio dopaminérgico, o MPP^+ poderá seguir três caminhos distintos: (I) ser captado por transportadores vesiculares de monoaminas e acumular-se em vesículas, o que inibe temporariamente o seu efeito neurotóxico (LIU et al., 1992; TAKAHASHI et al., 1997); (II) concentrar-se na mitocôndria, onde o MPP^+ inibe o complexo I da cadeia de transporte de elétrons, o que acarreta uma redução na produção de adenosina trifosfato (ATP) e aumento na formação de radicais livres (LANGSTON et al., 1984; RAMSAY e SINGER, 1986; TIPTON e SINGER, 1993; BEAL, 2001); (III) permanecer no citosol, onde irá interagir com enzimas citosólicas, principalmente aquelas contendo cargas negativas (KLAIDMAN et al., 1993).

Existem diferentes hipóteses sobre o mecanismo de neurotoxicidade induzido pelo acúmulo do íon MPP^+ em neurônios dopaminérgicos, dentre as quais nós destacamos duas:

1. *Formação de espécies reativas de oxigênio e “Estresse oxidativo”*: a inibição do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial pelo íon MPP^+ , além de reduzir a produção de ATP, estimula a produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO), principalmente de ânions superóxidos (HASEGAWA et al., 1990; 1997; SRIRAM et al., 1997).

Enquanto radical livre é definido como qualquer molécula que possui elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo (como o ânion superóxido, O_2^-) (MARKS et al., 1996; YOUNES, 1999), ERO é um termo mais abrangente, incluindo os radicais livres e as espécies não radicalares, como por exemplo: o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânions superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH^\cdot) e radicais hidroperoxil (HO_2) (HALLIWEL e GUTTERIDGE, 1999). Durante o metabolismo basal das células aeróbicas existe uma produção constante de ERO, acompanhada pela contínua inativação destes através da ação de agentes antioxidantes (como a glutatona reduzida, vitamina C, etc), de modo a manter a integridade estrutural e funcional da célula. A condição de estresse oxidativo é definida como um distúrbio no balanço pró/antioxidante, em favor do primeiro, podendo acarretar dano ao DNA, lise mitocondrial, influxo e desbalanço intracelular de cálcio, oxidação de proteínas e lipoperoxidação de membranas celulares e, conseqüentemente, dano celular (MARKS et al., 1996; SIES, 1997; HALLIWELL, 2001). Corroborando com esta hipótese do envolvimento da geração de ERO no mecanismo de neurotoxicidade induzido pelo MPTP, camundongos transgênicos que apresentam uma expressão aumentada das enzimas antioxidantes Cu/Zn superóxido dismutase (SOD-1) e Mn superóxido dismutase (SOD-2) são mais resistentes à toxicidade do MPTP (PRZEDBORSKI et al., 1992; KLIVENYI et al., 1998). Em

contrapartida, os efeitos neurotóxicos do MPTP são exacerbados em camundongos que apresentam deficiência destas enzimas (ZHANG et al., 2000; ANDREASSEN et al., 2001). Além disso, tem sido demonstrado que o tratamento com diferentes antioxidantes, como a vitamina E, β -caroteno e ácido ascórbico, é capaz de atenuar a neurotoxicidade induzida pelo MPTP em camundongos (PERRY et al., 1985; ODUNZE et al., 1990). Entretanto, as alterações na geração de ERO apresentam uma resposta máxima algumas horas após a administração do MPTP, sendo que a morte neuronal induzida pelo MPTP ocorrerá somente após alguns dias desta administração (JACKSON-LEWIS et al., 1995). Portanto, a geração de ERO parece ser um dos eventos iniciais no mecanismo de neurotoxicidade induzido pelo MPTP, que embora não seja o responsável direto pela morte neuronal, funcionará como um ativador de diferentes eventos celulares que acarretarão a morte dos neurônios dopaminérgicos (para revisão ver DAUER e PRZEDBORSKI, 2003; PRZEDBORSKI e VILA, 2003; PRZEDBORSKI et al., 2003).

2. *Apoptose mediada por proteínas quinases de c-Jun N-terminal (JNK)*: um dos aspectos que permanece controverso quanto ao mecanismo de toxicidade do MPTP/ MPP⁺, é com relação a morte dos neurônios dopaminérgicos ser decorrente de um processo de apoptose ou necrose.

Embora não exista um consenso na literatura, tem sido postulado que baixas doses de MPTP/ MPP⁺ levariam à um processo de apoptose, enquanto que doses mais elevadas de MPTP/ MPP⁺, capazes de induzirem uma toxicidade aguda, estariam associadas à um processo de necrose (ver Nicotra e Parvez, 2000, 2002). Por outro lado, a JNK representa um grupo de proteínas que fosforilam o domínio N-terminal do fator de transcrição c-Jun,

regulando a atividade do fator de transcrição AP-1 (DAVIS, 2000). Um crescente número de trabalhos tem indicado que a JNK pode regular o processo de morte celular programada (apoptose) induzido pelo MPTP. Por exemplo, elevadas concentrações de dopamina aumentam a atividade da JNK no estriado, o que é acompanhado por processo de apoptose (LUO et al., 1998). SAPORITO e colaboradores (2000) demonstraram que o tratamento com MPTP é capaz de aumentar a ativação da JNK na substância negra de camundongos. Além disso, tem sido demonstrado que inibidores seletivos da JNK são capazes de atenuar a perda de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal induzida pelo MPTP em camundongos (SAPORITO et al., 1999; WANG et al., 2004), o mesmo sendo observado em camundongos com deleção gênica da JNK (HUNOT et al., 2004).

Uma outra característica importante do MPTP é que a sua toxicidade e os sintomas derivados da sua administração apresentam grande variação conforme a espécie estudada. Em primatas (homens, macacos e babuínos), o MPTP induz sintomas que são praticamente indistinguíveis da DP, como degeneração de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal, aparecimento de agregados da proteína α -sinucleína (embora não existam corpos de *Lewy* característicos), além de distúrbios motores clássicos da DP, como tremores, rigidez muscular, bradicinesia e instabilidade postural (LANGSTON et al., 1983; BURNS et al., 1983; KOPIN e MARKEY, 1988; FORNO et al., 1993; VARASTET et al., 1994; BEAL, 2001). De maneira similar ao observado na DP, a neurotoxicidade e os sintomas induzidos pelo MPTP aumentam com o avanço da idade em primatas (ROSE et al., 1993; OVADIA et al., 1995), podendo estes serem revertidos quando tratados com levodopa e agonistas dopaminérgicos (LANGSTON e IRWIN,

1986; KOPIN e MARKEY, 1988). Por outro lado, a principal dificuldade do uso da administração de MPTP em primatas como um modelo animal da DP é que este induz um processo neurodegenerativo rápido, contrastando com o avanço lento e gradual verificado na condição clínica. Entretanto, estudos mais recentes (BEZARD et al., 1997, 2001) têm demonstrado que a administração crônica de MPTP em macacos é capaz de induzir uma degeneração lenta e progressiva da neurotransmissão dopaminérgica.

Já roedores (ratos e camundongos) parecem ser menos sensíveis à neurotoxicidade induzida pelo MPTP quando comparados aos primatas, além de não apresentarem toda a sintomatologia característica da DP. Em camundongos, os efeitos da administração sistêmica do MPTP são dependentes do regime do tratamento, da linhagem estudada e da idade dos animais (IRWIN et al., 1992, 1993; SEDELIS et al., 2000, 2001; SCHMIDT e FERGER, 2001). Tem sido demonstrado que a linhagem C57BL6 apresenta uma maior sensibilidade aos efeitos do MPTP quando comparada às demais linhagens de camundongos (SEDELIS et al., 2000, 2001). Além disso, a exemplo do ocorrido com primatas, os efeitos do MPTP aumentam com o avanço da idade nestes animais (IRWIN et al., 1992, 1993). Por razões de praticidade e logística, a administração sistêmica de MPTP em camundongos tem sido um dos modelos animais mais empregados no estudo dos mecanismos de neurotoxicidade associados à DP, bem como para o teste de novos agentes terapêuticos para esta doença (HEIKKILA et al., 1984; ARAI et al., 1990; ARAKI et al., 2001a; SCHMIDT e FERGER, 2001).

Por outro lado, tem sido demonstrado que ratos são particularmente resistentes aos efeitos do MPTP quando este é administrado sistemicamente (CHIUEH et al., 1984; KALARIA et al., 1987). Embora as razões para esta resistência não estejam totalmente

esclarecidas, alguns autores sugerem que isto poderia ser decorrente de diferenças no metabolismo do MPTP (JOHANNESSEN et al., 1985), na retenção ou distribuição do seu metabólito MPP⁺ (LANGSTON, 1985), ou ainda da presença de altos níveis da enzima MAO-B (ver acima) nos capilares cerebrais de ratos, o que constituiria uma espécie de barreira “enzimática” hemato-encefálica (KALARIA et al., 1987). Esta resistência aos efeitos neurotóxicos da administração sistêmica do MPTP exibida por ratos é o principal fator responsável pelo limitado número de trabalhos destinados a investigar as ações desta neurotoxina em ratos, chegando ao extremo de alguns autores desaconselharem o emprego do modelo do MPTP nesta espécie (SCHMIDT e FERGER, 2001).

Entretanto, HARIK e colaboradores (1987) demonstraram que a infusão de uma dose elevada de MPTP (200 µg) na SNc de ratos é capaz de causar uma lesão parcial desta estrutura, reduzindo significativamente os níveis de DA e seus metabólitos no estriado. Posteriormente, demonstrou-se que a infusão bilateral de MPTP (100 µg) na SNc de ratos é capaz de induzir uma redução de 40-70% no número de células imunorreativas para a enzima tirosina hidroxilase (enzima crítica na síntese de DA e utilizada como um marcador de neurônios dopaminérgicos) na SNc (DA CUNHA et al., 2001; GEVAERD et al., 2001a), além de causar uma redução de 30-50% nos níveis de DA no estriado dorsal (GEVAERD et al., 2001a). Uma característica importante desta administração bilateral de MPTP na SNc de ratos é a sua capacidade de induzir prejuízos no desempenho destes em diferentes modelos de aprendizado e memória, sem alterar significativamente a função motora dos animais (DA CUNHA et al., 2001, 2002, 2003; GEVAERD et al., 2001a,b; MIYOSHI et al., 2002; BELLISSIMO et al., 2004; BRAGA et al., 2005; FERRO et al., 2005). Uma vez que o estágio inicial da DP é caracterizado

por uma lesão parcial da SNc, prejuízos cognitivos e ausência dos sintomas motores, Da Cunha e colaboradores (2001, 2002) têm proposto a administração bilateral de MPTP na SNc de ratos como um modelo para o estudo dos prejuízos cognitivos associados à DP.

1.5. INTERAÇÃO ENTRE OS SISTEMAS DOPAMINÉRGICO E ADENOSINÉRGICO

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o consumo de café pode estar associado a um menor risco de desenvolvimento futuro da DP, sendo a cafeína o constituinte responsável por este efeito (HELLENBRAND et al., 1996; FALL et al., 1999; ROSS et al., 2000; ASCHERIO et al., 2001; ROSS e PETROVITCH, 2001; GALE e MARTYN, 2003; TAN et al., 2003). Os efeitos centrais da cafeína são decorrentes, principalmente, por sua ligação e bloqueio (de maneira inespecífica) dos receptores para adenosina no cérebro. A adenosina, produzida em vários tecidos como um subproduto da degradação do ATP, desempenha diferentes funções na modulação da atividade de tecidos periféricos e centrais (FREDHOLM, 1995; DAVAL et al., 1996). Até o presente momento, quatro subtipos de receptores para a adenosina (A_1 , A_{2A} , A_{2B} and A_3) foram clonados e caracterizados em diferentes espécies de mamíferos, incluindo humanos e ratos, sendo que todos eles pertencem a família dos receptores acoplados à proteína-G (FREDHOLM et al., 2001). Os receptores A_1 e A_3 para adenosina encontram-se, na maioria das vezes, acoplados a proteínas G inibitórias (G_i), promovendo uma inibição da enzima adenilato ciclase e, conseqüentemente, redução nos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPC). Por outro lado, os receptores A_{2A} e A_{2B} para adenosina

estão acoplados a proteínas G estimulatórias (Gs), levando a um aumento na atividade da enzima adenilato ciclase e nos níveis de AMPc (DALY et al., 1983; SVENNINGSSON et al., 1999; FREDHOLM et al., 2001).

Um número crescente de evidências tem demonstrado que a adenosina apresenta efeitos opostos aos da DA no SNC. A ativação motora induzida por antagonistas dos receptores da adenosina (como a cafeína) é inibida pela depleção de DA ou pelo bloqueio dos receptores da DA. Além disso, agonistas adenosinérgicos inibem, enquanto antagonistas adenosinérgicos potencializam, a estimulação motora induzida por agonistas dopaminérgicos (ver FERRE et al., 1997, 2001; FRANCO et al., 2000). Uma descoberta chave neste processo é a co-localização dos receptores D_1/A_1 e D_2/A_{2A} no estriado, inicialmente observado em ratos (FERRE et al., 1991), e posteriormente também descrito em humanos (DIAZ-CABIALE et al., 2001) (ver Figura 1).

Estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem que o mecanismo desta interação entre os receptores de DA e adenosina pode envolver a formação de heterodímeros, levando a alterações alostéricas que afetam a afinidade e o acoplamento com a proteína-G, modulando a eficácia da ativação do receptor. Desta forma, a estimulação dos receptores da adenosina diminui a afinidade de ligação de agonistas dopaminérgicos com os receptores da DA. Ou seja, em geral, os agonistas da adenosina produzem efeitos similares aos dos antagonistas da DA, enquanto que os efeitos dos antagonistas da adenosina assemelham-se aqueles induzidos por agonistas dopaminérgicos (FUXE et al., 1998).

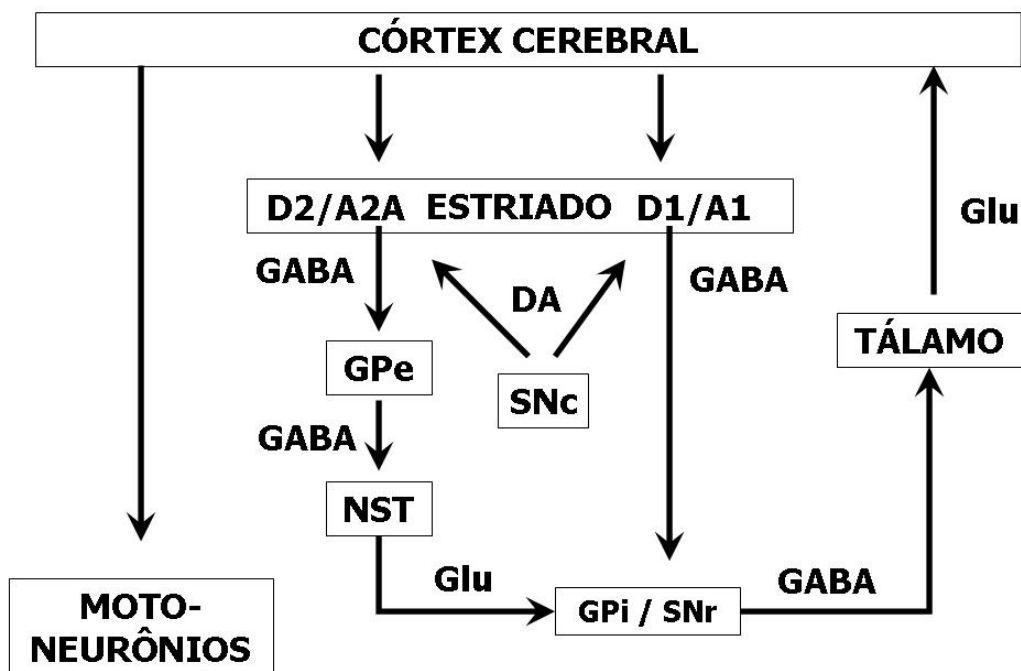


Figura 1. Representação esquemática do circuito cortico-gânglio basal-talâmico-cortical. As siglas A1 e A2A referem-se aos subtipos de receptores para a adenosina. As siglas D1 e D2 referem-se aos subtipos de receptores para dopamina. As demais siglas referem-se as estruturas que compõem os gânglios da base: GPe (globo pálido externo), GPi (globo pálido interno), SNc (substância negra parte compacta), SNr (substância negra parte reticulada), NST (núcleo subtalâmico), além dos neurotransmissores presentes no circuito: DA (dopamina), GLU (glutamato), GABA (ácido gama-aminobutírico) (Adaptado de BERGMAN et al., 1998).

Dentre os quatro subtipos de receptores para a adenosina, o receptor A_{2A} é aquele que tem atraído maior atenção como possível alvo para o tratamento da DP (MALLY e STONE, 1998; FERRE et al., 2001; MORELLI e PINNA, 2001; MORELLI, 2003). O potencial terapêutico da cafeína e de antagonistas seletivos do receptor A_{2A} para

adenosina no tratamento da DP tem sido confirmado em diversos estudos utilizando modelos animais desta doença. A cafeína e antagonistas seletivos do receptor A_{2A} para adenosina promovem rotação contralateral em ratos que sofreram lesão unilateral da SNc por 6-OHDA (SVENNINGSSON et al., 1999), reduzem a catalepsia induzida por antagonistas do receptor D_2 para dopamina (HAUBER et al., 2001), além de atenuarem a perda de neurônios dopaminérgicos estriatais induzidas pelo tratamento com MPTP em camundongos (CHEN et al., 2001). Além disso, a cafeína é também capaz de reverter os prejuízos cognitivos induzidos pela administração intranigral de MPTP em ratos (GEVAERD et al., 2001b), indicando que a cafeína e antagonistas do receptor A_{2A} para adenosina podem ser úteis no controle dos sintomas motores e cognitivos associados à DP.

Diante do exposto acima e ressaltando a limitada literatura relacionando os prejuízos cognitivos e olfativos em modelos animais da DP, o presente trabalho foi desenvolvido para testar, inicialmente, a hipótese de que ratos reserpinados apresentam prejuízo em testes de discriminação olfativa e memória social, e que este prejuízo pode ser revertido pela administração de agonistas dopaminérgicos e antagonistas adenosinérgicos.

Em segundo lugar, buscamos também testar a hipótese de que o MPTP pode ser absorvido pela via intranasal, causando alterações neuroquímicas (como a redução dos níveis de dopamina) que resultarão em prejuízo olfativo, cognitivo e motor. Na eventuais alterações cerebrais causadas pelo MPTP, investigar se seus mecanismos relacionam-se aos processos de estresse oxidativo e apoptose.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o desempenho dos animais tratados com reserpina (via intraperitoneal) nas tarefas de discriminação olfativa, teste de reconhecimento social (memória olfativa de curta-duração), e atividade locomotora, quando tratados com cafeína, antagonistas seletivos adenosinérgicos e agonistas seletivos dopaminérgicos.

- Estudar o efeito da administração intranasal de MPTP no desempenho de ratos nas tarefas de discriminação olfativa, teste de reconhecimento social, atividade locomotora, e em três versões da tarefa do labirinto aquático de Morris (memória operacional, memória de procedimento e memória espacial de referência).

- Estudar o efeito da administração intranasal de MPTP sobre as concentrações extracelulares de dopamina e seus metabólitos no bulbo olfatório, estriado, córtex pré-frontal e hipocampo de ratos através da cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).

- Avaliar o efeito do tratamento intranasal com MPTP sobre a expressão da enzima tirosina hidroxilase no bulbo olfatório e substância negra de ratos através da técnica de imunodeteção de proteínas (“*western blot*”).

- Investigar uma possível indução de “estresse oxidativo” em diferentes áreas cerebrais (bulbo olfatório, estriado, substância negra e hipocampo) de ratos pela administração intranasal de MPTP, avaliado através da medida de parâmetros antioxidantes: glutathiona total (GSH-t) e da atividade das enzimas glutathiona redutase (GR) e glutathiona peroxidase (GPx).

- Avaliar o efeito do tratamento intranasal com MPTP sobre a ativação da proteína JNK no bulbo olfatório e substância negra de ratos através da técnica de imunodeteccção de proteínas (“*western blot*”).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos com aproximadamente 3 meses de idade e peso corporal variando entre 240 e 320 g provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Para o teste de Reconhecimento Social, foram utilizados além desses animais, ratos Wistar machos jovens com aproximadamente 1 mês de idade e peso corporal variando entre 100 e 150 g. Os animais foram alojados em grupos de seis animais por caixa (42 x 34 x 17 cm) e mantidos em condições controladas de umidade e temperatura ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas das 7:00 às 19:00 h), tendo livre acesso à água e à comida. Todos os procedimentos experimentais utilizados no presente estudo foram conduzidos cuidadosamente de acordo com as normas previstas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA/UFSC).

3.2. DROGAS

Reserpina (Sigma Chemical Co., USA) foi dissolvida em 50 μl de ácido acético glacial e salina (NaCl 0,9%), e foi administrada pela via intraperitoneal (i.p.) na dose de 1 mg/kg de peso corporal, 24 h antes dos experimentos.

MPTP-HCl (Sigma Chemical Co., USA) foi dissolvido em etanol 10% v/v, e administrado pela via intranasal na concentração de 0,2 mg/narina (solução 2 mg/ml).

Cafeína (Sigma Chemical Co., USA), antagonista não seletivo dos receptores para adenosina, foi dissolvido em salina com 10% de dimetilsufóxido (DMSO), e administrado i.p. nas doses de 3; 10 ou 30 mg/kg, 30 min antes dos experimentos.

8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX) (Tocris Cookson, USA), antagonista seletivo dos receptores A₁ para adenosina, foi dissolvido em salina com 10% de dimetilsufóxido (DMSO), e foi administrado i.p. nas doses de 0,5; 1 ou 3 mg/kg, 30 min antes dos experimentos.

4-(2-[7-amino-2-{2-furyl} {1,2,4}triazolo-{2,3-a} {1,3,5}triazin-5-yl-amino] ethyl)phenol (ZM241385) (Tocris Cookson, USA), antagonista seletivo dos receptores A_{2A} para adenosina, foi dissolvido em salina com 10% de dimetilsufóxido (DMSO), e foi administrado i.p. nas doses de 0,1; 0,5 ou 1,0 mg/kg, 30 min antes dos experimentos.

7,8-dihidroxi-1-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1H-3 benzazepina (SKF 38393) (Research Biochemicals International, USA), agonista seletivo D₁ para dopamina, foi dissolvido em salina, e administrado i.p. nas doses de 0,5; 1 ou 3 mg/kg, 15 min antes dos experimentos.

Quinpirole (Research Biochemicals International, USA), agonista seletivo D₂ para dopamina, foi dissolvido em salina e administrado i.p. nas doses de 0,01; 0,05 ou 0,1 mg/kg, 15 min antes dos experimentos.

As soluções controles utilizadas foram: salina com 50 µl de ácido acético glacial para a reserpina; etanol 10% v/v para o MPTP; salina com DMSO 10% para cafeína, DPCPX e ZM241385; e salina para SKF 38393 e quinpirole.

3.3. ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE MPTP

A administração intranasal de MPTP em ratos foi realizada utilizando um procedimento semelhante ao descrito por DLUZEN e KEFALAS (1996). Os animais foram levemente anestesiados com éter e receberam a infusão bilateral (nas duas narinas) de MPTP na dose de 0,2 mg/narina (solução 2,0 mg/ml). A infusão do MPTP foi realizada com o auxílio de um tubo de polietileno (PE 50), que foi inserido cerca de 10 mm de profundidade na narina dos animais. O tubo de polietileno foi conectado a uma micro-seringa de 25 µl (Hamilton, USA) acoplada à uma bomba de infusão (Insight, Brasil), permitindo o controle da velocidade (12.5 µl/min) e do volume (50 µl/narina) de infusão.

3.4. MODELOS COMPORTAMENTAIS

3.4.1. Campo aberto

Para avaliarmos possíveis alterações locomotoras induzidas pelos diferentes tratamentos utilizados, os animais foram testados durante 5 min no campo aberto. O aparato, feito de madeira e fórmica, é formado por um chão de cor branca (100 x 100 cm), dividido em 25 quadrantes de 20 x 20 cm, com paredes brancas de 40 cm de altura. Durante os experimentos, cada rato foi colocado no centro do campo aberto, sendo que um sistema de câmera de vídeo captava as imagens do campo aberto, sendo registrado o número de quadrantes cruzados e os atos de levantar.

3.4.2. Teste de discriminação olfativa

A discriminação olfativa dos animais foi avaliada através do teste de discriminação olfativa, previamente descrito por SOFFIÉ e LAMBERTY (1988) e, posteriormente, modificado em nosso laboratório (PREDIGER et al., 2005a,b). O teste consistiu em isolar os animais 48 horas antes do início dos experimentos em caixas individuais (42 x 34 x 17 cm) para que haja uma padronização da impregnação do odor. A caixa de discriminação olfativa consiste em dois compartimentos idênticos (30 x 30 x 20 cm) separados por uma porta aberta que permite o acesso dos animais para os dois compartimentos. O chão de um dos compartimentos foi forrado com a serragem retirada da gaiola na qual o animal ficou isolado por 48 horas, enquanto que o outro compartimento foi forrado com serragem limpa e inodora. O experimento consistiu em colocar o rato na caixa de discriminação olfativa e registrou-se, durante um período de 5 minutos, o tempo que o animal gastou investigando cada um dos compartimentos. A discriminação olfativa foi avaliada pela preferência do rato em ficar no compartimento impregnado com o seu cheiro (compartimento familiar) em relação ao compartimento inodoro (não-familiar), visto que nesta situação, tem sido demonstrado que ratos machos adultos preferem permanecer em ambientes impregnados com seu próprio cheiro (CAR et al., 1976; PREDIGER et al., 2005a,b).

3.4.3. Teste de reconhecimento social

O experimento foi realizado utilizando o procedimento descrito por DANTZER e colaboradores (1987) e recentemente padronizado em nosso laboratório (PREDIGER e TAKAHASHI, 2003; PREDIGER et al., 2004). Os ratos adultos (3 meses de idade) foram isolados em caixas de plástico individuais por 7 dias antes do experimento. O teste de reconhecimento social consiste em duas apresentações sucessivas (5 min cada), separadas por um intervalo variável. Durante a primeira apresentação, um rato jovem (1 mês de idade) foi colocado na gaiola-moradia do rato adulto, e registrou-se o tempo que o rato adulto gastou investigando (cheirar, lambar, se aproximar, etc) o rato jovem. Ao final da primeira apresentação, o rato jovem foi retirado da caixa do rato adulto, ficando isolado em uma outra caixa durante o intervalo entre as apresentações. Após um intervalo de 30 min, o rato jovem foi reapresentado ao rato adulto, registrando-se novamente o tempo de investigação gasto pelo rato adulto durante a segunda apresentação.

O que acontece neste modelo é que quando o mesmo rato jovem (familiar) é reapresentado após um intervalo pequeno (menor que 40 minutos), o rato adulto “reconhece” este rato jovem, sendo verificada uma redução no tempo de investigação durante a segunda apresentação. Esta redução não é decorrente de uma simples habituação por parte do rato adulto, uma vez que não é observada quando um rato jovem diferente (não-familiar) daquele utilizado no primeiro encontro é apresentado ao rato adulto. Além disso, quando o intervalo entre as duas apresentações é estendido para uma ou duas horas, o rato adulto perde a capacidade de reconhecer o rato jovem com o qual

foi previamente exposto, não sendo registrada diferença significativa no comportamento investigatório durante as duas apresentações (DANTZER et al., 1987; PREDIGER e TAKAHASHI, 2003; PREDIGER et al., 2004).

Por esta razão, o teste de reconhecimento social vem sendo utilizado como um modelo válido para o estudo da memória olfativa de curta duração, sendo que um intervalo reduzido (30 minutos) entre as duas apresentações ao rato jovem é utilizado para demonstrar possíveis efeitos “amnésicos” de diferentes drogas e procedimentos. Por outro lado, um intervalo mais longo (120 minutos) tem sido selecionado como uma janela temporal sensível a tratamentos ou manipulações que aumentam ou facilitam esta memória social (DANTZER et al., 1987; PREDIGER e TAKAHASHI, 2003; PREDIGER et al., 2004).

3.4.4. Teste do labirinto aquático de Morris

O labirinto aquático consiste de um tanque circular de cor preta (1,7 m de diâmetro e 80 cm de altura), baseado no modelo proposto por MORRIS e colaboradores (1982), e localizado no interior de uma sala com várias pistas visuais fixadas nas paredes. O tanque foi preenchido com água até a altura de 60 cm, sendo a temperatura da água mantida à temperatura constante (25 ± 2 °C) através de um sistema automatizado de resistências. Foram estabelecidas 4 posições de partida (Norte, Sul, Leste e Oeste) que dividiam a superfície do labirinto em 4 quadrantes (Nordeste, Noroeste, Sudeste e Sudoeste). A plataforma utilizada para os testes com a plataforma submersa (testes de memória operacional e memória espacial de referência) era de acrílico transparente (10 x

10 cm) e foi submersa 1 cm da superfície da água. Para o teste com pista visual (teste da memória de procedimento), uma bola de cor branca (7 cm de diâmetro) foi fixada sobre a superfície superior da plataforma submersa, permitindo que a bola permaneça visível sobre a superfície da água.

Durante os experimentos, um sistema de câmera de vídeo captava as imagens do labirinto aquático, sendo estas gravadas em fitas VHS e a latência gasta pelos animais para encontrar a plataforma foram analisadas posteriormente.

- **Versão memória operacional:** os animais foram submetidos a 4 treinos por dia, durante 5 dias, no labirinto aquático. Em cada dia os animais eram liberados de 4 pontos de partida diferentes de forma pseudoaleatória. A plataforma submersa permaneceu em uma mesma posição durante todas as sessões do dia, mas entre um dia e outro foi trocada de posição. O animal foi liberado para nadar até encontrar a plataforma ou até um tempo máximo de 60 s. Caso o animal não encontrasse a plataforma nesse tempo, ele era levado manualmente até a plataforma e deixado nesta por 30 s. Os tempos de latência para o animal encontrar a plataforma foram registrados. Após os 30 s, o animal era colocado no ponto de partida seguinte.

- **Versão memória espacial de referência:** os animais foram submetidos a 6 treinos no labirinto aquático (durante um único dia). Em cada treino os animais foram liberados de pontos de partida diferentes de forma pseudoaleatória. A plataforma submersa permaneceu em uma mesma posição (Sudeste) durante todo o treinamento. No dia do teste (48 h após o treinamento), repetiu-se o procedimento do dia de treinamento com a exceção do número de sessões terem sido reduzidas para 3. O animal foi liberado para nadar até encontrar a plataforma ou até um tempo máximo de 60 s. Caso o animal

não encontrasse a plataforma nesse tempo, ele era levado manualmente até a plataforma onde permanecia por 10 s. Os tempos de latência até o animal encontrar a plataforma foram registrados. Após os 10 s, o animal foi retirado da plataforma e colocado em uma caixa fora do labirinto aquático por 20 s, sendo que em seguida ele era colocado no próximo ponto de partida.

- **Versão memória de procedimento** (com pista visual): os animais foram submetidos a 4 treinos por dia, durante 4 dias, no labirinto aquático. Em cada treino os animais foram liberados dos 4 pontos de partida diferentes (Norte, Sul, Leste, Oeste) e a **plataforma visível** foi sendo trocada de posição em cada treino entre os 4 diferentes quadrantes (Nordeste, Noroeste, Sudeste, Sudoeste). O animal foi liberado para nadar até encontrar a plataforma ou até um tempo máximo de 60 s. Caso o animal não encontrasse a plataforma nesse tempo, ele era levado manualmente até a plataforma onde permanecia por 10 s. Os tempos de latência até o animal encontrar a plataforma foram registrados. Após os 10 s, o animal era retirado da plataforma e colocado em uma caixa fora do labirinto aquático por 20 s. Nesse intervalo era efetuada a troca de posição da plataforma para o treino seguinte. A posição de partida e a posição da plataforma foram arranjadas de modo que as distâncias (proximal e distal) fossem contrabalançadas entre os treinos.

3.5. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS CEREBRAIS DE DOPAMINA – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO (HPLC)

Com o objetivo de verificar possíveis alterações nos níveis de dopamina (DA) após o tratamento intranasal com MPTP, os níveis endógenos de DA e seu metabólitos não-conjugados, o ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) e o ácido homovanílico (HVA) foram analisados através do HPLC de fase reversa acoplado a detector eletroquímico segundo protocolo previamente descrito por FELICIO et al. (1996).

Após diferentes intervalos (1, 7, 14 ou 21 dias) da administração intranasal de MPTP ou solução controle (intranasal), os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação e seus cérebros foram removidos e lavados com solução salina gelada (4 °C). Imediatamente após, o cérebro foi dissecado rapidamente (tempo máximo de 3 minutos) sobre uma placa de Petri rodeada por pedras de gelo seco, formando assim um micro-ambiente o mais frio possível. O bulbo olfatório, o estriado, o córtex pré-frontal e o hipocampo foram dissecados, pesados e em seguida armazenados em freezer -70°C.

Os tecidos cerebrais foram homogeneizados por sonicação (caneta sonicadora), durante 2 ou 3 minutos sobre uma cuba de gelo seco, com solução de ácido perclórico 0,1 M contendo 0,02% de Na₂S₂O₅, EDTA dissódico e uma concentração conhecida de (3,4 dihidroxibenzilamina (DHBA), utilizado como padrão interno para as dosagens de monoaminas.

O sistema utilizado consistiu em cromatógrafo líquido de alta pressão (HPLC) acoplado a um detector eletroquímico (HPLC-ED; Shimadzu Modelo 6A). O HPLC-ED era composto de um recipiente injetor (válvula) de 20µl, bombas de fluxo A e B, um

sistema controlador (monitoramento de fluxo, pressão e temperatura), uma coluna cromatográfica medindo 150 X 4,6 mm, diâmetro de partícula μm (Shimpack – ODS C 18) com filtro de linha, um detector eletroquímico e um integrador modulado Chromatopac. A técnica utilizada foi a de cromatografia em fase reversa com pareamento iônico. Esta técnica fundamenta-se na cromatografia de partição ou absorção. As condições de trabalho foram as seguintes: temperatura 50°C, tempo de obtenção dos picos: até 24 minutos.

A fase móvel para o HPLC utilizada consistiu em um sistema isocrático formado por um tampão citrato 0,02 M, metanol 92/8 (v/v), 0,12 mM EDTA sódico e 0,0556% de ácido 1-heptanosulfônico (HSA). O pH foi ajustado para 3,0 com ácido ortofosfórico (H_3PO_4). A fase móvel foi filtrada em um sistema a vácuo e deaerada por 15 minutos por um degaseificador a hélio antes de ser instalada no HPLC, e circulou no sistema por 12 horas (overnight) para equilíbrio da coluna, que operou num fluxo de 1 ml/min. O detector foi mantido com um potencial de 0,8V no eletrodo de trabalho.

Para o preparo das soluções padrões de DA e metabólitos foi utilizado padrões de concentrações 1 nM de DA, DOPAC e HVA diluídos em ácido clorídrico 0,1 M contendo 0,02% de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ e estocados em freezer -80°C por um período de até 2 meses. No momento da análise, os padrões foram descongelados e diluídos 2.500 a 10.000 vezes em ácido perclórico 0,1 M. Pelo menos dois padrões foram injetados no HPLC-ED diariamente, antes e ao final das dosagens dos homogenatos e os valores utilizados como referência. Utilizou-se a área sob a curva dos padrões para quantificar as amostras. Os valores obtidos foram expressos em ng/g de tecido úmido (FELICIO et al., 1996).

3.6. DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ENZIMA TIROSINA HIDROXILASE (TH) E DA ATIVAÇÃO DA PROTEÍNA QUINASE DE C-Jun N-TERMINAL (JNK) – IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS (“western blot”)

3.6.1. Coleta dos tecidos

Após diferentes intervalos da administração intranasal de MPTP ou solução controle (intranasal), os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação e seus cérebros foram removidos e lavados com solução salina (NaCl 0,9%) gelada (4 °C). Imediatamente após, o cérebro foi dissecado rapidamente (tempo máximo de 3 minutos) sobre uma placa de Petri rodeada por pedras de gelo seco, formando assim um micro-ambiente o mais frio possível. O bulbo olfatório e a substância negra foram dissecados, pesados e em seguida armazenados em freezer -70°C.

3.6.2. Preparação das frações de proteínas celulares

As amostras coletadas foram homogeneizadas em tampão de lise A gelado (HEPES 10 mM (pH 7,9), contendo: 1,5 mM de MgCl₂, 10 mM de KCl, 0,5 mM de fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), 0,5 mM de ditioneitol (DTT), 50 mM de NaF, 2 mM de Na₃VO₄, 1,5 µg/ml de inibidor de tripsina, 7 µg/ml de pepstatina A, 5 µg/ml de leupeptina, 10 µg/ml de aprotinina e 1 % de triton X-100), incubadas em gelo por 15 min

e centrifugadas a 14.000 rpm, 15 min, 4 °C. O sobrenadante foi coletado como extrato protéico total (membrana e citosol). A determinação da concentração de proteínas das amostras foi realizada utilizando o kit Bio-Rad para determinação de proteínas (*Bio-Rad Protein Assay Kit*) segundo recomendações do fabricante. As frações celulares foram armazenadas em freezer a -70°C até o momento do uso.

3.6.3. Ensaio de “*western blot*”

Com o objetivo de verificar possíveis alterações no padrão de expressão das proteínas TH e JNK após o tratamento intranasal com MPTP, foi realizado o ensaio de imunodeteção de proteínas (“*western blot*”). A fração citosólica, obtida como descrito anteriormente, foi submetida à eletroforese em gel desnaturante, SDS-poliacrilamida (12%), sendo logo depois transferida para membrana de polivinilideno difluorido (PVDF). Após a transferência, a membrana foi bloqueada em solução de leite desnatado (5%) e posteriormente incubada com anticorpos contra TH e JNK (Santa Cruz Biotechnology). A visualização das proteínas foi realizada utilizando anticorpo secundário específico conjugado a peroxidase e as bandas imunorreativas foram visualizadas através do uso de kit de aumento de quimioluminescência (ECL, Amersham Pharmacia Biotech.) e filme radiográfico, segundo recomendações do fabricante.

3.7. DETERMINAÇÃO DE MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO – PARÂMETROS ANTIOXIDANTES

Com o objetivo de verificar um possível estresse oxidativo em consequência da administração intranasal de MPTP, foram mensurados os parâmetros antioxidantes: níveis de glutathiona total (GSH-t) e a atividade das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR), após diferentes intervalos (0,5; 2; 6 e 24 horas) do tratamento com MPTP.

3.7.1. Preparação de extrato dos tecidos

Após diferentes intervalos da administração intranasal de MPTP ou solução controle (intranasal), os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação e seus cérebros foram removidos sobre uma placa de Petri invertida colocada sobre o gelo. As estruturas cerebrais (bulbo olfatório, substância negra, estriado e hipocampo) foram isoladas, pesadas e homogeneizadas em tampão HEPES 20 mM, pH 7,4. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 20.000 g por 30 minutos em centrífuga refrigerada (4° C). O sobrenadante foi então separado e conservado a -70° C para posterior dosagem das atividades enzimáticas (GPx e GR).

Para as dosagens do conteúdo de GSH-t, os tecidos foram homogeneizados em ácido perclórico (PCA) 0,5M e em seguida centrifugados a 15.000g por 2 minutos (4° C). O sobrenadante foi separado e neutralizado (diluição 10x) em tampão fosfato (KPI 0,1M, pH 7,4).

3.7.2. Medida dos níveis de glutathiona total (GSH-t)

O método utilizado é enzimático e foi originalmente descrito por TIETZE (1969), e posteriormente modificado por AKERBOOM e SIES (1981). Consiste em um método cíclico que detecta tanto a forma oxidada (GSSG) quanto à forma reduzida (GSH) da glutathiona, o que então é definido como glutathiona total (GSH-t). O reagente de Ellman, DTNB, reage espontaneamente com GSH formando o ânion colorido TNB e o conjugado GS-TNB, incolor. A GR cliva este conjugado e utiliza NADPH como co-fator, resultando em GSH e TNB, desenvolvendo mais cor. A GSH reage novamente com DTNB reiniciando o ciclo. Caso haja presença de GSSG, esta é primeiramente reduzida a GSH pela ação da enzima glutathiona redutase (GR) e, em seguida, entra no ciclo. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 412 nm por 1-4 min.

Neste ensaio, o meio de reação consistia de tampão fosfato de potássio 0,1 M, 1 mM EDTA, DTNB 0,1 mM; NADPH 0,2 mM. Após a adição da amostra ou do padrão, iniciava-se a reação pela adição da GR 0,2 U/mL. A concentração de GSH-t foi obtida pela comparação das absorbâncias das amostras com a absorbância de uma curva padrão de GSSG (0,1-1,0 nmol/mL). A reação basal, sem a presença de GSSG ou amostra, foi descontada do delta de absorbância por minuto obtido na presença do padrão ou da amostra. O valor obtido foi multiplicado pelas diluições.

3.7.3. Avaliação da atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx)

A GPx catalisa a redução de H_2O_2 , bem como de outros lipodroperóxidos, utilizando a glutathiona reduzida (GSH) como co-substrato para esta reação e produzindo glutathiona oxidada (GSSG). A GSSG é reduzida pela glutathiona redutase com o consumo de NADPH, que pode ser acompanhado espectrofotometricamente em 340 nm (WENDEL, 1981; FLOHÉ e GÜNZLER, 1984). Para este ensaio, o meio de reação continha tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, EDTA 1 mM, GSH 1mM, NADPH 0,1 mM. Adicionou-se a amostra neste meio para mensurar o consumo inespecífico de NADPH através de uma leitura por 2-4 min a 340 nm. Ao decréscimo de absorbância (340 nm) por minuto obtido descontou-se o consumo inespecífico de NADPH. O valor obtido foi dividido pelo coeficiente de extinção molar de NADPH ($\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e multiplicado pelas diluições. O valor foi expresso como mUnidades/mg de proteína. Uma Unidade corresponde a 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$.

3.7.4. Avaliação da atividade da enzima glutathiona redutase (GR)

A GR catalisa a redução da glutathiona oxidada (GSSG) através da oxidação do NADPH. Ao utilizar o substrato GSSG a enzima leva ao consumo de NADPH, que é acompanhado espectrofotometricamente em 340 nm ($\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A velocidade

de consumo de NADPH, em condições de saturação, expressa a atividade enzimática (CALBERG e MANNERVIK, 1985). O meio de reação continha tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, EDTA 1mM, NADPH 0,2 mM. Após adicionar a amostra, o consumo inespecífico de NADPH foi mensurado por 2-4 min a 340 nm. Ao adicionar o substrato GSSG 1 mM a leitura foi realizada por 2-4 min adicionais e do decaimento por minuto obtido descontou-se o consumo inespecífico de NADPH. O valor obtido foi dividido pelo coeficiente de extinção molar de NADPH ($\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e multiplicado pelas diluições. O valor foi expresso como mUnidades/mg de proteína. Uma Unidade corresponde a $1 \mu\text{mol}/\text{min}$.

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (e.p.m.). Os resultados iniciais do tratamento com reserpina, bem como os efeitos da administração intranasal de MPTP sobre os níveis cerebrais de dopamina e seus metabólitos foram comparados utilizando o teste “t” de Student não pareado. As comparações estatísticas dos demais resultados foram realizadas por análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, adequadas ao protocolo experimental. Posteriormente, os grupos foram comparados entre si empregando-se o teste *post-hoc* de Newman-Keuls. A probabilidade aceita como indicativo da existência de diferença estatisticamente significativa foi $P \leq 0,05$. Todas as comparações estatísticas foram efetuadas utilizando-se o pacote estatístico *Statistic 5.0*.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do tratamento com reserpina na discriminação olfativa e memória social de ratos

A Figura 2 ilustra o efeito do tratamento com reserpina (1 mg/kg, i.p.), 24 h antes dos experimentos, sobre a discriminação olfativa de ratos. Os animais tratados com a solução controle (i.p.) foram capazes de discriminar os dois compartimentos, permanecendo um tempo significativamente maior no compartimento familiar. Por outro lado, o grupo de animais tratado com reserpina apresentou um significativo prejuízo na discriminação olfativa, permanecendo tempos semelhantes nos dois compartimentos [$t=4,78$; $P<0,0001$; Teste “t” de Student] (Figura 2).

No teste de reconhecimento social, a administração de reserpina (1 mg/kg, i.p.), 24 horas antes do experimento, prejudicou a capacidade de reconhecimento dos ratos adultos, indicado por um aumento no tempo de investigação quando o mesmo rato jovem foi re-apresentado após um intervalo de 30 min [$t=5,75$; $P<0,001$; Teste “t” de Student] (Figura 3A). Como ilustrado na Figura 3B, quando um rato jovem diferente daquele utilizado durante a primeira apresentação foi exposto ao rato adulto, nenhuma redução significativa no tempo de investigação pode ser observada, independente do tratamento [$t=1,00$; $P=0,33$] (controle ou reserpina).

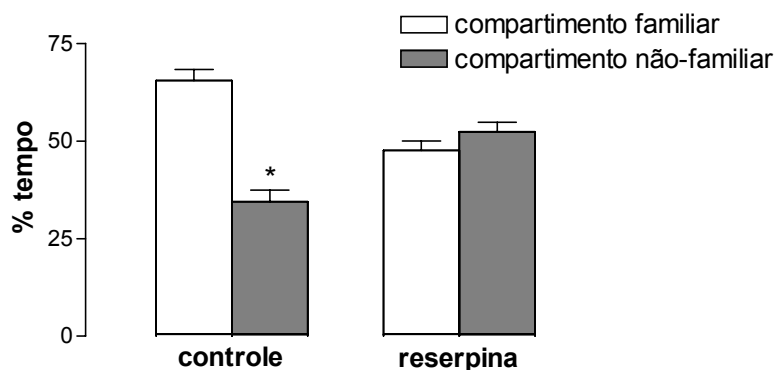


Figura 2. Efeito do tratamento com reserpina (1 mg/kg, i.p.) ou solução controle (i.p.) (24 horas antes dos experimentos) na discriminação olfativa de ratos. As barras representam a porcentagem do tempo (média \pm E.P.M.) gasto em cada um dos compartimentos (n= 8 animais por grupo). * $P \leq 0.05$ comparado a % do tempo gasto no compartimento familiar (Teste "t" de Student).

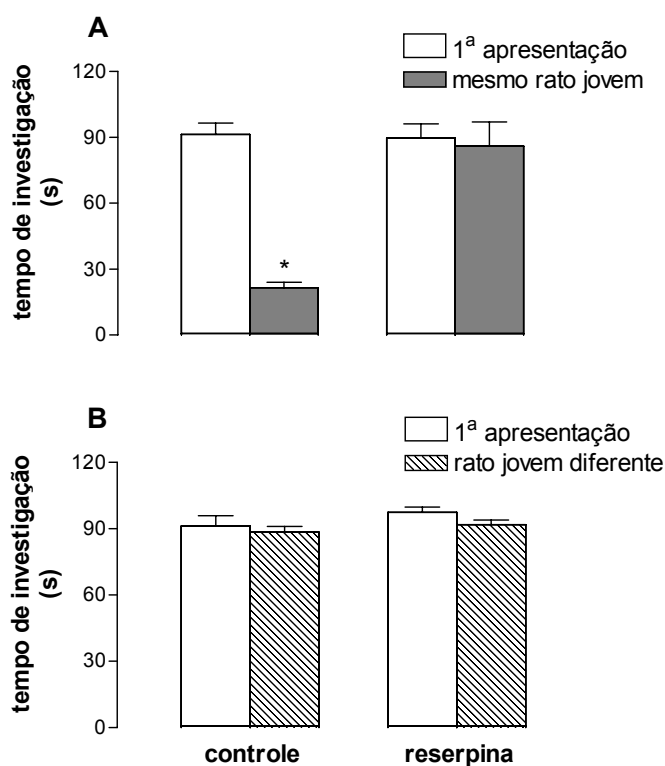


Figura 3. Efeito do tratamento com reserpina (1 mg/kg, i.p.) ou solução controle (i.p.) (24 horas antes dos experimentos) no tempo de investigação quando o mesmo rato jovem (A) ou um rato jovem diferente (B) daquele utilizado durante a 1ª apresentação foi exposto ao rato adulto após um intervalo de 30 min. As barras representam o tempo de investigação (média + E.P.M.) de 8 animais por grupo. * $P \leq 0.05$ comparado ao tempo de investigação gasto durante a 1ª apresentação do rato jovem do mesmo grupo (Teste "t" de Student).

Além disso, os efeitos da administração de reserpina (1 mg/kg, i.p.) sobre a discriminação olfativa e memória social de ratos parecem não estar associados a um comprometimento da função motora dos animais, uma vez que este tratamento não alterou os parâmetros comportamentais de exploração no campo aberto: número de quadrantes cruzados [$t=0,30$; $P=0,76$] e número de respostas de levantar [$t=0,40$; $P=0,70$] (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito do tratamento com reserpina (1 mg/kg, i.p.) ou solução controle (i.p.) (24 horas antes dos experimentos) nos parâmetros comportamentais de ratos testados no campo aberto (por 5 min).

Tratamento (mg/kg)	Cruzamentos	Levantar	N
controle	72,0 ± 3,4	16,8 ± 1,8	8
reserpina (1)	70,2 ± 4,6	15,9 ± 1,3	8

Os resultados são expressos pela média ± E.P.M.

4.2. Efeitos da administração de agonistas dopaminérgicos sobre os prejuízos na discriminação olfativa e memória social induzidos pela reserpina em ratos

Os efeitos da administração aguda (15 min antes dos experimentos) dos agonistas seletivos dos receptores para dopamina SKF 38393 (agonista do receptor D₁, 0,5; 1,0 ou 3,0 mg/kg, i.p.) ou quinpirole (agonista do receptor D₂, 0,01; 0,05 ou 0,1 mg/kg, i.p.) na discriminação olfativa de ratos previamente tratados com reserpina (1 mg/kg, i.p.) (24 horas antes dos experimentos) são ilustrados na Figura 4. A análise de variância efetuada

pela ANOVA de uma via revelou um efeito significativo do tratamento com quinpirole [$F(3,25) = 10,00$; $P < 0,001$]. Entretanto, revelou um efeito não significativo para o tratamento com SKF 38391 [$F(3,24) = 0,75$; $P = 0,53$]. O teste post-hoc de Newman-Keuls indicou que aqueles animais que foram tratados com reserpina no dia anterior ao teste e receberam quinpirole (0,05-0,1 mg/kg, i.p.), foram capazes de discriminar entre os dois compartimentos, permanecendo tempos significativamente maiores no compartimento familiar (Figura 4).

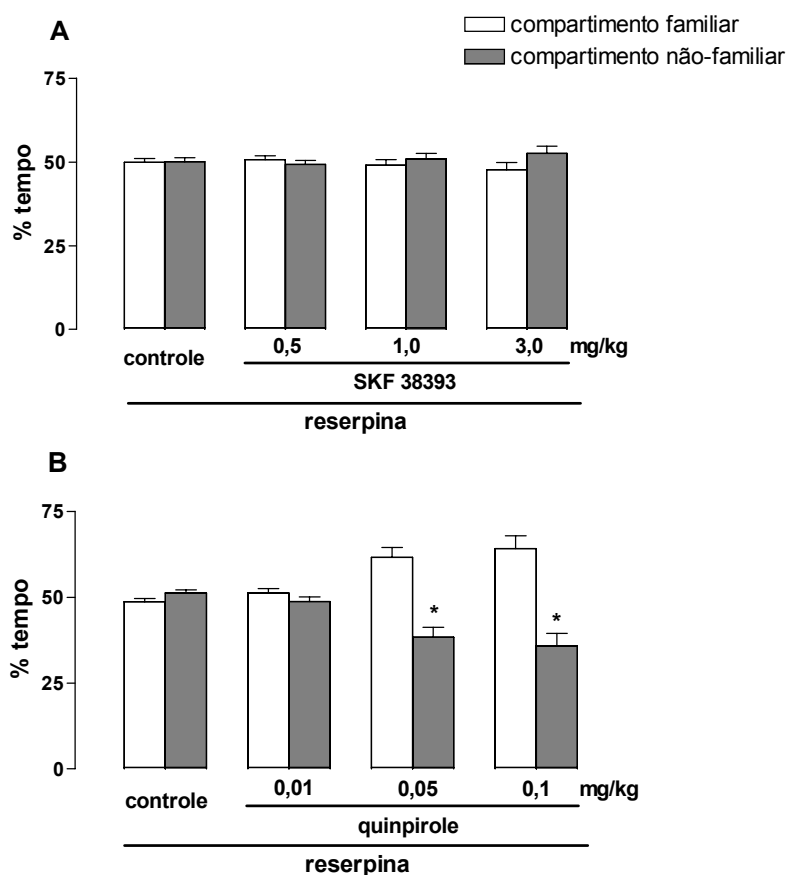


Figura 4. Efeito do tratamento i.p. com os agonistas dopaminérgicos (15 min antes dos experimentos) SKF 38393 (agonista D_1 , 0,5; 1,0 ou 3,0 mg/kg) ou quinpirole (agonista D_2 , 0,01; 0,05 ou 0,1 mg/kg) na discriminação olfativa de ratos previamente tratados com reserpina (1 mg/kg, i.p.) 24 horas antes dos experimentos. As barras representam a porcentagem do tempo (média \pm E.P.M.) gasto em cada um dos compartimentos (n=7-8 animais por grupo). * $P \leq 0.05$ comparado a % do tempo gasto no compartimento familiar do respectivo grupo (Teste de Newman-Keuls).

A Figura 5 ilustra os efeitos da administração aguda (15 min antes dos experimentos) dos agonistas seletivos dos receptores para dopamina SKF 38393 (agonista do receptor D₁, 0,5; 1,0 ou 3,0 mg/kg, i.p.) ou quinpirole (agonista do receptor D₂, 0,01; 0,05 ou 0,1 mg/kg, i.p.) no tempo de investigação social de ratos previamente tratados com reserpina (1 mg/kg, i.p.) (24 horas antes dos experimentos) quando o mesmo rato jovem foi re-apresentado após 30 min. A análise estatística efetuada através da ANOVA de uma via revelou um efeito significativo do tratamento com quinpirole [$F(3,24) = 39,69$; $P < 0,001$] no tempo de investigação social. Entretanto, revelou um efeito não significativo para o tratamento com SKF 38391 [$F(3,24) = 0,90$; $P = 0,46$]. O teste post-hoc de Newman-Keuls indicou que os animais previamente tratados com reserpina (1 mg/kg, i.p.) e injetados com quinpirole (0,05 – 0,1 mg/kg, i.p.) apresentaram uma redução significativa no tempo de investigação durante a segunda apresentação do rato jovem (Figura 5).

Como pode ser observado na Figura 6, a administração aguda destas mesmas doses de SKF 38393 e quinpirole não alteraram significativamente o tempo de investigação quando um rato jovem diferente foi utilizado durante a segunda apresentação [$F(3,24) = 0,98$; $P = 0,42$ e $F(3,24) = 0,15$; $P = 0,93$, respectivamente]. Isto sugere um efeito seletivo do quinpirole sobre a memória social de ratos reserpinaados.

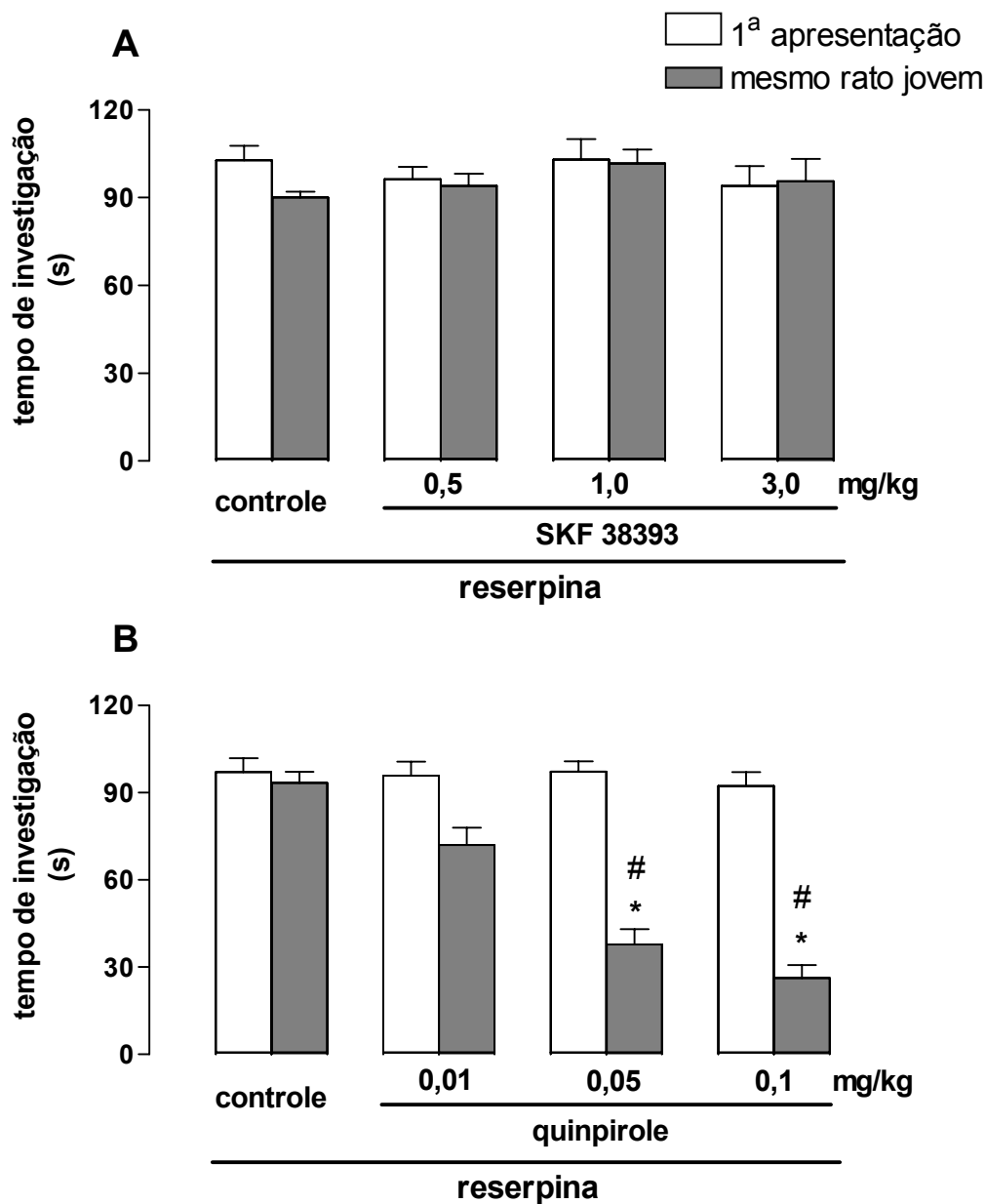


Figura 5. Efeito do tratamento i.p. com os agonistas dopaminérgicos (15 min antes dos experimentos) SKF 38393 (agonista D₁, 0,5; 1,0 ou 3,0 mg/kg) ou quinpirole (agonista D₂, 0,01; 0,05 ou 0,1 mg/kg) no tempo de investigação quando o mesmo rato jovem foi re-apresentado ao rato adulto após um intervalo de 30 min. As barras representam o tempo de investigação (média ± E.P.M.) de 8 animais por grupo. * $P \leq 0.05$ comparado ao tempo de investigação gasto durante a 1^a apresentação do rato jovem do mesmo grupo. # $P \leq 0.05$ comparado ao tempo de investigação gasto durante a 2^a apresentação do rato jovem do grupo controle (Teste de Newman-Keuls).

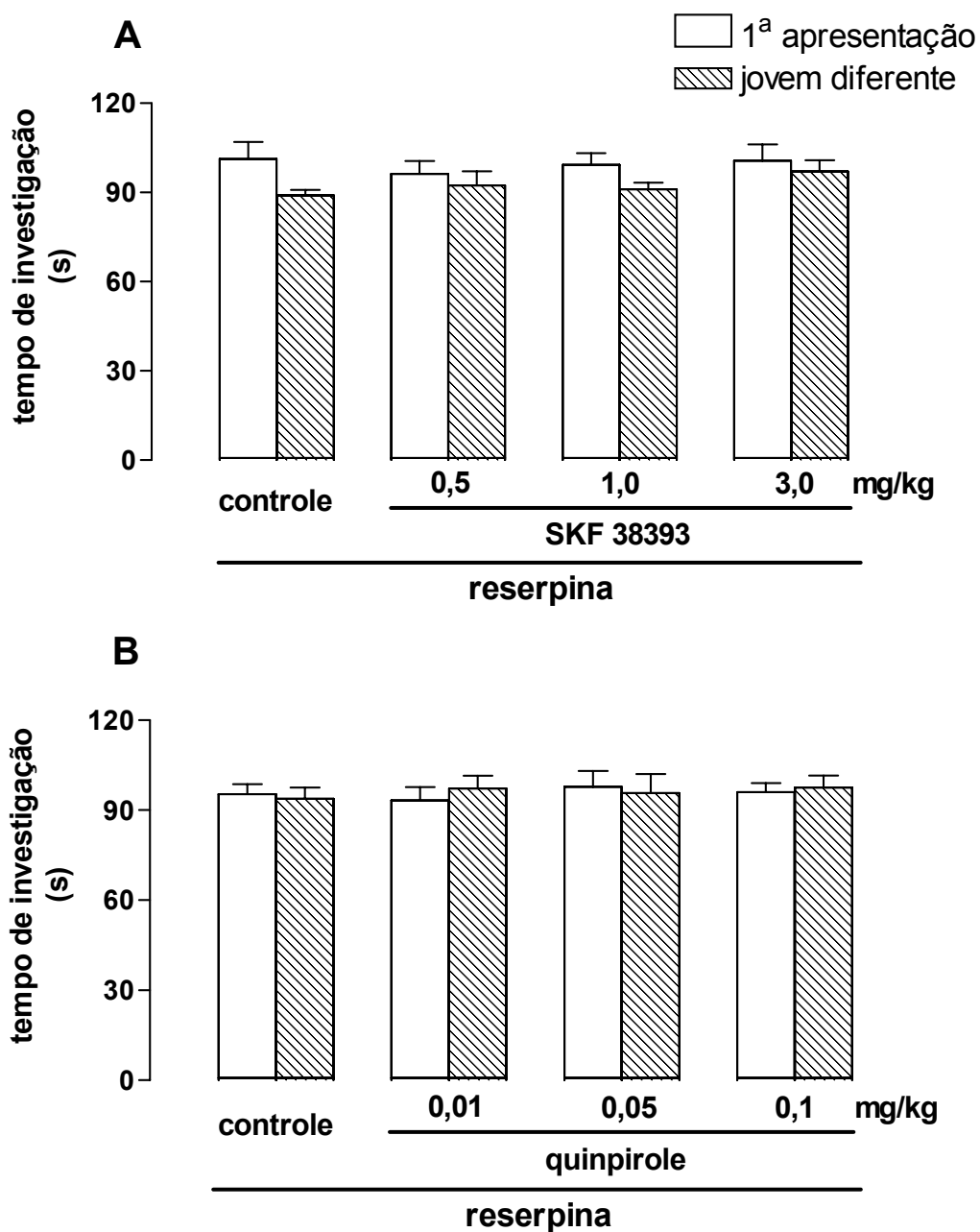


Figura 6. Efeito do tratamento i.p. com os agonistas dopaminérgicos (15 min antes dos experimentos) SKF 38393 (agonista D₁, 0,5; 1,0 ou 3,0 mg/kg) ou quinpirole (agonista D₂, 0,01; 0,05 ou 0,1 mg/kg) no tempo de investigação quando um rato jovem diferente foi apresentado ao rato adulto após um intervalo de 30 min. As barras representam o tempo de investigação (média \pm E.P.M.) de 8 animais por grupo.

Além disso, os efeitos positivos da administração de quinpirole sobre a discriminação olfativa e a memória social de ratos reserpinados parecem não estar associados diretamente a uma alteração da atividade locomotora dos animais, uma vez que este tratamento não alterou os parâmetros comportamentais de exploração no campo aberto (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito da administração aguda (i.p.) dos agonistas dopaminérgicos (15 min antes dos experimentos) SKF 38393 (agonista D₁, 0,5; 1,0 ou 3,0 mg/kg) ou quinpirole (agonista D₂, 0,01; 0,05 ou 0,1 mg/kg) nos parâmetros comportamentais de ratos previamente tratados com reserpina (1 mg/kg, i.p.) e testados no campo aberto (por 5 min).

Tratamento (mg/kg)	Cruzamentos	Levantar	N
reserpina (1) + controle	67,7 ± 4,2	15,6 ± 1,6	7
reserpina (1) + SKF 38393 (0,5)	69,7 ± 3,2	16,5 ± 1,0	8
reserpina (1) + SKF 38393 (1,0)	67,1 ± 7,7	14,3 ± 1,7	8
reserpina (1) + SKF 38393 (3,0)	72,8 ± 10,6	14,8 ± 2,1	8
reserpina (1) + quinpirole (0,01)	65,7 ± 3,0	13,4 ± 1,5	8
reserpina (1) + quinpirole (0,05)	61,7 ± 6,1	13,8 ± 1,2	7
reserpina (1) + quinpirole (0,1)	63,3 ± 4,3	16,0 ± 1,9	7

Os resultados são expressos pela média ± E.P.M.

4.3. Efeitos da administração de antagonistas adenosinérgicos sobre os prejuízos na discriminação olfativa e memória social induzidos pela reserpina em ratos

A Figura 7 ilustra os efeitos da administração aguda (30 min antes dos experimentos) dos antagonistas adenosinérgicos cafeína (antagonista não-seletivo, 3; 10 ou 30 mg/kg, i.p.), DPCPX (antagonista do receptor A_1 , 0,5; 1 ou 3 mg/kg, i.p.) ou ZM241385 (antagonista do receptor A_{2A} , 0,1; 0,5 ou 1,0 mg/kg, i.p.) na discriminação olfativa de ratos previamente tratados com reserpina (1 mg/kg, i.p.) (24 horas antes dos experimentos). A análise de variância efetuada pela ANOVA de uma via revelou um efeito significativo dos tratamentos com cafeína [$F(3,25) = 14,08$; $P < 0,0001$] e ZM241385 [$F(3,23) = 3,43$; $P < 0,05$]. Entretanto, revelou um efeito não significativo para o tratamento com DPCPX [$F(3,23) = 0,70$; $P = 0,56$]. Confirmando os resultados anteriores, aqueles animais que foram tratados com reserpina (1 mg/kg, i.p.) no dia anterior e receberam a solução controle (i.p.), 30 min antes dos experimentos, não foram capazes de discriminar entre os compartimentos familiar e não-familiar, permanecendo tempos semelhantes nos dois compartimentos. A administração aguda de cafeína (10 -30 mg/kg, i.p.) ou ZM241385 (0,5 – 1,0 mg/kg, i.p.) reverteu este prejuízo na discriminação olfativa induzido pela reserpina, uma vez que os animais permaneceram um tempo significativamente maior no compartimento familiar (Figura 7).

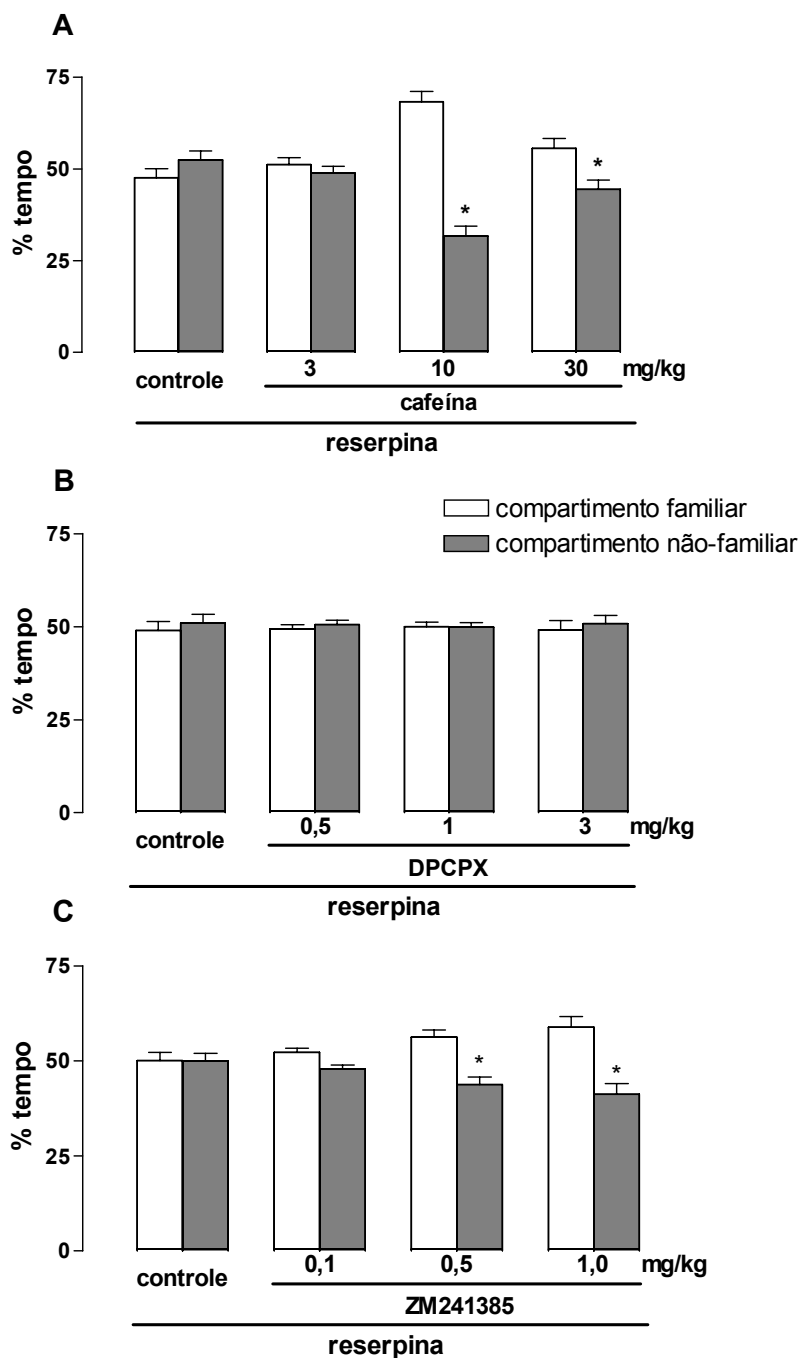


Figura 7. Efeito do tratamento i.p. com os antagonistas adenosinérgicos (30 min antes dos experimentos) cafeína (antagonista não-seletivo, 3; 10 ou 30 mg/kg, i.p.), DPCPX (antagonista A₁, 0,5; 1 ou 3 mg/kg) ou ZM241385 (antagonista A_{2A}, 0,1; 0,5 ou 1,0 mg/kg) na discriminação olfativa de ratos previamente tratados com reserpina (1 mg/kg, i.p.) 24 horas antes dos experimentos. As barras representam a porcentagem do tempo (média ± E.P.M.) gasto em cada um dos compartimentos (n=7-8 animais por grupo). * $P \leq 0.05$ comparado a % do tempo gasto no compartimento familiar do respectivo grupo (Teste de Newman-Keuls).

Os efeitos da administração aguda (30 min antes dos experimentos) dos antagonistas adenosinérgicos cafeína (antagonista não-seletivo, 3; 10 ou 30 mg/kg, i.p.), DPCPX (antagonista do receptor A_1 , 0,5; 1 ou 3 mg/kg, i.p.) ou ZM241385 (antagonista do receptor A_{2A} , 0,1; 0,5 ou 1,0 mg/kg, i.p.) no tempo de investigação social de ratos previamente tratados com reserpina (1 mg/kg, i.p.) (24 horas antes dos experimentos) quando o mesmo rato jovem foi re-apresentado após 30 min é ilustrado na Figura 8. A análise estatística efetuada através da ANOVA de uma via revelou um efeito significativo dos tratamentos com cafeína [$F(3,24) = 15,80$; $P < 0,0001$] e ZM241385 [$F(3,26) = 65,26$; $P < 0,0001$] no tempo de investigação social. Entretanto, revelou um efeito não significativo para o tratamento com DPCPX [$F(3,25) = 0,11$; $P = 0,95$]. Confirmando os resultados anteriores, a administração de reserpina promoveu um significativo prejuízo na memória social dos animais, uma vez que estes não foram capazes de reconhecer o rato jovem quando este foi re-apresentado após um intervalo de 30 min. A administração aguda de cafeína (10 – 30 mg/kg, i.p.) ou ZM241385 (0,5 – 1,0 mg/kg, i.p.) reverteu este prejuízo na capacidade de reconhecimento social induzida pela reserpina, promovendo uma redução significativa ($P \leq 0,05$, teste de Newman-Keuls) no tempo de investigação durante a segunda apresentação do rato jovem (Figura 8).

Como pode ser observado na Figura 9, a administração aguda destas mesmas doses de cafeína, DPCPX e ZM241385 não alterou significativamente o tempo de investigação quando um rato jovem diferente foi utilizado durante a segunda apresentação. Isto sugere que a cafeína e o ZM241385 estão atuando seletivamente na melhoria dos prejuízos induzidos pela reserpina sobre a memória social de ratos.

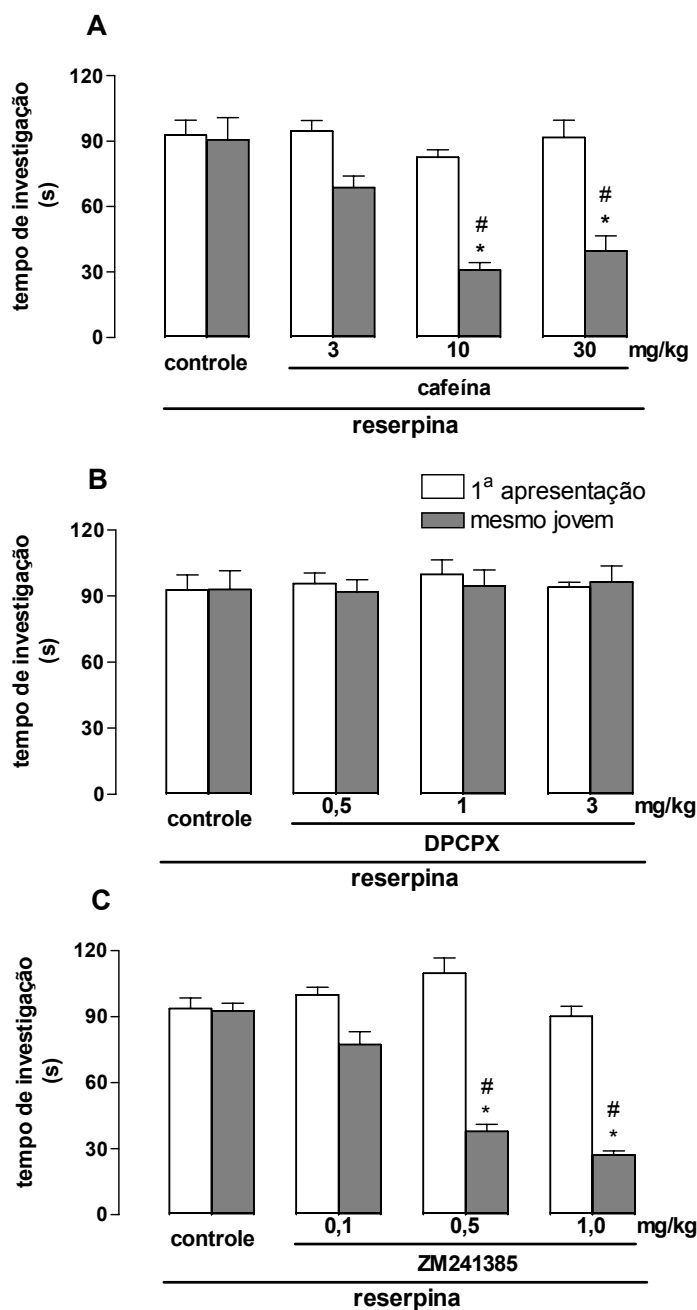


Figura 8. Efeito do tratamento i.p. com os antagonistas adenosinérgicos (30 min antes dos experimentos) cafeína (antagonista não-seletivo, 3; 10 ou 30 mg/kg, i.p.), DPCPX (antagonista A_1 , 0,5; 1 ou 3 mg/kg) ou ZM241385 (antagonista A_{2A} , 0,1; 0,5 ou 1,0 mg/kg) no tempo de investigação quando o mesmo rato jovem foi re-apresentado ao rato adulto após um intervalo de 30 min. As barras representam o tempo de investigação (média \pm E.P.M.) de 7-9 animais por grupo. * $P \leq 0.05$ comparado ao tempo de investigação gasto durante a 1ª apresentação do rato jovem do mesmo grupo. # $P \leq 0.05$ comparado ao tempo de investigação gasto durante a 2ª apresentação do rato jovem do grupo controle (Teste de Newman-Keuls).

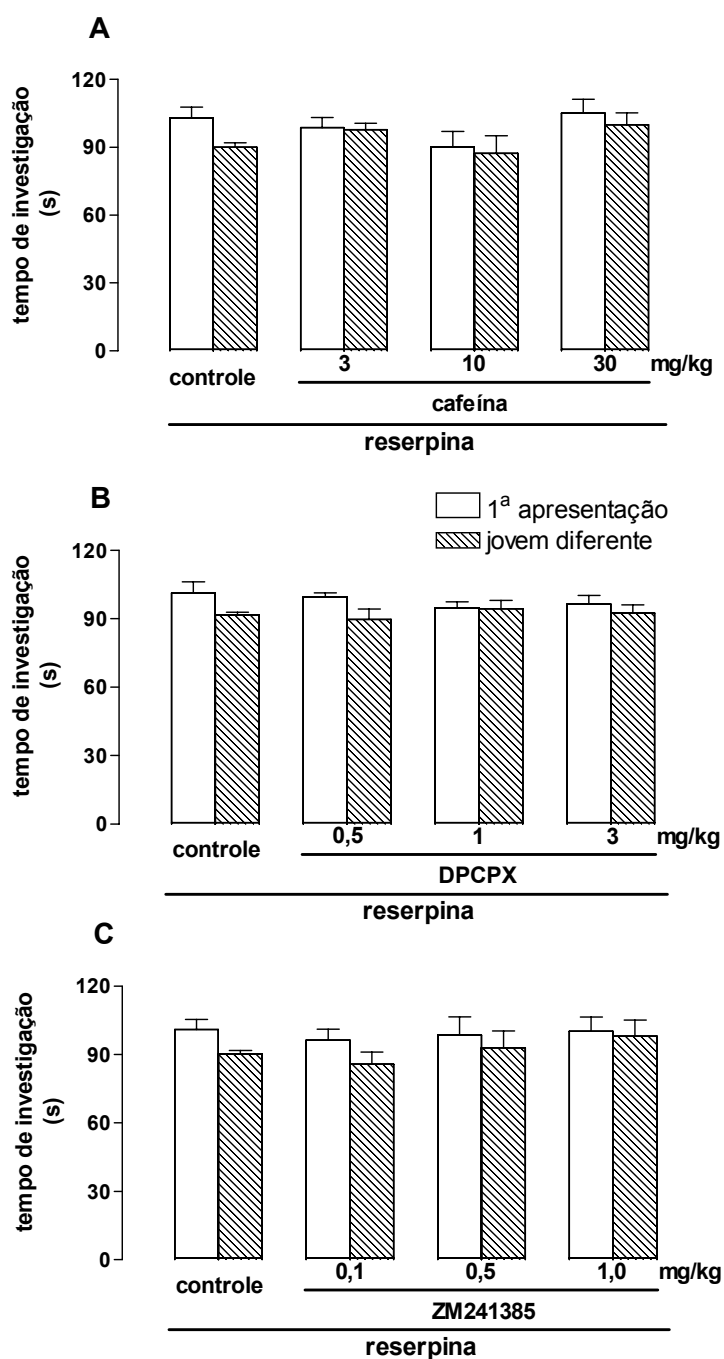


Figura 9. Efeito do tratamento i.p. com os antagonistas adenosinérgicos (30 min antes dos experimentos) cafeína (antagonista não-seletivo, 3; 10 ou 30 mg/kg, i.p.), DPCPX (antagonista A₁, 0,5; 1 ou 3 mg/kg) ou ZM241385 (antagonista A_{2A}, 0,1; 0,5 ou 1,0 mg/kg) no tempo de investigação quando um rato jovem diferente foi apresentado ao rato adulto após um intervalo de 30 min. As barras representam o tempo de investigação (média ± E.P.M.) de 7-8 animais por grupo.

Além disso, administração de cafeína (3 – 30 mg/kg, i.p.), DPCPX (0,5 – 3 mg/kg, i.p.) e ZM241385 (0,1 – 1,0 mg/kg, i.p.) não alteraram os parâmetros comportamentais de exploração no campo aberto (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito da administração aguda (i.p.) dos antagonistas adenosinérgicos (30 min antes dos experimentos) cafeína (antagonista não-seletivo, 3; 10 ou 30 mg/kg, i.p.), DPCPX (antagonista A₁, 0,5; 1 ou 3 mg/kg) ou ZM241385 (antagonista A_{2A}, 0,1; 0,5 ou 1,0 mg/kg) nos parâmetros comportamentais de ratos previamente tratados com reserpina (1 mg/kg, i.p.) e testados no campo aberto (por 5 min).

Tratamento (mg/kg)	Cruzamentos	Levantar	N
reserpina (1) + controle	68,3 ± 5,7	15,7 ± 1,2	7
reserpina (1) + cafeína (3)	65,3 ± 5,4	17,3 ± 0,7	8
reserpina (1) + cafeína (10)	74,8 ± 5,4	17,1 ± 1,6	8
reserpina (1) + cafeína (30)	72,3 ± 11,5	20,0 ± 5,1	7
reserpina (1) + DPCPX (0,5)	66,4 ± 4,8	17,3 ± 1,7	8
reserpina (1) + DPCPX (1)	61,8 ± 3,9	13,1 ± 2,0	8
reserpina (1) + DPCPX (3)	69,7 ± 2,1	17,6 ± 1,3	8
reserpina (1) + ZM241385 (0,1)	61,6 ± 6,5	17,7 ± 1,3	8
reserpina (1) + ZM241385 (0,5)	64,8 ± 4,9	20,0 ± 2,2	7
reserpina (1) + ZM241385 (1,0)	76,4 ± 2,9	25,3 ± 4,2	8

Os resultados são expressos pela média ± E.P.M.

4.4. Interação entre os receptores A_{2A} para adenosina e D_2 para dopamina no prejuízo da memória social induzido pela reserpina em ratos

Para avaliarmos uma possível interação entre os receptores A_{2A} para adenosina e D_2 para dopamina no prejuízo da memória social induzido pela reserpina, ratos previamente tratados com reserpina (1 mg/kg, i.p.), 24 horas antes dos experimentos, receberam uma dose sub-efetiva de ZM241385 (antagonista do receptor A_{2A} , 0,1 mg/kg, i.p.) 15 min antes da injeção de uma dose sub-efetiva de quinpirole (agonista do receptor D_2 , 0,01 mg/kg, i.p.), e foram testados 15 min depois no modelo de reconhecimento social (Figura 10). A análise de variância efetuada através da ANOVA de uma via revelou um efeito significativo para o fator tratamento [$F(3,28) = 14,84$; $P < 0,001$]. Posterior teste de Newman-Keuls indicou que a administração combinada de ZM241385 e quinpirole promoveu uma redução significativa no tempo de investigação quando o mesmo rato jovem foi reapresentado após 30 min (Figura 10A). Por outro lado, esta administração combinada de ZM241385 e quinpirole não alterou o tempo de investigação quando um rato jovem diferente foi utilizado durante a segunda apresentação (Figura 10B). Estes resultados apontam para um efeito somatório do bloqueio dos receptores A_{2A} para adenosina e a ativação dos receptores D_2 para dopamina na reversão dos prejuízos induzidos pela reserpina na memória social de ratos.

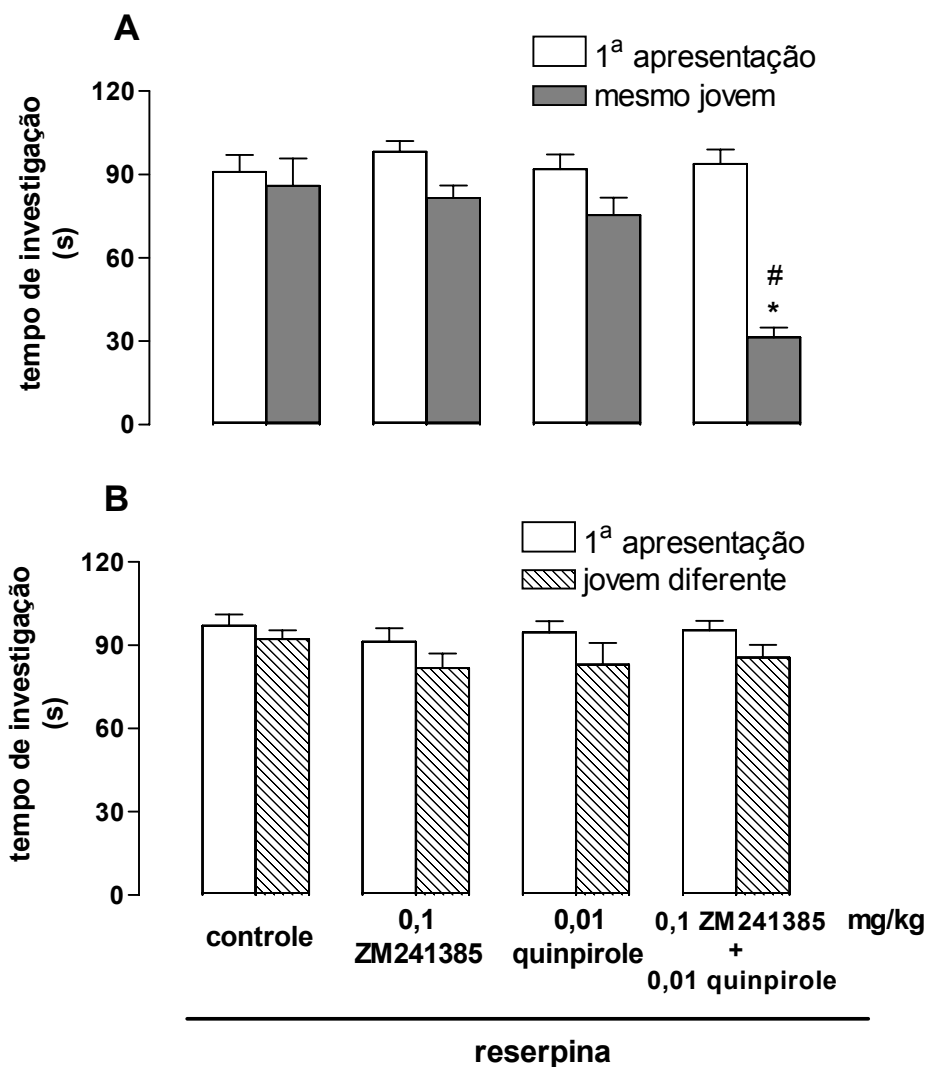


Figura 10. Efeito da co-administração (i.p.) de ZM241385 (antagonista A_{2A} , 0,1 mg/kg) com quinpirole (agonista D_2 , 0,01 mg/kg) no tempo de investigação social de ratos previamente tratados com reserpina (1 mg/kg, i.p.), 24 horas antes dos experimentos. As barras representam o tempo de investigação (média \pm E.P.M.) quando o mesmo rato jovem (A) ou um rato jovem diferente (B) foi utilizado durante a 2^a apresentação (n=7-8 animais por grupo). * $P \leq 0.05$ comparado ao tempo de investigação gasto durante a 1^a apresentação do rato jovem do mesmo grupo. # $P \leq 0.05$ comparado ao tempo de investigação gasto durante a 2^a apresentação do rato jovem do grupo controle (Teste de Newman-Keuls).

4.5. Efeito da administração intranasal de MPTP sobre as funções olfativa e motora de ratos

Com o objetivo de avaliarmos a hipótese de que um agente químico presente no meio ambiente poderia utilizar a cavidade nasal como porta de entrada no organismo e estar relacionado à etiologia da Doença de Parkinson, nós administramos o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (0,2 mg/narina) pela via intranasal em ratos e avaliamos as funções olfativa e motora destes (através dos testes de discriminação olfativa e campo aberto, respectivamente), 1, 7, 14 e 21 dias após o tratamento com o MPTP ou solução controle (intanasal).

A Figura 11 ilustra o efeito da administração intranasal de MPTP (0,2 mg/narina) sobre a discriminação olfativa dos animais. A análise de variância efetuada através da ANOVA de duas vias (tratamento x tempo) revelou um efeito significativo para o fator tratamento [$F(1,56) = 8,26; P < 0,001$]. Entretanto, revelou um efeito não significativo para o fator tempo [$F(3,56) = 2,02; P = 0,12$], e para o fator de interação entre tratamento e tempo [$F(3,56) = 0,88; P = 0,46$]. Posterior teste de Newman-Keuls indicou que o tratamento intranasal com MPTP promoveu um prejuízo precoce na discriminação olfativa dos animais, podendo ser detectado já no primeiro dia após o tratamento com MPTP, e sofrendo uma reversão 21 dias após o tratamento (Figura 11).

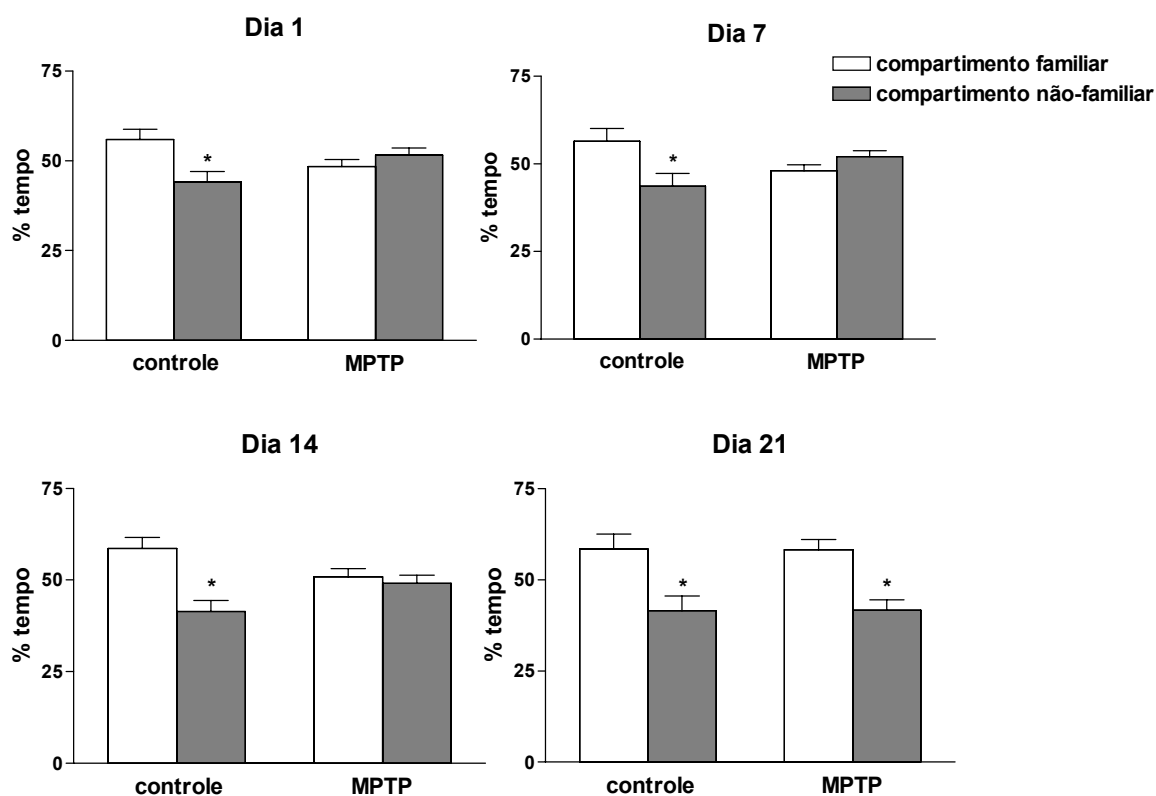


Figura 11. Efeito da administração intranasal de MPTP (0,2 mg/narina) ou solução controle (intranasal) na discriminação olfativa de ratos. As barras representam a porcentagem do tempo (média \pm E.P.M.) gasto em cada um dos compartimentos (n=8 animais por grupo). * $P \leq 0.05$ comparado a % do tempo gasto no compartimento familiar do respectivo grupo (Teste de Newman-Keuls).

Já o efeito da administração intranasal de MPTP (0,2 mg/narina) sobre a atividade locomotora dos animais é apresentado na Tabela 4. A ANOVA de duas vias (tratamento x tempo) revelou um efeito significativo para os fatores tratamento, tempo e o fator de interação nos parâmetros comportamentais avaliados no campo aberto: cruzamentos [$F(1,56) = 6,46$; $P < 0,01$; $F(3,56) = 7,89$; $P < 0,0001$ e $F(3,56) = 6,15$; $P < 0,001$, respectivamente] e levantar [$F(1,56) = 19,75$; $P < 0,0001$; $F(3,56) = 14,94$; $P < 0,0001$ e

$F(3,56) = 8,68$; $P < 0,0001$, respectivamente]. Posterior teste de Newman-Keuls indicou que o tratamento intranasal com MPTP promoveu uma redução significativa na atividade locomotora dos animais nos dias 14 e 21 pós-tratamento (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito da administração intranasal de MPTP (0,2 mg/narina) ou solução controle (intranasal) nos parâmetros comportamentais de ratos testados no campo aberto (por 5 min).

Tratamento	Dia	Cruzamentos	Levantar	N
controle	1	74,6 ± 8,1	17,1 ± 1,9	8
MPTP	1	79,1 ± 7,5	18,5 ± 1,6	8
controle	7	71,1 ± 7,4	16,4 ± 0,7	8
MPTP	7	80,0 ± 6,3	16,1 ± 1,2	8
controle	14	62,1 ± 7,9	16,1 ± 0,8	8
MPTP	14	42,9 ± 6,5*	7,4 ± 1,2*	8
controle	21	73,9 ± 7,5	14,8 ± 1,1	8
MPTP	21	29,0 ± 4,6*	6,2 ± 1,3*	8

Os resultados são expressos pela média ± E.P.M. * $P \leq 0,05$ comparado ao grupo controle do mesmo dia pós-tratamento (Teste de Newman-Keuls).

4.6. Efeito da administração intranasal de MPTP sobre os processos de aprendizado e memória em ratos

Para avaliarmos um possível efeito da administração intranasal de MPTP (0,2 mg/narina) no desempenho dos animais em modelos de aprendizado e memória, utilizamos os testes de reconhecimento social e as três versões do labirinto aquático de Morris 7 dias após o tratamento com MPTP ou solução controle (intranasal). Como demonstrado anteriormente (Tabela 4), neste intervalo os animais não apresentam alterações locomotoras significativas que poderiam dificultar a interpretação dos resultados.

No teste de reconhecimento social, administração intranasal de MPTP (0,2 mg/narina) prejudicou a capacidade de reconhecimento dos ratos adultos, indicado por um aumento no tempo de investigação quando o mesmo rato jovem foi re-apresentado após um intervalo de 30 min [$t = -12,63$; $P < 0,0001$; Teste “t” de Student] (Figura 12A). Como ilustrado na Figura 12B, quando um rato jovem diferente daquele utilizado durante a primeira apresentação foi exposto ao rato adulto, nenhuma redução significativa no tempo de investigação pode ser observada, independente do tratamento (controle ou MPTP) [$t = -0,14$; $P = 0,89$; Teste “t” de Student].

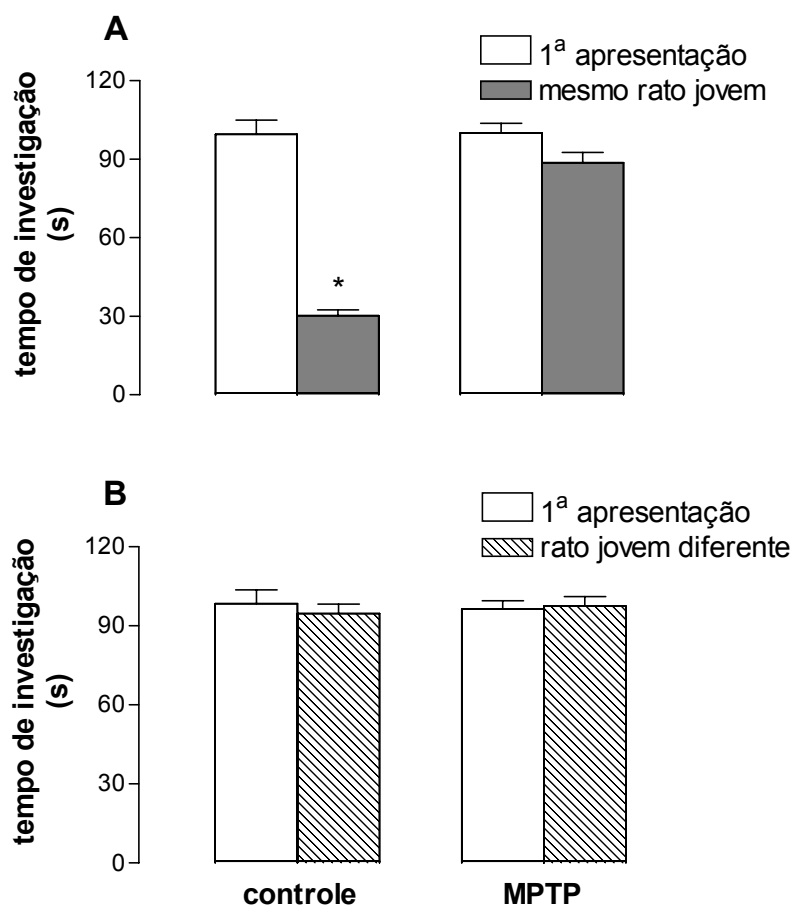


Figura 12. Efeito da administração intranasal de MPTP (0,2 mg/narina) ou solução controle (intranasal) no tempo de investigação quando o mesmo rato jovem (A) ou um rato jovem diferente (B) daquele utilizado durante a 1^a apresentação foi exposto ao rato adulto após um intervalo de 30 min. As barras representam o tempo de investigação (média \pm E.P.M.) de 8 animais por grupo. * $P \leq 0.05$ comparado ao tempo de investigação gasto durante a 1^a apresentação do rato jovem do mesmo grupo (Teste “t” de Student).

A Figura 13 ilustra os efeitos da administração intranasal de MPTP (0,2 mg/narina) sobre o desempenho dos animais em três versões do labirinto aquático de Morris. Os grupos controle demonstraram típica curva de aprendizagem nos procedimentos utilizados, sendo verificada uma significativa redução na latência para encontrar a plataforma ao longo dos sucessivos treinamentos. A ANOVA de duas vias (tratamento x fator de repetição) indicou que o tratamento com MPTP causou um significativo prejuízo no desempenho dos animais nas tarefas de memória operacional [$F(1,12) = 7,98; P < 0,01$] (Figura 13A) e memória de procedimento com pista visual [$F(1,14) = 20,05; P < 0,01$] (Figura 13C). Por outro lado, como ilustrado na Figura 13B, a administração intranasal de MPTP não prejudicou o desempenho dos animais na tarefa do labirinto aquático, versão memória espacial de referência [$F(1,13) = 0,16; P = 0,70$].

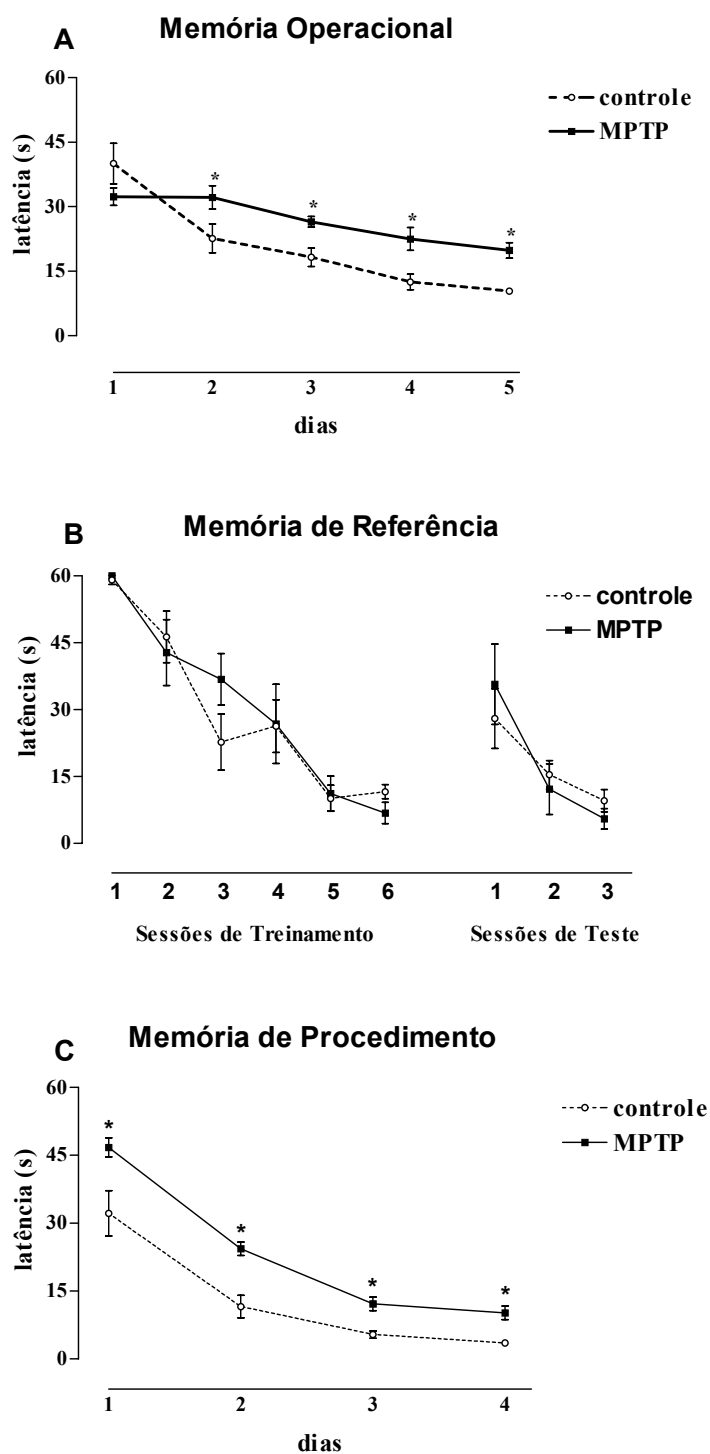


Figura 13. Efeito da administração intranasal de MPTP (0,2 mg/narina) ou solução controle (intranasal) sobre o desempenho dos animais nas três versões do labirinto aquático. Os valores são expressos pela latência para encontrar a plataforma (média \pm E.P.M.) de 7-8 animais por grupo. * $P \leq 0,05$ comparado ao grupo controle (Teste de Newman-Keuls).

4.7. Efeito da administração intranasal de MPTP sobre os níveis cerebrais de dopamina e seus metabólitos

Com o objetivo de verificar possíveis alterações nos níveis cerebrais de dopamina (DA) e de seus metabólitos não-conjugados, o ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) e o ácido homovanílico (HVA) pela administração intranasal de MPTP (0,2 mg/narina), procedeu-se a dosagem destes compostos por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) no bulbo olfatório, estriado, córtex pré-frontal e hipocampo de ratos nos mesmos intervalos (1, 7, 14 ou 21 dias) após o tratamento com MPTP utilizados nos experimentos comportamentais.

A Figura 14 ilustra os níveis de DA no bulbo olfatório de ratos após diferentes intervalos (1, 7, 14 e 21 dias) da administração intranasal de MPTP (0,2 mg/narina) ou solução controle (intranasal). A ANOVA de duas vias (tratamento x tempo) revelou um efeito significativo para os fatores tratamento [$F(1,32) = 12,98$; $P < 0,001$] e tempo [$F(3,32) = 2,91$; $P < 0,05$]. Entretanto, revelou um efeito não significativo para o fator de interação [$F(3,32) = 0,88$; $P = 0,46$]. Posterior teste de Newman-Keuls revelou que o tratamento intranasal com MPTP promoveu uma redução significativa nos níveis de DA no bulbo olfatório de ratos nos intervalos de 1, 7 e 14 dias após o tratamento, sendo que estes retornam aos níveis basais 21 dias após a administração do MPTP (Figura 14).

No estriado, a ANOVA de duas vias (tratamento x tempo) revelou um efeito significativo para o fator tratamento e o fator de interação (tratamento x tempo) nos níveis de DA [$F(1,32) = 6,02$; $P < 0,001$ e $F(3,32) = 5,96$; $P < 0,001$, respectivamente] e de seus metabólitos DOPAC [$F(1,32) = 13,84$; $P < 0,0001$ e $F(3,32) = 6,84$; $P < 0,001$,

respectivamente] e HVA [$F(1,32) = 17,14$; $P < 0,001$ e $F(3,32) = 6,28$; $P < 0,001$, respectivamente]. Entretanto revelou um efeito não significativo para o fator tempo nos níveis de DA [$F(3,32) = 2,08$; $P = 0,12$], DOPAC [$F(3,32) = 2,92$; $P = 0,09$] e HVA [$F(3,32) = 1,12$; $P = 0,36$]. Posterior teste de Newman-Keuls indicou que esta redução nos níveis de DA, DOPAC e HVA no estriado ocorreu mais tardiamente em comparação ao bulbo olfatório, sendo verificada nos intervalos de 14 e 21 dias após a administração intranasal do MPTP (Figura 15).

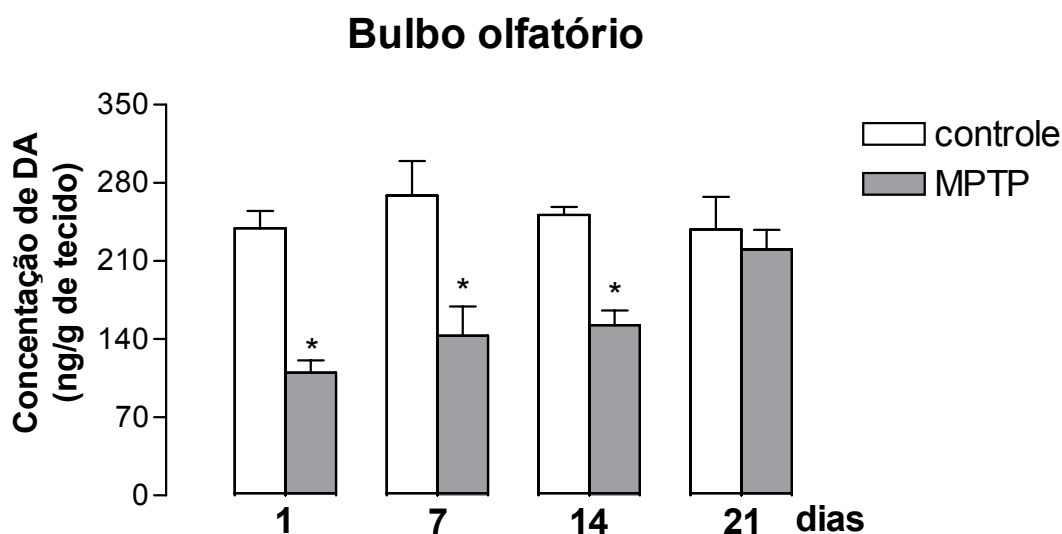


Figura 14. Efeito da administração intranasal de MPTP (0,2 mg/narina) ou solução controle (intranasal) sobre os níveis de dopamina (DA) no bulbo olfatório de ratos. Os valores são expressos pela média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo. $*P \leq 0,05$ comparado ao grupo controle do mesmo dia (Teste de Newman-Keuls).

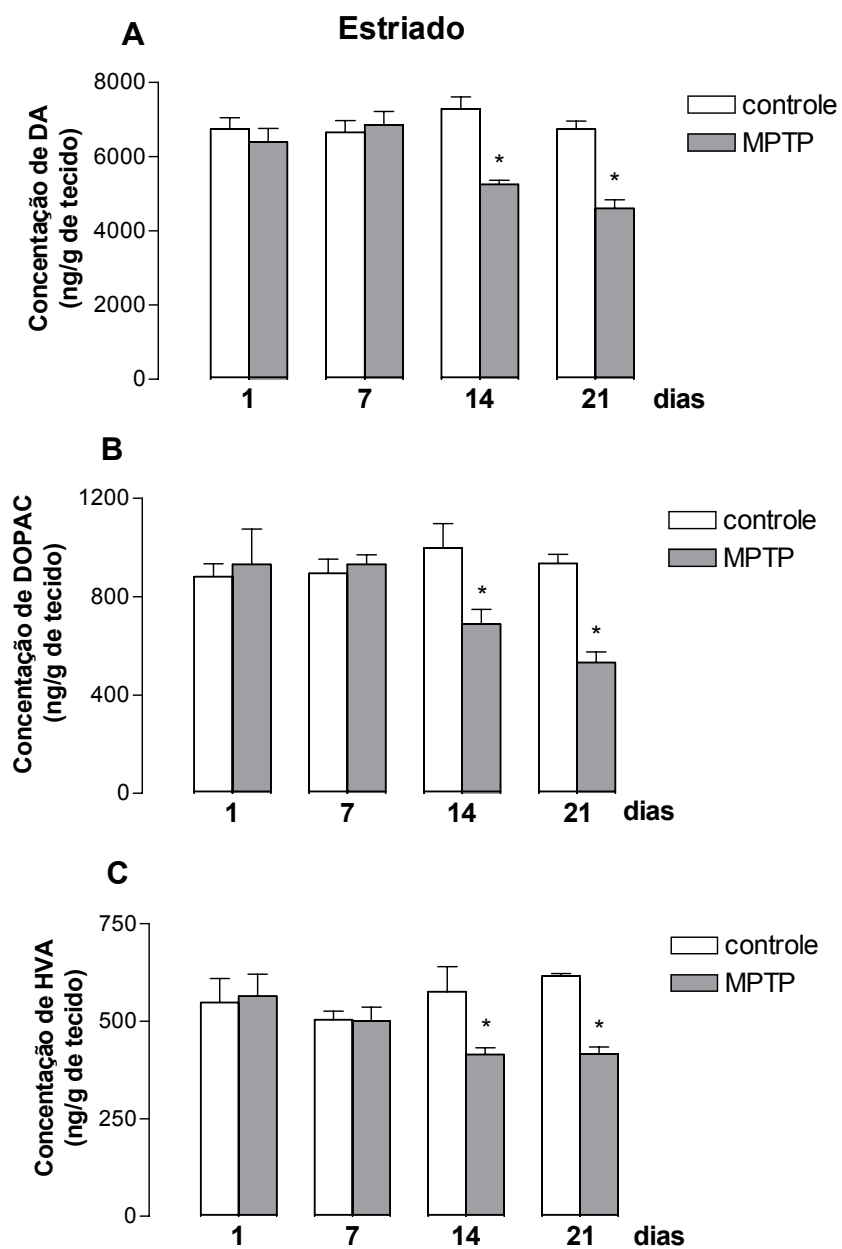


Figura 15. Efeito da administração intranasal de MPTP (0,2 mg/narina) ou solução controle (intranasal) sobre os níveis de dopamina (DA) e de seus metabólitos, o ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) e o ácido homovanílico (HVA) no estriado de ratos. Os valores são expressos pela média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo. $*P \leq 0,05$ comparado ao grupo controle do mesmo dia (Teste de Newman-Keuls).

Para fazermos uma correlação com os resultados comportamentais obtidos no teste do labirinto aquático de Morris, 7 dias após a administração intranasal de MPTP (0,2 mg/narina) ou solução controle (intranasal), realizamos a dosagem de DA e seus metabólitos DOPAC e HVA no córtex pré-frontal e hipocampo de ratos. Como ilustrado na Figura 16, a administração intranasal de MPTP causou uma redução significativa nos níveis de DA [$t=2,89$; $P\leq 0,05$] e de seus metabólitos DOPAC [$t=9,33$; $P<0,0001$] e HVA [$t=3,02$; $P<0,01$] no córtex pré-frontal de ratos.

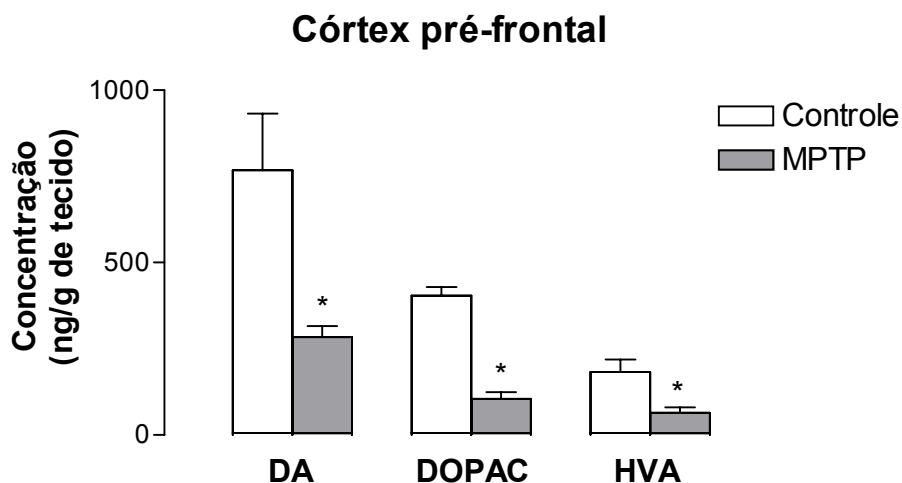


Figura 16. Efeito da administração intranasal de MPTP (0,2 mg/narina) ou solução controle (intranasal) sobre os níveis de dopamina (DA) e de seus metabólitos, o ácido 3,4-dihidroxiifenilacético (DOPAC) e o ácido homovanílico (HVA) no córtex pré-frontal de ratos. Os valores são expressos pela média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo. * $P\leq 0,05$ comparado ao grupo controle do mesmo dia (Teste “t” de Student).

Por outro lado, a administração intranasal de MPTP (0,2 mg/narina) não alterou significativamente os níveis de DA no hipocampo de ratos [teste “t” de Student: $t=0,46$; $P=0,65$] (Figura 17).

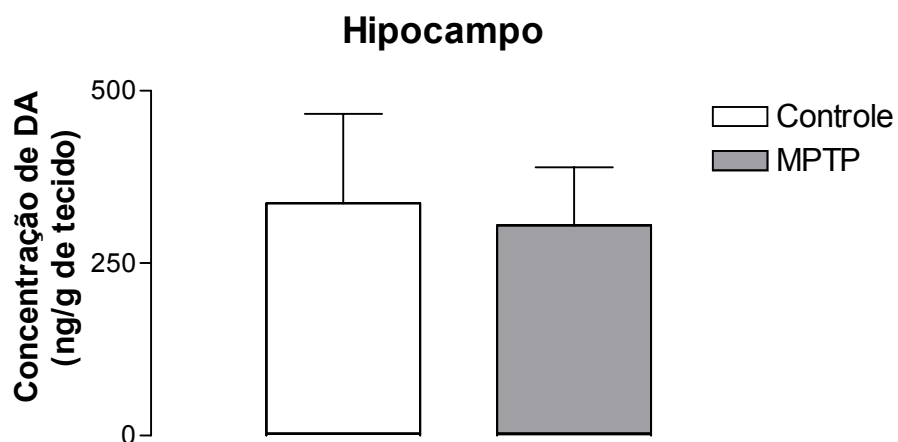


Figura 17. Efeito da administração intranasal de MPTP (0,2 mg/narina) ou solução controle (intranasal) sobre os níveis de dopamina (DA) no hipocampo de ratos. Os valores são expressos pela média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo.

4.8. Efeito da administração intranasal de MPTP sobre a expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) no bulbo olfatório e substância negra de ratos

Com o objetivo de verificar possíveis alterações no padrão de expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) (utilizada como um marcador de neurônios dopaminérgicos) após o tratamento intranasal com MPTP, foi realizado o ensaio de imunodeteção de proteínas (“*western blot*”) nos mesmos intervalos (1, 7, 14 e 21 dias) utilizados nos experimentos comportamentais.

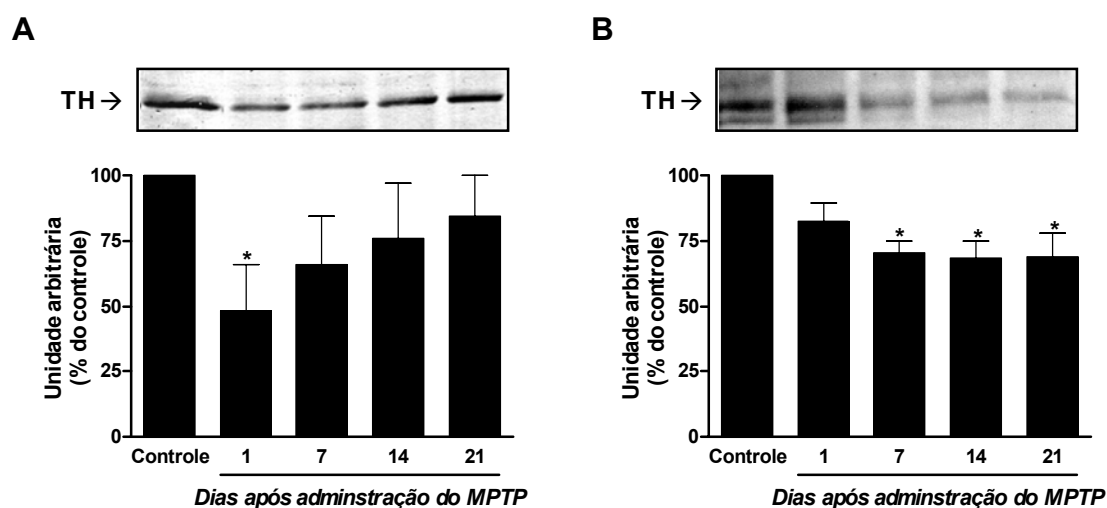


Figura 18. Efeito da administração intranasal de MPTP (0,2 mg/narina) ou solução controle (intranasal) sobre a expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) no bulbo olfatório (A) e substância negra (B) de ratos. Os valores são expressos pela média \pm E.P.M. de 3 animais por grupo. * $P \leq 0,05$ comparado ao grupo controle (Teste de Newman-Keuls).

Como ilustrado na Figura 18, a ANOVA de uma via indicou que a administração intranasal de MPTP (0,2 mg/narina) promoveu uma redução significativa na expressão da TH no bulbo olfatório [$F(4,5) = 1,40$; $P < 0,05$] (Figura 18A) e na substância negra [$F(4,10) = 4,61$; $P < 0,05$] (Figura 18B) de ratos. Posterior teste de Newman-Keuls indicou que esta redução na expressão da TH ocorreu primeiramente no bulbo olfatório (dia 1), sendo verificado mais tardiamente na substância negra (dias 7-21) (Figura 18).

4.9. Efeito da administração intranasal de MPTP sobre os níveis de marcadores do estresse oxidativo – parâmetros antioxidantes

Com o objetivo de caracterizar um possível estresse oxidativo em consequência da administração intranasal de MPTP, foram mensurados os parâmetros antioxidantes: níveis de glutathiona total (GSH-t) e a atividade das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR), após diferentes intervalos do tratamento com MPTP. A quantificação dos parâmetros antioxidantes foi realizada em intervalos curtos (0,5; 2, 6 e 24 horas) após a administração intranasal de MPTP, uma vez que o estresse oxidativo pode representar um dos primeiros eventos do mecanismo de neurotoxicidade do MPTP (JACKSON-LEWIS et al., 1995; SRIRAM et al., 1997).

A Figura 19 ilustra os efeitos da administração intranasal de MPTP (0,2 mg/narina) sobre os níveis de glutathiona total (GSH-t) em diferentes áreas cerebrais do rato. A ANOVA de uma via indicou que o tratamento com MPTP promoveu um aumento

significativo nos níveis de GSH-t no bulbo olfatório [$F(4,20) = 4,36$; $P < 0,01$], estriado [$F(4,20) = 5,69$; $P < 0,001$] e hipocampo [$F(4,20) = 5,80$; $P < 0,01$], entretanto, não alterou os níveis de GSH-t na substância negra [$F(4,8) = 0,48$; $P = 0,75$] de ratos. O teste post-hoc de Newman-Keuls indicou que este efeito do MPTP sobre os níveis de GSH-t no bulbo olfatório, estriado e hipocampo foi mais pronunciado 6 horas após a sua administração (Figura 19).

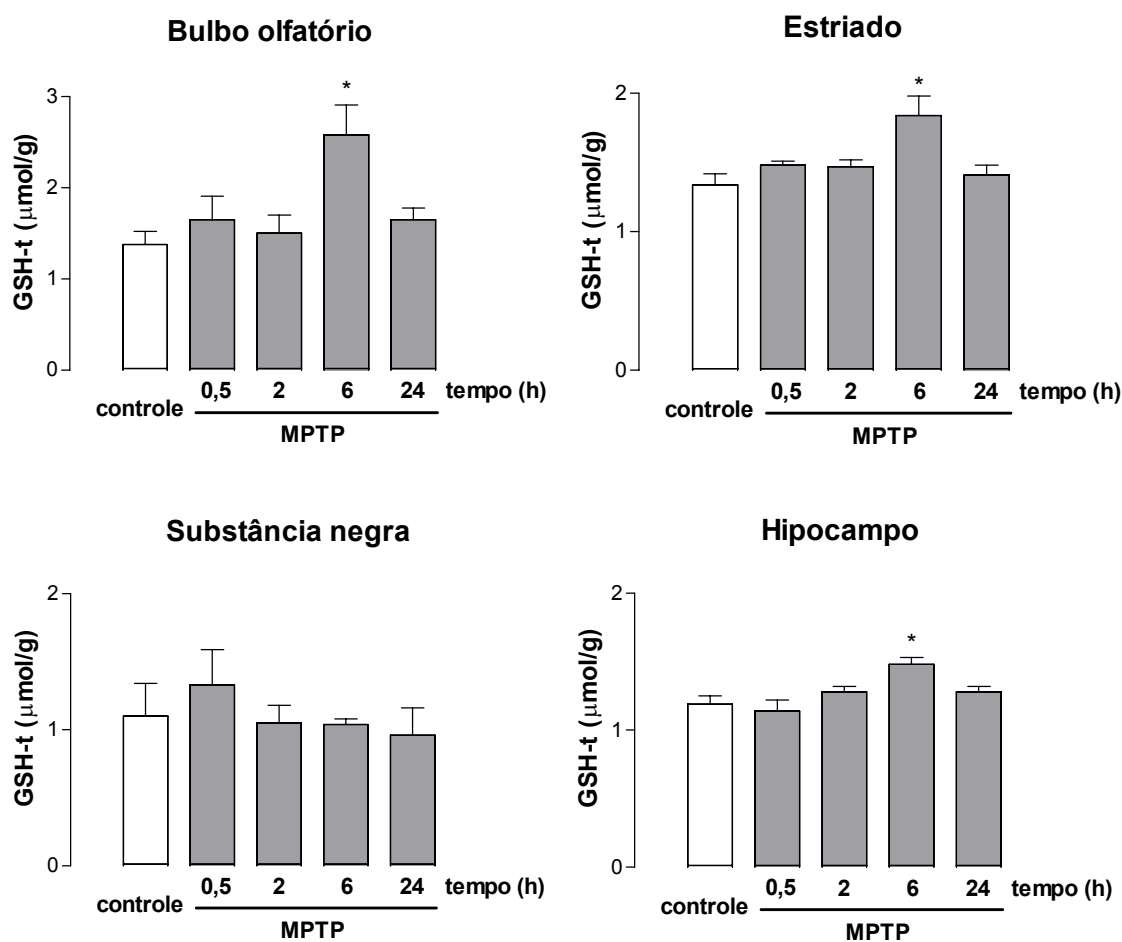


Figura 19. Efeito da administração intranasal de MPTP (0,2 mg/narina) ou solução controle (intranasal) sobre os níveis de glutatona total (GSH-t) no bulbo olfatório, estriado, substância negra e hipocampo de ratos. Os valores são expressos pela média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo. * $P \leq 0,05$ comparado ao grupo controle (Teste de Newman-Keuls).

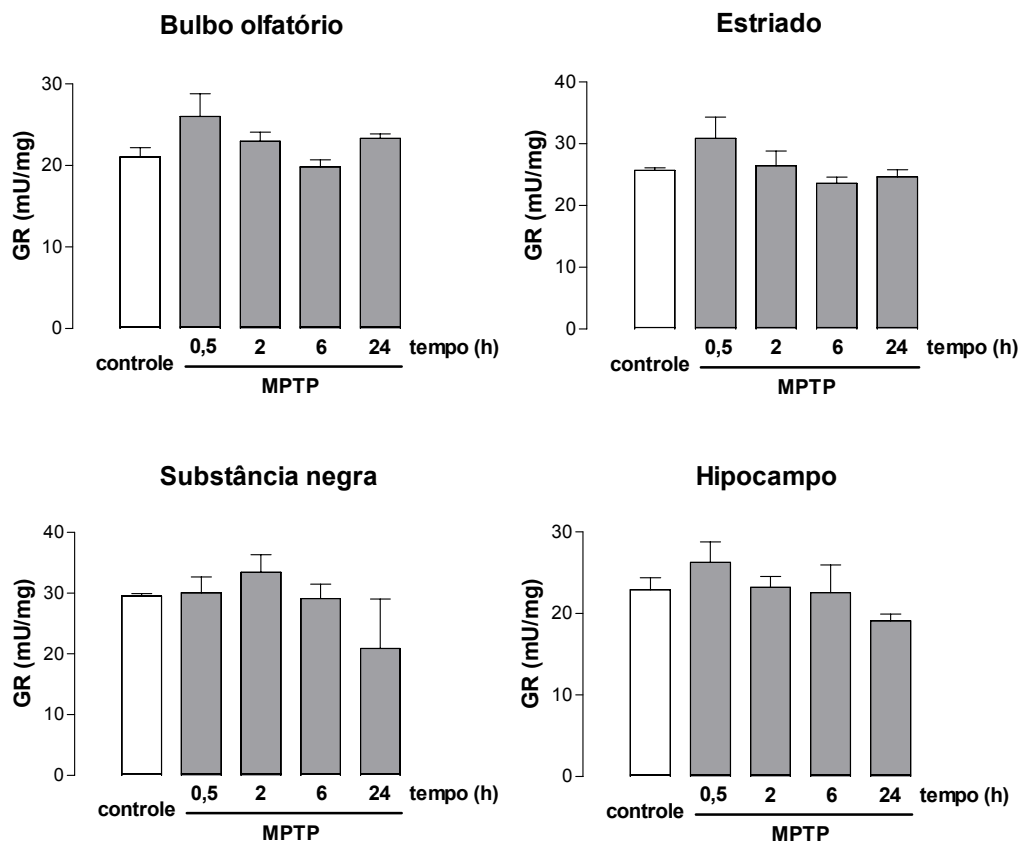


Figura 20. Efeito da administração intranasal de MPTP (0,2 mg/narina) ou solução controle (intranasal) sobre a atividade da enzima glutationa redutase (GR) no bulbo olfatório, estriado, substância negra e hipocampo de ratos. Os valores são expressos pela média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo.

O efeito da administração intranasal de MPTP (0,2 mg/narina) sobre a atividade das enzimas glutationa redutase (GR) e glutationa peroxidase (GPx) em diferentes áreas cerebrais de rato é apresentado nas Figuras 20 e 21, respectivamente. A ANOVA de uma via revelou que o tratamento com MPTP não alterou significativamente a atividade destas

enzimas em nenhuma das áreas cerebrais investigadas: bulbo olfatório [GR: $F(4,20) = 2,44$; $P=0,08$; GPx: $F(4,20) = 1,23$; $P=0,33$], estriado [GR: $F(4,20) = 1,94$; $P=0,14$; GPx: $F(4,20) = 0,16$; $P=0,96$], substância negra [GR: $F(4,6) = 1,28$; $P=0,37$; GPx: $F(4,6) = 2,64$; $P=0,14$] e hipocampo [GR: $F(4,20) = 1,42$; $P=0,26$; GPx: $F(4,20) = 1,57$; $P=0,22$] (Figuras 20 e 21).

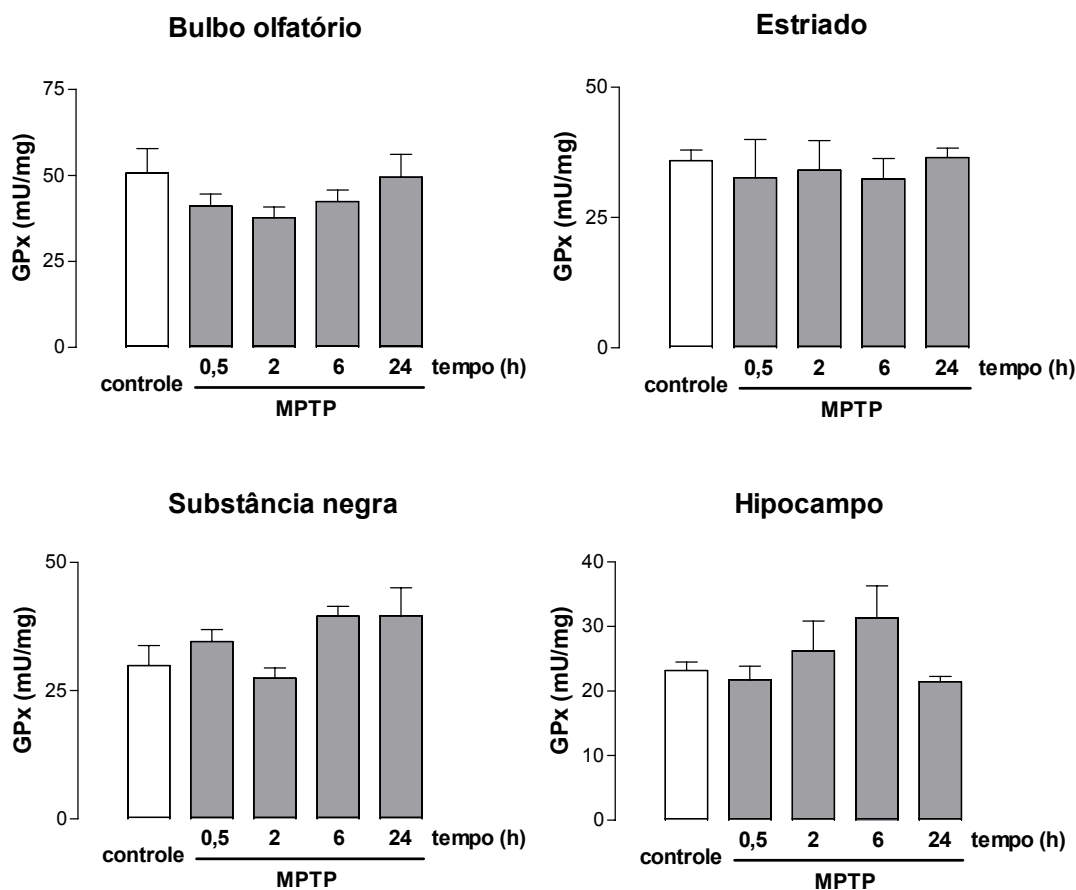


Figura 21. Efeito da administração intranasal de MPTP (0,2 mg/narina) ou solução controle (intranasal) sobre a atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx) no bulbo olfatório, estriado, substância negra e hipocampo de ratos. Os valores são expressos pela média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo.

4.10. Efeito da administração intranasal de MPTP sobre a ativação da proteína quinase de C-Jun N-terminal (JNK)

Com o objetivo de verificar possíveis alterações na ativação da proteína JNK após diferentes intervalos (30 min – 21 dias) do tratamento intranasal com MPTP, foi realizado o ensaio de imunodeteção de proteínas (“*western blot*”) para a forma fosforilada (ativada) das três isoformas (JNK1, JNK2 e JNK3) desta proteína.

Como ilustrado na Figura 22, em condições basais foi observado um baixo nível de ativação da proteína JNK no bulbo olfatório e substância negra de ratos. Por outro lado, a ANOVA de uma via indicou que a administração intranasal de MPTP (0,2 mg/narina) promoveu um aumento marcante no nível de ativação dessa proteína no bulbo olfatório [$F(9,10) = 0,78$; $P < 0,0001$] (Figura 22A) e na substância negra [$F(9,10) = 4,61$; $P < 0,0001$] (Figura 22B) de ratos. Posterior teste post-hoc de Newman-Keuls revelou que este aumento na atividade da JNK induzido pela administração intranasal de MPTP pode ser detectada em ambas estruturas em todos os intervalos investigados (30 min – 21 dias).

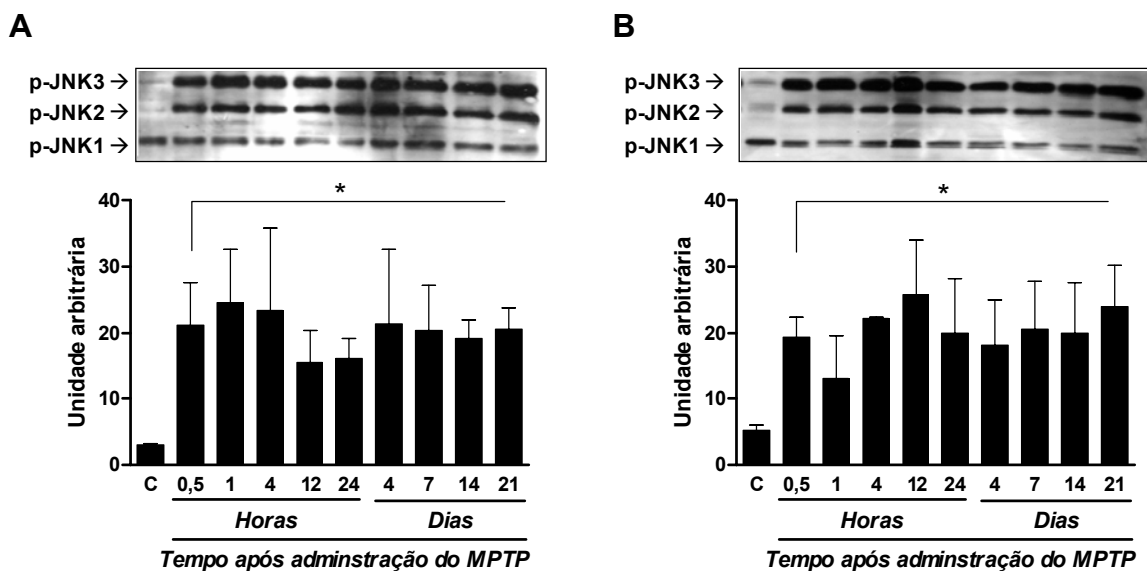


Figura 22. Efeito da administração intranasal de MPTP (0,2 mg/narina) ou solução controle (intranasal) sobre a ativação da proteína quinase de *c-Jun N-terminal* (JNK) no bulbo olfatório (A) e substância negra (B) de ratos. Os valores são expressos pela média \pm E.P.M. de 3 animais por grupo. $*P \leq 0,05$ comparado ao grupo controle (Teste de Newman-Keuls).

5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que a administração intraperitoneal (i.p.) de reserpina induz prejuízos significativos na capacidade de discriminação olfativa e memória social de ratos, sendo estes prejuízos revertidos pelo bloqueio dos receptores A_{2A} para adenosina e da ativação dos receptores D_2 para dopamina. Além disso, este estudo demonstra pela primeira vez que a administração intranasal de MPTP é capaz de induzir prejuízos progressivos nas funções olfativa, cognitiva e motora dos animais, sendo estas alterações comportamentais acompanhadas pela redução na expressão da enzima tirosina hidroxilase e nos níveis de dopamina em diferentes áreas cerebrais. Os presentes resultados indicam ainda que a morte de neurônios dopaminérgicos induzida pela administração intranasal de MPTP pode estar associada à geração de estresse oxidativo e processo apoptótico mediado por JNK.

Embora desde a sua descrição inicial, feita por James Parkinson em 1817, a doença de Parkinson (DP) venha sendo caracterizada como um distúrbio do movimento (RIEDERER e WUKETICH, 1976; JELLINGER, 1991; BARRIO et al., 1997; LINDNER et al., 1999), é amplamente aceito que os pacientes parkinsonianos manifestam também prejuízos cognitivos (DUBOIS e PILLON, 1997; FAGLIONI et al., 1997; PILLON et al., 1998; STEBBINS et al., 1999) e olfativos (DOTY et al., 1988, 1995; HAWKES et al., 1997, 1999), sendo que estes podem ser observados mesmo nos estágios iniciais da doença, antes que as alterações motoras sejam percebidas (FAGLIONI et al., 1997; HAWKES et al., 1999).

Por outro lado, o aumento do conhecimento acerca da fisiopatologia da DP, seus sintomas e o desenvolvimento de tratamentos mais efetivos depende da existência de modelos animais representativos. A DP é uma das várias doenças humanas que parece não ocorrer espontaneamente em outros animais. Entretanto, conforme detalhado anteriormente na Introdução, as características desta doença podem ser mimetizadas, em maior ou menor escala, em animais de laboratório (como roedores) através da administração de diferentes compostos (para revisão ver GERLACH e RIEDERER, 1996; DAWSON, 2000; BEAL, 2001; SHIMOHAMA et al., 2003).

Grande parte dos estudos realizados até o presente momento utilizando estes modelos animais da DP tem sido focada em seus efeitos sobre a via dopaminérgica nigrostriatal e a indução de comprometimentos motores nos animais. Entretanto, como a DP está associada com alterações em uma variedade de funções, incluindo alterações afetivas (SANTAMARIA et al., 1986; CUMMINGS, 1992); cognitivas (OWEN et al., 1995; DUBOIS e PILLON, 1997; GOLDMAN et al., 1998) e olfativas (DOTY et al., 1988,1995; HAWKES et al., 1998,1999), torna-se importante avaliar se estes modelos animais são também capazes de reproduzir algumas destas alterações.

No presente estudo, investigamos a existência de prejuízos olfativos em ratos tratados com uma dose aguda de reserpina (1 mg/kg, i.p.), 24 horas antes dos experimentos, que interfere com o armazenamento vesicular de monoaminas, levando a uma depleção temporária nos níveis de monoaminas nas terminações nervosas (CARLSSON, 1975; GERLACH e RIEDERER, 1996). A administração de reserpina em roedores (dependendo da dose utilizada) tem sido proposta como um modelo experimental para o estudo dos sintomas motores (CARLSSON, 1975; COLPAERT,

1987), cognitivos (ALVES et al., 2000) e depressivos (SKALISZ et al., 2002) associados à DP. O teste de discriminação olfativa utilizado, adaptado das descrições prévias feitas por SOFFIÉ e LAMBERTY (1988) e recentemente modificado em nosso laboratório (PREDIGER et al., 2005a,b), baseia-se nas observações de que ratos adultos machos preferem permanecer em ambientes impregnados com seu cheiro do que em ambientes inodoros ou com o cheiro de outros animais (CARR et al., 1976). A administração aguda de reserpina (1 mg/kg, i.p.) induziu um prejuízo significativo na discriminação olfativa dos animais, que passaram a explorar os dois compartimentos (familiar e não-familiar) de maneira semelhante.

Além disso, confirmando resultados prévios do nosso laboratório (PREDIGER et al., 2004), o presente estudo demonstra que ratos adultos tratados com reserpina (1 mg/kg, i.p.), 24 horas antes dos experimentos, apresentaram um prejuízo na capacidade de reconhecer um rato jovem quando este foi re-apresentado após um curto intervalo de tempo (30 min), sugerindo um prejuízo na memória social. Esta resposta parece não estar associada à alteração na atividade locomotora dos animais, uma vez que esta não foi observada no teste do campo aberto.

A memória social, avaliada através do teste de reconhecimento social, é um modelo de memória olfativa de curta duração que pode ser facilitada por drogas que melhoram os processos de aprendizado e memória (PERIO et al., 1989; TERRANOVA et al., 1996; PREDIGER et al., 2005b), e prejudicada por processos fisiopatológicos (como isquemia, envelhecimento, etc) que sabidamente interferem com os processos de aprendizado e memória (TERRANOVA et al., 1994; PREDIGER et al., 2005a).

Os presentes resultados estão de acordo com trabalhos prévios da literatura que indicam a importância das monoaminas na memória social de ratos. GRIFFING e TAYLOR (1995) demonstraram que a memória social de ratos pode ser facilitada ou prejudicada, respectivamente, por um aumento ou redução nos níveis de noradrenalina no SNC. Além disso, LETTY e colaboradores (1997) demonstraram que a serotonina é capaz de melhorar a memória social de ratos através da ativação dos receptores 5-HT₄.

Por outro lado, diferentes linhas de evidência sugerem o envolvimento da dopamina (DA) em processos cognitivos e olfativos, tanto em humanos quanto em roedores. Em ratos, estruturas cerebrais relacionadas aos processos de aprendizado e memória, como o hipocampo, o córtex pré-frontal e o estriado, são inervadas por neurônios dopaminérgicos (BAULAC et al., 1986; SEAMANS et al., 1998). A disfunção dopaminérgica nestas áreas está relacionada ao prejuízo seletivo das memórias espacial, operacional e de procedimento (ou hábitos), respectivamente (GASBARRI et al., 1996; DA CUNHA et al., 2001, 2003; MIYOSHI et al., 2002). Além disso, o bulbo olfatório de mamíferos contém um grande número de interneurônios dopaminérgicos que são muito importantes no processamento de odores (HALASZ et al., 1977; HALASZ e SHEPHERD, 1983; DOTY e RISSER, 1989; DAVILA et al., 2003).

Em roedores, estudos prévios têm demonstrado um prejuízo nas funções olfativas em consequência de tratamentos que reduzem a neurotransmissão dopaminérgica, como MPTP (DLUZEN e KREUTZBERG, 1993) e reserpina (PREDIGER et al., 2004). A DA parece ser também importante para os processos de aprendizado e memória olfativa, uma vez que seus níveis cerebrais aumentam durante o aprendizado olfativo (KENDRICK et al., 1988; COOPERSMITH et al., 1991; KEVERNE et al., 1993), sendo que a depleção

de DA ou a administração de antagonistas dopaminérgicos prejudicam a memória olfativa (WELDON et al., 1991; DLUZEN e KREUTZBERG, 1993; PREDIGER et al., 2004).

A clonagem e a identificação dos receptores dopaminérgicos têm revelado a existência de cinco diferentes subtipos de receptores (para revisão ver OGAWA, 1995). Os receptores do tipo D₁ incluem os subtipos D_{1A} e D_{1B} do rato (também chamados D₁ e D₅ em humanos), que estimulam a enzima adenilato ciclase. Já os receptores do tipo D₂ incluem os subtipos D₂, D₃ e D₄ que inibem a enzima adenilato ciclase (OGAWA, 1995).

No presente estudo, a administração de doses agudas do agonista seletivo do receptor D₂ para DA quinpirole (0,05 – 0,1 mg/kg, i.p.), mas não do agonista seletivo do receptor D₁ para DA SKF 38393 (0,5 – 3 mg/kg, i.p.), 15 min antes dos experimentos, reverteu os prejuízos na discriminação olfativa e memória social induzidos pela injeção de reserpina (1 mg/kg, i.p.). Os presentes resultados estão de acordo com muitos estudos que demonstram a importância dos receptores D₂ para DA em processos olfativos. Existe uma predominância de receptores dopaminérgicos do subtipo D₂ no nervo olfativo e camadas glomerulares do bulbo olfatório de ratos (CORONAS et al., 1997). Em um estudo prévio, demonstramos que a administração dos antagonistas dopaminérgicos haloperidol (não-seletivo) e sulpirida (antagonista do receptor D₂), mas não de SCH 23390 (antagonista do receptor D₁), prejudica a memória social de ratos (PREDIGER et al., 2004). Existem também evidências de que experiências olfativas podem alterar os níveis de DA e a densidade de receptores D₂ no bulbo olfatório de roedores (COOPERSMITH et al., 1991; GUTHRIE et al., 1991). Em conjunto, estes resultados sugerem que a ativação dos receptores D₂ para DA induzem uma inibição temporária de

sinapses recíprocas (entre células mitrais e granulares) no bulbo olfatório de ratos, sendo este um passo crítico na formação de memórias olfativas (para revisão ver BRENNAN e KEVERNE, 1997). Este, provavelmente, é o mecanismo pelo qual o agonista dopaminérgico quinpirole reverteu os prejuízos olfativos induzidos pela administração de reserpina.

Por outro lado, o potencial da cafeína e de antagonistas seletivos dos receptores A_{2A} para adenosina no tratamento da DP tem sido demonstrado em estudos realizados em humanos (HELLENBRAND et al., 1996; FALL et al., 1999; ROSS et al., 2000; ASCHERIO et al., 2001; GALE e MARTYN, 2003; TAN et al., 2003) e animais de laboratório (SVENNINGSSON et al., 1999; HAUBER et al., 2001; CHEN et al., 2001; GEVAERD et al., 2001b). Estes estudos sugerem que a cafeína pode estar associada a um menor risco no desenvolvimento futuro da DP (FALL et al., 1999; TAN et al., 2003), bem como redução na perda de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal (CHEN et al., 2001), e melhoria dos sintomas motores (SVENNINGSSON et al., 1999; HAUBER et al., 2001) e cognitivos (GEVAERD et al., 2001b) em modelos animais da DP.

Diversos estudos têm demonstrado que a adenosina apresenta efeitos opostos aos da DA no SNC. A ativação motora induzida por antagonistas dos receptores da adenosina (como a cafeína) é inibida pela depleção de DA ou pelo bloqueio dos receptores da DA. Além disso, agonistas adenosinérgicos inibem e antagonistas adenosinérgicos potencializam a estimulação motora induzida por agonistas dopaminérgicos (ver FERRE et al., 1997, 2001; FRANCO et al., 2000). Uma descoberta chave neste processo é a co-localização dos receptores D_1/A_1 e D_2/A_{2A} no estriado, inicialmente observado em ratos

(FERRE et al., 1991), mas posteriormente também descrito em humanos (DIAZ-CABIALE et al., 2001).

Apesar do grande número de trabalhos relatando os diferentes efeitos farmacológicos e comportamentais da cafeína, o envolvimento da cafeína e dos receptores da adenosina em funções olfativas tem sido praticamente ignorado. Resultados recentes obtidos em nosso laboratório têm indicado que a adenosina parece modular a memória social em ratos através da ativação dos receptores A_1 e A_{2A} , com agonistas e antagonistas dos receptores para adenosina, respectivamente, prejudicando e facilitando, a memória social (PREDIGER e TAKAHASHI, 2005). Além disso, nossos resultados prévios sugerem que a administração aguda de cafeína ou do antagonista seletivo dos receptores A_{2A} para adenosina ZM241385 é capaz de reverter os prejuízos na memória social em ratos idosos (PREDIGER et al., 2005a) e em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (PREDIGER et al., 2005b), nos quais algumas alterações na neurotransmissão adenosinérgica têm sido relatadas (DAVIES et al., 1987; MATIAS et al., 1992; CUNHA et al., 1995; LOPES et al., 1999).

No presente estudo, a administração de doses agudas de cafeína (10 – 30 mg/kg, i.p.) ou ZM241385 (0,5 – 1,0 mg/kg, i.p.), mas não de DPCPX (antagonista do receptor A_1 , 0,5 – 3 mg/kg, i.p.), 30 min antes dos experimentos, revertem os prejuízos na discriminação olfativa e memória social induzidos pela administração de reserpina (1 mg/kg, i.p.). É importante ser destacado que a administração destas mesmas doses de DPCPX foram capazes de estender a memória social de ratos não-reserpina por um período de 120 min (PREDIGER e TAKAHASHI, 2005), indicando que as doses de DPCPX utilizadas foram efetivas, mas falharam em reverter os prejuízos induzidos pela

reserpina. Além disso, os presentes resultados obtidos com a administração da cafeína e do ZM241385 não estão diretamente relacionados a alterações na atividade locomotora dos animais, uma vez que estas não foram observadas no teste do campo aberto. Além disso, os nossos resultados apontam para uma possível interação entre os receptores A_{2A} para adenosina e D_2 para DA na regulação de funções olfativas, uma vez que a administração combinada de doses sub-efetivas de ZM241385 (0,1 mg/kg, i.p.) e quinpirole (0,01 mg/kg, i.p.) atenuaram os prejuízos na memória social induzidos pela reserpina. Embora não seja possível determinar o local exato desta interação, algumas considerações podem ser feitas. Trabalhos independentes têm demonstrado uma elevada expressão dos receptores A_{2A} para adenosina (KAELIN-LANG et al., 1999) e D_2 para dopamina (CORONAS et al., 1997) no bulbo olfatório de ratos. Além disso, HADFIELD (1997) demonstrou que a cafeína, através do bloqueio dos receptores A_{2A} para adenosina, é capaz de modular a liberação de diferentes neurotransmissores (incluindo a DA) no bulbo olfatório de roedores. Desta forma, uma possível co-localização e interação antagônica entre os receptores A_{2A}/D_2 no bulbo olfatório, de maneira semelhante ao observado no estriado, pode ser responsável pelo efeito somatório observado pela administração do ZM241385 e quinpirole na memória social de ratos tratados com reserpina.

Por outro lado, como mencionado na Introdução, embora a causa primária da DP não esteja completamente esclarecida, uma hipótese muito difundida atualmente, é a de que ela representaria uma doença multifatorial decorrente da combinação de fatores genéticos e ambientais (LANGSTON, 1996). Neste sentido, estudos epidemiológicos têm demonstrado um aumento na incidência da DP em populações expostas a certos agentes

ambientais, como: metais e certos tipos de pesticida e herbicida (TANNER, 1989; SEMCHUK et al., 1993; GORELL et al., 1998; ALTSCHULER, 1999; FALL et al., 1999; VANACORE et al., 2002). Desta forma, um agente ambiental poderia influenciar decisivamente no desenvolvimento da DP em indivíduos geneticamente susceptíveis (MENESES e TEIVE, 1996).

Com o objetivo de verificar se uma toxina ou agente químico presente no meio ambiente poderia utilizar a cavidade nasal como porta de entrada no organismo e estar relacionado à etiologia da DP, nós administramos o MPTP pela via intranasal em ratos. Os efeitos do MPTP são dependentes da espécie estudada, sendo que em primatas (homens, macacos e babuínos) o MPTP induz sintomas e alterações neuroquímicas praticamente indistinguíveis da DP (LANGSTON et al., 1983; BURNS et al., 1983; KOPIN e MARKEY, 1988; FORNO et al., 1993; VARASTET et al., 1994; BEAL, 2001). Já roedores (ratos e camundongos) parecem ser menos sensíveis à neurotoxicidade induzida pelo MPTP quando comparados aos primatas, além de não apresentarem toda a sintomatologia característica da DP. Em camundongos, os efeitos da administração sistêmica do MPTP são dependentes do regime do tratamento, da linhagem estudada e da idade dos animais (IRWIN et al., 1992, 1993; SEDELIS et al., 2000, 2001; SCHMIDT e FERGER, 2001). Já ratos são particularmente resistentes aos efeitos do MPTP quando este é administrado sistemicamente (CHIUEH et al., 1984; KALARIA et al., 1987), sendo este o principal fator responsável pelo limitado número de trabalhos destinados a investigar as ações desta neurotoxina em ratos, chegando ao extremo de alguns autores desaconselharem o emprego do modelo do MPTP nesta espécie (SCHMIDT e FERGER, 2001). Entretanto, tem sido demonstrado que a microinjeção do MPTP diretamente à

substância negra parte compacta (SNc) de ratos é capaz de lesar seletivamente neurônios dopaminérgicos desta estrutura, ocasionando uma redução nos níveis estriatais de DA (HARIK et al., 1987; DA CUNHA et al., 2001; GEVAERD et al., 2001a).

No presente estudo, o procedimento utilizado para a administração intranasal de MPTP foi adaptado de um estudo prévio de DLUZEN e KEFALAS (1996), que administraram esta neurotoxina pela via intranasal em camundongos. Os resultados obtidos no teste de discriminação olfativa indicam que os animais tratados com MPTP (0,2 mg/narina) apresentaram um prejuízo precoce na capacidade de discriminar odores, sendo este verificado 1, 7 e 14 dias após a administração de MPTP. Estes prejuízos olfativos induzidos pela administração intranasal de MPTP foram acompanhados por uma redução significativa nos níveis de DA e na expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) no bulbo olfatório dos animais. A TH é a enzima limitante na síntese de catecolaminas e, por esta razão, utilizada como um marcador neuronal de neurônios dopaminérgicos. As alterações neuroquímicas no bulbo olfatório induzidas pela administração intranasal de MPTP foram mais pronunciadas no dia 1 após o tratamento, verificando-se uma redução de aproximadamente 54% nos níveis de DA e 50% no número de neurônios reativos para TH.

De maneira interessante, o prejuízo na discriminação olfativa induzido pela administração intranasal de MPTP sofreu uma reversão 21 dias após este tratamento. Neste intervalo, os experimentos com dosagens neuroquímicas indicam que os níveis de DA, bem como a expressão da enzima TH, no bulbo retornaram aos valores basais. Uma possível explicação para estes resultados, é de que a lesão dos neurônios dopaminérgicos no bulbo olfatório induzida pela administração intranasal de MPTP tenha sido regenerada

após este período (21 dias). Isto se deve ao fato do bulbo olfatório representar uma das estruturas do SNC (tanto em humanos quanto em roedores) dotada da capacidade de produzir novos neurônios mesmo em indivíduos na idade adulta, um processo conhecido como neurogênese (para revisão ver HACK et al., 2005; LLEDO e SAGHATELYAN, 2005). Em acordo com a nossa hipótese, YAMADA e colaboradores (2004) demonstraram recentemente que a administração i.p. de MPTP (4 injeções na dose de 20 mg/kg) em camundongos da linhagem C57BL6 produz uma perda significativa de neurônios dopaminérgicos do bulbo olfatório destes animais. Entretanto, os autores verificaram que à partir de uma semana após o tratamento com MPTP, ocorreu um processo de neurogênese seletivo de neurônios dopaminérgicos no bulbo olfatório dos camundongos (YAMADA et al., 2004).

Os nossos resultados sugerem também que a administração intranasal de MPTP (0,2 mg/narina) promoveu um prejuízo mais tardio na atividade locomotora dos animais, sendo este efeito observado no teste do campo aberto 14 e 21 dias após o tratamento com MPTP. Este comprometimento motor foi acompanhado por uma redução significativa nos níveis estriatais de DA (32%), DOPAC (43%) e HVA (27%), bem como na expressão da enzima TH (27%) na substância negra dos animais. Os presentes resultados contrastam com trabalhos prévios da literatura nos quais o MPTP tem sido administrado bilateralmente à SNc de ratos. Nestes estudos, a infusão de MPTP não causa nenhum prejuízo significativo na função motora dos animais, quando esta é avaliada 18-21 dias após a cirurgia (DA CUNHA et al., 2001; GEVAERD et al., 2001b; MIYOSHI et al., 2002; FERRO et al., 2005), sendo observada uma hiperlocomoção dos animais 6 dias após a administração intranigral de MPTP (FERRO et al., 2005). Uma possível

explicação para esta discrepância dos resultados, é que em contraste aos estudos utilizando a infusão bilateral de MPTP à SNc de ratos, onde verifica-se uma lesão dopaminérgica homogênea nos dois hemisférios, a administração intranasal de MPTP pode estar induzindo uma difusão não-homogênea desta neurotoxina no SNC dos animais e, conseqüentemente, causando um desequilíbrio nos níveis de DA nos dois estriados e resultando nas alterações motoras. Uma outra possível explicação para os prejuízos motores observados no presente estudo, é que o MPTP, quando administrado pela via intranasal, poder lesionar neurônios noradrenérgicos do locus ceruleus, sendo esta uma das principais maneiras de se induzir acinesia em ratos (LE e LU, 1995; SRINIVASAN E SCHMIDT, 2003). Corroborando com esta hipótese, DLUZEN e KEFALAS (1996) demonstraram que a administração intranasal de MPTP é capaz de reduzir os níveis de noradrenalina no estriado de camundongos.

O fato da administração intranasal de MPTP ter promovido alterações olfativas antes de afetar a função motora dos animais parece estar de acordo com os estudos clínicos existentes nesta área, que descrevem que os prejuízos olfativos apresentados por pacientes parkinsonianos podem ser detectados antes mesmo do aparecimento dos sintomas clássicos motores (DANIEL e HAWKES, 1992; DOTY et al., 1995; BERENDSE et al., 2001). Segundo BRAAK e colaboradores (2004), diferentes áreas olfativas, juntamente com o tronco cerebral, seriam as primeiras áreas acometidas pelo processo neurodegenerativo verificado na DP, representando os estágios pré-sintomáticos 1-2 desta doença. Portanto, os nossos resultados estendem a idéia de que o desenvolvimento de técnicas mais precisas, que permitam mensurar este prejuízo olfativo precocemente, pode vir a representar uma importante ferramenta para o diagnóstico da

DP em seus estágios iniciais, melhorando a eficácia do seu tratamento (DOTY et al., 1984, 1995; DANIEL e HAWKES, 1992; BECKER et al., 2002).

Por outro lado, uma vez que os pacientes parkinsonianos manifestam também prejuízos cognitivos (DUBOIS e PILLON, 1997; FAGLIONI et al., 1997; PILLON et al., 1998; STEBBINS et al., 1999), nós avaliamos o efeito da administração intranasal de MPTP (0,2 mg/narina) sobre a memória social e o desempenho dos animais em três versões do labirinto aquático de Morris. Os testes foram realizados 7 dias após a administração do MPTP, sendo que neste intervalo os animais não apresentam alterações motoras significativas que pudessem dificultar a interpretação dos resultados. Ratos adultos tratados com MPTP (0,2 mg/narina) apresentaram um prejuízo significativo na capacidade de reconhecer um rato jovem quando este foi re-apresentado após um curto intervalo de tempo (30 min), sugerindo um prejuízo na memória social. Em acordo com os nossos resultados, DLUZEN e KREUTZBERG (1993) demonstraram que a administração i.p. de MPTP (4 injeções na dose de 10 mg/kg) promove um prejuízo na memória social de camundongos. Além disso, como já descrito anteriormente, os presentes resultados reforçam estudos prévios que demonstram a importância da DA em processos olfativos, incluindo a formação de memórias olfativas (COOPERSMITH et al., 1991; GUTHRIE et al., 1991; CORONAS et al., 1997; PREDIGER et al., 2004).

Existem muitos trabalhos na literatura indicando que os diferentes tipos de memória são organizados e controlados por sistemas neuroanatômicos distintos (PACKARD et al., 1989; PACKARD e McGAUGH, 1992; MOSCOVITCH, 1994; MILNER et al., 1998; WHITE e McDONALD, 2002; DA CUNHA et al., 2003). Por exemplo, a lesão do sistema hipocampal prejudica seletivamente o desempenho de

roedores nos testes em que a memória espacial é necessária para a sua realização, enquanto que a lesão do caudado-putamen (estriado) prejudica seletivamente o desempenho nos testes em que se avalia a memória implícita/procedural (ex.: versão do labirinto aquático em que a plataforma é sinalizada por uma pista visual) (PACKARD et al., 1989; PACKARD e MCGAUGH, 1992, 1996; MIYOSHI et al., 2002; DA CUNHA et al., 2003).

No presente estudo, a administração intranasal de MPTP (0,2 mg/narina) promoveu um prejuízo significativo no desempenho dos animais nas tarefas de memória operacional e memória de procedimento (ou hábito) do labirinto aquático. Estes prejuízos nos processos de aprendizado e memória foram acompanhados pela redução significativa nos níveis de DA (63%), DOPAC (74%) e HVA (65%) no córtex pré-frontal, embora no estriado, esta redução tenha sido observada somente mais tardiamente (dia 14). Entretanto, o desempenho dos animais na tarefa de memória espacial de referência, bem como os níveis de DA no hipocampo, não foi afetado pela administração intranasal de MPTP. Estes resultados comportamentais e neuroquímicos são muito parecidos aos obtidos por MIYOSHI e colaboradores (2002), onde a administração de MPTP na SNc de ratos promoveu um prejuízo no desempenho dos animais nas tarefas de memória operacional e de procedimento, sem alterar a memória espacial de referência, no labirinto aquático.

Novamente, os resultados obtidos com a administração intranasal de MPTP em ratos apresentam semelhanças com a condição clínica. Embora existam divergências quanto aos tipos de memória que estariam comprometidos na DP, diversos estudos têm demonstrado que tanto as memórias implícitas (BONDI e KASZNIAK, 1991;

FERRARO et al., 1993; RONCACCI et al., 1996) quanto às memórias operacionais (DUBOIS e PILLON, 1997; STEBBINS et al., 1999; COSTA et al., 2003; CRUCIAN e OKUN, 2003) encontram prejudicadas, enquanto que as memórias declarativas estariam mais preservadas na DP (FLOWERS et al., 1984; KNOWLTON et al., 1996; DUBOIS e PILLON, 1997; RIEKKINEN et al., 1998).

A neurotoxicidade induzida pelo MPTP envolve a sua conversão no íon 1-metil-4-fenil piperidínio (MPP^+) pela ação da enzima monoamina oxidase B (MAO-B), sendo este então captado pelo sistema de transporte da dopamina nos terminais dopaminérgicos nigroestriatais. Uma vez no interior do neurônio dopaminérgico, o MPP^+ se concentra principalmente na mitocôndria, onde ele inibe o complexo I da cadeia de transporte de elétrons, acarretando uma redução na produção de adenosina trifosfato (ATP) e aumento na formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO) (LANGSTON et al., 1984; RAMSAY e SINGER, 1986; HASEGAWA et al., 1990; 1997; TRIPTON e SINGER, 1993; BEAL, 2001). Dessa maneira, a geração de “estresse oxidativo” parece representar um dos principais mecanismos da neurotoxicidade induzida pelo MPTP/ MPP^+ . O estresse oxidativo é definido como um distúrbio no balanço pró/antioxidante, em favor do primeiro, podendo acarretar dano ao DNA, lise mitocondrial, influxo e desbalanço intracelular de cálcio, oxidação de proteínas e lipoperoxidação de membranas celulares e, conseqüentemente, dano celular (MARKS et al., 1996; SIES, 1997; HALLIWELL, 2001). Estudos prévios têm demonstrado que o tratamento com diferentes antioxidantes, como a vitamina E, β -caroteno e ácido ascórbico, é capaz de atenuar a neurotoxicidade induzida pelo MPTP em camundongos (PERRY et al., 1985; ODUNZE et al., 1990). Além disso, camundongos transgênicos que

apresentam uma expressão aumentada das enzimas antioxidantes Cu/Zn superóxido dismutase (SOD-1) e Mn superóxido dismutase (SOD-2) são mais resistentes à toxicidade do MPTP (PRZEDBORSKI et al., 1992; KLIVENYI et al., 1998). Em contrapartida, os efeitos neurotóxicos do MPTP são exacerbados em camundongos que apresentam deficiência destas enzimas (ZHANG et al., 2000; ANDREASSEN et al., 2001).

No presente estudo, de acordo com resultados prévios da literatura (HUNG e LEE, 1998), a administração intranasal de MPTP não alterou a atividade das enzimas antioxidantes glutathiona redutase (GR) e glutathiona peroxidase (GPx) em nenhuma das áreas cerebrais investigadas. Entretanto, verificamos um aumento significativo nos níveis de glutathiona total (GSH-t) no bulbo olfatório, estriado e hipocampo de ratos, 6 horas após a administração intranasal de MPTP. Contrastando com estes resultados, estudos prévios demonstram uma redução nos níveis cerebrais de GSH-t em ratos tratados com MPTP (LERET et al., 2002), bem como em pacientes parkinsonianos (SIAN et al., 1994a,b). Entretanto, reforçando os nossos resultados, SRIRAM e colaboradores (1997) demonstraram que a administração de MPTP (30 mg/kg, s.c.) em camundongos, promove inicialmente (2 horas após o tratamento) uma redução nos níveis de GSH-t no estriado e mesencéfalo, o que é acompanhado pela produção de ERO. Como a produção de ERO permanencia aumentada, verificou-se um aumento tardio nos níveis de GSH-t (6-8 horas após o tratamento com MPTP). Portanto, o presente aumento nos níveis de GSH-t, verificado 6 horas após a administração intranasal de MPTP, parece representar um mecanismo de defesa do SNC na tentativa de controlar a produção de ERO e evitar o estresse oxidativo. Corroborando com esta visão, a redução nos níveis cerebrais de GSH-t

ou a administração de um precursor de GSH tem sido associada, respectivamente, com o aumento e a diminuição da neurotoxicidade induzida pelo MPTP (WIENER et al., 1988; ADAMS et al., 1989).

As alterações na geração de ERO apresentam uma resposta máxima algumas horas após a administração do MPTP, sendo que a morte neuronal induzida pelo MPTP ocorrerá somente após alguns dias desta administração (JACKSON-LEWIS et al., 1995). Portanto, a geração de ERO parece ser um dos eventos iniciais no mecanismo de neurotoxicidade induzido pelo MPTP, que embora não seja o responsável direto pela morte neuronal, funcionará como um ativador de diferentes eventos celulares que acarretarão a morte dos neurônios dopaminérgicos (para revisão ver DAUER e PRZEDBORSKI, 2003; PRZEDBORSKI e VILA, 2003; PRZEDBORSKI et al., 2003).

Tem sido demonstrado que um dos eventos celulares desencadeado pelo estresse oxidativo e que poderia estar sendo responsável pela neurodegeneração dopaminérgica induzida pelo MPTP seria um processo de apoptose mediada por proteínas quinases de *c-Jun N-terminal* (JNK). SAPORITO e colaboradores (2000) demonstraram que o tratamento com MPTP é capaz de aumentar a ativação da JNK na substância negra de camundongos. Além disso, tem sido demonstrado que o tratamento com inibidores seletivos da JNK, bem como a deleção gênica da JNK, é capaz de reduzir a perda de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal induzida pelo MPTP em camundongos (SAPORITO et al., 1999; HUNOT et al., 2004; WANG et al., 2004). De acordo com estas observações, os presentes resultados demonstram uma expressão aumentada da forma fosforilada (ativada) das três isoformas da JNK no bulbo olfatório e substância negra após a administração intranasal de MPTP (0,2 mg/narina). Este aumento na

ativação da JNK pode ser observada 30 min após o tratamento com MPTP, se mantendo por longos períodos (21 dias). Portanto, a degeneração dopaminérgica verificada em diferentes áreas cerebrais de ratos após a administração intranasal de MPTP pode estar sendo desencadeada por um processo de apoptose mediado pela indução de estresse oxidativo e a conseqüente ativação sustentada da JNK.

Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstram a presença de prejuízos olfativos e cognitivos em ratos após a administração de reserpina (i.p.) e MPTP (intranasal), utilizados como modelos experimentais da DP. Estes prejuízos antecedem o comprometimento das funções motoras dos animais. Estes resultados confirmam e estendem a importância do desenvolvimento de testes olfativos específicos como uma importante ferramenta no diagnóstico precoce da DP. Além disso, os nossos resultados sugerem o envolvimento dos sistemas adenosinérgico e dopaminérgico nos comprometimentos olfativos e cognitivos no modelo da reserpina, reforçando o potencial terapêutico da cafeína e de antagonistas seletivos dos receptores A_{2A} para adenosina na DP, além de cofirmarem o valor preditivo e por semelhança do modelo da reserpina. O presente estudo demonstra ainda que a administração intranasal de MPTP em ratos é capaz de induzir alterações neuroquímicas semelhantes às observadas na DP, indicando que este modelo parece reproduzir melhor o avanço gradual do quadro clínico verificado na DP, além de reforçar a hipótese de que um vírus ou agente químico, presente no meio ambiente, poderia utilizar a cavidade nasal como porta de entrada no organismo e estar relacionado à etiologia da DP. Finalmente, os nossos resultados indicam que a morte de neurônios dopaminérgicos induzidos pela administração intranasal de MPTP pode estar associada à geração de estresse oxidativo e processo de apoptose mediado por JNK.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, J.D. Jr; KALIVAS, P.W.; MILLER, C.A. The acute histopathology of MPTP in the mouse CNS. **Brain Res. Bull.**, 23: 1-17, 1989.
- AKERBOOM, T.P.; SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods Enzymol.**, 77: 373-382, 1981.
- ALTSCHULER, E. Aluminum-containing antacids as a cause of idiopathic Parkinson's disease. **Med. Hypotheses.**, 53: 22-23, 1999.
- ALVES, C.S.D.; ANDREATINI, R.; DA CUNHA, C.; TUFIK, S.; VITAL, M.A.B.F. Phosphatidylserine reverses reserpine-induced amnesia. **Eur. J. Pharmacol.**, 404: 161-167, 2000.
- ANDREASSEN, O.A.; FERRANTE, R.J.; DEDEOGLU, A.; ALBERS, D.W.; KLIVENYI, P.; CARLSON, E.J.; EPSTEIN, C.J.; BEAL, M.F. Mice with a partial deficiency of manganese superoxide dismutase show increased vulnerability to the mitochondrial toxins malonate, 3-nitropropionic acid, and MPTP. **Exp. Neurol.**, 167: 189-195, 2001.
- ARAI, N.; MISURGI, K.; GOSHIMA, Y.; MISU, Y. Evaluation of a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated C57 black mouse model for parkinsonism. **Brain Res.**, 515: 57-63, 1990.
- ARAKI, T.; KUMAGAI, T.; TANAKA, K.; MATSUBARA, M.; KATO, H.; ITOYAMA, Y.; IMAI, Y. Neuroprotective effect of riluzole in MPTP-treated mice. **Brain Res.**, 918: 176-181, 2001a.
- ARAKI, T.; MIKAMI, T.; TANJI, H.; MATSUBARA, M.; IMAI, Y.; MIZUGAKI, M.; ITOYAMA Y. Biochemical and immunohistological changes in the brain of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated mouse. **Eur. J. Pharm. Sci.**, 12: 231-238, 2001b.
- ASCHERIO, A.; ZHANG, S.M.; HERNAN, M.A.; KAWACHI, I.; COLDITZ, G.A.; SPEIZER, F.E.; WILLETT, W.C. Prospective study of caffeine consumption and risk of Parkinson's disease in men and women. **Ann. Neurol.**, 50: 56-63, 2001.

- BADDELEY, A.D. **Working memory**. Oxford University Press, Oxford, 1986.
- BALLARD, P.A.; TETRUD, J.W.; LANGSTON, J.W. Permanent human parkinsonism due to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): seven cases. **Neurology**, 35: 949-956.
- BANDMANN, O.; MARSDEN, C.D.; WOOD, N.W. Genetic aspects of Parkinson's disease. **Mov. Disord.**, 13: 203-211, 1998.
- BARRIO, J.R.; HUANG, S.C.; PHELPS, M.E. Biological imaging and molecular basis of dopaminergic disease. **Biochem. Pharmacol.**, 54: 341-348, 1997.
- BAULAC, M.; VERNEY, C.; BERGER, B. Dopamine innervation of the parahippocampal and hippocampal regions in the rat. **Rev. Neurol.**, 142: 895-905, 1986.
- BEAL, M.F. Experimental models of Parkinson's disease. **Nat. Rev. Neurosci.**, 2: 325-334, 2001.
- BECKER, G.; MULLER, A.; BRAUNE, S.; BUTTNER, T.; BENECKE, R.; GREULICH, W.; KLEIN, W.; MARK, G.; RIEKE, J.; THUMLER, R. Early diagnosis of Parkinson's disease. **J. Neurol.**, 249 (Suppl. 3): 40-48, 2002.
- BELLISSIMO, M.I.; KOUZMINE, I.; FERRO, M.M.; OLIVEIRA, B.H.; CANTERAS, N.S.; DA CUNHA, C. Is the unilateral lesion of the left substantia nigra pars compacta sufficient to induce working memory impairment in rats? **Neurobiol. Learn. Mem.**, 82: 150-158, 2004.
- BERENDSE, H.W.; BOOIJ, J.; FRANCOIS, C.M.; BERGMANS, P.L.; HIJMAN, R.; STOOFF, J.C.; WOLTERS, E.C. Subclinical dopaminergic dysfunction in asymptomatic Parkinson's disease patients' relatives with a decrease sense of smell. **Ann. Neurol.**, 50: 34-41, 2001.
- BERGMAN, H.; FEINGOLD, A.; NINI, A.; RAZ, A.; SLOVIN, H.; ABELES, M.; VAADIA, E. Physiological aspects of information processing in the basal ganglia of normal and parkinsonian primates. **Trends Neurosci.**, 21: 32-38, 1998.
- BEZARD, E.; DOVERO, S.; PRUNIER, C.; RAVENSCROFT, P.; CHALON, S.; GUILLOTEAU, D.; CROSSMAN, A.R.; BIOULAC, B.; BROTCHE, J.M.;

- GROSS, C.E. 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. **J. Neurosci.**, 21: 6853-6861, 2001.
- BEZARD, E.; IMBERT, C.; DELOIRE, X.; BIOULAC, B.; GROSS, C.E. A chronic MPTP model reproducing the slow evolution of Parkinson's disease: Evolution of motor symptoms in the monkey. **Brain Res.**, 766: 107-112, 1997.
- BLANDINI, F.; NAPPI, G.; TASSORELLI, C.; MARTIGNONI, E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. **Prog. Neurobiol.**, 62: 63 – 88, 2000.
- BLISS, T.V.P.; COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation. **Nature**, 361: 31-39, 1993.
- BONDI, M.W., KASZNIAK, A.W. Implicit and explicit memory in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **J. Clin. Exp. Neuropsychol.**, 13: 339-358, 1991.
- BONIFATI, V.; RIZZU, P.; VAN BAREN, M.J.; SCHAAP, O.; BREEDVELD, G.J.; KRIEGER, E.; DEKKER, M.C.; SQUITIERI, F.; IBANEZ, P.; JOOSSE, M.; VAN DONGEN, J.W.; VANACORE, N.; VAN SWIETEN, J.C.; BRICE, A.; MECO, G.; VAN DUIJN, C.M.; OOSTRA, B.A.; HEUTINK, P. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. **Science**, 299: 256-259, 2003.
- BRAAK H, GHEBREMEDHIN E, RUB U, BRATZEK H, DEL TREDICI K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. **Cell Tissue Res.**, 318: 121-134, 2004.
- BRAGA, R.; KOUZMINE, I.; CANTERAS, N.S.; DA CUNHA, C. Lesion of the substantia nigra, pars compacta impairs delayed alteration in a Y-maze in rats. **Exp. Neurol.**, 192: 134-141, 2005.
- BRENNAN, P.A.; KEVERNE, E.B. Neural mechanisms of mammalian olfactory learning. **Prog. Neurobiol.**, 51: 457-481, 1997.

- BURN, D.J.; MARK, M.H.; PLAYFORD, E.D.; MARAGANORE, D.M.; ZIMMERMAN, T.R.; DUVOISIN, R.C.; HARDING, A.E.; MARSDEN, C.D.; BROOKS, D.J. Parkinson's disease in twins studied with ^{18}F -DOPA and positron tomography. **Neurology**, 42: 1894-1900, 1992.
- BURNS, R.S.; CHIUEH, D.D.; MARKEY, S.P.; EBERT, M.H.; JACOBOWITZ, D.M.; KOPIN, I.J. A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 80: 4546-4550, 1983.
- CALBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods Enzymol.**, 113: 484-490, 1985.
- CARLSSON, A. Monoamine-depleting drugs. **Pharmacol. Ther.**, 1: 393-400, 1975.
- CARR, W.J.; YEE, L.; GABLE, D.; MARASCO, E. Olfactory recognition of conspecifics by domestic Norway rats. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, 90: 821-828, 1976.
- CHEN, J.F.; XU, K.; PETZER, J.P.; STAAL, R.; XU, Y.H.; BEILSTEIN, M.; SONSALLA, P.K.; CASTAGNOLI, K.; CASTAGNOLI JR., N.; SCHWARZSCHILD, M.A. Neuroprotection by caffeine and A2A adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. **J. Neurosci.**, 21: RC143, 2001.
- CHIUEH, C.; MARKEY, S.P.; BURNS, R.S.; JOHANNESSEN, J.N.; PERT, A.; KOPIN, I.J. Neurochemical and behavioral effects of systemic and intranigral administration of N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, 100: 189-194, 1984.
- COLPAERT, F.C. Pharmacological characteristics of tremor, rigidity and hypokinesia induced by reserpine in rats. **Neuropharmacology**, 26: 1431-1440, 1987.

- COOPERSMITH, R.; WEIHMULLER, F.B.; KIRSTEIN, C.L.; MARSHALL, J.F.; LEON, M. Extracellular dopamine increase in neonatal olfactory bulb during odor preference training. **Brain Res.**, 564: 149–153, 1991.
- CORONAS, V.; SRIVASTAVA, L.K.; LIANG, J.J.; JOURDAN, F.; MOYSE, E. Identification and localization of dopamine receptor subtype in rat olfactory mucosa and bulb: a combined in situ hybridization and ligand binding radioautographic approach. **J. Chem. Neuroanat.**, 12: 243–257, 1997.
- COSTA, A.; PEPPE, A.; DELL'AGNELLO, G.; CARLESIMO, G.A.; MURRI, L., BONUCCELLI, U.; CALTAGIRONE, C. Dopaminergic modulation of visual-spatial working memory in Parkinson's disease. **Dement. Geriatr. Cogn. Disord.**, 15: 55-66, 2003.
- CRUCIAN, G.P.; OKUN, M.S. Visual-spatial ability in Parkinson's disease. **Front. Biosci.**, 8: s992-997, 2003.
- CUMMINGS, J.L. Depression and Parkinson's disease: a review. **Am. J. Psychiatry**, 149: 443–454, 1992.
- CUNHA, R.A.; CONSTANTINO, M.D.; SEBASTIÃO, A.M.; RIBEIRO, J.A. Modification of A₁ and A_{2A} adenosine receptor binding in aged striatum, hippocampus and cortex of the rat. **NeuroReport**, 6: 1583–1588, 1995.
- DA CUNHA, C.; ANGELLUCCI, M.E.M.; CANTERAS, N.S.; WONNACOTT, S.; TAKAHASHI, R.N. The lesion of the rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons as a model for Parkinson's disease memory disabilities. **Cell Mol. Neurobiol.**, 22: 227-237, 2002.
- DA CUNHA, C.; GEVAERD, M.S.; VITAL, M.A.B.F.; MIYOSHI, E.; ANDREATINI, R.; SILVEIRA, R.; TAKAHASHI, R.N.; CANTERAS, N.S. Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. **Behav. Brain Res.**, 124: 9-18, 2001.
- DA CUNHA, C.; WIETZIKOSKI, S.; WIETZIKOSKI, E.C.; MIYOSHI, E.; FERRO, M.M.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; CANTERAS, N.S. Evidence for the substantia

- nigra pars compacta as an essential component of a memory system independent of the hippocampal memory system. **Neurobiol. Learn. Mem.**, 79: 236-242, 2003.
- DALY, J.W.; BUTTS-LAMB, P.; PADGETT, W. Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system. Interaction with caffeine and related methylxanthines. **Cell. Mol. Neurobiol.**, 1: 69-80, 1983.
- DANIEL, S.E.; HAWKES, C.H. Preliminary diagnosis of Parkinson's disease using olfactory bulb pathology. **Lancet**, 18: 186, 1992.
- DANTZER, R.; BLUTHE, R.M.; KOOB, G.F.; LE MOAL, M. Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides. **Psychopharmacology**, 91: 363-368, 1987.
- DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, 39: 889-909, 2003.
- DAVAL, J.L.; NICOLAS, F.; DORIAT, J.F. Adenosine and pharmacology: how about A₂ receptors. **Pharmacol. Ther.**, 71: 325-335, 1996.
- DAVILA, N.G.; BLAKEMORE, L.J.; TROMBLEY, P.Q. Dopamine modulates synaptic transmission between rat olfactory bulb neurons in culture. **J. Neurophysiol.**, 90: 395-404, 2003.
- DAVIES, L.P.; HAMBLEY, J.W.; JOHNSTON, G.A.R. Reduced adenosine deaminase activity in the CNS of spontaneously hypertensive rats. **Neurochem. Int.**, 10: 533-536, 1987.
- DAVIS, G.C.; WILLIAMS, A.C.; MARKEY, S.P.; EBERT, M.H.; CALNE, E.D.; REICHERT, C.M.; KOPIN, I.J. Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. **Psychiatry Res.**, 1: 249-254, 1979.
- DAVIS, L.E.; ADAIR, J.C. Parkinsonism from methanol poisoning: benefit from treatment with anti-Parkinson drugs. **Mov. Disord.**, 14: 520-522, 1999.
- DAVIS, R.J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. **Cell**, 103: 239-252, 2000.
- DAWSON, T.M. New animal models for Parkinson's disease. **Cell**, 101: 115-118, 2000.

- DIAZ-CABIALE, Z.; HURD, Y.; GUIDOLIN, D.; FINNMAN, U.B.; ZOLI, M.; AGNATI, L.F.; VANDERHAEGHEN, J.J.; FUXE, K.; FERRE, S. Adenosine A_{2A} agonist CGS 21680 decreases the affinity of dopamine D₂ receptors for dopamine in human striatum. **NeuroReport**, 12: 1831–1834, 2001.
- DLUZEN, D.E.; KEFALAS, G. The effects of intranasal infusion of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) upon catecholamine concentrations within olfactory bulbs and corpus striatum of male mice. **Brain Res.**, 741: 215-219, 1996.
- DLUZEN, D.E.; KREUTZBERG, J.D. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) disrupts social memory/recognition processes in the male mouse. **Brain Res.**, 609: 98–102, 1993.
- DOTY, R.L.; BROMLEY, S.M.; STERN, M. Olfactory testing as an aid in the diagnosis of Parkinson's disease: development of optimal discrimination criteria. **Neurodegeneration**, 4: 93–97, 1995.
- DOTY, R.L.; DEEMS, D.; STELLAR, S. Olfactory dysfunction in Parkinson's disease: A general deficit unrelated to neurologic signs, disease state, or disease duration. **Neurology**, 38: 1237–1244, 1988.
- DOTY, R.L.; RISSER, J.M. Influence of the D₂ dopamine receptor agonist quinpirole on the odor detection performance of rat before and after spiperone administration. **Psychopharmacology**, 98: 310–315, 1989.
- DOTY, R.L.; SHAMAN, P.; DANN, M. Development of the University of Pennsylvania Smell Identification Test: a standardized microencapsulated test of olfactory function. **Physiol. Behav.**, 32: 489-502, 1984.
- DOTY, R.L.; STERN, M.B.; PFEIFFER, C.; GOLLOMP, S.M.; HURTIG, H.I. Bilateral olfactory dysfunction in early stage treated and untreated idiopathic Parkinson's disease. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, 55: 138-142, 1992.
- DUBOIS, B.; PILLON, B. Cognitive deficits in Parkinson's disease. **J. Neurol.**, 244: 2-8, 1997.
- DUVOISAN, R.C. Genetics of Parkinson's disease. **Adv. Neurol.**, 45: 307-312, 1987.

- DUVOISIN, R.C. (ed). **Parkinson's disease**. Third Edition. Raven Press, New York, 1991.
- FAGLIONI, P.; BOTTI, C.; SCARPA, M.; FERRARI, V.; SAETTI, M.C. Learning and forgetting processes in Parkinson's disease: a model-based approach to disentangling storage, retention and retrieval contributions. **Neuropsychologia**, 35: 767-769, 1997.
- FALL, P.A.; FREDRIKSON, M.; AXELSON, O.; GRANERUS, A.K. Nutritional and occupational factors influencing the risk of Parkinson's disease: a case-control study in southeastern Sweden. **Mov. Disord.**, 14: 28-37, 1999.
- FELICIO, L.F.; FLORIO, J.C.; SIDER, L.H.; CRUZ-CASALLAS, P.E.; BRIDGES, R.S. Reproductive experience increases striatal and hypothalamic dopamine levels in pregnant rats. **Brain Res. Bull.**, 40: 253-256, 1996.
- FERRARO, F.R.; BALOTA, D.A.; CONNOR, L.T. Implicit memory and the formation of new association in nondemented Parkinson's disease individuals and individuals with senile dementia of the Alzheimer type: a serial reaction time (SRT) investigation. **Brain Cogn.**, 21: 163-180, 1993.
- FERRE, S.; FREDHOLM, B.B.; MOELLI, M.; POPOLI, P.; FUXE, K. Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. **Trends Neurosci.**, 20: 482-487, 1997.
- FERRE, S.; POPOLI, P.; GIMÉNEZ-LLORT, L.; RIMONDINI, R.; MÜLLER, C.E.; STRÖMBERG, I.; OGREN, S.O.; FUXE, K. Adenosine/dopamine interaction: implications for the treatment of Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat. Disord.**, 7: 235-241, 2001.
- FERRE, S.; VON EULER, G.; JOHANSSON, B.; FREDHOLM, B.B.; FUXE, R. Stimulation of high-affinity adenosine A₂ receptors decreases the affinity of dopamine D₂ receptors in rat striatal membranes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 88: 7238-7241, 1991.
- FERRO, M.M.; BELLISSIMO, M.I.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; ANGELLUCCI, M.E.; CANTERAS, N.S.; DA CUNHA, C. 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. **J. Neurosci. Methods**, 2005 (no prelo).

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.**, 105: 114-121, 1984.

FLOWERS, K.A.; PEARCE, I.; PEARCE, J.M.S. Recognition memory in Parkinson's disease. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, 47: 1174-1181, 1984.

FORNO, L.S.; DELANNEY, L.E.; IRWIN, I.; LANGSTON, J.W. Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonism and Parkinson's disease. Neuropathologic consideration. **Adv. Neurol.**, 60: 600-608, 1993.

FRANCO, R.; FERRE, S.; AGNATI, L.; TORVINEN, M.; GINES, S.; HILLION, J.; CASADO, V.; LLEDO, P.; ZOLI, M.; LLUIS, C.; FUXE, K. Evidence for adenosine/dopamine receptor interaction: indications for heteromerization. **Neuropsychopharmacology**, 23 (Suppl. 4): S50-59, 2000.

FREDHOLM, B.B. Purinoceptors in the nervous system. **Pharmacol. Toxicol.**, 76: 228-239, 1995.

FREDHOLM, B.B.; IJZERMAN, A.P.; JACOBSON, K.A.; KLOTZ, K.N.; LINDEN, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. **Pharmacol. Rev.**, 53: 527-552, 2001.

FUXE, K.; FERRE, S.; ZOLI, M.; AGNATI, L.F. Integrated events in central opamine transmission as analyzed at multiple levels. Evidence for intramembrane adenosine A2A/dopamine D2 and adenosine A1/dopamine D1 receptor interactions in the basal ganglia. **Brain Res. Rev.**, 26: 258-273, 1998.

GALE, C.; MARTYN, C. Tobacco, coffee, and Parkinson's disease. **B.M.J.**, 326: 561-562, 2003.

GASBARRI, A.; SULLI, A.; INNOCENZI, R.; PACITTI, C.; BRIONI, J.D. Spatial memory impairment induced by lesions of the mesohippocampal dopaminergic system in the rat. **Neuroscience**, 74: 1037-1044, 1996.

- GERLACH, M.; RIEDERER, P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. **J. Neural Transm.**, 103: 987-1041, 1996.
- GEVAERD, M.S.; MIYOSHI, E.; SILVEIRA, R.; CANTERAS, N.S.; TAKAHASHI, R.N.; DA CUNHA, C. L-Dopa restores striatal dopamine level but fails to reverse MPTP-induced memory deficits in rats. **Int. J. Neuropsychopharmacol.**, 4: 361-370, 2001a.
- GEVAERD, M.S.; TAKAHASHI, R.N.; DA CUNHA, C. Caffeine reverses the memory disruption induced by intra-nigral MPTP-injection in rats. **Brain Res. Bull.**, 55: 101-106, 2001b.
- GOLD, P.E.; McGAUGH, J.L. A single-trace, two-processes view of memory storage processes. In: DEUTSCH, D.; DEUTSCH, J.A. (eds). **Short-term memory**. Academic Press, New York, pp. 355-378, 1975.
- GOLDMAN, W.P.; BATY, J.D.; BUCKLES, V.D.; SAHRMANN, S.; MORRIS, J.C. Cognitive and motor functioning in Parkinson's disease – subjects with and without questionable dementia. **Arch. Neurol.**, 55: 674–680, 1998.
- GOOD, P.F.; OLANOW, C.W.; PERL, D.P. Neuromelanin-containing neurons of the substantia nigra accumulate iron and aluminum in Parkinson's disease: a LAMMA study. **Brain Res.**; 593: 343-346, 1992.
- GORELL, J.M.; JOHNSON, C.C.; RYBICKI, B.A.; PETERSON, .L.; KORTSHA, G.X.; BROWN, G.G.; RICHARDSON, R.J. Occupational exposure to manganese, copper, lead, iron, mercury and zinc and the risk of Parkinson's disease. **Neurotoxicology**, 20: 239-247, 1999.
- GORELL, J.M.; JOHNSON, C.C.; RYBICKI, B.A.; PETERSON, E.L.; RICHARDSON, R.J. The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. **Neurology**, 50: 1346-1350, 1998.
- GRIFFING, M.G.; TAYLOR, G.T. Norepinephrine modulation of social memory: evidence for a time-dependent functional recovery of behavior. **Behav. Neurosci.**, 109: 466–473, 1995.

- GUTHRIE, K.M.; PULLARA, J.M.; MARSHALL, J.F.; LEON, M. Olfactory deprivation increases dopamine D₂ receptors density in the rat olfactory bulb. **Synapse**, 8: 61–70, 1991.
- HACK, M.A.; SAGHATELYAN, A.; DE CHEVIGNY, A.; PFEIFER, A.; ASHERY-PADA, R.; LLEDO, P.M.; GOTZ, M. Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. **Nat. Neurosci.**, 8: 865-872, 2005.
- HADFIELD, M.G. Caffeine and the olfactory bulb. **Mol. Neurobiol.**, 15: 31–39, 1997.
- HAGAN, J.J.; MIDDLEMISS, D.N.; SHARPE, P.C.; POSTE, G.H. Parkinson's disease: prospects for improved drug therapy. **Trends Pharmacol. Sci.**, 18: 156-163, 1997.
- HAGEMAN, G.; VAN DER HOEK, J.A.F.; VAN HOUT, M.; VAN DER LAAN, G.; STEUR, E.J.; DE BRUIN, W.; HERHOLZ, K. Parkinsonism, pyramidal signs, polyneuropathy, and cognitive decline after long-term occupational solvent exposure. **J. Neurol.**, 246: 198-206.
- HALASZ, N.; LJUNDGAHL, A.; HÖKFELT, T.; JOHANSSON, O.; GOLDSTEIN, M.; PARK, D.; BIBERFIELD, P. Transmitter histochemistry of the rat olfactory bulb. I. Immunohistochemical localization of monoamine synthesizing enzymes. Support for intrabulbar, periglomerular dopamine neurons. **Brain Res.**, 126: 455–474, 1977.
- HALASZ, N.; SHEPHERD, G.M. Neurochemistry of the vertebrate olfactory bulb. **Neuroscience**, 10: 759–619, 1983.
- HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases. **Drugs Aging**, 9: 685-716, 2001.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine.** Oxford University Press, Oxford, 1999.
- HARIK, S.I.; SCHMIDLEY, J.W.; IACOFANO, L.A.; BLUE, P.; ARORA, P.K.; SAYRE, L.M. On the mechanisms underlying 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity: the effect of perinigral infusion of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, its metabolite and their analogs in rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 241: 669-676, 1987.

- HARRISON, P.J.; PEARSON, R.C.A. Environmental toxins and Parkinson's disease. **Trends. Neurosci.**, 12: 182, 1989.
- HASEGAWA, E.; KANG, D.; SAKAMOTO, K.; MITSUMOTO, A.; NAGANO, T.; MINAKAMI, S.; TAKESHIGE, K. A dual effect of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-analogs on the respiratory chain of bovine heart mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.**, 337: 69-74, 1997.
- HASEGAWA, E.; TAKESHIGE, K.; OISHI, T.; MURAI, Y.; MINAKAMI, S. 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) induces NADH dependent superoxide formation and enhances NADH dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 170: 1049-1055, 1990.
- HAUBER, W.; NEUSCHELER, P.; NAGEL, J.; MULLER, C.E. Catalepsy induced by a blockade of dopamine D₁ or D₂ receptors was reversed by a concomitant blockade of adenosine A_{2A} receptors in the caudate-putamen of rats. **J. Neurosci.**, 14: 1287-1293, 2001.
- HAWKES, C.H.; SHEPHARD, B.C.; DANIEL, S.E. Is Parkinson's disease a primary olfactory disorder? **Q. J. Med.**, 92: 473-480, 1999.
- HAWKES, C.H.; SHEPHARD, B.C.; DANIEL, S.E. Olfactory dysfunction in Parkinson's disease. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, 62: 436-446, 1997.
- HAWKES, C.H.; SHEPHARD, B.C.; GEDDES, J.F.; BODY, G.D.; MARTIN, J.E. Olfactory disorder in motor neuron disease. **Exp. Neurol.**, 150: 248-253, 1998.
- HEIKKILA, R.E.; MANZINO, L.; CABBAT, F.S.; DUVOISIN, R.C. Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors. **Nature**, 311: 467-469, 1984.
- HELLENBRAND, W.; SEIDLER, A.; BOEING, H.; ROBRA, B.P.; VIEREGGE, P.; NISCHAN, P.; JOERG, J.; OERTEL, W.H.; SCHNEIDER, E.; ULM, G. Diet and Parkinson's disease. I: a possible role for the past intake of specific foods and food groups. Results from a self-administered food-frequency questionnaire in a case-control study. **Neurology**, 47: 636-643, 1996.

- HERTZMAN, C.; WIENS, M.; SNOW, B.; KELLY, S.; CALNE, D. A case-control study of Parkinson's disease in a horticultural region of British Columbia. **Mov. Disord.**, 9: 69-75, 1994.
- HIRSCH, E.C.; BRANDEL, J.P.; GALLE, P.; JAVOY-AGID, F.; AGID, Y. Iron and aluminum increase in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease: an X-ray microanalysis. **J. Neurochem.**, 56: 446-451, 1991.
- HUNG, H.C.; LEE, E.H. MPTP produces differential oxidative stress and antioxidative response in the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways. **Free Radic. Biol. Med.**, 24: 76-84, 1998.
- HUNOT, S.; VILA, M.; TEISMANN, P.; DAVIS, R.J.; HIRSCH, E.C.; PRZEDBORSKI, S.; RAKIC, P.; FLAVELL, R.A. JNK-mediated induction of cyclooxygenase 2 is required for neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 101: 665-670, 2004.
- IBGE (Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Censo Demográfico, 2000**. Rio de Janeiro: IBGE.
- IRWIN, I.; DELANNEY, L.E.; LANGSTON, J.W. MPTP and aging: Studies in the C57BL/6 mouse. **Adv. Neurol.**, 60: 197-206, 1993.
- IRWIN, I.; FINNEGAN, K.T.; DELANNEY, L.E.; DI MONTE, D.; LANGSTON, J.W. The relationships between aging, monoamine oxidase, striatal dopamine and the effects of MPTP in C57BL/6 mice: a critical reassessment. **Brain Res.**, 572: 224-231, 1992.
- IZQUIERDO, I. **Memória**. Editora Artmed, Porto Alegre, 2002.
- IZQUIERDO, I. **Organização, consolidação, construção e reconstrução da memória**. Editora UFRJ, Rio de Janeiro, 1988.
- IZQUIERDO, I. The neurobiology of memory consolidation. **Neurosciences**, 18: 1-11, 1992.
- IZQUIERDO, I.; BARROS, D.M.; MELLO e SOUZA, T.; DE SOUZA, M.M.; IZQUIERDO, L.A.; MEDINA, J.H. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, 393: 635-636, 1998.

- IZQUIERDO, I.; McGAUGH, J.L. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. **Behav. Pharmacol.**, 11: 517-534, 2000.
- IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. GABA A receptor modulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines. **Trends. Pharmacol. Sci.**, 12: 260-265, 1991.
- IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H.; VIANNA, M.R.M.; IZQUIERDO, L.A.; BARROS, D.M. Separate mechanisms of short- and long-term memory. **Behav. Brain Res.**, 103: 1-11, 1999.
- JACKSON-LEWIS, V.; JAKOWEC, M.; BURKE, R.E.; PRZEDBORSKI, S. Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. **Neurodegeneration**, 4: 257-269, 1995.
- JELLINGER, K.A. Pathology of Parkinson's syndrome. In: CALNE, D.B. (ed). **Handbook of experimental pharmacology**, vol. 88. Springer, New York, pp. 47-112, 1988.
- JELLINGER, K.A. Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. **Mol. Chem. Neuropathol.**, 14: 153 – 197, 1991.
- JOHANNESSEN, J.N.; CHIUEH, C.C.; BURNS, R.S.; MARKEY, S.P. Differences in the metabolism of MPTP in the rodent and primate parallel differences in sensitivity to its neurotoxic effects. **Life Sci.**, 36: 219-224, 1985.
- KAELIN-LANG, A.; LAUTERBURG, T.; BURGUNDER, J.M. Expression of adenosine A_{2a} receptor genes in the olfactory bulb and spinal cord of rat and mouse. **Neurosci. Lett.**, 261: 189–191, 1999.
- KALARIA, R.N.; MITCHELL, M.J.; HARIK, S.I. Correlation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity with blood-brain barrier monoamine-oxidase activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 84: 3521-3525, 1987.
- KAUR, S.; STARR, M.S. Antiparkinsonian action of dextramethorphan in the reserpine-treated mouse. **Eur. J. Pharmacol.**, 280: 159–166, 1995.
- KENDRICK, K.M.; KEVERNE, E.B.; CHAPMAN, C.; BALDWIN, B.A. Intracranial dialysis measurement of oxytocin, monoamine and uric acid release from the

- olfactory bulb and substantia nigra of sheep during parturition, suckling, separation from lambs and eating. **Brain Res.**, 439: 1–10, 1998.
- KEVERNE, E.B.; LEVY, F.; GHEVARA-GUZMAN, R.; KENDRICK, K.M. Influence of birth and maternal experience on olfactory bulb neurotransmitter release. **Neuroscience**, 56: 557–565, 1993.
- KITADA, T.; ASAKAWA, S.; HATTORI, N.; MATSUMINE, H.; YAMAMURA, Y.; MINOSHIMA, S.; YOKOCHI, M.; MIZUNO, Y.; SHIMIZU, N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. **Nature**, 392: 605–608, 1998.
- KLAIDMAN, L.K.; ADAMS, J.D. JR; LEUNG, A.C.; KIM, S.S.; CADENAS, E. Redox cycling of MPP⁺: Evidence for a new mechanism involving hydride transfer with xanthine oxidase, aldehyde dehydrogenase, and lipoamide dehydrogenase. **Free Radic. Biol. Med.**, 15: 169–179, 1993.
- KLAWANS, H.L.; STEIN, R.W.; TANNER, C.M.; GOETZ, C.G. A pure parkinsonian syndrome following acute carbon monoxide intoxication. **Arch.Neurol.**, 39: 302–304, 1982.
- KLIVENYI, P.; ST CLAIR, D.; WERMER, M.; YEN, H.C.; OBERLEY, T.; YANG, L.; BEAL, M. F. Manganese superoxide dismutase overexpression attenuates MPTP toxicity. **Neurobiol. Dis.**, 5: 253–258, 1998.
- KNOWLTON, B.J.; MANGELS, J.A.; SQUIRE, L.R. A neostriatal habit learning system in humans. **Science**, 273: 1399–1402, 1996.
- KOPIN, I.J.; MARKEY, S.P. MPTP toxicity: implications for research in Parkinson's disease. **Annu. Rev. Neurosci.**, 11: 81–96, 1988.
- KORCZYN, AD. Parkinson's disease. In: BLOOM, F.E.; KUPFER, D.J. (ed). **Psychopharmacology: the fourth generation of progress**. Raven Press, New York, pp. 1479–1484, 1995.
- KRUGER, R.; KUHN, W.; MULLER, T.; WOITALLA, D.; GRAEBER, M.; KOSEL, S.; PRZUNTEK, H.; EPPLEN, J.T.; SCHOLS, L.; RIESS, O. Ala30Pro mutation in

the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. **Nat. Genet.**, 18: 106-108, 1998.

LANGSTON, J.W. Mechanisms of MPTP toxicity: more answers, more questions. **Trends Pharmacol. Sci.**, 6: 375-378, 1985.

LANGSTON, J.W. The etiology of Parkinson's disease with emphasis on the MPTP story. **Neurology**, (Suppl. 3), 47: S153-S160, 1996.

LANGSTON, J.W.; BALLARD, P.; TETRUD, J.W.; IRWIN, I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. **Science**, 219: 979-980, 1983.

LANGSTON, J.W.; BALLARD, P.A. Parkinsons-disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. **N. Engl. J. Med.**, 309: 310, 1983.

LANGSTON, J.W.; IRWIN, I. MPTP: current concepts and controversies. **Clin. Neuropharmacol.**, 9: 485-507, 1986.

LANGSTON, J.W.; IRWIN, I.; LANGSTON, E.B.; FORNO, L.S.; 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺): Identification of a metabolite of MPTP, a toxin selective to the substantia nigra. **Neurosci. Lett.**, 48: 87-92, 1984.

LEE, E.H.; LU, K.T. Neurotoxicity of MPTP and uptake of MPTP into dopamine and dorepinhphrine neurons in mice. **Adv. Exp.Med. Biol.**, 363: 29-46, 1995.

LENT, R. Pessoas com História: As Bases Neurais da Memória e da Aprendizagem. Em: LENT, R. (ed). **Cem Bilhões de Neurônios**. Editora Atheneu, São Paulo, pp. 587-618, 2001.

LERET, M.L.; SAN MILLAN, J.A.; FABRE, E.; GREDILLA, R.; BARJA, G. Dprenyl protects from MPTP-induced Parkinson-like syndrome and glutathione oxidation in rat striatum. **Toxicology**, 170: 165-171, 2002.

LETTY, S.; CHILD, R.; DUMUIS, A.; PANTALONI, A.; BOCKAERT, J.; RONDOUIN, G. 5-HT₄ receptors improve social olfactory memory in the rat. **Neuropharmacol.**, 36: 681-687, 1997.

LINDNER, M.D.; CAIN, C.K.; PLONE, M.A.; FRYDEL, B.R.; BLANEY, T.J.; EMERICH, D.F.; HOANE, M.R. Incomplete nigrostriatal dopaminergic cell loss

and partial reductions in striatal dopamine produce akinesia, rigidity, tremor and cognitive deficits in middle-aged rats. **Behav. Brain Res.**, 102: 1-16, 1999.

LIU, H.H.; TSAI, M.C.; CHEN, C.J.; JENG, J.S.; CHANG, Y.C.; CHEN, S.Y.; CHEN, R.C. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan. **Neurology**, 48: 1583-1588, 1997.

LIU, Y.; ROGHANI, A.; EDWARDS, R.H. Gene transfer of a reserpine-sensitive mechanism of resistance to *N*-methyl-4-phenyl-pyridinium. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 89: 9074-9078, 1992.

LLEDO, P.M.; SAGHATELYAN, A. Integrating new neurons into the adult olfactory bulb: joining the network, life-death decisions, and the effects of sensory experience. **Trends Neurosci.**, 28: 248-254, 2005.

LOPES, L.V.; CUNHA, R.A.; RIBEIRO, J.A. Increase in the number, G protein coupling, and efficiency of facilitatory adenosine A_{2A} receptors in the limbic cortex, but not striatum, of aged rats. **J. Neurochem.**, 73: 1733-1738, 1999.

LUO, Y.; UMEGAKI, H.; WANG, X.; ABE, R.; ROTH, G.S. Dopamine induces apoptosis through an oxidation-involved SAPK/JNK activation pathway. **J. Biol. Chem.**, 273: 3756-3764, 1998.

MALLY, J.; STONE, T.W. Potential of adenosine A_{2A} receptor antagonists in the treatment of movement disorders. **CNS Drugs**, 10: 311-320, 1998.

MARDER, K.; LOGROSCINO, G.; ALFARO, B.; MEJIA, H.; HALIM, A.; LOUIS, E.; COTE, L.; MAYEUX, R. Environmental risk factors for Parkinson's disease in an urban multiethnic community. **Neurology**, 50: 279-281, 1998.

MARIÉ, R.M.; BARRÉ, L.; DUPUY, B.; VIADER, F.; DEFER, G.; BARON, J.C. Relationships between striatal dopamine denervation and frontal executive tests in Parkinson's disease. **Neurosci. Lett.**, 260: 77-80, 1999.

MARKEY, S.P.; JOHANNESSEN, J.N.; CHIUEH, C.C.; BURNS, R.S.; HERKENHAM, M.A. Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. **Nature**, 311: 464-467, 1984.

- MARKS, D.B.; MARKS, A.D.; SMITH, C.M. Oxygen Metabolism and Toxicity. In: **Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach**. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 327-340, 1996.
- MARTZKE, J.S., KOPALA, L.C.; GOOD, K.P. Olfactory dysfunction in neuropsychiatric disorders: review and methodological considerations. **Biol. Psychiatry**, 42: 731-732, 1997.
- MATIAS, A.; ZIMMER, F.J.; KEIL, R. Decreased affinity of central A₁ adenosine receptors in spontaneously hypertensive rats. **Naunyn-Schmied Arch. Pharmacol.**, 315: R59, 1992.
- McGAUGH, J.L. A multiple-trace view of memory storage processes. **Accademico Nazionale dei Lincei**, 109: 13-28, 1968.
- McGAUGH, J.L. Time-dependent processes in memory storage. **Science**, 153: 1351-1358.
- MENESES, M.S.; TEIVE, H.A. **Doença de Parkinson. Aspectos Clínicos e cirúrgicos**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1996.
- MENZAGHI, F.; WHELAN, K.T.; RISBROUGH, V.B.; RAO, T.S.; LLOYD, G.K. Interactions between a novel cholinergic ion channel agonist SIB-1765F and L-DOPA in the reserpine model of Parkinson's disease in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 280: 393-401, 1997.
- MESHOLAM, R.I.; MOBERG, P.J.; MAHR, R.N.; DOTY, R.L. Olfaction in neurodegenerative disease: a meta-analysis of olfactory functioning in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **Arch. Neurol.**, 55: 84-90, 1998.
- MILNER, B.; SQUIRE, L.R.; KANDEL, E.R. Cognitive neuroscience and the study of memory. **Neuron**, 20: 445-468, 1998.
- MIYOSHI, E.; WIETZIKOSKI, S.; CAMPLESSEI, M.; SILVEIRA, R.; TAKAHASHI, R.N.; DA CUNHA, C. Impaired learning in a spatial working memory version and in a cued version of the water maze in rats with MPTP-induced mesencephalic dopaminergic lesions. **Brain Res. Bull.**, 58: 41-47, 2002.
- MOBERG, P.J.; PEARLSON, G.D.; SPEEDIE, L.J.; LIPSEY, J.R.; STRAUSS, M.E.; FOLSTEIN, S.E. Olfactory recognition: differential impairments in early and late

- Huntington's and Alzheimer's disease. **J. Clin. Exp. Neuropsychol.**, 9: 650-664, 1987.
- MOO-PUC, R.E., VILLANUEVA-TOLEDO, J.; ARANKOWSKY-SANDOVAL, G.; ALVAREZ-CERVERA, F.; GONGORA-ALFARO, J.L. Treatment with subthreshold doses of caffeine plus trihexyphenidyl fully restores locomotion and exploratory activity in reserpinized rats. **Neurosci. Lett.**, 367: 327-331, 2004.
- MORANO, A.; JIMENEZ-JIMENEZ, F.J.; MOLINA, J.A.; ANTOLIN, M.A. Risk-factors for Parkinson's disease: a case-control study in the province of Caceres, Spain. **Acta Neurol. Scand.**, 89: 164-170, 1994.
- MORELLI, M. Adenosine A_{2A} antagonists: potential preventive and palliative treatment for Parkinson's disease. **Exp. Neurol.**, 184: 20-23, 2003.
- MORELLI, M.; PINNA, A. Interaction between dopamine and adenosine A_{2A} receptors as a basis for the treatment of Parkinson's disease. **Neurol. Sci.**, 22: 71-72, 2001.
- MORRIS, R.G.M.; GARRUD, P.; RAWLINS, J.N.P.; O'KEEFE, J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature**, 297: 681-683, 1982.
- MOSCOVITCH, M. Memory and working with memory: evaluation of a component process model and comparisons with other models. In: SCHACTER, D.L.; TULVING, E. (eds.). **Memory Systems**. MIP Press, Cambridge, pp. 269-230, 1994.
- NICOTRA, A.; PARVEZ, S.H. Apoptotic molecules and MPTP-induced cell death. **Neurotoxicol. Teratol.**, 24: 599-605, 2002.
- NICOTRA, A.; PARVEZ, S.H. Cell death induced by MPTP, a substrate for monoamine oxidase B. **Toxicology**, 153: 157-166, 2000.
- ODUNZE, I.N.; KLAIDMAN, L.K.; ADAMS, J.D. Jr. MPTP toxicity in the mouse brain and vitamin E. **Neurosci. Lett.**, 108: 346-349, 1990.
- OGAWA, N. Molecular and chemical neuropharmacology of dopamine receptor subtypes. **Acta Med. Okayama**, 49: 1-11, 1995.
- OLANOW, C.W.; JENNER, P.; BEAL, M.F. Cell death and neuroprotection in Parkinson's disease. **Ann. Neurol.**, (Suppl. 1), 44: S1-S196, 1998.

- OVADIA, A.; ZHANG, Z.; GASH, D.M. Increased susceptibility to MPTP toxicity in middle-aged rhesus monkeys. **Neurobiol. Aging**, 16: 931-937, 1995.
- OWEN, A.M.; SAHAKIAN, B.J.; HODGES, J.R.; SUMMERS, B.A.; POLKEY, C.E.; ROBINS, T.W. Dopamine-dependent frontostriatal planning in early Parkinson's disease. **Neuropsychology**, 9: 126-140, 1995.
- PACKARD, M.G.; HIRSH, R.; WHITE, N.M. Differential effects of fornix and caudate nucleus lesion on two radial maze tasks: evidence of multiple memory systems. **J. Neurosci.**, 9: 1465-1472, 1989.
- PACKARD, M.G.; McGAUGH, J.L. Double dissociation of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: Further evidence for multiple memory systems. **Behav. Neurosci.**, 106: 439-446, 1992.
- PACKARD, M.G.; McGAUGH, J.L. Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response. **Neurobiol. Learn. Mem.**, 65: 65-72, 1996.
- PARKINSON, J. **An Essay on the Shaking Palsy**. Sherwood, Neely and Jones, 1817.
- PEARCE, R.K.B.; HAWKES, C.H.; DANIEL, S.E. The anterior olfactory nucleus in Parkinson's disease. **Mov. Disord.**, 10: 283-287, 1995.
- PERIO, A.; TERRANOVA, J.P.; WORMS, P.; BLUTHE, R.M.; DANTZER, R.; BIZIERE, K. Specific modulation of social memory in rats by cholinomimetic and nootropic drugs, by benzodiazepine inverse agonists, but not by psychostimulants. **Psychopharmacology**, 97: 262-268, 1989.
- PERRY, T.L.; YONG, V.W.; CLAVIER, R.M.; JONES, K.; WRIGHT, J.M.; FOULKS, J.G.; WALL, R.A. Partial protection from the dopaminergic neurotoxin N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by four different antioxidants in the mouse. **Neurosci. Lett.**, 60: 109-114, 1985.
- PEZZOLI, G.; STRADA, O.; SILANI, V.; ZECCHINELLI, A.; PERBELLINI, L.; JAVOY-AGID, F.; GHIDONI, P.; MOTTI, E.D.; MASINI, T.; SCARLATO, G.; AGID, Y.; HIRSCH, E.C. Clinical and pathological features in hydrocarbon-induced parkinsonism. **Ann. Neurol.**, 40: 922-925, 1996.

- PILLON, B.; DEWEER, B.; VIDALHET, M.; BONNET, A.M.; HARN-BARMA, V.; DUBOIS, B. Impaired for spatial location in Parkinson's disease domain specific or dependent on "strategic" processes? **Neuropsychologia**, 36: 1-9, 1998.
- POLYMEROPOULOS, M.H.; LAYDEN, C.; LEROY, E.; IDE, S.E.; DEHEJIA, A.; DUTRA, A.; PIKE, B.; ROOT, H.; RUBENSTEIN, J.; BOYER, R.; STENROOS, E.S.; CHANDRASEKHARAPPA, S.; ATHANASSIADOU, A.; PAPAPETROPOULOS, T.; JOHNSON, W.G.; LAZZARINI, A.M., DUVOISIN, R.C.; DI IORIO, G.; GOLBE, L.I.; NUSSBAUM, R.L. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. **Science**, 276: 2045-2047, 1997.
- PREDIGER, R.D.S.; BATISTA, L.C.; MIYOSHI, E.; TAKAHASHI, R.N. Facilitation of short-term social memory by ethanol in rats is mediated by dopaminergic receptors. **Behav. Brain Res.**, 153:149–157, 2004.
- PREDIGER, R.D.S.; BATISTA, L.C.; TAKAHASHI, R.N. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. **Neurobiol. Aging**, 26: 957-964, 2005a.
- PREDIGER, R.D.S.; FERNANDES, D.; TAKAHASHI, R.N. Blockade of adenosine A2A receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. **Behav. Brain Res.**, 159: 197-205, 2005b.
- PREDIGER, R.D.S.; TAKAHASHI, R.N. Ethanol improves short-term social memory in rats. Involvement of opioid and muscarinic receptors. **Eur. J. Pharmacol.**, 462: 115–123, 2003.
- PREDIGER, R.D.S., TAKAHASHI, R.N. Modulation of short-term social memory in rats by adenosine A1 and A2A receptors. **Neurosci. Lett.**, 376: 160–165, 2005.
- PRZEDBORSKI, S.; JACKSON-LEWIS, V.; VILA, M.; WU, D.C.; TEISMANN, P.; TIEU, K.; CHOI, D.K.; COHEN, O. Free radical and nitric oxide toxicity in Parkinson's disease. In: GORDIN, A.; KAAKKOLA, S.; TERÄVÄINEN, H.

- (eds.). **Parkinson's disease**. Lippincot Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 83-94, 2003.
- PRZEDBORSKI, S.; VILA, M. The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model. A tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 991: 189-198, 2004.
- PRZEDBOSKI, S.; KOSTIC, V.; JACKSON-LEWIS, V.; NAINI, A.B.; SIMONETTI, S.; FAHN, S.; CARLSON, E.; EPSTEIN, C.J.; CADET, J.L. Transgenic mice with increased Cu/Zn-superoxide dismutase activity are resistant to N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. **J. Neurosci.**, 12: 1658-1667, 1992.
- QUINN, N.P.; ROSSOR, M.N.; MARSDEN, C.D. Olfactory threshold in Parkinson's disease. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, 50: 88-89, 1987.
- RAMSAY, R.R.; SINGER, T.P. Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria. **J. Biol. Chem.**, 261: 7585-7587, 1986.
- RIEDERER, P.; WUKETICH, S. Time course of nigrostriatal degeneration in Parkinson's disease. A detailed study of influential factors in human brain amine analysis. **J. Neural Transm.**, 38: 277-301, 1976.
- RIEKKINEN, M.; KEJONEN, K.; JAKALA, P.; SOININEN, H.; RIEKKINEN, P. Jr. Reduction of noradrenaline impairs attention and dopamine depletion slows responses in Parkinson's disease. **Eur. J. Neurosci.**, 10: 1429-1435, 1998.
- ROBERTS, E. Alzheimer disease may begin in the nose and may be caused by aluminosilicilates. **Neurobiol. Aging**, 7: 561-567, 1986.
- RONCACCI, S.; TROISI, E.; CARLESIMO, G.A.; NOCENTINI, U.; CALTAGIRONE, C. Implicit memory in Parkinsonian patients: evidence for deficits skill learning. **Eur. Neurol.**, 36: 154-159, 1996.
- ROSE, S.; NOMOTO, M.; JACKSON, E.A.; GIBB, W.R.G.; JAEHNIG, P.; JENNER, P.; MARSDEN, C.D. Age-related effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-

- tetrahydropyridine treatment of common marmosets. **Eur. J. Pharmacol.**, 230: 177-185, 1993.
- ROSS, G.W.; ABBOTT, R.D.; PETROVITCH, H.; MORENS, D.M.; GRANDINETTI, A.; TUNG, K.H.; TANNER, C.M.; MASAKI, K.H.; BLANCHETTE, P.L.; CURB, J.D.; POPPER, J.S.; WHITE, L.R. Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson's disease. **JAMA**, 283: 2674–2679, 2000.
- ROSS, G.W.; PETROVITCH, H. Current evidence for neuroprotective effects of nicotine and caffeine against Parkinson's disease. **Drugs Aging**, 18: 797–806, 2001.
- SALMON, D.P.; BUTTERS, N. Neurobiology of skill and habit learning. **Curr. Opin. Neurobiol.**, 5: 184-190, 1995.
- SANTAMARIA, J.; TOLOSA, E.; VALLES, A. Parkinson's disease with depression: a possible subgroup of idiopathic Parkinsonism. **Neurology**, 36: 1130–1133, 1986.
- SAPORITO, M.S.; BROWN, E.M.; MILLER, M.S.; CARSWELL, S. CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of c-jun N-terminal kinase activation, attenuates the 1-methyl-4-phenyl tetrahydropyridine-mediated loss of nigrostriatal dopaminergic neurons in vivo. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 288: 421-427, 1999.
- SAPORITO, M.S.; THOMAS, B.A.; SCOTT, R.W. MPTP activates c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK) and its upstream regulatory kinase MKK4 in nigrostriatal neurons in vivo. **J. Neurochem.**, 75: 1200-1208, 2000.
- SAWYER, T.F.; HENGELHOLD, A.K.; PEREZ, W.A. Chemosensory and hormonal mediation of social memory in male rats. **Behav. Neurosci.**, 98: 908–913, 1984.
- SCHMIDT, N.; FERGER, B. Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. **J. Neural Transm.**, 108: 1263-1282, 2001.
- SEAMANS, J.K.; FLORESCO, S.B.; PHILLIPS, A.G. D1 receptor modulation of hippocampal-prefrontal cortical circuits integrating spatial memory with executive functions in the rat. **J. Neurosci.**, 18: 1613-1621, 1998.
- SEDELIS, M.; HOFELE, K.; AUBURGER, G.W.; MORGAN, S.; HUSTON, J.P.; SCHWARTING, R.K. MPTP susceptibility in the mouse: behavioral,

- neurochemical, and histological analysis of gender and strain differences. **Behav. Genet.**, 30: 171-182, 2000.
- SEDELIS, M.; SCHWARTING, R.K.; HUSTON, J.P. Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Behav. Brain Res.**, 125: 109-125, 2001.
- SEIDLER, A.; HELLENBRAND, W.; ROBRA, B.P.; VIEREGGE, P.; NISCHAN, P.; JOERG, J.; OERTEL, W.H.; ULM, G.; SCHNEIDER, E. Possible environmental, occupational, and other etiologic factors for Parkinson's disease: a case-control study in Germany. **Neurology**, 46: 1275-1284.
- SEMCHUK, K.M.; LOVE, E.J.; LEE, R.G. Parkinson's disease: a test of the multifactorial etiology hypothesis. **Neurology**, 43: 1173-1180; 1993.
- SHIMOHAMA, S.; SAWADA, H.; KITAMURA, Y.; TANIGUCHI, T. Disease model: Parkinson's disease. **Trends Mol. Med.**, 9: 360-365, 2003.
- SIAN, J.; DEXTER, D.T.; LEES, A.J. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. **Ann. Neurol.**, 36: 348-355, 1994a.
- SIAN, J.; DEXTER, D.T.; LEES, A.J.; DANIEL, S.; JENNER, P.; MARSDEN, C.D. Glutathione-related enzymes in brain in Parkinson's disease. **Ann. Neurol.**, 36: 356-361, 1994b.
- SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Exp. Physiol.**, 82: 291-295, 1997.
- SINGLETON, A.B.; FARRER, M.; JOHNSON, J.; SINGLETON, A.; HAGUE, S.; KACHERGUS, J.; HULIHAN, M.; PEURALINNA, T.; DUTRA, A.; NUSSBAUM, R.; LINCOLN, S.; CRAWLEY, A.; HANSON, M.; MARAGANORE, D.; ADLER, C.; COOKSON, M.R.; MUENTER, M.; BAPTISTA, M.; MILLER, D.; BLANCATO, J.; HARDY, J.; GWINN-HARDY, K. Alpha-synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*, 302: 841-ja, 2003.
- SKALISZ, L.L.; BEIJAMINI, V.; JOCA, S.L.; VITAL, M.A.B.F.; DA CUNHA, C.; ANDREATINI, R. Evaluation of the face validity of reserpine administration as an

- animal model of depression–Parkinson’s disease association. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, 26: 879–883, 2002.
- SOFFIÉ, M.; LAMBERTY, Y. Scopolamine effects on juvenile conspecific recognition in rats: possible interaction with olfactory sensitivity. **Behav. Process.**, 17: 181-90, 1988.
- SQUIRE, L.R. Mechanisms of memory. **Science**, 232: 1612-1619, 1986.
- SRINIVASAN, J.; SCHMIDT, W.J. Potentiation of parkinsonian symptoms by depletion of locus coeruleus noradrenaline in 6-hydroxydopamine-induced partial degeneration of substantia nigra in rats. **Eur. J. Neurosci.**, 17: 2586-2592, 2003.
- SRIRAM, K.; PAI, K.S.; BOYD, M.R.; RAVINDRANATH, V. Evidence for generation of oxidative stress in brain by MPTP: in vitro and in vivo studies in mice. **Brain Res.**, 749: 44-52, 1997.
- STEBBINS, G.T.; GABRIELI, J.D.E.; MASCHIARI, F.; MONTI, L.; GOETZ, C.G. Delayed recognition memory in Parkinson’s disease: a role for working memory? **Neuropsychol.**, 37: 503-510, 1999.
- STOOF, J.C.; WINOGRODZKA, A.; VAN MUISWINKEL, F.L.; WOLTERS, E.C.; VOORN, P.; GROENEWEGEN, H.J.; BOOIJ, J.; DRUKARCH, B. Leads for the development of neuroprotective treatment in Parkinson’s disease and brain imaging methods for estimating treatment efficacy. **Eur. J. Pharmacol.**, 375: 75-86, 1999.
- SVENNINGSSON, P.; LE MOINE, C.; FISONE, G.; FREDHOLM, B.B. Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A_{2A} receptors. **Prog. Neurobiol.**, 59: 355-396, 1999.
- TAKAHASHI, N.; MILNER, L.L.; SORA, I.; UJIKE, H.; REVAY, R.; KOSTIC, V.; JACKSON-LEWIS, V.; PRZEDBORSKI, S.; UHI, G.R. VMAT2 knockout mice: heterozygotes display reduced amphetamine-conditioned reward, enhanced amphetamine locomotion, and enhanced MPTP toxicity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 94: 9938-9943, 1997.
- TAN, E-K.; TAN, C.; FOOK-CHONG, S.M.C.; LUM, S.Y.; CHAI, A.; CHUNG, H.; SHEN, H.; ZHAO, Y.; TEOH, M.L.; YIH, Y.; PAVANNI, R.; CHANDRAN, V.R.;

- WONG, M.C. Dose-dependent protective effect of coffee, tea, and smoking in Parkinson's disease: a study in ethnic Chinese. **J. Neurol. Sci.**, 216: 163–167, 2003.
- TANNER, C.M. The role of environmental toxins in the etiology of Parkinson's disease. **Trends Neurosci.**, 12: 49-54, 1989.
- TANNER, C.M.; OTTMAN, R.; ELLENBERG, J.H.; GOLDMAN, S.M.; MAYEUX, R.; CHAN, P.; LANGSTON, J.W. Parkinson's disease (PD) concordance in elderly male monozygotic (MZ) and dizygotic (DZ) twins. **Neurology**, (Suppl.), 48: 42002, 1997.
- TERRANOVA, J.P.; PÉRIO, A.; WORMS, P.; LE FUR, G.; SOUBRIÉ, P. Social olfactory recognition in rodents: deterioration with age, cerebral ischaemia and septal lesion. **Behav. Pharmacol.**, 5: 90–98, 1994.
- TERRANOVA, J.P.; STORME, J.J.; LAFON, N.; PÉRIO, A.; RINALDI-CARMONA, M.; LE FUR, G.; SOUBRIÉ, P. Improvement of memory in rodents by the selective CB1 cannabinoid receptor antagonist, SR141716. **Psychopharmacology**, 126: 165–172, 1996.
- TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Anal Biochem.**, 27: 502-522, 1969.
- TIPTON, K.F.; SINGER, T.P. Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds. **J. Neurochem.**, 61: 1191-1206, 1993.
- UITTI, R.J.; SNOW, B.J.; SHINOTOH, H.; VINGERHOES, F.J.G.; HAYWARD, M.; HASHIMOTO, S.; RICHMOND, J.; MARKEY, S.P.; MARKEY, C.J.; CALNE, D.B. Parkinsonism induced by solvent abuse. **Ann. Neurol.**, 35: 616-619, 1994.
- VANACORE, N.; NAPPO, A.; GENTILE, M.; BRUSTOLIN, A.; PALANGE, S.; LIBERATI, A.; DI REZZE, S.; CALDORA, G.; GASPARINI, M.; BENEDETTI, F.; BONIFATI, V.; FORASTIERE, F.; QUERCIA, A.; MECO, G. Evaluation of

- risk of Parkinson's disease in a cohort of licensed pesticide users. **Neurol. Sci.**, (Suppl. 2): S119-S120.
- VARASTED, M.; RICHIE, D.; MAZIERE, M.; HANTRAYE, P. Chronic MPTP treatment reproduces in baboons the differential vulnerability of mesencephalic dopaminergic neurons observed in Parkinson's disease. **Neuroscience**, 63: 47-56, 1994.
- WANG, W.; SHI, L.; XIE, Y.; MA, C.; LI, W.; SU, X.; HUANG, S.; CHEN, R.; ZHU, Z.; MAO, Z.; HAN, Y.; LI, M. SP600125, a new JNK inhibitor, protects dopaminergic neurons in the MPTP model of Parkinson's disease. **Neurosci. Res.**, 48: 195-202, 2004.
- WELDON, D.A.; TRAVIS, M.L.; KENNEDY, D.A. Posttraining D₁ receptor blockade impairs odor conditioning in neonatal rats. **Behav. Neurosci.**, 105: 450-458, 1991.
- WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.**, 77: 325-333, 1981.
- WENNING, G.K.; SHEPHARD, B.; HAWKES, C.; PETRUCKEVITCH, A.; LEES, A.; QUINN, N. Olfactory function in atypical parkinsonian syndromes. **Acta Neurol. Scand.**, 91: 247-250, 1995.
- WHITE, N.M.; McDONALD, R.J. Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. **Neurobiol. Learn. Mem.**, 77: 125-184, 2002.
- WIENER, H.L.; HASHIM, A.; LAJTHA, A.; SERSHEN, H. (-)-2-oxo-4-thiazolidine carboxylic acid attenuates 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine induced neurotoxicity. **Res. Commun. Subst. Abuse**, 9: 53-60, 1988.
- WILLNER, P. Validation criterion for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, 10: 677-609, 1986.
- YAMADA, M.; ONODERA, M.; MIZUNO, Y.; MOCHIZUKI, H. Neurogenesis in olfactory bulb identified by retroviral labeling in normal and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated adult mice. **Neuroscience**, 124: 173-181, 2004.
- YASUI, M.; KIHARA, T.; OTA, K. Calcium, magnesium and aluminum concentration in Parkinson's disease. **Neurotoxicology**, 13: 593-600, 1992.

YOUNES, M. Free Radicals and Reactive Oxygen Species. In: **Toxicology**. Academic Press, New York, pp. 223-234, 2002.

ZARRANZ, J.J.; ALEGRE, J.; GOMEZ-ESTEBAN, J.C.; LEZCANO, E.; ROS, R.; AMPUERO, I.; VIDAL, L.; HOENICKA, J.; RODRIGUEZ, O.; ATARES, B.; LLORENS, V.; TORTOSA, E.G.; DEL SER, T.; MUNOZ, D.G., DE YEBENES, J.G. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. **Ann. Neurol.**, 55: 164-173, 2004.

ZHANG, J.; GRAHAM, D.G.; MONTINE, T.J.; HO, Y.S. Enhanced N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity in mice deficient in CuZn-superoxide dismutase or glutathione peroxidase. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, 59: 53-61, 2000.