

**Efeitos da exposição a um ambiente enriquecido
sobre parâmetros comportamentais, bioquímicos e
moleculares em um modelo murino da doença de
Parkinson**

Willyan Franco Hilario

Dissertação de Mestrado em Bioquímica e Farmacologia

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, agosto de 2015

WILLYAN FRANCO HILARIO

Efeitos da exposição a um ambiente enriquecido sobre parâmetros motores, cognitivos, bioquímicos e moleculares em um modelo murino da doença de Parkinson

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Bioquímica da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Farmacologia

Orientador: Prof.^a Dr.^a. Rita Gomes Wanderley Pires

Co-orientador: Prof.^a Dr.^a. Cristina Martins e Silva

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, agosto de 2015

Willyan Franco Hilário

Efeitos da exposição a um ambiente enriquecido sobre parâmetros comportamentais, bioquímicos e moleculares em um modelo murino da doença de Parkinson

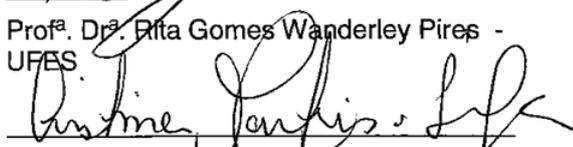
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito final para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Farmacologia na área de concentração Farmacologia Bioquímica e Molecular.

Aprovado em 05 de agosto de 2015.

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Rita Gomes Wanderley Pires - UFES



Prof^a. Dr^a. Cristina Martins e Silva - UFES



Prof^a. Dr^a. Livia Carla de Melo Rodrigues - UFES



Prof^a. Dr^a. Ester Miyuki Nakamura-Palacios - UFES

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade
Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

H641e Hilario, Willyan Franco, 1989 -
Efeitos da exposição a um ambiente enriquecido sobre
parâmetros comportamentais, bioquímicos e moleculares em um
modelo murino da doença de Parkinson / Willyan Franco Hilario
– 2015.
83 f. : il.

Orientador: Rita Gomes Wanderley Pires.
Coorientador: Cristina Martins e Silva.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1. Doença de Parkinson. 2. Neuroprotetores. I. Pires, Rita
Gomes Wanderley. II. Martins e Silva, Cristina. III. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde.
IV. Título.

CDU: 61

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Neurobiologia Molecular e Comportamental do Departamento de Fisiologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, com auxílio das seguintes instituições:

- Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES)**
- Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior (CAPES)**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar saúde, força e paz nesta caminhada e pelas muitas bênçãos e fidelidade;

Aos meus pais Ayr e Dulcineia e a minha irmã Daniela, por terem investido em minha educação, pelo grande amor, confiança, compreensão, paciência e total apoio que me dão;

À minha noiva Lívia, pela paciência, compreensão, apoio e amor incondicional, além dos valiosos ensinamentos e suporte nos protocolos com o HPLC e expressão gênica. Te amo! Você é o amor da minha vida!

À minha orientadora, professora Rita e co-orientadora Cristina, pela incansável dedicação, paciência, ensinamentos e por devotarem confiança em meu trabalho;

À professora Ester e à professora Lívia, por gentilmente aceitarem o convite, pela disponibilidade, além das valiosas colaborações;

Aos companheiros do Laboratório de Neurobiologia Molecular e Comportamental (LNMC) pelos bons momentos convividos e por estarem sempre dispostos a ajudar. Em especial à Tassiane, Tamara, Bruna, Lorena, Filipe e Alice pelos ensinamentos e suporte no *grip test*, labirinto aquático de Morris e nos protocolos de expressão gênica;

Aos colegas farmacêuticos e biomédicos do ULABCLIN Flávia, Djane, Fausto, Cárcia, Silas e Wander pelas fundamentais trocas de plantão em finais de semana chave para mim;

Ao Cristiano pelo respeito enquanto eu estava no “Ambiente enriquecido”;

À equipe do Laboratório de Análise Biomolecular (LABIOM) pelo suporte;

E a todos que, de qualquer forma, contribuíram e incentivaram a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 A Doença de Parkinson.....	15
1.2 Neurotransmissão dos gânglios da base.....	17
1.3 Etiologia da doença de Parkinson	22
1.4 Neurociência translacional dos aspectos cognitivos da doença de Parkinson	24
1.5 Modelos animais da doença Parkinson.....	25
1.6 Tratamento da doença de Parkinson	28
1.7 Enriquecimento ambiental	29
1.8 Enriquecimento ambiental e doenças neurodegenerativas	31
2 JUSTIFICATIVA	33
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 Animais.....	34
4.2 Delineamento experimental.....	34
4.3 A exposição ao ambiente enriquecido.....	36
4.4 O modelo de doença de Parkinson	37
4.5 Teste de força de agarre (<i>grip test</i>).....	37
4.6 Atividade locomotora	38
4.7 Memória de referência no labirinto aquático de Morris.....	38
4.8 Memória de trabalho no labirinto aquático de Morris.....	39
4.9 Dosagem estriatal de DA, DOPAC e HVA.....	40
4.10 Expressão gênica no mesencéfalo e córtex	41
4.11 Análises estatísticas	43
5 RESULTADOS	44
5.1 Análise dos parâmetros motores	44
5.1.1 Teste de força de agarre (<i>grip test</i>)	44

5.1.2 Atividade locomotora no campo aberto	44
5.1.3 Dosagem estriatal de DA, DOPAC e HVA.....	45
5.1.4 Expressão gênica do sistema dopaminérgico no mesencéfalo	47
5.1.5 Expressão gênica do sistema colinérgico no mesencéfalo	48
5.2 Análise dos parâmetros cognitivos	50
5.2.1 Memória de referência.....	50
5.2.2 Memória de trabalho.....	52
5.2.3 Expressão gênica do sistema dopaminérgico no córtex	54
5.2.4 Expressão gênica do sistema colinérgico no córtex.....	55
6 DISCUSSÃO	56
6.1 Parâmetros motores	57
6.2 Parâmetros cognitivos	65
7 CONCLUSÕES	69
8 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	70
9 REFERÊNCIAS.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema simplificado da via nigroestriatal normal e em pacientes com doença de Parkinson

Figura 2: Circuitaria básica dos gânglios da base

Figura 3: Transmissão dopaminérgica e síntese e metabolismo da DA

Figura 4: Mecanismo de ação do MPTP

Figura 5: Representação esquemática da exposição a um AE e das áreas que sofrem influência pela exposição

Figura 6: Representação esquemática do delineamento experimental

Figura 7: Representação esquemática do nosso protocolo de exposição a um AE

Figura 8: Representação do teste de força de agarre (*Grip test*)

Figura 9: Caixa monitora de atividades utilizada para o teste de atividade locomotora

Figura 10: Representação esquemática do labirinto aquático de Morris

Figura 11: Representação das posições da plataforma ao longo das sessões de MT

Figura 12: *Grip test*

Figura 13: Atividade locomotora no campo aberto

Figura 14: Dosagens de dopamina, DOPAC e HVA

Figura 15: Metabolismo relativo (*turnover*) de DA, DOPAC/DA, HVA/DA e DOPAC + HVA/DA

Figura 16 Expressão gênica da TH, DAT e dos receptores D1R e D2R na região mesencefálica

Figura 17: Expressão gênica da ChAT, AChE, relação de expressão gênica ChAT/AChE e dos M1R e α 7NR na região mesencefálica

Figura 18: Latência e distância percorrida no labirinto aquático de Morris para memória de referência

Figura 19: PROBE, índice de extinção, distância percorrida no PROBE e latência entre a 4^o e 5^o (pós PROBE) sessão de memória de referência no aquático de Morris

Figura 20: Latência, distância percorrida no labirinto aquático de Morris para memória de trabalho e número de sessões para critério na mesma tarefa

Figura 21: Soma das latências e distâncias percorridas das primeiras e últimas tentativas nas sessões de memória de referência

Figura 22: Expressão gênica da TH e dos receptores D1R e D2R no córtex

Figura 23: Expressão gênica da ChAT e AChE e dos M1R e α 7NR no córtex

LISTA DE ABREVIATURAS

- 5-HT** Serotonina
- 6-HODA** 6-hidroxidopamina
- ACh** Acetilcolina
- AE** Ambiente enriquecido
- AEM** ambiente enriquecido MPTP
- AES** ambiente enriquecido salina
- ANOVA** Análise de variância
- APM** Ambiente padrão MPTP
- APS** Ambiente padrão salina
- ARE's** Elementos de resposta antioxidantes
- ATP** Adenosina trifosfato
- BDNF** Fator neurotrófico derivado do cérebro
- cDNA** Ácido desoxirribonucléico complementar
- ChAT** Colina acetiltransferase
- ChIs** Interneurônios colinérgicos
- COMT** Catecol-O-metiltransferase
- COX-2** Cicloxigenase-2
- CPF** Córtex pré-frontal
- D1R, D2R, D3R, D4R e D5R** Receptores dopaminérgicos do tipo D1, D2, D3, D4 e D5
- DA** Dopamina
- DAT** Transportador de dopamina
- DDA** Deficientes em DA
- DNA** Ácido desoxirribonucleico
- DOPAC** Ácido diidroxifenilacético
- DP** Doença de Parkinson
- GDNF** Fator neurotrófico derivado da glia
- GMF** Fator maturador da glia
- GPe** Parte externa do globo pálido
- GPI** Parte interna do globo pálido
- GST** glutationala S-transferase
- H₂O₂** Peróxido de hidrogênio

HO-1 Heme-oxidase 1
HO[•] Radical hidroxila
HPLC Cromatografia líquida de alta eficiência
HVA Ácido homovanílico
i.p. Intraperitoneal
IL-1 β Interleucina 1 beta
L-DOPA 3,4-dihidroxifenilalanina
LTP Potencialização de longo prazo
M1R, M2R, M3R, M4R, M5R Receptores muscarínicos M1, M2, M3, M4 e M5
MAO-A Monoamino oxidase A
MAO-B Monoamino oxidase B
MPDP⁺ 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridínio
MPP⁺ 1-metil-4-fenilpiridínio
MPTP 1-metil-4-fenil-1,2,3, 6-tetraidropiridina
NGF Fator de crescimento do nervo
NQO1 NAD(P)H-quinona-oxirredutase-1
Nrf2 Fator nuclear 2 semelhante ao fator eritróide 2
O₂⁻ Ânion superóxido
PGs Prostaglandinas
PCR Reação em cadeia da polimerase
RNA Ácido ribonucleico
ROS Espécies reativas de oxigênio
SNpc Parte compacta da substância negra
SNpr Parte reticulada da substância negra
TH Tirosina hidroxilase
TNF- α Fator tumoral de necrose alfa
MT Memória de trabalho
 α 4 β 2NR Receptores nicotínicos alfa 4 beta 2
 α 7NR Receptores nicotínicos alfa 7

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum no mundo e é caracterizada pela morte dos neurônios dopaminérgicos da parte compacta da substância negra (SNpc). Embora a DP seja definida como uma doença motora, atualmente uma série de evidências mostram que pacientes com DP apresentam declínio e outras alterações cognitivas. O declínio cognitivo tem sido descrito frequentemente nos estágios mais precoces da doença, antes mesmo dos sintomas motores, sendo que, com o curso da doença, a sua magnitude aumenta. O tratamento farmacológico da DP tem sido baseado na reposição dos níveis de dopamina (DA), utilizando-se o precursor dopaminérgico 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) e/ou o uso de agonistas dopaminérgicos. Contudo, esses medicamentos não previnem o avanço da doença e agem somente sobre os sintomas motores, não sendo efetivos na melhora dos aspectos cognitivos do indivíduo. O ambiente enriquecido (AE) é um paradigma que tem se mostrado efetivo na prevenção de vários processos neurodegenerativos, principalmente em modelos experimentais. O AE consiste na manipulação das condições de moradia, exposição de animais a diversos estímulos cognitivos, motores e somatossensoriais. Vários estudos revelam que a exposição a um AE induz mudanças morfológicas, bioquímicas e moleculares, o que reflete em facilitação cognitiva, prevenção de doenças neurodegenerativas e atenuação dos efeitos do estresse, da ansiedade e da depressão. No presente estudo, investigamos se a exposição a um ambiente enriquecido é capaz de prevenir as alterações motoras, cognitivas, bioquímicas e moleculares num modelo murino de DP, induzido pela droga parkinsoniana 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). O MPTP induziu hiperlocomoção e déficit de força muscular, os quais foram completamente prevenidos pela exposição a um AE. No contexto bioquímico, o AE não preveniu a depleção dopaminérgica induzida pelo MPTP no estriado, entretanto, retardou e preveniu, respectivamente, a depleção de DOPAC e HVA nesta região. A administração de MPTP, assim como a exposição a um AE, não induziu alterações na expressão gênica do sistema dopaminérgico na região mesencefálica. Nessa mesma região, o MPTP induziu a diminuição da expressão gênica da enzima colina acetiltransferase (ChAT) e aumento da expressão da enzima acetilcolinesterase (AChE) e do receptor muscarínico (M1R). O AE foi capaz de prevenir apenas o aumento da expressão do M1R. Utilizando o labirinto aquático de Morris, nem o MPTP nem a exposição a um AE induziram, respectivamente, déficit e facilitação cognitiva nas tarefas de memória de referência e memória de trabalho (MT). Adicionalmente, nenhuma alteração na expressão gênica do sistema dopaminérgico e colinérgico foi observada no córtex pré-frontal. Nesse contexto, nossos resultados evidenciam o potencial neuroprotetor que a exposição a um AE tem frente à DP.

Palavras chave: Doença de Parkinson; ambiente enriquecido; neuroproteção.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease in the world, characterized by dopaminergic neurodegeneration of substantia nigra pars compacta (SNpc). Although PD has been defined primarily like a motor disorder, currently a wide range of evidences has shown cognitive impairment in PD patients. Frequently, the cognitive impairment has been described in early stages of PD, even before the motor abnormalities and increases with the disease progression. The pharmacotherapy of PD has been based on replacement of the striatal dopamine (DA) levels with the dopaminergic precursor L-DOPA and/or dopaminergic agonists in order to mitigate the motor abnormalities. However, this pharmacotherapy neither prevents the disease progression nor reduces the cognitive impairments in these patients. The enriched environment (EE) is a paradigm that has been effective in preventing of several neurodegenerative processes, mainly in experimental models. The EE consists on the manipulation of the housing conditions, exposes the animals to diverse cognitive, motor and somatosensory stimuli. Several studies have demonstrated that EE induces morphological, biochemical and molecular changes, reflected in cognitive enhancing, neuroprotection and attenuation of stress, anxiety and depression effects. In this study, we investigated whether EE could prevent the motor, cognitive, biochemical and molecular abnormalities in a murine model of PD, induced by the drug 1-metil -4-fenil-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). The EE prevented completely the muscle strength deficit and the hyperlocomotion induced by MPTP. Our biochemical data show that EE did not prevent the dopaminergic striatal depletion MPTP-induced, however, it was able to slow down and prevent, respectively, the DOPAC and HVA depletion. Neither MPTP nor EE caused changes in the gene expression of the midbrain dopaminergic system. As for cholinergic system in midbrain, MPTP induced a decrease in gene expressions of the choline acetyltransferase (ChAT) and increase of the both acetylcholinesterase (AChE) and the M1 muscarinic receptor (M1R). Using the Morris water maze, neither MPTP nor exposition to EE induced, respectively, cognitive deficits and enhancing in the reference and working memory (WM) tasks. Furthermore, no changes in gene expression of dopaminergic and cholinergic systems were reported in the prefrontal cortex. In this context, our results showed the neuroprotective potential of EE against the PD.

Keywords: Parkinson's disease; enriched environment; neuroprotection.

1. Introdução

1.1. A doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) foi primeiramente descrita pelo médico britânico James Parkinson, em sua famosa monografia *An essay on the shaking palsy*, de 1817, na qual a descreveu como uma "paralisia agitante" (TEIVE; MENESES, 2003). Jean Charcot, posteriormente, adicionou mais informações à descrição inicial do quadro clínico, como a micrografia (caligrafia com letras pequenas que se reduzem progressivamente), presença de alteração postural, rigidez muscular, bradicinesia e ainda sugeriu a mudança do nome da enfermidade para doença de Parkinson, em homenagem ao autor da primeira descrição (DUVOISIN, 1991). Além disso, ele também discordou do britânico em relação à conservação de algumas funções corticais e demonstrou a presença de comprometimento da memória e disfunções cognitivas nesses pacientes (MENESES; TEIVE, 1996).

A DP é uma enfermidade neurodegenerativa e progressiva caracterizada pelo tremor de repouso, rigidez muscular, instabilidade postural, desequilíbrio, acinesia e/ou hipocinesia (CICCHETTI et al, 2009; FRISINA et al, 2009; FUCHS et al, 2004; GUIMARÃES; ALEGRIA 2004; LEE; LIU, 2008). Essas anormalidades motoras são irreversíveis e geralmente se tornam incapacitantes com o avanço da doença (GOMES; DEL BELI, 2003; SCHAPIRA et al, 2006).

Em 1960, republicado em 1998, Ehringer e Hornykiewicz elucidaram a gênese neuroquímica da DP ao demonstrar que a concentração de dopamina (DA) da parte compacta da substância negra (SNpc) e do núcleo estriado era ínfima em encéfalos *post-mortem* de pacientes com DP. Juntamente com esses achados, a observação da despigmentação da SNpc foi associada à maciça morte de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal (Fig. 1) (BARTELS; LEENDERS, 2009; GERLACH; RIEDERER, 1996; HORNYKIEWICZ, 2006; LEE; LIU, 2008; DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Uma segunda característica, porém fisiopatológica, é a presença de inclusões eosinofílicas citoplasmáticas denominadas corpúsculos de Lewy em diversas regiões mesencefálicas (CICCHETTI et al, 2009; LEE; LIU, 2008). Esses corpúsculos são caracterizados e compostos por agregados proteicos de parkina, ubiquitina e α -sinucleína (BLANDINI et al, 2000; ELBAZ; TRANCHANT, 2007; HAGAN et al, 1997; KORCZYN, 1995).

Dados epidemiológicos revelam que a DP é a segunda doença neurodegenerativa mais frequente entre as pessoas idosas, ficando somente atrás da doença de Alzheimer, com prevalência de até 2% (BARTELS; LEENDERS, 2009; ELBAZ; TRANCHANT, 2007; LEES et al, 2009; MANOR et al, 2009). A média de idade para ocorrência da DP é de 55 anos, sendo que o risco de desenvolvimento pode aumentar em cinco vezes por volta dos 70 anos de idade (HALD; LOTHARIUS, 2005).

O comprometimento dos níveis de DA e da transmissão dopaminérgica são os principais responsáveis pelos sintomas motores observados na doença. Esse comprometimento influencia diretamente a atividade da via nigroestriatal e dos componentes responsáveis pelo controle da atividade motora, os gânglios da base. (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; GOODMAN; GILMAN, 2012). As orquestradas eferências e aferências de impulsos neuromotores dos gânglios da base para o tálamo e córtex, e, vice-versa, são vitais para o planejamento e execução do correto movimento (WICHMANN; DELONG, 1999).

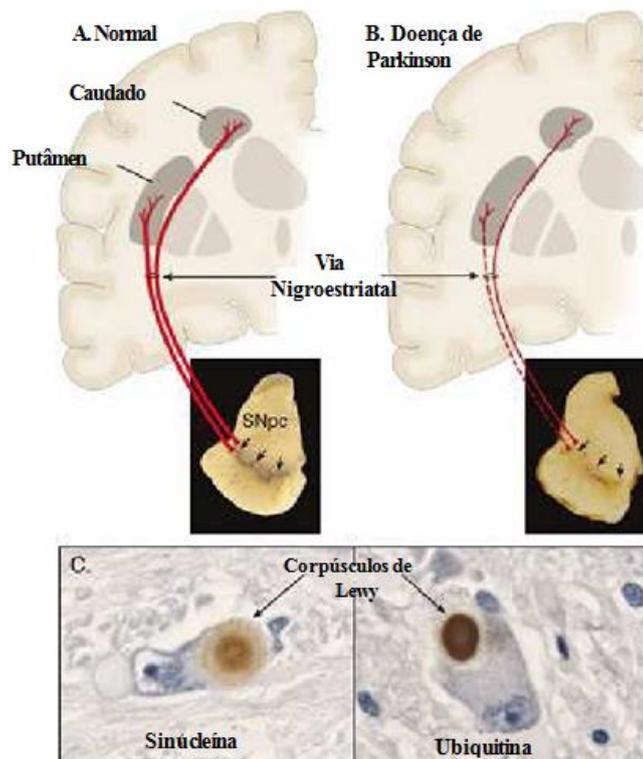


Fig. 1: Esquema simplificado da via nigroestriatal normal (A) e na DP (B) mostrando a despigmentação da SNpc e consequente degeneração da via nigroestriatal, e em (C) imunohistoquímica mostrando os chamados corpúsculos de Lewy em neurônios dopaminérgicos na SNpc. Adaptado de: DAUER; PRZEDORSKI (2003).

1.2. Neurotransmissão dos gânglios da base

Os gânglios da base são constituídos por um grupo de núcleos que atuam conjuntamente, sendo eles: estriado (caudado e putâmen), globo pálido e suas partes interna (GPi) e externa (GPe), núcleo subtalâmico (STN), parte compacta da substância negra (SNpc) e parte reticulada da substância negra (SNpr) como mostrado esquematicamente na figura 2 (NICHOLSON; PEREIRA; HALL, 2002). Esses núcleos funcionam colateralmente como um sistema modulador, regulando o fluxo das informações provenientes do córtex cerebral para os neurônios motores da medula espinal (GOODMAN; GILMAN, 2012). A DA liberada pelos neurônios da SNpc no estriado é vital na coordenação da atividade dos gânglios da base (GRAYBIEL, 2005). Além disso, o estriado recebe projeções glutamatérgicas de várias áreas do cérebro. A grande maioria dos neurônios presentes no estriado, por volta de 95%, são gabaérgicos, os quais inervam as estruturas citadas acima. Uma menor parte desses neurônios são interneurônios colinérgicos (ChIs) (GOODMAN; GILMAN, 2012; LIM; KANG; McGEHEE, 2014).

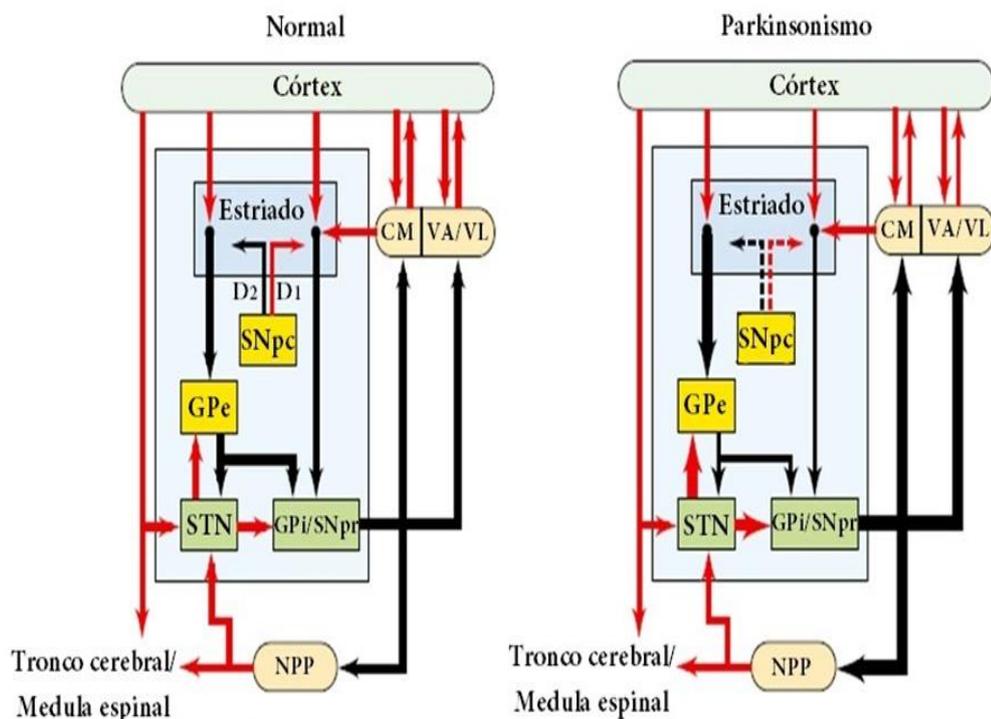


Fig. 2: Circuitaria básica dos gânglios da base. Os núcleos da base regulam o fluxo das informações provenientes do córtex cerebral para os neurônios motores da medula espinal. A DA liberada pelos neurônios da SNpc no estriado exerce papel vital na coordenação da atividade dos núcleos da base, através dos receptores D1R e D2R. À esquerda, está demonstrado o funcionamento em indivíduos normais e à direita o funcionamento em indivíduos com DP. SNpc = parte compacta da substância negra; SNpr = parte reticulada da substância negra; GPe = globo pálido externo; GPi = globo pálido interno; STN = núcleo

subtalâmico; NPP = núcleo pedunculopontino; CM, VA e VL = núcleos talâmicos: centro-medial, ventro-anterior e ventro-lateral, respectivamente. Setas vermelhas: projeções glutamatérgicas (excitatórias); setas pretas: projeções GABAérgicas (inibitórias). Adaptado de: WICHMANN; DELONG, 1999.

A inervação eferente do estriado estende-se ao longo de dois trajetos diferentes, conhecidos como vias direta e indireta. A via direta é formada pelos neurônios estriatais que se projetam para o GPi e SNpr, resultando na menor inibição do tálamo e conseqüente aumento da atividade tálamo-cortical, que facilita o movimento. A via indireta é composta pelos neurônios estriatais que se projetam para o GPe, que por sua vez se projetam para o núcleo subtalâmico, gerando estímulos eferentes para o GPi e SNpr, levando à redução da saída dos estímulos excitatórios do tálamo para o córtex cerebral, inibindo o movimento (LIM; KANG; McGEHEE, 2014).

A DA é sintetizada pelos neurônios dopaminérgicos pela hidroxilação do aminoácido L-tirosina a L-DOPA pela enzima tirosina hidroxilase (TH) como mostrado na figura 3. O composto L-DOPA sofre descarboxilação pela ação da DA descarboxilase formando DA, que é então alocada em vesículas sinápticas pelo transportador vesicular de monoaminas 2. Em resposta ao potencial de ação, a DA é liberada na fenda sináptica e liga-se a seus receptores pós e pré-sinápticos. A ação desse neurotransmissor é terminada pela sua recaptação ativa pelo transportador de dopamina (DAT) e a DA pode ser novamente alocada em vesículas sinápticas ou ser degradada enzimaticamente. Os neurônios dopaminérgicos degradam a DA em ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) pela ação da monoamina oxidase (MAO-A). O metabólito DOPAC difunde-se para fora das células dopaminérgicas onde pode ser convertido a ácido homovanílico (HVA) pela enzima catecol-O-metiltransferase (COMT). Concomitantemente, parte da DA não recaptada é degradada por outras células, como as células da glia, que convertem o neurotransmissor em 3-metoxitiramina (3-MT) e este metabólito é oxidado principalmente pela moniamino oxidase B (MAO-B) para formar HVA (ZABORSZKY; VADASZ, 2001).

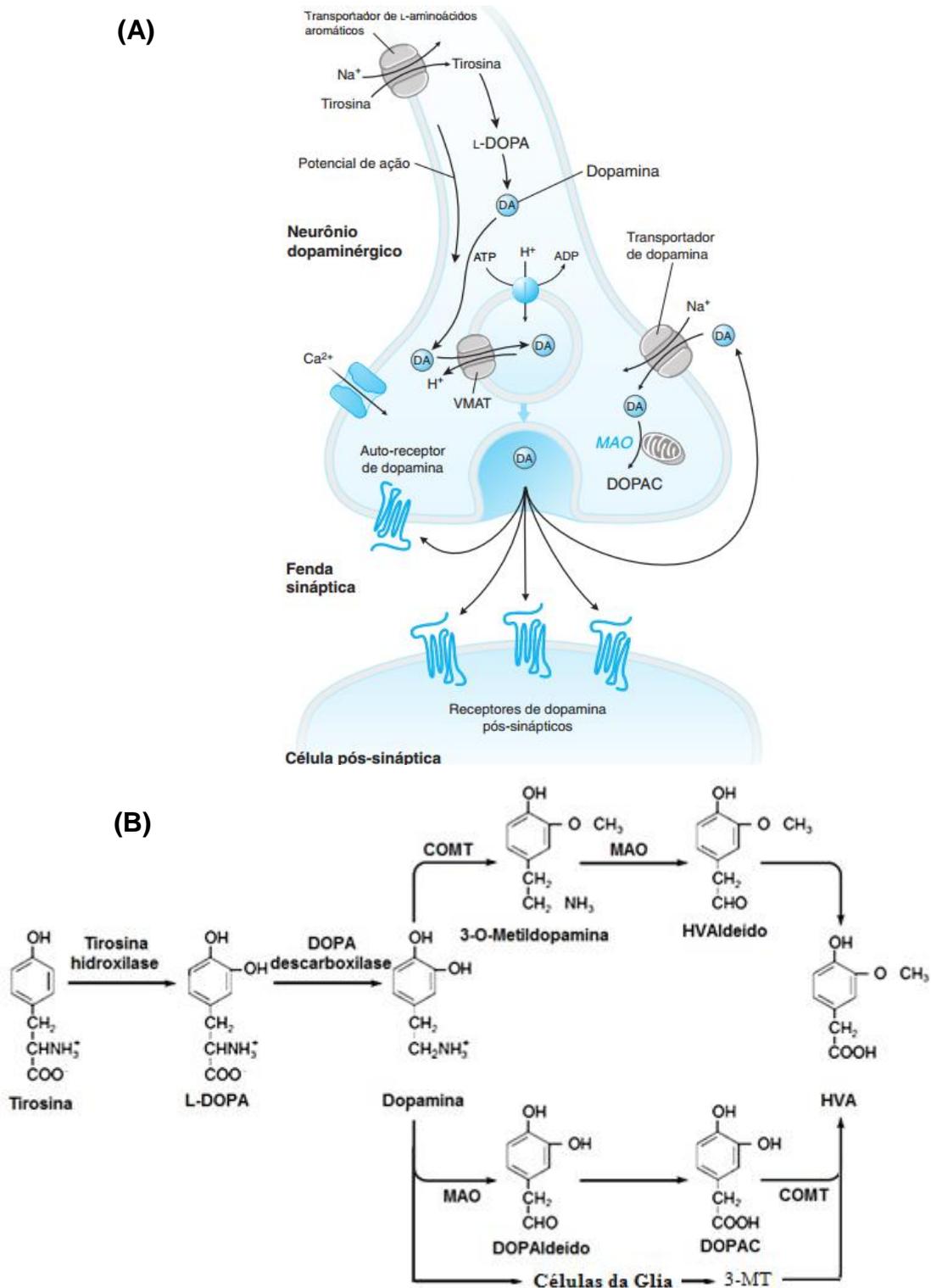


Fig 3: (A) Transmissão dopaminérgica, (B) síntese e metabolismo da DA. A DA é sintetizada pelos neurônios dopaminérgicos pela hidroxilação do aminoácido L-tirosina a L-DOPA pela enzima TH. O composto L-DOPA sofre descarboxilação pela ação da dopamina descarboxilase, formando DA. Os neurônios dopaminérgicos degradam a DA em DOPAC pela ação da monoamina oxidase (MAO-A). O metabólito DOPAC difunde-se para fora das células dopaminérgicas, podendo ser convertido a HVA pela enzima catecol metiltransferase (COMT). A DA que não foi recaptada é degradada por células da glia, que a convertem em

3-metoxitiramina (3-MT), que é posteriormente oxidado pela MAO-B para formar HVA. Adaptado de GOLAN; TASHJIAN, 2009.

Como mostrado na figura 2, a DA exerce um efeito diferenciado nas vias direta e indireta dos gânglios da base (GERFEN et al, 1990; STRAUB et al, 2014 LIM; KANG; McGEHEE, 2014). A sinalização da DA é mediada por cinco receptores dopaminérgicos acoplados à proteína G (D1R-D5R). Estes receptores são divididos em duas classes, baseado na proteína G à qual estão acoplados. D1R e D5R estimulam as proteínas $G_{s/olf}$, enquanto os D2R, D3R e D4R estimulam G_0 e G_i (NEVE et al, 2004). Os neurônios estriatais da via direta expressam principalmente o receptor excitatório D1R, enquanto os que constituem a via indireta expressam predominantemente o receptor inibitório D2R (LIM; KANG; McGEHEE, 2014). A liberação adequada de DA da substância negra favorece, por meio da ativação dos D1R, a atividade da via direta, que deve ser facilitada para que o córtex motor suplementar se torne ativo antes e durante os movimentos. Já a ativação dos D2R diminui a atividade da via indireta. Considerando ainda a figura 2, num paciente com DP, a morte dos neurônios dopaminérgicos da SNpc e o conseqüente comprometimento da ativação dos receptores dopaminérgicos no estriado geram alterações na atividade das duas vias, com predomínio da atividade da via indireta (LIM; KANG; McGEHEE, 2014). Ocorre, então, um aumento da atividade neuronal do GPi e SNpr, culminando com uma inibição excessiva do sistema tálamo-cortical. Além disso, essa redução da transmissão dopaminérgica desencadeia a diminuição da atividade neuronal do GPe e desinibição do núcleo subtalâmico, que também resulta em inibição tálamo-cortical. Essa excessiva inibição do sistema cortical motor e os níveis insuficientes de DA para ativar os receptores D1R e D2R desencadeiam um comprometimento da estimulação da via direta e da inibição da via indireta o que leva o paciente com DP apresentar os sintomas característicos da doença (STRAUB et al, 2014 LIM; KANG; McGEHEE, 2014). Corroborando com isso, estudos eletrofisiológicos, que avaliaram a atividade de várias estruturas dos gânglios da base e do mesencéfalo em pacientes com DP, revalam um STN hiperativo demonstrando que tais sintomas são verdadeiramente oriundos da maior atividade da via indireta em relação à via direta. (NICHOLSON; PEREIRA; HALL, 2002; STRAUB et al, 2014; LIM; KANG; McGEHEE, 2014) (figura 2).

Os sistemas de neurotransmissores não trabalham isoladamente. Eles são integrados anatomicamente e funcionalmente como uma rede de maneira direta e/ou

indireta através de junções sinápticas (TSUKADA et al, 2000). Embora muitas doenças neuropsiquiátricas e neurodegenerativas sejam atribuídas ao comprometimento de um único sistema de neurotransmissores, a progressão destas pode influenciar e modular outros sistemas (TSUKADA et al, 2000).

O estriado possui altos níveis de acetilcolina (ACh), de colina acetiltransferase (ChAT) e acetilcolinesterase (AChE), que são, respectivamente, as enzimas de síntese e degradação deste neurotransmissor, bem como os vários tipos de receptores muscarínicos (M1R-M5R) e os receptores nicotínicos alfa 7 ($\alpha 7$ NR) e alfa 4 beta 2 ($\alpha 4\beta 2$ NR) que fazem a mediação dos efeitos pré e pós-sinápticos (LIM; KANG; McGEHEE, 2014). Os ChIs, aproximadamente 1 a 5% da população neural, são a principal fonte de ACh do estriado e se ramificam em centenas de milhares de projeções que modulam fortemente a atividade das vias direta, indireta e de outras estruturas dos gânglios da base (XIANG et al, 2012, STRAUB et al, 2014 LIM; KANG; McGEHEE, 2014).

O controle da liberação de Ach pelos ChIs se dá principalmente pelas aferências dopaminérgicas da SNpc (LIM; KANG; McGEHEE, 2014). Estudos revelam que a DA estimula a liberação de Ach via D1R e D5R e inibe via D2R (AJIMA et al, 1990; BERTORELLI; CONSOLO, 1990; DAMSMA et al, 1990; GOMEZA et al, 1999; BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011).

Muitos trabalhos vêm mostrando, tanto em modelos animais quanto em pacientes com DP, que a morte dos neurônios dopaminérgicos da SNpc desencadeia aumento do tônus colinérgico nos gânglios da base, o que gera um aumento da atividade da via indireta e diminuição da atividade da via direta (DEBOER et al, 1993; HRISTOVA; KOLLER, 2000). Sem dúvida, este mecanismo concorda com o fato de que os agentes anticolinérgicos são capazes de restaurar o balanço entre ACh e DA nessa região e apresentarem eficácia comprovada no tratamento dos sintomas motores da DP (CHEN; SWOPE, 2007; XIANG et al, 2012). Não obstante, uma ampla gama de estudos, básicos e clínicos, relata que o sistema colinérgico pode estar suprimido em decorrência da depleção dopaminérgica observada na DP tanto nos gânglios da base quanto em outras regiões menos subcorticais do cérebro (CHUNG et al, 2010; BOHNEN; ALBIN, 2011; MÜLLER; BOHNEN, 2013; HAGINO et al, 2015).

Baseado nisso, a integração entre os sistemas dopaminérgico e colinérgico é crítica para a compreensão das manifestações motoras e cognitivas observadas em

pacientes com DP (GOMEZA et al, 1999; MÜLLER; BOHNEN, 2013; HAGINO et al, 2015)

1.3. Etiologia da DP

Os mecanismos e fatores subjacentes ao processo neurodegenerativo na DP ainda são pouco conhecidos, embora muitas evidências sugiram que o desenvolvimento deste processo seja multifatorial (REALE et al, 2009; SING; DIKSHI, 2007). Estudos básicos e clínicos realizados nas últimas décadas têm revelado muito sobre a patogênese da DP. As principais hipóteses pontuam que a neuroinflamação, estresse oxidativo e apoptose, condição genética do indivíduo e a exposição a certas condições ambientais contribuem para o desenvolvimento do quadro clínico (CHEN; LE, 2006; DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; SINGH; DIKSHI, 2007).

Os neurônios são particularmente vulneráveis a processos inflamatórios por sua grande diferenciação celular e relativa incapacidade de se dividir. Em processos inflamatórios precoces, o sistema imune inato é ativado e dirige uma cascata de eventos que implicam no recrutamento do sistema imune adaptativo (GAO et al, 2003).

Na DP, a formação dos corpúsculos de Lewy por si só é capaz de ativar a ação neurotóxica do sistema imune inato que está relacionado com linhagens de células de mieloides. Essas linhagens são as primeiras linhas de defesa do encéfalo a responderem a qualquer injúria cerebral (MOSLEY et al, 2006).

O aumento da atividade das células da micróglia, que é persistente em pacientes com DP, libera inúmeros fatores neuroinflamatórios como, por exemplo, o fator maturador da glia (GMF) o qual desencadeia o aumento de expressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β) e da cicloxigenase-2 (COX-2) e das prostaglandinas (PGs) (BARBOSA et al, 2006; HALD; LOTHARIUS, 2005; MOSLEY et al, 2006; KHAN et al, 2015). Os processos inflamatórios associados ao aumento de expressão do TNF- α , IL-1 β , COX-2 e às altas concentrações de PGs estão envolvidos em eventos deletérios que promovem a neurodegeneração de neurônios dopaminérgicos da SNpc (LIMA et al, 2006; TEISMANN et al, 2003; KHAN et al, 2015).

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a formação e a neutralização de espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo esta uma das causas

do dano neuronal observado em várias doenças neurológicas incluindo a DP (MOSLEY et al, 2006). Regiões encefálicas ricas em catecolaminas, como a SNpc, podem ser mais sensíveis a geração de ROS (MOSLEY et al, 2006). A metabolização da DA em neurônios dopaminérgicos pode favorecer o ambiente para a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido (O_2^-) e DA-quinona. Adicionalmente, esses neurônios possuem uma menor reserva mitocondrial em relação a outras populações neuronais, o que torna esta região do mesencéfalo particularmente mais suscetível aos efeitos nocivos desses ROS (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; PREDIGER et al, 2010). Níveis elevados de H_2O_2 podem reagir com o grupo heme de certas proteínas, como a hemoglobina e o citocromo, gerando o radical hidroxila (HO^\cdot), o qual é capaz de oxidar carboidratos, lipídios, proteínas e o ácido desoxirribonucleico (DNA) (BARBOSA et al, 2006; MOSLEY et al, 2006). Adicionalmente, O_2^- e a DA-quinona podem reagir com resíduos proteicos de cisteína, danificando várias proteínas celulares (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

A expressão de genes tidos, em sua maioria, como oncogenes, caracteriza a morte por apoptose. Por exemplo, a expressão de genes como o *bax* e *bcl-x* facilita as vias que determinam a morte celular, já a expressão de *bcl-2* e *bcl-xL* facilitam as vias relacionadas aos processos pró-vida da célula (LEV et al, 2003).

Estudos realizados tanto *in vivo* quanto *in vitro* demonstram que o aumento da expressão de genes pró-apoptose de neurônios dopaminérgicos da SNpc é um evento diretamente relacionado com o processo de neurodegeneração na DP (BATTISTI et al, 2008; MLADENOVIC et al, 2004; NOVIKOVA et al, 2006; SINGH; DIKSHIT, 2007).

É importante ressaltar que cerca de 10 a 20% dos pacientes com DP apresentam um histórico familiar da doença o qual pode ser tanto autossômico dominante como autossômico recessivo (ELBAZ; TRANCHANT, 2007; LEE; LIU, 2008). As alterações genéticas relacionadas afetam principalmente os genes de codificação da α -sinucleína, parkina e componentes do sistema proteassômico (ELBAZ; TRANCHANT, 2007; LEE; LIU, 2008).

Além disso, um amplo número de evidências revela que a exposição a agentes ambientais específicos e até certos hábitos podem influenciar e determinar o desenvolvimento do processo neurodegenerativo em indivíduos geneticamente susceptíveis (MENESES; TEIVE, 1996). A exposição a metais, toxinas, inseticidas,

pesticidas e herbicidas tem se destacado como um importante fator associado ao aumento do risco de desenvolvimento da DP nessa população (GORELL et al, 1998; GORELL et al, 1999; HERNÁNDEZ-MONTIEL, 2006).

1.4. Neurociência translacional dos aspectos cognitivos da DP

Embora a DP seja definida e caracterizada como uma doença motora, atualmente é bem aceito que pacientes com DP manifestem declínio e outras alterações cognitivas. O declínio cognitivo tem sido descrito frequentemente nos estágios mais precoces da doença, antes mesmo dos sintomas motores, sendo que, com o curso da doença a magnitude deste aumenta (MORIGUCHI; YABUKI; FUKUNAGA, 2012).

Geralmente as alterações cognitivas precoces mais comuns são aquelas relacionadas à memória declarativa e às habilidades operacionais complexas como o foco atencional, memória operacional ou de trabalho (MT) e flexibilidade cognitiva, às quais dependem da integridade funcional do hipocampo e córtex pré-frontal (CPF). Essas alterações têm profundos efeitos nos aspectos que envolvem iniciativa, tomada de decisão, planejamento e a efetiva realização de uma determinada tarefa ou ação pelo indivíduo (SAYKINS et al, 2004).

Recentemente, Pfeiffer et al. (2013), em um estudo clínico realizado num grande hospital da Dinamarca, descreveram e caracterizaram o perfil cognitivo de pacientes com DP precoce que não possuíam comorbidades psiquiátricas. O estudo, que contou com 86 pacientes com idades de 40 a 70 anos, revelou que 69 % dos pacientes mostravam comprometimento da memória declarativa, 54% disfunções executivas, 46% anormalidades visuoespaciais e 35% déficits de atenção e MT. Além disso, o prejuízo cognitivo observado foi relacionado a um maior nível de bradicinesia, rigidez postural e simetria axial consoante à escala unificada da DP (UPDRS - *Unified Parkinson Disease Rating*) (PFEIFFER et al, 2013).

O conhecimento acerca da etiologia, fisiopatologia e terapêutica da DP ainda não é totalmente claro. Por isso, o uso de modelos animais é fundamental para ampliar a compreensão dos mecanismos patogênicos da doença e para a busca de novas abordagens terapêuticas para serem testadas na clínica médica (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006).

1.5. Modelos animais da DP

Modelos animais, por definição, refletem as características da doença do homem e simulam as mudanças patológicas, histológicas e bioquímicas da doença e seus distúrbios funcionais. Todavia, a DP é uma doença humana, e não se manifesta espontaneamente em animais, sendo necessária sua indução por meio da administração de agentes neurotóxicos. Naturalmente, não existe um modelo que represente fidedignamente todos os sinais da DP (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

O primeiro modelo animal de DP descrito foi o induzido pela toxina 6-hidroxi-dopamina (6-HODA), no qual a perda de neurônios dopaminérgicos da SNpc se dá pela formação de grandes quantidades de ROS após a infusão desta toxina na região citada (DAUER; PRZEDBORSKI 2003). Outro modelo utilizado é a infusão de lipopolissacarídeo, que é uma endotoxina encontrada na membrana externa das bactérias gram-negativas e leva à ativação de vias sinalizadoras intracelulares, transcrição de genes geradores de ROS e ao aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Semelhantemente ao modelo da 6-HODA, a infusão do lipopolissacarídeo na SNpc induz neurodegeneração dopaminérgica semelhante a observada na DP (LIMA et al, 2006). Outro modelo é o induzido pela rotenona, um inseticida de amplo espectro, o qual se acumula no complexo mitocondrial e inibe a transferência de elétrons, acarretando também no aumento de ROS no meio intracelular dos neurônios dopaminérgicos (CICCHETTI et al, 2009; DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

O 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) é uma neurotoxina lipossolúvel, fato que lhe confere grande capacidade de cruzar a barreira hematoencefálica, que é capaz de produzir mudanças bioquímicas e neuropatológicas muito semelhantes à que ocorre na DP (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Devido a essas similaridades bioquímicas e histológicas o modelo do MPTP tem sido muito importante para a compreensão da fisiopatologia da DP (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

Uma vez no encéfalo, seja por administração parenteral ou infusão direta na SNpc, o MPTP é oxidado a 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridínio (MPDP⁺) pela enzima MAO-B presente nas células da glia. Então, esse intermediário é convertido a 1-metil-4-piridínio (MPP⁺) (provavelmente por oxidação espontânea). Como a molécula do MPP⁺ é polar, ela depende de carreadores de membrana plasmática para entrar

nas células. Além disso, o MPP^+ é um substrato de alta afinidade para o DAT que ao penetrar nos neurônios dopaminérgicos promove a saída da DA (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Dentro desses neurônios, o MPP^+ se concentra no interior das mitocôndrias bloqueando o complexo I da cadeia respiratória, interrompendo a transferência de elétrons para a ubiquinona. Essa inibição promove o aumento de ROS e diminui a síntese de adenosina trifosfato (ATP), portanto, comprometendo o aporte energético da célula gerando morte celular (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003) (figura 4). Adicionalmente, o MPTP também é capaz de induzir a liberação de fatores neuroinflamatórios e promover o aumento da atividade microglial na SNpc como ocorre na DP (KHAN et al, 2013; KHAN et al, 2015).

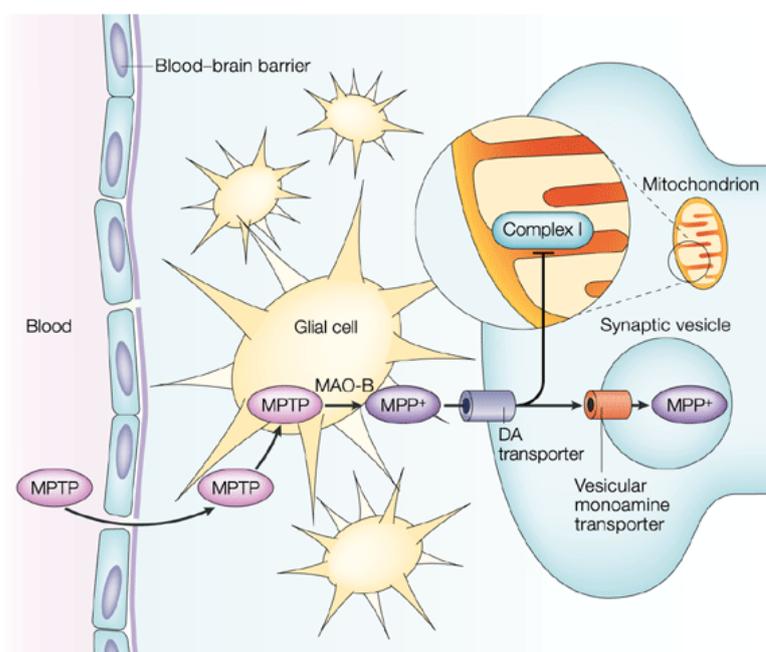


Fig 4: Mecanismo de ação do MPTP. O MPTP é uma toxina lipossolúvel, capaz de cruzar a barreira hematoencefálica. Após sua administração parenteral ou infusão direta na SNpc, o MPTP é oxidado a 1-metil-4-fenil-2,3-diidropiridina ($MPDP^+$) pela enzima MAO-B presente nas células da glia, e esse intermediário é convertido a MPP^+ , provavelmente por oxidação espontânea. O MPP^+ é um substrato de alta afinidade para o transportador de dopamina (DAT) dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal. Dentro dos neurônios, o MPP^+ se acumula no interior da membrana mitocondrial, inibindo o complexo I da cadeia transportadora de elétrons e induzindo a morte por apoptose. VILA; PRZEDORSKI (2003).

Estudos básicos utilizando esses modelos animais de DP têm corroborado com os achados clínicos, revelando que, atrelado ao comprometimento motor, ocorre também comprometimento do aprendizado, da memória de reconhecimento de objetos, memória de referência e MT (DEGUIL et al, 2010; MORIGUCHI; YABUKI; FUKUNAGA, 2012; PREDIGER et al, 2010).

Moriguchi, Yabuki e Fukunaga (2012), utilizando a administração via intraperitoneal (i.p.) de MPTP por cinco dias consecutivos, numa dose de 25 mg/Kg em camundongos C57BL/6, mostraram que os animais tratados com MPTP tiveram comprometimento do equilíbrio e da coordenação motora nos testes de *rota-rod* e *beam-walking* a partir da primeira semana após a última administração da droga. Adicionalmente, a partir da terceira semana pós tratamento, esses animais apresentaram um acentuado déficit no reconhecimento de objetos e comprometimento da potencialização de longo prazo (LTP) induzida na área CA1 do hipocampo. O grupo também relacionou esses achados a reduções significativas da proteína cinase 2 dependente de calcio-calmodulina e do nível de fosforilação das subunidades R1 dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA no estriado, área CA1 e CA3 do hipocampo e giro denteado (MORIGUCHI; YABUKI; FUKUNAGA, 2012).

Prediger et al (2010) validaram um modelo de DP o qual utiliza uma única infusão intranasal de MPTP na mesma linhagem de camundongos citada acima. O estudo revelou que os animais expostos ao MPTP tiveram comprometimento do reconhecimento social, MT no labirinto aquático de Morris e do componente de curto prazo relacionado à memórias aversivas utilizando o *step-down*, um protocolo de esquivas ativa. Associado a esses resultados observou-se acentuada redução dos níveis de DA e noradrenalina (NA), respectivamente, no CPF e hipocampo. Além disso, existe a evidência de que ocorra um desequilíbrio na expressão de fatores pró-apoptóticos e anti-apoptóticos nas regiões acima citadas e que isto também estaria relacionado aos déficits de memória observados no labirinto aquático de Morris (DEGUIL et al, 2010).

Esse conjunto de achados demonstra claramente que o efeito da depleção dopaminérgica que ocorre na DP não influencia somente as funções dependentes dos gânglios da base, como também naquelas dependentes do CPF, hipocampo e amígdala (DEGUIL et al, 2010; MORIGUCHI; YABUKI; FUKUNAGA, 2012; PFEIFFER et al, 2013; PREDIGER et al, 2010). Todavia, ainda não foi relatado qualquer tipo de tratamento capaz de prevenir, frear e/ou reverter as alterações cognitivas observadas nas fases mais precoces da DP.

1.6. Tratamento da DP

O tratamento farmacológico da DP tem como base a reposição dos níveis de DA que se encontram comprometidos devido à neurodegeneração da SNpc. A terapia que é mais efetiva nas fases precoces da doença se dá pelo uso do precursor dopaminérgico 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) que é a droga mais utilizada e efetiva para tratar a bradicinesia e rigidez muscular (RAJPUT, 2001; SCHAPIRA et al, 2006). O uso crônico da L-DOPA, em pacientes em estágios mais avançados gera o desenvolvimento de resistência à terapia, possivelmente pelo baixo número de neurônios viáveis capazes de metabolizar a L-DOPA a DA (BENBIR et al, 2006). Adicionalmente, outra característica do uso crônico da L-DOPA é a ocorrência de variações motoras do tipo “*on-off*”, que são flutuações do estado clínico no qual hipocinesia e a rigidez muscular podem se exacerbar em questão de minutos (LUNDBLAD et al, 2004). Além da L-DOPA, são também utilizados agonistas dopaminérgicos que atuam diretamente nos receptores de dopamina. Contudo, como a L-DOPA, estes medicamentos não previnem o avanço da doença e agem somente sobre os sintomas motores, não sendo efetivos na melhora dos aspectos cognitivos (YABUKI et al, 2014).

Diante dessas complicações, tem surgido a proposta de novas estratégias terapêuticas com o objetivo de não somente reverter o quadro motor do paciente, mas também prevenir o desenvolvimento da DP e tratar os sintomas mais precoces da doença como, por exemplo, o déficit cognitivo (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006; PANG; HANNAN, 2013; SCHAPIRA et al, 2006).

Estudos epidemiológicos pontuam a existência de uma correlação entre o uso de anti-inflamatórios e redução da incidência de casos de doenças neurodegenerativas tais como a DP (GAO et al, 2003; MCGEER; MCGEER, 2001).

Anti-inflamatórios esteroidais (AIEs), mostram ser capazes de inibir parcialmente a reação de células da micróglia, acarretando numa diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias, fato que resulta numa atenuação da lesão induzida por MPTP em ratos (KURKOWSKA-JASTRZEBSKA et al, 1999). Semelhantemente, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) previnem de modo eficaz a depleção dopaminérgica induzida por MPTP em camundongos (SAIRAM et al, 2003; TEISMANN; FERGER, 2001; TEISMANN et al, 2003).

Adicionalmente, um grande número de terapias não farmacológicas têm emergido nas últimas décadas com resultados promissores para o tratamento da DP (BOGGIO et al, 2006; DUCAN; EARHART, 2012; FREGNI et al, 2004; NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006; PANG; HANNAN, 2013). Por exemplo, a estimulação transcraniana magnética (TMS) e a estimulação transcraniana por corrente contínua de baixa intensidade (tDCS), quando aplicadas repetidas vezes sobre o córtex pré-frontal dorso lateral esquerdo, se mostraram eficazes na recuperação motora e cognitiva de pacientes com DP e depressão associada (BOGGIO PS et al, 2006; FREGNI et al, 2004).

Ducan e Earhart (2012), utilizando outra ferramenta não farmacológica num estudo clínico, relataram melhora motora em pacientes idosos com DP que iniciaram a prática de *Tango*. Esse achado reforça a ideia de que o exercício físico voluntário pode proteger e até reverter alguns sintomas característicos da DP (FREDRIKSSON et al, 2011; GERECKE et al, 2010).

Além disso, estudos envolvendo a manipulação de fatores ambientais por meio do paradigma do ambiente enriquecido (AE), principalmente na neurociência básica, têm reforçado a ideia de *mens sana in corpore sano* (mente sã, corpo são) como alternativa para terapia não farmacológica para DP e outras doenças neurodegenerativas. A identificação e a melhor compreensão dos principais mecanismos e alvos relacionados à influência ambiental pode fornecer as bases para o desenvolvimento racional de fármacos genericamente chamados de “ambientomnemônicos” e a prática de atividades físicas, sociais e culturais como forma de prevenção da DP e de outras doenças neurodegenerativas (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006; PANG; HANNAN, 2013).

1.7. Enriquecimento ambiental

Para o ser humano, o ambiente é considerado como todo o contexto à sua volta, o qual envolve os relacionamentos familiares, amizades, lazer, condição socioeconômica, moradia, entre outros. Esse ambiente pode ter grandes influências, tanto positivas quanto negativas sobre o desenvolvimento cerebral e, conseqüentemente, sobre diversos aspectos comportamentais relacionados ao indivíduo (SOLINAS et al, 2010).

Nesse contexto, o AE estaria atrelado aos fatores ambientais positivos, como condições socioeconômicas favoráveis, bons relacionamentos, educação adequada,

prática de atividades esportivas e culturais. Contrariamente, condições socioeconômicas desfavoráveis, déficit educacional, estresse e relacionamentos conturbados, pouca ou nenhuma prática de atividades esportivas e culturais estão relacionados a um ambiente empobrecido, que pode facilitar o desenvolvimento de diversas doenças neurodegenerativas (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006).

No âmbito da neurociência básica, o AE é um paradigma no qual animais são expostos a um ambiente que fornece uma variedade de estímulos sensoriais, motores e cognitivos (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006; PANG; HANNAN 2013) (figura 5). Esse paradigma foi descrito pela primeira vez por Donald Olding Hebb, quando este relatou melhora comportamental dos ratos que eram criados livremente em sua casa, em relação aos mantidos em gaiolas convencionais (HEBB, 1947).

Inúmeros trabalhos vêm sendo publicados relatando os benefícios desse paradigma sobre o comportamento de animais (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006; PANG; HANNAN 2013). Apesar dos protocolos variarem muito entre si, o AE é geralmente composto de gaiolas maiores, com vários objetos como escadas, túneis, gangorras, esconderijos, e uma roda de correr (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006). Esse ambiente oferece diferentes oportunidades de estímulos visuais, somatossensoriais, olfativos, motores e cognitivos com maior probabilidade de interação social, exploração do ambiente, e os benefícios da atividade física voluntária (PANG; HANNAN, 2013). Além disso, a localização e os tipos de objetos são atualizados constantemente, o que facilita a aprendizagem espacial dos animais por meio da criação de novos mapas espaciais (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006; PANG; HANNAN, 2013; VAN PRAAG et al, 2000).

Uma série de estudos relata que a exposição a um AE promove benefícios fisiológicos, morfológicos e moleculares que incluem aumento da arborização dendrítica, gliogênese, neurogênese e modificações na expressão de genes ligados à plasticidade neuronal (BIRCH. MACGARRY; KELLY, 2013; LEGER et al, 2014; LLORENS-MARTÍN et al, 2010; NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006; ROSSI et al, 2006; PANG; HANNAN, 2013; YANG et al, 2015;). Por isso, a exposição a um AE facilita processos de aprendizagem e memória, atenua os efeitos do estresse, da ansiedade e da depressão e previne o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (BENAROYA-MILSHTEIN et al, 2004; BRENES; FONARGUERA, 2008; FOX et al, 2006; HUTCHINSON et al, 2012;

NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006; VAN PRAAG et al, 2000; YANG et al, 2015; WILL et al, 2004).

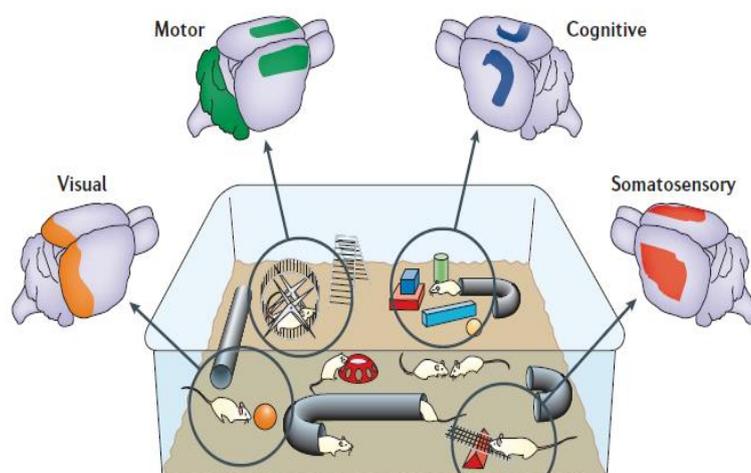


Fig 5: Representação esquemática da exposição a um AE e das áreas que sofrem influência pela exposição. NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006.

1.8. Enriquecimento ambiental e doenças neurodegenerativas

A doença de Huntington (DH) é uma doença devastadora caracterizada pela neurodegeneração do córtex cerebral e do núcleo estriado, que desencadeia disfunções motoras, cognitivas e psiquiátricas debilitantes para o indivíduo (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006). Van Dellen et al (2000) e Nithianantharajah et al (2008) mostraram que a exposição a um AE é capaz de retardar o início do comprometimento motor, diminuir a magnitude deste e reverter o déficit cognitivo em um modelo animal de DH. Adicionalmente a esses efeitos, tem sido relatado aumento da expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), diminuição da perda de volume cortical e estriatal, aumento da expressão de receptores CB1 do sistema endocanabinóide (CB1R) e neurogênese (NITHIANANTHARAJAH et al, 2006).

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa que compromete principalmente o neocórtex e hipocampo e evolui o desenvolvimento de demência. A doença é caracterizada pela presença de placas senis e pelos emaranhados neurofibrilares (NFTs) (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006). Cracchiolo et al. (2007), utilizando camundongos transgênicos APPsw/PS1, mostraram que os déficits de aprendizagem no labirinto radial aquático e no reconhecimento de objetos

foram revertidos como consequência da exposição a um AE. Além disso, esses efeitos cognitivos foram relacionados com acentuada redução da deposição dos agregados da proteína β -amilóide no hipocampo (CRACCHIOLO et al, 2007).

No que tange a DP, apesar do número limitado de trabalhos, têm se demonstrado o grande potencial neuroprotetor da exposição a um AE sobre os aspectos motores e/ou morfológicos (BEZARD et al, 2003; DUNNETT et al, 2004; FAHERTY et al, 2005). Bezard et al. (2003), utilizando um modelo de administração aguda de MPTP, demonstraram que a exposição a um AE é capaz de prevenir a perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc e que este efeito está relacionado à diminuição do nível e da expressão do transportador do DAT no estriado.

Todavia, nenhum trabalho teve seu foco centrado nos efeitos neuroprotetores promovidos pela exposição a um AE relacionado às alterações cognitivas presentes na DP.

2. Justificativa

Diante da contextualização exposta, considerou-se:

- I. A comprovada relação entre o declínio e as alterações cognitivas no curso do desenvolvimento da DP;
- II. A limitação do tratamento farmacológico e a busca por novas estratégias terapêuticas com o objetivo de prevenir e tratar os sintomas cognitivos e motores da DP;
- III. O potencial que a exposição a um AE tem mostrado sobre diversos aspectos motores e cognitivos;
- IV. O potencial neuroprotetor que a exposição a um AE tem exibido frente a inúmeras doenças neurodegenerativas;
- V. A carência de dados que relacionam a influência da exposição a um AE frente aos sintomas cognitivos da DP.

Por conseguinte, a investigação dos efeitos da exposição a um AE sobre os aspectos motores, cognitivos, bioquímicos e moleculares da DP é vital para a identificação e a melhor compreensão dos principais mecanismos e correlatos subjacentes à neuroproteção induzida pelo AE. Adicionalmente, o estudo objetiva contribuir com as bases para desenvolvimento racional de fármacos genericamente chamados de “ambientomnemônicos” e sustentar evidências sólidas que justifiquem a prática de atividades físicas, sociais e culturais como forma de prevenção da DP.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Investigar e avaliar se a exposição a um ambiente enriquecido é capaz de prevenir as alterações motoras, cognitivas, bioquímicas e moleculares induzidas pela neurotoxina parkinsoniana MPTP em camundongos C57Bl/6.

3.2. Objetivos específicos

Em animais tratados ou não com MPTP e expostos ou não ao ambiente enriquecido, avaliou-se:

- ◆ A força de agarre por meio do *grip test* e a atividade locomotora em campo aberto;
- ◆ A aprendizagem, a memória de referência e memória de trabalho ou operacional espacial por meio do labirinto aquático de Morris;
- ◆ O nível do neurotransmissor DA e seus metabólitos no estriado;
- ◆ O perfil de expressão gênica dos sistemas dopaminérgico e colinérgico na região mesencefálica e córtex.

4. Materiais e métodos

4.1. Animais

Foram utilizados 28 camundongos machos da linhagem C57Bl/6, com 8 a 9 semanas de idade, provenientes do Biotério do Laboratório de Neurobiologia Molecular e Comportamental (LNMC) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, com assoalho coberto por serragem em ambiente climatizado ($22^{\circ}\text{C} \pm 2$), num ciclo claro-escuro artificial de 12 h, com água e ração comercial *ad libitum*.

Neste estudo foram respeitados os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, www.cobea.org.br), que está em conformidade com normas internacionais de pesquisa envolvendo animais. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo (protocolo número 001/2011)

4.2. Delineamento Experimental

O delineamento desse estudo foi de amostras independentes para o tipo de ambiente e para o tratamento com MPTP. Os 28 animais foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos, a saber:

- ◆ **Ambiente padrão – Salina (APS) (n=7):** Os animais, após o desmame, foram mantidos em gaiolas padrão por 60 dias. No 41º dia foi iniciado o regime de uma administração diária via i.p. de salina durante cinco dias consecutivos e, então, seguido para o repouso e demais testes.
- ◆ **Ambiente enriquecido – Salina (AES) (n=7):** Os animais, após os desmame, foram mantidos em gaiolas com enriquecimento de ambiente por 60 dias. No 41º dia foi iniciado o regime de uma administração diária via i.p. de salina durante cinco dias consecutivos e, então, seguido para o repouso e demais testes.
- ◆ **Ambiente padrão – MPTP (APM) (n=7):** Os animais, após o desmame, foram mantidos em gaiolas padrão por 60 dias. No 41º dia foi iniciado o

regime de uma administração diária via i.p. de MPTP (25 mg/Kg) durante cinco dias consecutivos e, então, seguido para o repouso e demais testes.

- ◆ **Ambiente enriquecido – MPTP (AEM) (n=7):** Os animais, após os desmame, foram mantidos em gaiolas com enriquecimento de ambiente por 60 dias. No 41º dia foi iniciado o regime de uma administração diária via i.p. de MPTP (25 mg/Kg) durante cinco dias consecutivos e, então, seguido para o repouso e demais testes.

A Figura 6 representa o delineamento experimental e os grupos do estudo.

1º dia	...	40º dia	41º dia	42º dia	43º dia	44º dia	45º dia	46º dia	47º dia	48º dia	49º dia	50º dia	51º dia	52º dia	53º dia	54º dia	55º dia	56º dia	57º dia	58º dia	59º dia	60º dia	61º dia
AE ou AP	...	AE ou AP	AE ou AP	AE ou AP	AE ou AP	AE ou AP	AE ou AP	AE ou AP	AE ou AP	AE ou AP	AE ou AP	AE ou AP	AE ou AP	AE ou AP	AE ou AP	AE ou AP	AE ou AP	AE ou AP					
		Salina ou MPTP	Repouso	Grip e atividade	Ref	Ref	Ref	Ref	PROBE	Ref	WM	Dissecação											



APS



AES



APM



AEM

Fig 6: Representação esquemática do delineamento experimental (AP para ambiente padrão, AE para ambiente enriquecido, *grip*: para o teste de força de agarre, atividade para atividade locomotora, ref para as sessões de memória de referência, PROBE para teste comprobatório de aprendizagem e MT para sessões de memória de trabalho). Juntamente, a representação dos grupos APS (ambiente padrão salina), AES (ambiente enriquecido salina), APM (ambiente padrão MPTP) e AEM (ambiente enriquecido MPTP).

4.3. A exposição a um AE

A exposição a um AE foi realizada com a manutenção dos animais em gaiolas com dimensões de 60x50x22 cm nas quais foram adicionados de quatro a cinco brinquedos diferentes entre si, uma roda giratória e uma casa em miniatura. Os brinquedos foram trocados semanalmente por outros com cores, formas e material diferente, porém, a roda giratória e a casa em miniatura foram mantidas constantemente.



Fig 7: Representação esquemática do protocolo de exposição a um AE utilizado neste trabalho.

4.4. O modelo de DP

A partir do 41^o dia, os animais foram submetidos à administração de MPTP (Sigma-Aldrich, cat M0896), dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%) na dose de 25 mg/kg uma vez ao dia por cinco dias consecutivos e aos animais controle foi administrado salina. Esse tratamento causa perda seletiva de neurônios dopaminérgicos na SNpc e redução da inervação dopaminérgica estriatal, e, por isso, vem sendo utilizado como modelo experimental de neurodegeneração dopaminérgica similar à que acomete pacientes parkinsonianos (MORIGUCHI; YABUKI; FUKUNAGA, 2012).

4.5. Teste de força de agarre (*Grip test*)

Após 48 horas da última administração de MPTP, os animais foram submetidos ao teste de força de agarre. Primeiramente eles foram habituados à sala de experimentação 30 min antes do início do experimento. Para mensurar a força de agarre, foi utilizado um suporte metálico acoplado a um transdutor de força o qual era conectado a um computador que possuía o *software* WinDaQ DATAQ Instruments®, Inc. para os registros.

Durante o teste, o experimentador manteve o animal seguro pela cauda e o permitiu agarrar o suporte com as patas dianteiras, mantendo o corpo sempre paralelo em relação à superfície. Após manter o animal por dois segundos nessa posição, o experimentador aumentou a força continuamente até que o animal soltasse o suporte. O pico de força máxima foi registrado automaticamente no momento em que o animal soltava o suporte e foi expresso em gramas força (gf).

Cinco testes foram realizados por animal num período máximo de 50 segundos e a média destes foram utilizadas nas análises.



Fig 8: Representação do teste de força de agarre (Grip test). http://depts.washington.edu/compmed/ivs/images/GripStrength_large.jpg.

4.6. Atividade locomotora em campo aberto

Decorrido o intervalo de três horas da realização do teste de força de agarre, foi realizada a avaliação da atividade locomotora dos animais na caixa monitora de atividades EP 149 *Insight*®. Os camundongos foram habituados à sala de experimentação por 30 min e, então, introduzidos na caixa e permitidos explorar o ambiente livremente por cinco minutos. Toda a atividade locomotora foi monitorada e os resultados obtidos foram expressos em distância total percorrida em centímetros por intervalo de minuto, e como distância total percorrida em metros por intervalo de hora.



Fig 9: Caixa monitora de atividades utilizada para o teste de atividade locomotora. <http://insightltda.com.br/insight-equipamento-cientifico-261-Monitor-de-Atividades---IR>

4.7. Memória de referência no labirinto aquático de Morris

O labirinto aquático de Morris consiste em uma piscina circular de 66 cm de diâmetro por 50 cm de altura de cor azul, dividida em quatro quadrantes imaginários preenchida com água e leite (para tornar a água turva e assim impedir a visualização da plataforma pelo animal). Pistas espaciais foram localizadas na parede da sala

para auxiliar na orientação espacial do animal. Em um dos quadrantes, foi alocada uma plataforma fixa submersa a 0,75 cm da superfície da água. A piscina foi marcada com os quatro pontos cardinais equidistantes e a plataforma posicionada no quadrante norte.

O treinamento consistiu de quatro sessões diárias, com quatro tentativas por sessão (saindo dos quatro pontos cardinais). Em cada tentativa o animal foi colocado na água com focinho voltado para a parede da piscina, e este foi permitido nadar livremente por 60 segundos ou até que o mesmo encontrasse a plataforma de escape. Se a plataforma não fosse encontrada em 60 segundos, o animal era conduzido gentilmente até a plataforma e ali permanecia por 15 segundos. A avaliação do desempenho dos animais foi pela latência (intervalo de tempo desde a liberação do animal até o momento em que o mesmo encontra a plataforma) e pela distância percorrida até encontrar a plataforma.

No quinto dia de experimento foi realizado o teste comprobatório (PROBE). Nesse teste, a plataforma foi retirada e o tempo despendido e a distância percorrida pelo animal em cada quadrante foi mensurado.

Após 24 horas do PROBE, os animais realizaram uma nova sessão de memória de referência para manutenção da linha de base da tarefa (não extinção da tarefa). A linha de base foi mantida os animais foram conduzidos aos testes de MT.

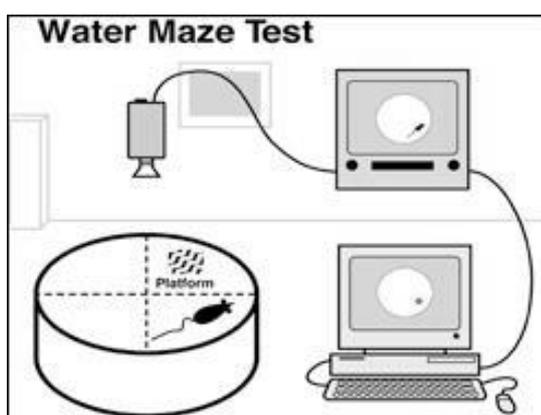


Fig 10: Representação esquemática do labirinto aquático de Morris. <https://ffiproject.files.wordpress.com/2012/04/watermasetest.jpg>.

4.8. Memória de trabalho no labirinto aquático de Morris

A memória operacional ou MT se refere à capacidade de um indivíduo manter uma informação ativa ou *online*, e enquanto houver relevância dessa informação, ser capaz de evocá-la e utilizá-la para programar respostas comportamentais adequadas num contexto operacional. No âmbito da neurociência básica, a MT é

definida como a memória que capacita o animal a se localizar no espaço através da evocação da informação acerca de um local onde este esteve anteriormente. É o que chamamos de memória operacional espacial (D'EPOSITO, 2007; FUNAHASHI, 2006; GOLDMAN-RAKIC, 1995).

O protocolo de avaliação de MT foi semelhante ao citado acima. Contudo, a cada sessão a plataforma foi, semi-aleatoriamente em ordem alfabética, como mostrado na figura 8, alocada em um novo ponto do labirinto e os animais tiveram cinco tentativas por sessão. Entre cada uma dessas cinco tentativas, ocorreu um intervalo de um minuto para se avaliar a MT propriamente dita. A avaliação do desempenho dos animais foi realizada pela latência (intervalo de tempo desde a liberação do animal até o momento em que o mesmo encontra a plataforma) e distância percorrida até achar a plataforma.

O critério de aprendizagem consistiu no encontro da plataforma num tempo inferior a 30 segundos em no mínimo cinco sessões. Findada essa fase os animais foram encaminhados para dissecação.

Todos os protocolos no labirinto aquático de Morris foram gravados e os parâmetros citados acima foram analisados pelo *software* ANY-maze™ 4.70 Stoelting Co. ®.

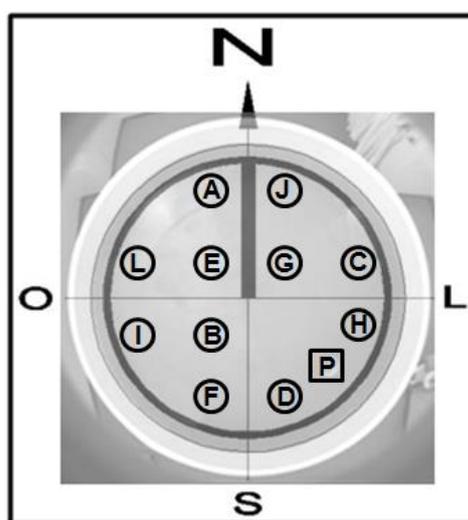


Fig 11: Representação das posições da plataforma ao longo das sessões de MT. O retângulo com a letra "P" representa a posição da plataforma usada nas sessões de memória de referência, a qual não foi utilizada nas sessões de MT. A exclusão dessa posição objetivou eliminar os componentes da tarefa de memória de referência.

4.9. Dosagem de dopamina, DOPAC e HVA no estriado

Os animais foram eutanasiados por decapitação um dia após todos os testes comportamentais, o cérebro removido e o estriado dissecado.

Os tecidos foram rapidamente pesados e mantidos a -80°C até serem processados. Os estriados foram homogeneizados em solução gelada de ácido perclórico 0,1 M; 0,1 mM EDTA e centrifugados a 10.000 xg por 10 min a 4°C . Os sobrenadantes foram filtrados com filtro de poro 0,22 μm . Aproximadamente 20 microlitros foram quantificados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) equipado com uma coluna de fase reversa (Eclipse XDB – C18 Agilent, 4,6 x 250 mm, 5 μm) e detector eletroquímico (VT-03, Decode II Antec®) para quantificar os níveis estriatais de DA, DOPAC e HVA.

Para quantificar a DA, foi utilizada fase móvel contendo 0,15 M de NaH_2PO_4 , 1 mM de EDTA dissódico diidratado, 2,28 mM de ácido octanossulfônico de sódio e 13% (v/v) de metanol em água grau HPLC, com pH 5,25, com um fluxo de 0,7 mL/min (ZAPATA et al, 2009). Para quantificar DOPAC e HVA, a fase móvel consistiu de 0,02 M de acetato de sódio, 0,0125 M ácido cítrico, 16% v/v de metanol, 0,033% p/v de ácido octanossulfônico e 0,1 mM EDTA, com pH 3,92. Todas as soluções utilizadas no HPLC foram filtradas com membrana de 0,22 μm de porosidade. As injeções das amostras foram feitas em triplicata, e as concentrações do neurotransmissor e seus metabólitos foram expressos em % do controle (APS).

4.10. Expressão gênica no mesencéfalo e córtex pré-frontal

O mesencéfalo e córtex foram dissecados e armazenados como citado acima. Os genes das proteínas da TH, DAT, D1R e D2R do sistema dopaminérgico e da ChAT, AChE, $\alpha 7\text{NR}$ do sistema colinérgico foram avaliados.

Os tecidos foram triturados em nitrogênio líquido e o ácido ribonucléico (RNA) total extraído utilizando “TRI Reagent RNA Isolation Reagent” (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, os tecidos foram solubilizados em trizol (1mL/100 mg de tecido) com o uso de um homogeneizador elétrico por 30 segundos e o homogenato centrifugado a 12.000 xg por 15 min a 4°C . Ao sobrenadante, foi adicionado clorofórmio (200 μL /100 mg tecido), misturado por inversão por 15 segundos e incubado à temperatura ambiente por cinco minutos. A mistura foi então centrifugada a 12.000xg por 20 min a 4°C e à fase aquosa foi adicionado isopropanol (500 μL /100 mg tecido) para a precipitação do RNA. Então esta seguiu para centrifugação 12.000 xg por 15 min e o precipitado foi lavado com etanol 75% (1 mL/100 mg tecido) e centrifugado a 7500 xg por cinco

minutos. O RNA foi ressuspensionado em 40 µL de água deionizada, previamente tratada com dietilpirocarbonato.

A concentração e a qualidade do RNA extraído foram verificadas utilizando o equipamento NanoDrop™ (ThermoScientific, Wilmington, USA) e por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida, respectivamente.

A síntese do ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA) foi realizada com o kit iScript cDNA Synthesis Kit (Biorad, CA, USA) usando o equipamento S1000 Thermal Cycler (Biorad, CA, USA). As condições da reação foram as seguintes: 25°C por 5 min, 42°C por 30 min, 85°C por 5 min.

As amostras de cDNA obtidas foram então submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real utilizando o equipamento CFX96 Real Time PCR (Biorad, CA, USA) e o kit iQ SYBR Green Supermix (Biorad, CA, USA). Resumidamente, as reações foram preparadas em um volume total de 10 µL contendo 5 µL de SYBR Green Supermix 2x, 3,5 µL de água purificada, 0,5 µL de cada iniciador a 10µM e 0,5 µL de cDNA. 45 ciclos foram realizados após a desnaturação inicial (95°C, dois minutos) de acordo com os seguintes parâmetros: 95°C (desnaturação) por 15s; 60°C (anelamento) por 30 s e 72°C (amplificação) por 30 s. A tabela 1 mostra as sequências iniciadoras utilizadas para avaliar o nível de expressão gênica dos sistemas dopaminérgico e colinérgico neste estudo.

Para garantir a qualidade da reação, as amostras foram preparadas em triplicata, e para cada experimento incluiu-se uma reação sem molde como controle negativo. Além disso, a ausência de contaminantes de DNA foi avaliada utilizando-se amostras RT-negativas e pela análise da curva de *melting* dos produtos amplificados, em que resfriou-se as amostras a 60°C e, em seguida, aumentando-se a temperatura para 95°C a 0,1°C/s. A especificidade das reações de PCR também foi confirmada pela verificação dos amplicons em gel de acrilamida, além da curva de *melting*. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utilizando o gene da β -actina para normalização dos dados.

Tabela 1: Iniciadores utilizados nas reações de qPCR

Gene	Sequência 5'-3'
TH	F: AAG ATC AAA CCT ACC AGC CG R: TAC GGG TCA AAC TTC ACA GAG
DAT	F: TGG CAC ATC TAT CCT CTT TGG R: GAC CAC GAC CAC ATA CAG AAG
D1R	F: CCA AGA ACG TGA GGG CTA AG R: TGA GGA TGC GAA AGG AGA AG
D2R	F: GAG CCA ACC TGA AGA CAC C R: TGA CAG CAT CTC CAT TTC CAG
ChAT	F: CAA ATA AGT CAT AAA GGC AGA GGC R: CTC AAG GAA GAC TGT GCT ATG G
AChE	F: GCG CCA CCG ATA CTC TGG ACG R: GGG TCC CCC AAG GGG TCA CA
M1R	F: GGT TTC CTT CGT TCT CTG G R: GAG GAA CTG GAT GTA GCA CTG
α7NR	F: AAA GAG CCA TAC CCA GAT GTC R: ATG AGC AGA TTG AGG CCA TAG
Actina	F: TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG A R: AAT GCC TGG GTA CAT GGT GGT A

4.11. Análises estatísticas

Para o teste de força de agarre, atividade locomotora, concentração de DA e seus metabólitos, metabolismo da DA, expressão gênica, índice de extinção, distância no PROBE, sessões para critério e soma das primeiras e últimas tentativas nas sessões de memória de referência empregou-se a análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Newman-Keuls para comparações múltiplas.

Para os testes de memória de referência, memória de trabalho, PROBE e 4^o e 5^o(pós PROBE) sessão de memória de referência foi empregada ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas e teste *t de Student* quando aplicável. Para todas as análises foi empregado um nível de significância para $p < 0.05$.

Foi utilizado o software GraphPad Prism versão 5.0 para as análises estatísticas e confecção dos gráficos

5. Resultados

5.1. Parâmetros motores

5.1.1. Teste de força de agarre (*Grip test*)

A ANOVA de uma via, como mostrado na figura 12, revelou diferenças significativas entre os grupos APS, AES, APM e AEM [$F(3,23) = 11,61$; $p < 0,0001$]. O teste de Newman-Keuls mostrou que a exposição a um AE por si só gerou aumento na força de agarre significativo do grupo AES em relação ao grupo APS (** $p < 0,01$), e, além disso, o tratamento com MPTP acarretou déficit de força significativo no grupo APM em relação ao grupo APS (* $p < 0,05$). Como evidencia a diferença significativa entre os grupos APM e AEM (* $p < 0,05$) e a ausência de diferença entre os grupos APS e AEM, sugere-se que o déficit de força gerado pelo MPTP tenha sido prevenido pela exposição a um AE. Também observamos diferenças significativas entre os grupos AES e APM (** $p < 0,01$) e AES e AEM (* $p < 0,05$).

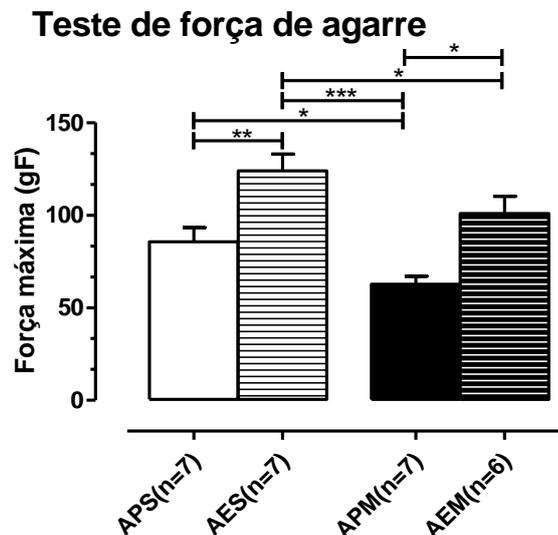


Fig 12: *Grip test*. Média \pm erro padrão. Ambiente padrão salina (APS) (n=7), ambiente enriquecido salina (AES) (n=7), ambiente padrão MPTP (APM) (n=7) e ambiente enriquecido MPTP (AEM) (n=6). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,0001$. [$F(3,23) = 11,61$; $p < 0,0001$].

5.1.2. Atividade locomotora no campo aberto

A ANOVA de uma via, como mostrado na figura 13 revelou diferenças significativas entre os grupos APS, AES, APM e AEM [$F(3,23) = 7,375$; $p = 0,0012$]. O teste de Newman-Keuls mostrou que a exposição a um AE por si só não teve qualquer influência na atividade locomotora entre os animais dos grupos APS e

AES. Intrigantemente, o tratamento com MPTP promoveu hiperlocomoção significativa no grupo APM em relação ao grupo APS (** $p < 0,01$) e AES (** $p < 0,01$). Como evidencia a diferença significativa entre os grupos APM e AEM (** $p < 0,01$) e a ausência de diferença entre os grupos APS e AEM, sugere-se que a hiperlocomoção induzida pelo MPTP tenha sido prevenida pela exposição a um AE.

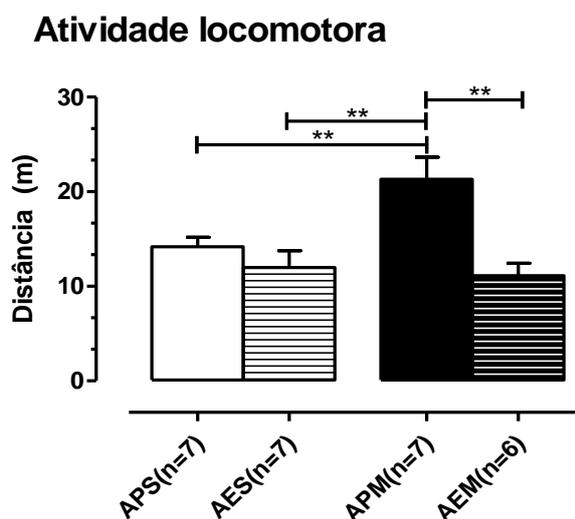


Fig 13: Atividade locomotora no campo aberto. Média \pm erro padrão. Ambiente padrão salina (APS) (n=7), ambiente enriquecido salina (AES) (n=7), ambiente padrão MPTP (APM) (n=7) e ambiente enriquecido MPTP (AEM) (n=6). ** $p < 0,01$. [F(3,23) = 7,375; $p = 0,0012$].

5.1.3. Dosagem de dopamina, DOPAC e HVA no estriado

A ANOVA de uma via, como mostrado na figura 14, revelou diferenças significativas entre os grupos APS, AES, APM e AEM para os níveis estriatais de DA [F(3,22) = 27,85; $p < 0,0001$], DOPAC [F(3,22) = 11,04; $p < 0,0001$] e HVA [F(3,22) = 4,681; $p = 0,0112$]. O teste de Newman-Keuls mostrou que a exposição a um AE por si só não teve qualquer influência sobre os níveis de DA, DOPAC e HVA entre os animais dos grupos APS e AES. Como esperado, o tratamento com MPTP promoveu depleção significativa dos níveis de DA, DOPAC e HVA nos animais do grupo APM em relação ao grupo APS (** $p < 0,001$), (** $p < 0,001$) e (* $p < 0,05$), respectivamente, e também em relação ao grupo AES (** $p < 0,001$), (** $p < 0,001$) e (** $p < 0,01$). Como evidencia a figura 14 e a diferença significativa entre os grupos APS e AEM (** $p < 0,001$), a exposição a um AE não preveniu a depleção de DA induzida pelo MPTP. O fato de ter sido revelado diferenças significativas para o DOPAC entre os animais dos grupos AEM em relação ao grupo APS (* $p < 0,05$) e entre os animais dos grupos APM e AEM (* $p < 0,05$) sugere que a exposição a um AE seja capaz de retardar a depleção deste metabólito induzida pela toxina.

Interessantemente para os níveis de HVA, como demonstra a diferença entre os animais dos grupos APM e AEM (* $p < 0.05$) e a ausência de diferença entre os animais do grupo APS e AEM, sugere-se que a exposição a um AE seja capaz prevenir a depleção deste metabólito induzida pelo MPTP.

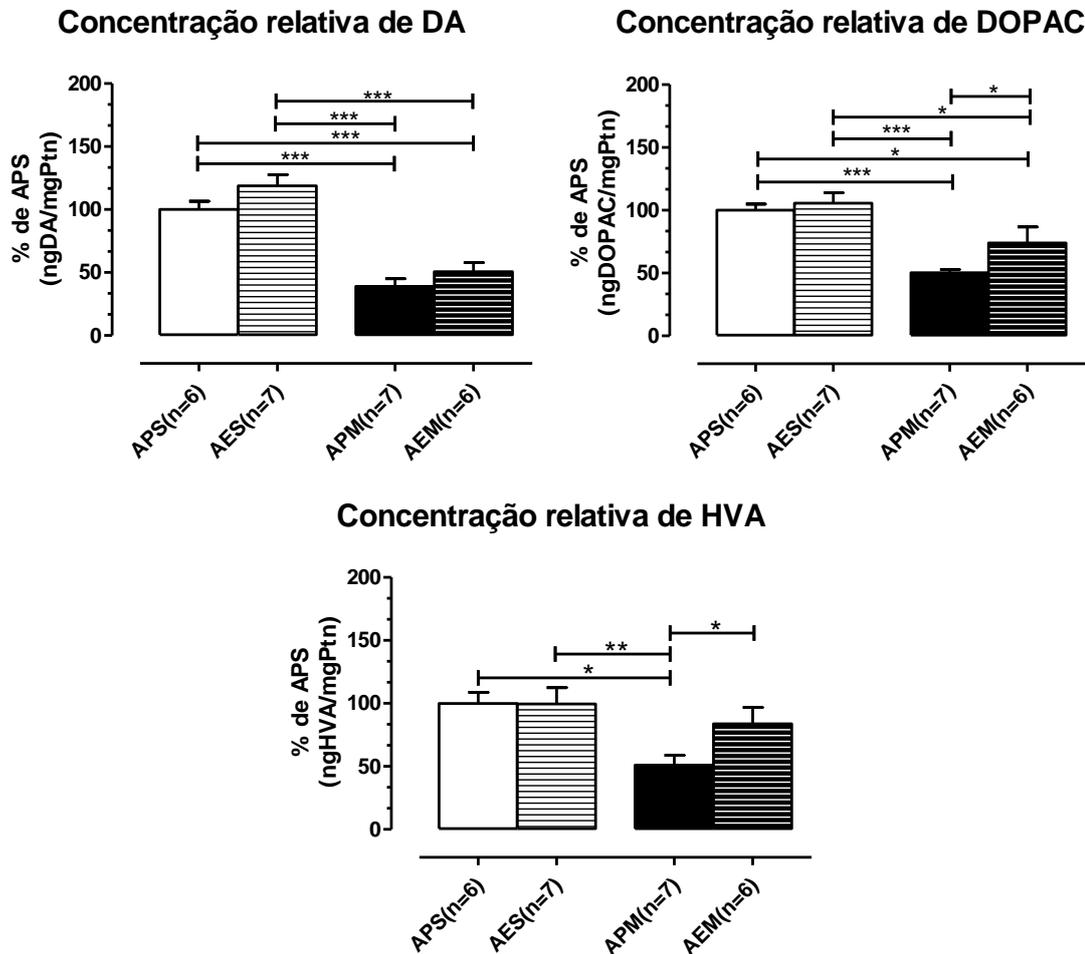


Fig 14: Dosagens de dopamina, DOPAC e HVA no estriado. Média \pm erro padrão. Ambiente padrão salina (APS) (n=7), ambiente enriquecido salina (AES) (n=7), ambiente padrão MPTP (APM) (n=7) e ambiente enriquecido MPTP (AEM) (n=6). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ DA: [F(3,22) = 27,85; $p < 0,0001$], DOPAC: [F(3,22) = 11,04; $p < 0,0001$] e HVA: [F(3,22) = 4,681; $p = 0,0112$].

Adicionalmente, como mostra a figura 15, a ANOVA de uma via revelou diferenças significativas entre os grupos APS, AES, APM e AEM para o metabolismo relativo ou *turnover* de DA, DOPAC/DA [F(3,22) = 3,242; $p = 0,0415$] e DOPAC + HVA/DA [F(3,22) = 3,183; $p = 0,0439$] e tendência para HVA/DA [F(3,22) = 2,712; $p = 0,0696$], contudo, o teste de Newman-Keuls não foi capaz de pontuar entre quais grupos estão tais diferenças.

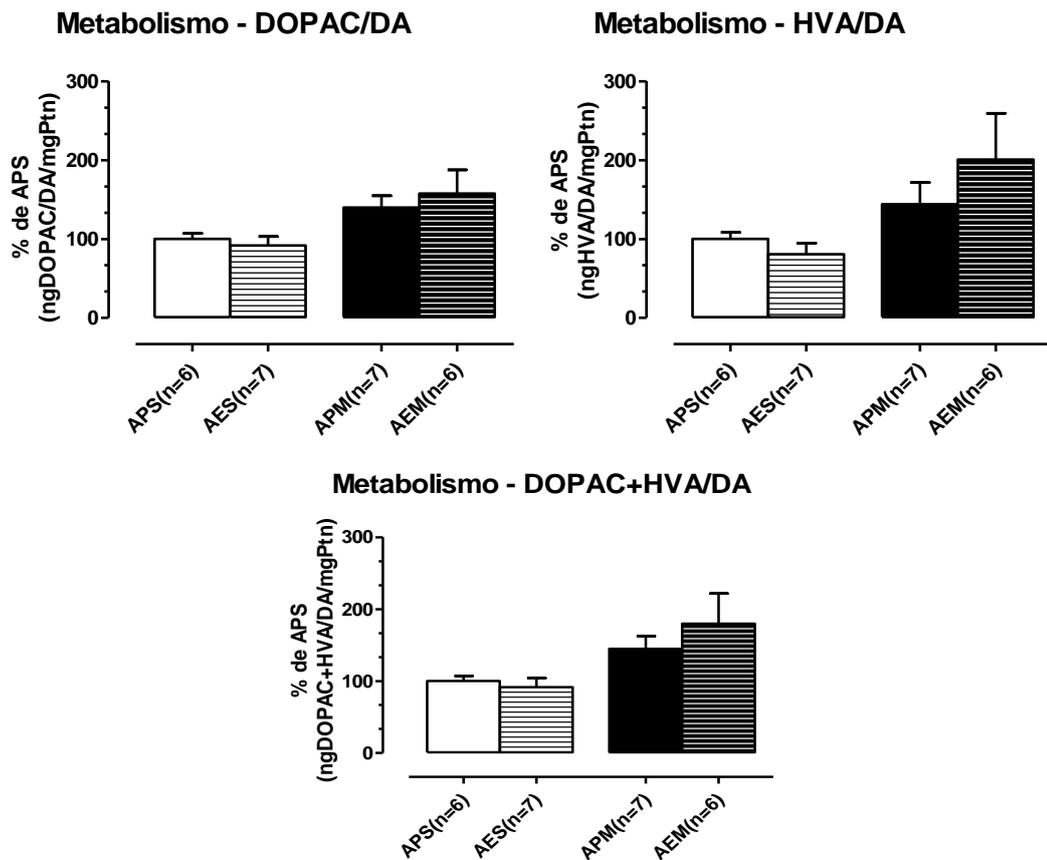
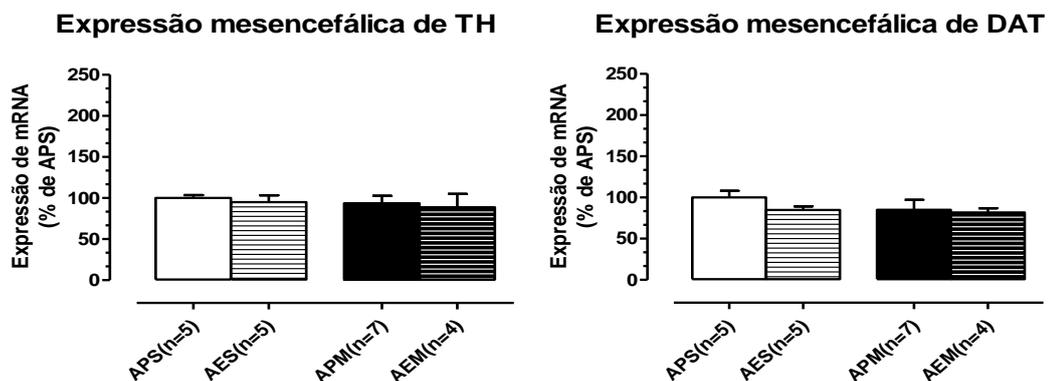


Fig 15: Metabolismo relativo (*turnover*) de DA, DOPAC/DA, HVA/DA e DOPAC + HVA/DA no estriado. Média \pm erro padrão. Ambiente padrão salina (APS) (n=7), ambiente enriquecido salina (AES) (n=7), ambiente padrão MPTP (APM) (n=7) e ambiente enriquecido MPTP (AEM) (n=6). DOPAC/DA: [F(3,22) = 3,242; p=0,0415] HVA/DA: [F(3,22) = 2,712; p=0,0696] e DOPAC + HVA/DA [F(3,22) = 3,183; p=0,0439].

5.1.4. Expressão gênica do sistema dopaminérgico no mesencéfalo

A ANOVA de uma via, como mostrado na figura 16, não revelou diferenças significativas entre os grupos APS, AES, APM e AEM para a expressão gênica da TH, DAT e para os receptores D1R e D2R na região mesencefálica.



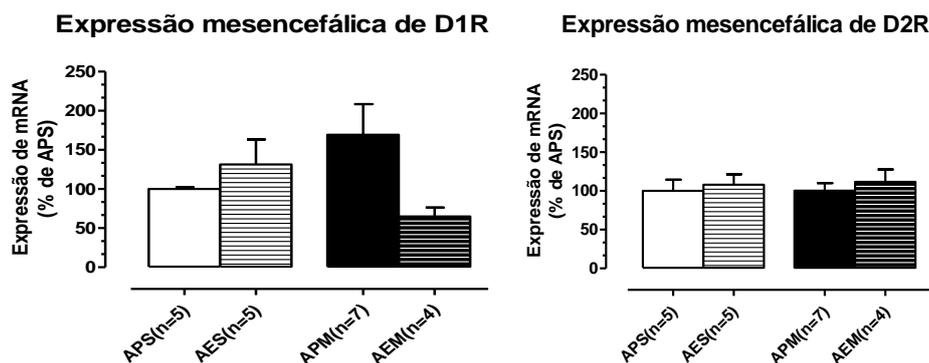


Fig 16: Expressão gênica da TH, DAT e dos receptores D1R e D2R na região mesencefálica. Média \pm erro padrão. Ambiente padrão salina (APS) (n=5), ambiente enriquecido salina (AES) (n=5), ambiente padrão MPTP (APM) (n=7) e ambiente enriquecido MPTP (AEM) (n=4). Nenhuma diferença foi revelada entre os grupos.

5.1.5. Expressão gênica do sistema colinérgico no mesencéfalo

A ANOVA de uma via, como mostrado na figura 17, revelou diferenças significativas entre os grupos APS, AES, APM e AEM para a expressão gênica da ChAT [$F(3,17) = 4,275$; $p=0,0202$], AChE [$F(3,17) = 3,600$; $p=0,0353$], relação de expressão gênica ChAT/AChE [$F(3,17) = 5,336$; $p<0,01$] e M1R [$F(3,17) = 5,991$; $p=0,0056$] na região mesencefálica. O teste de Newman-Keuls mostrou que a exposição a um AE por si só não teve qualquer influência sobre a expressão gênica colinérgica da região mesencefálica. O tratamento com MPTP, por sua vez, promoveu diminuição significativa da expressão gênica da ChAT no grupo APM em relação ao grupo APS ($*p<0,05$). Embora exista uma tendência de diminuição da expressão gênica da ChAT no grupo AEM em relação ao grupo APS, a ausência de diferença significativa entre estes grupos sugere que o AE atenuou a diminuição da expressão gênica da ChAT. O teste de Newman-Keuls ainda revelou aumento significativo da expressão gênica da AChE nos animais dos grupos APM e AEM em relação ao grupo APS ($*p<0,05$) e ($*p<0,05$), respectivamente. Considerando esses resultados e como demonstra a relação de expressão gênica ChAT/AChE, o MPTP induziu o aumento da expressão de AChE em relação a ChAT, que não foi prevenido pela exposição a um AE, como evidencia as diferenças entre os animais dos grupos APS e APM ($*p<0,05$) e APS e AEM ($**p<0,01$).

Adicionalmente, o teste de Newman-Keuls mostrou que o tratamento com MPTP promoveu aumento significativo da expressão gênica do M1R no grupo APM em relação ao grupo APS ($*p<0,05$) e em relação ao grupo AES ($*p<0,05$) na região

mesencefálica. Como mostra a diferença significativa entre os grupos APM e AEM (** $p < 0.01$) e a ausência de diferença significativa entre os grupos APS e AEM, sugere-se que o aumento da expressão do M1R induzido pelo MPTP tenha sido prevenido pela exposição a um AE. Interessantemente, nenhuma diferença significativa entre os grupos foi verificada para a expressão gênica de $\alpha 7NR$ nessa região.

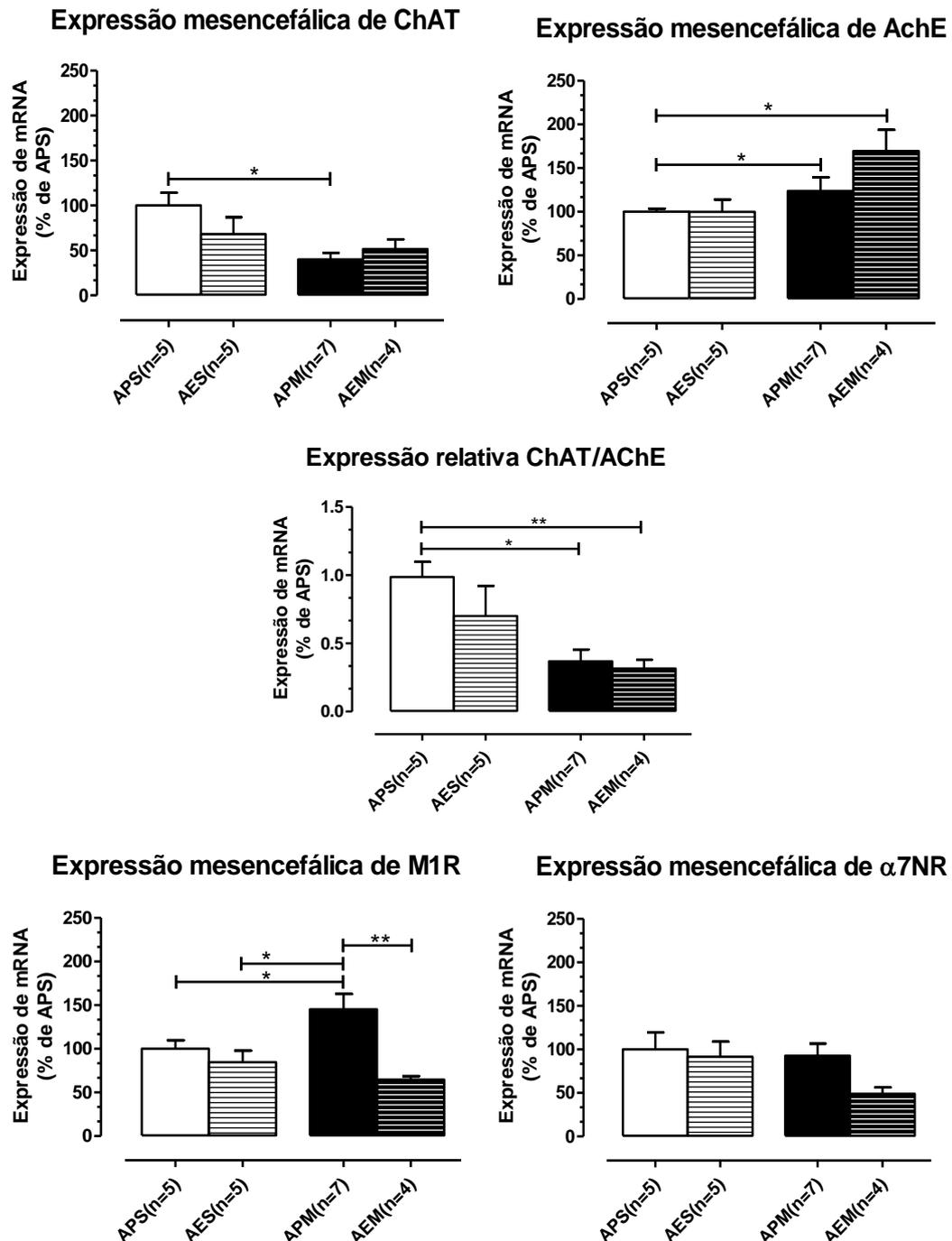


Fig 17: Expressão gênica da ChAT, AChE, relação de expressão gênica ChAT/AChE e dos M1R e $\alpha 7NR$ na região mesencefálica. Média \pm erro padrão. Ambiente padrão salina (APS)

(n=5), ambiente enriquecido salina (AES) (n=5), ambiente padrão MPTP (APM) (n=7) e ambiente enriquecido MPTP (AEM) (n=4). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. ChAT [F(3,17) = 4,275; $p = 0,0202$], AChE [F(3,17) = 3,600; $p = 0,0353$], ChAT/AChE [F(3,17) = 5,336; $p < 0,01$] e M1R [F(3,17) = 5,991; $p = 0,0056$].

5.2. Parâmetros cognitivos

5.2.1. Memória de referência

A ANOVA de duas vias, como mostrado na figura 18, revelou diminuição significativa tanto para latência [F(3,69) = 29,89; ### $p < 0,0001$] quanto para a distância percorrida [F(3,69) = 33,85; ### $p < 0,0001$] no decorrer das sessões nos grupos APS, AES, APM e AEM para o fator tempo. Para o fator tratamento, nenhuma diferença significativa foi observada entre os animais dos grupos APS, AES, APM e AEM tanto para latência quanto para distância percorrida.

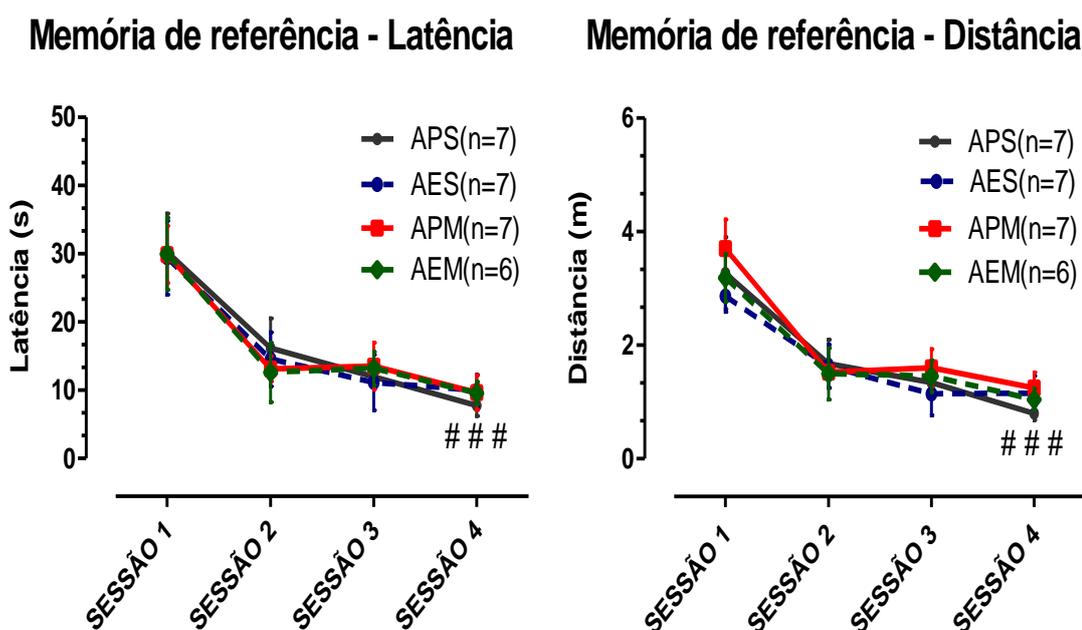


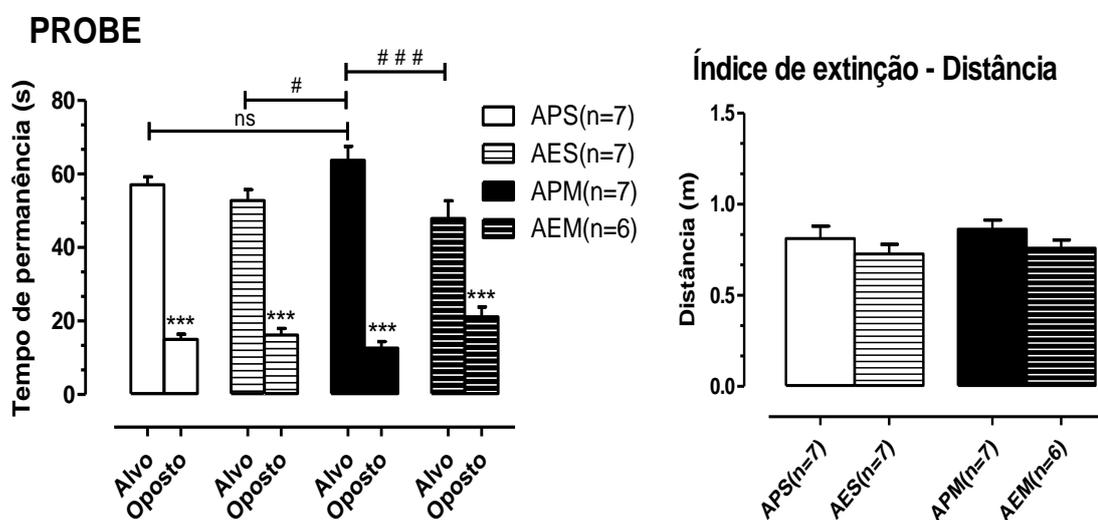
Fig 18: Latência e distância percorrida no labirinto aquático de Morris para memória de referência. Média \pm erro padrão. Ambiente padrão salina (APS) (n=7), ambiente enriquecido salina (AES) (n=7), ambiente padrão MPTP (APM) (n=7) e ambiente enriquecido MPTP (AEM) (n=6). Fator tempo para latência [F(3,69) = 29,89; ### $p < 0,0001$] e fator tempo para distância percorrida [F(3,69) = 33,85; ### $p < 0,0001$].

O teste *t de Student*, como mostrado na figura 19, revelou diferenças significativas entre o tempo de permanência no quadrante alvo e oposto no PROBE para os grupos APS [t(6) = 16,68; *** $p < 0,001$], AES [t(6) = 10,62; *** $p < 0,001$], APM [t(6) = 12,37; *** $p < 0,001$] e AEM [t(5) = 4,84; *** $p < 0,001$] demonstrando que os

animais dos grupos citados aprenderam satisfatoriamente a tarefa no labirinto aquático de Morris.

A ANOVA de duas vias, como mostrado na mesma figura, revelou diferenças significativas apenas entre o tempo de permanência no quadrante alvo nos grupos APS, AES, APM e AEM [F(1,23) = 229,3; $p < 0,0001$]. O teste de Bonferroni mostrou existir diferença significativa no tempo de permanência no quadrante alvo entre os grupos AES e APM ($\#p < 0,05$), o que poderia sugerir, pelo menos em parte, um comportamento do tipo perseverante do grupo APM induzido pelo MPTP. Adicionalmente, foi detectada diferença significativa desse mesmo parâmetro entre os grupos APM e AEM ($###p < 0,001$) sugerindo que a exposição a um AE é seria capaz de prevenir esse tipo de comportamento.

Como demonstrado por Pires et al. (2005), o índice de extinção ($d^{2^{min}}/d^{1^{min}}$), que consiste na razão entre as distâncias percorridas no segundo ($d^{2^{min}}$) e primeiro ($d^{1^{min}}$) minuto no PROBE, se mostrou válido para detectar o comportamento do tipo perseverante em um modelo animal de síndrome de Wernicke-Korsakof. Para confirmar nossa hipótese esse parâmetro foi mensurado, contudo, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos APS, AES, APM e AEM. Igualmente, a distância percorrida total no PROBE não diferiu entre os animais dos grupos citados. É importante ressaltar que nenhuma diferença significativa entre a latência e a distância (dado não representado) da 4^o e 5^o (pós PROBE) sessão de memória de referência foi encontrada, mostrando que os animais não extinguiram a tarefa e que a linha de base foi mantida, sendo estes conduzidos aos testes de memória de trabalho.



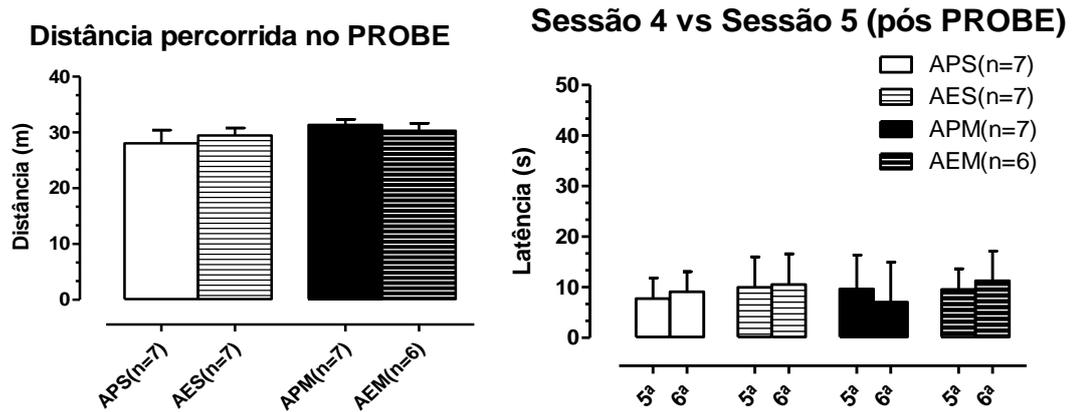
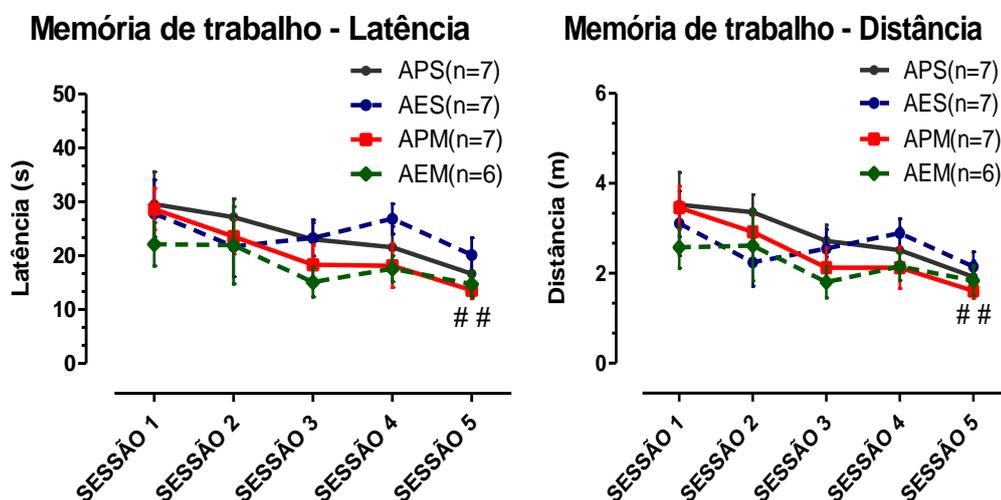


Fig 19: PROBE, índice de extinção, distância percorrida no PROBE e latência entre a 4^o e 5^o (pós PROBE) sessão de memória de referência no aquático de Morris. Média \pm erro padrão. Ambiente padrão salina (APS) (n=7), ambiente enriquecido salina (AES) (n=7), ambiente padrão MPTP (APM) (n=7) e ambiente enriquecido MPTP (AEM) (n=6). Tempo de permanência no quadrante alvo e oposto para os grupos APS [t(6) = 16,68; ***p<0,001], AES [t(6) = 10,62; ***p<0,001], APM [t(6) = 12,37; ***p<0,001] e AEM [t(5) = 4,84; ***p<0,001]. Tempo de permanência no quadrante alvo entre os grupos AES e APM (#p<0,05) e APM e AEM (###p<0,001). [F(1,23) = 229,3; p<0,0001].

5.2.2. Memória de trabalho

A ANOVA de duas vias, como mostrado na figura 20, revelou diminuição significativa tanto para latência [F(4,92) = 3,771; ###p<0,01] quanto para a distância percorrida [F(4,92) = 4,410; ###p<0,01] no decorrer das sessões nos grupos APS, AES, APM e AEM para o fator tempo. Para o fator tratamento, nenhuma diferença significativa foi observada entre os animais dos grupos APS, AES, APM e AEM tanto para latência quanto para distância percorrida. Além disso, nenhuma diferença foi observada entre os grupos APS, AES, APM e AEM no número de sessões para critério.



Sessões para critério

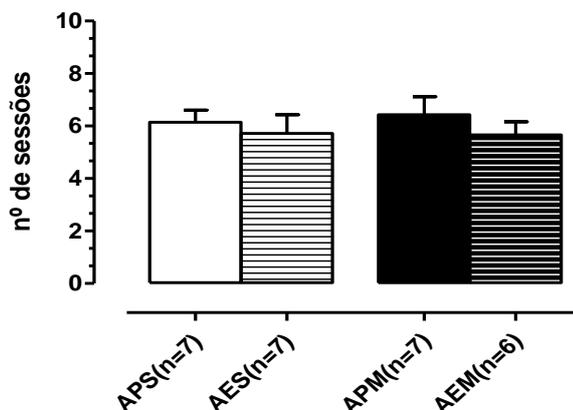
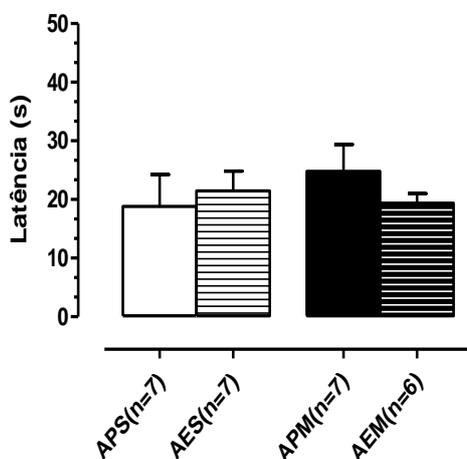


Fig 20: Latência, distância percorrida no labirinto aquático de Morris para memória de trabalho e número de sessões para critério na mesma tarefa. Média \pm erro padrão. Ambiente padrão salina (APS) (n=7), ambiente enriquecido salina (AES) (n=7), ambiente padrão MPTP (APM) (n=7) e ambiente enriquecido MPTP (AEM) (n=6). Fator tempo para latência [$F(4,92) = 3,771$; $##p < 0,01$] e fator tempo para distância percorrida [$F(4,92) = 4,410$; $##p < 0,01$].

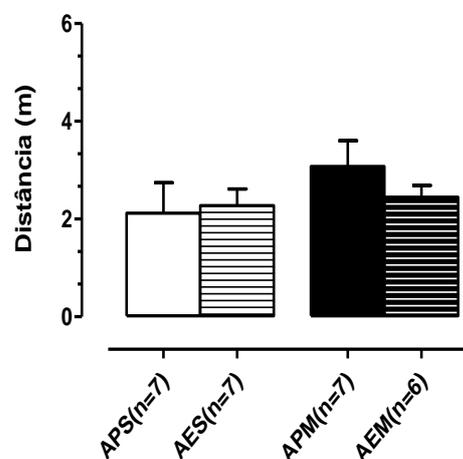
Segundo Robinson et al. (2010), o aumento da latência e da distância percorrida de todas as primeiras tentativas nas sessões de memória de referência refletem um comprometimento mais discreto deste tipo de memória. Já o aumento da latência e da distância percorrida de todas as últimas tentativas, nessas mesmas sessões, refletem um comprometimento mais discreto da MT.

Nesse contexto, os parâmetros citados acima foram avaliados, mas nenhuma diferença significativa para a latência e/ou distância percorrida foram observadas entre os grupos APS, AES, APM e AEM como mostra a figura 21.

Primeira tentativa - Latência



Primeira tentativa - Distância



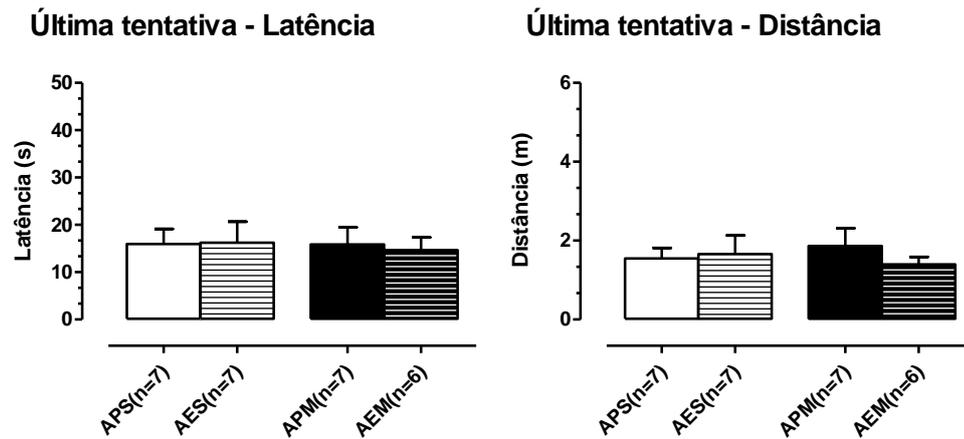


Fig 21: Soma das latências e distâncias percorridas das primeiras e últimas tentativas nas sessões de memória de referência. Média \pm erro padrão. Ambiente padrão salina (APS) (n=7), ambiente enriquecido salina (AES) (n=7), ambiente padrão MPTP (APM) (n=7) e ambiente enriquecido MPTP (AEM) (n=6).

5.2.3. Expressão gênica do sistema dopaminérgico no córtex

A ANOVA de uma via, como mostrado na figura 22, não revelou diferenças significativas entre os grupos APS, AES, APM e AEM para a expressão gênica da TH e para de D1R e D2R no córtex.

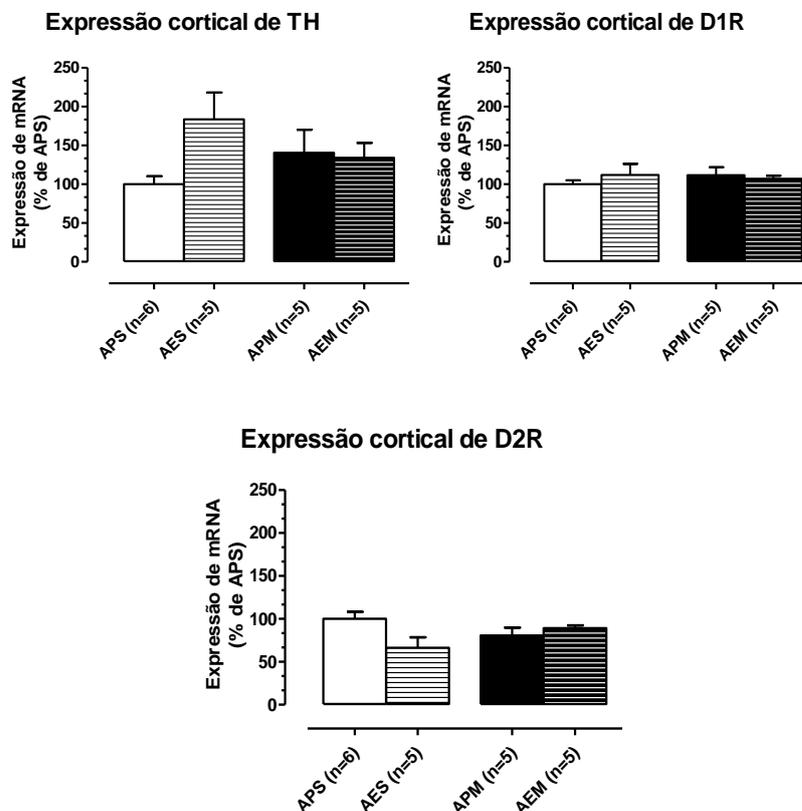


Fig 22: Expressão gênica da TH e dos receptores D1R e D2R no córtex. Média \pm erro padrão. Ambiente padrão salina (APS) (n=6), ambiente enriquecido salina (AES) (n=5),

ambiente padrão MPTP (APM) (n=5) e ambiente enriquecido MPTP (AEM) (n=5). Nenhuma diferença foi revelada entre os grupos.

Em nossas análises com PCR quantitativo em tempo real, não houve detecção da expressão gênica do DAT nesta região. As diferentes isoformas desse transportador e, conseqüentemente, as diferentes sequências iniciadoras do gene provavelmente comprometeram o adequado anelamento do nosso iniciador e a quantificação da expressão desse gene.

5.2.4. Expressão gênica do sistema colinérgico no córtex

A ANOVA de uma via, como mostrado na figura 23, não revelou diferenças significativas entre os grupos APS, AES, APM e AEM para a expressão de ChAt, AChE, M1R e α 7NR no córtex.

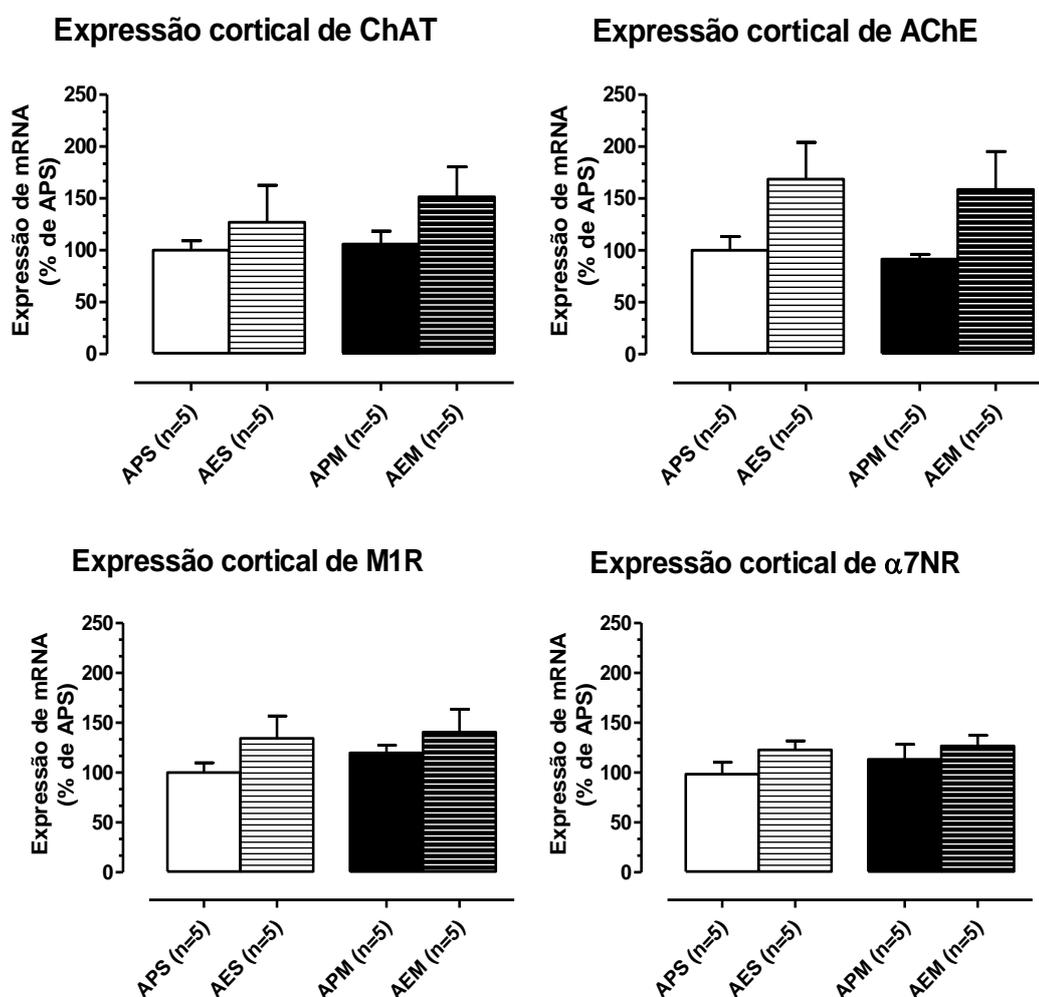


Fig 23: Expressão gênica da ChAT e AChE e dos M1R e α 7NR no córtex. Média \pm erro padrão. Ambiente padrão salina (APS) (n=5), ambiente enriquecido salina (AES) (n=5), ambiente padrão MPTP (APM) (n=5) e ambiente enriquecido MPTP (AEM) (n=5). Nenhuma diferença foi revelada entre os grupos.

6. Discussão

A DP é uma doença neurodegenerativa caracterizada pelo tremor de repouso, rigidez muscular, instabilidade postural, hipocinesia e déficits cognitivos como consequência da maciça perda dos neurônios dopaminérgicos da SNpc (MORIGUCHI; YABUKI; FUKUNAGA, 2012; MÜLLER; BOHNEN, 2013; PREDIGER et al, 2010; YABUKI et al, 2014; XIANG et al, 2012). Os mecanismos que dirigem o desenvolvimento da DP, como já mencionado, parecem ser multifatoriais e ainda pouco esclarecidos (REALE et al, 2009; SING; DIKSHI, 2007; CROCKER et al, 2003). Portanto, não é surpreendente que pacientes com DP manifestem uma ampla e variada gama de sintomas motores e não motores (NEELY et al, 2013; PFEIFFER et al, 2013).

Modelos de DP baseados na administração de MPTP via i.p, como o empregado neste trabalho, têm sido amplamente utilizados no meio científico. Isso ocorre devido à capacidade dessa toxina de mimetizar diversos fatores que contribuem para o desenvolvimento da DP, como os distúrbios mitocondriais, o estresse oxidativo e o sustentado processo de neuroinflamação observado na doença. (CROCKER et al, 2003; KHAN et al, 2015; YABUKI et al, 2014). Assim, esse modelo é considerado uma ferramenta vital para a avaliação de novas terapias e melhor compreensão da DP (ROUSSELET et al, 2003).

Em nosso estudo, foi avaliada se a exposição a um AE é capaz de prevenir as alterações motoras, cognitivas, bioquímicas e moleculares induzidas pelo MPTP.

No que se refere à análise dos parâmetros motores, os animais tratados com MPTP apresentaram déficit de força e, intrigantemente, aumento da atividade locomotora voluntária no campo aberto. Como esperado, o MPTP induziu uma depleção de aproximadamente 70% dos níveis de DA, DOPAC e HVA estriatais. Os animais tratados com MPTP não apresentaram nenhuma alteração na expressão gênica do sistema dopaminérgico no mesencéfalo, entretanto, foi observado diminuição da expressão gênica da ChaT e aumento da expressão da AChE e dos receptores M1R. A exposição a um AE preveniu o déficit de força e a hiperlocomoção induzidos pelo MPTP e dirigiu, por si só, um aumento da força de agarre. Interessantemente, essa exposição não preveniu a depleção da DA estriatal, entretanto, retardou e preveniu, respectivamente, a depleção de DOPAC e HVA nesta mesma região. Adicionalmente, a exposição a um AE foi capaz de atenuar a

diminuição da expressão da ChAT e prevenir o aumento da expressão dos M1R na região mesencefálica.

Em relação aos parâmetros cognitivos, os animais tratados com MPTP e expostos a um AE não apresentaram, respectivamente, déficits e facilitação cognitiva nas tarefas de memória de referência e de MT no labirinto aquático de Morris. Semelhantemente aos resultados comportamentais, nem o MPTP nem a exposição ao AE induziram quaisquer alterações na expressão gênica dos sistemas dopaminérgico e colinérgico do córtex.

6.1. Parâmetros motores

O teste de força de agarre (*grip test*) e o campo aberto mensuram, respectivamente, a força dos membros dianteiros e a locomoção voluntária de animais (HUTTER-SAUNDERS; GENDELMAN; MOSLE, 2012; NEELY et al, 2013; MORIGUCHI; YABUKI; FUKUNAGA, 2012). Em estudos básicos e clínicos de neuroimagem, esses testes têm se mostrado como valiosas ferramentas para a compreensão dos prejuízos motores, da conectividade e da atividade dos gânglios da base e de inúmeras outras regiões relacionadas com o movimento como, por exemplo, o tálamo, lóbulo da ínsula, cerebelo e córtices pré e sensório-motor na DP (CHIA et al, 1996; KHAN et al, 2015; NEELY et al, 2013; NEELY et al, 2014; PLANETTA et al, 2015; PRADHAN et al, 2014; SPRAKER et al, 2010).

Em nosso estudo, a exposição a um AE foi capaz de prevenir o déficit de força e a hiperlocomoção induzidos pelo MPTP e dirigir, por si só, o aumento da força de agarre. O MPTP, por sua vez, promoveu uma depleção de aproximadamente 70% dos níveis estriatais de DA, DOPAC e HVA.

Em relação ao *grip test*, nossos resultados concordam com uma ampla gama de trabalhos que atribuem o déficit de força e a incoordenação motora à depleção estriatal de DA e seus metabólitos (NEELY et al, 2013; HAGINO et al, 2015; KHAN et al, 2015; YABUKI et al, 2014). Além disso, a facilitação motora observada no grupo AES corrobora com o comprovado benefício da exposição a um AE e do exercício físico voluntário sobre diversos aspectos motores (JADAVJI; KOLB; METZ, 2006; PANG; HANNAN, 2013). Já em relação ao campo aberto, muitos estudos mostram resultados aparentemente discrepantes, que vão desde hipolocomoção à hiperlocomoção, permeando, muitas vezes, pela ausência de alterações na atividade locomotora (CHIA et al, 1996; CROCKER et al, 2003; HUTTER-SAUNDERS;

GENDELMAN; MOSLE, 2012; MORIGUCHI; YABUKI; FUKUNAGA, 2012; ROUSSELET et al, 2003). Variações nas doses de MPTP administradas, tempo e período de avaliação no campo aberto, podem estar relacionados a essa heterogeneidade de resultados (CHIA et al, 1996; MORIGUCHI; YABUKI; FUKUNAGA, 2012; ROUSSELET et al, 2003).

Interessantemente, a exposição a um AE não preveniu a depleção da DA, entretanto, retardou e preveniu, respectivamente, a depleção de DOPAC e HVA. Considerando nossos achados comportamentais motores, bioquímicos e o papel das células da glia no metabolismo da DA e do MPTP, nós hipotetizamos uma possível neuroproteção induzida pelo AE por mecanismos indiretos, ou seja, dependentes destas células.

A MAO é uma enzima que se localiza na membrana externa das mitocôndrias de neurônios e em outras células de vários tecidos periféricos (NAOI; MARUYAMA; INABA-HASEGAWA, 2012). Primariamente, ela catalisa a desaminação oxidativa de inúmeros neurotransmissores, como a DA, serotonina (5-HT), NA e de monoaminas bioativas exógenas como a tiramina (NAOI; MARUYAMA; INABA-HASEGAWA, 2012; ROBAKIS; FAHN, 2015). De acordo com a sensibilidade e especificidade da MAO frente a certos inibidores e substratos, esta pode ser classificada em duas isoformas, a MAO-A e a MAO-B (NAOI; MARUYAMA; INABA-HASEGAWA, 2012; YODIM; EDMONDSON; TIPTON, 2006). Tipicamente, a MAO-A é inibida por baixas concentrações de clorgilina e oxida preferencialmente a 5-HT e NA, já a MAO-B é inibida por baixas concentrações de l-deprenil (selegilina) e oxida preferencialmente a feniletilamina e a benzilamina (ROBAKIS; FAHN., 2015). Todavia, as duas isoformas são igualmente ativas para DA, triptamina e a tiramina (ROBAKIS; FAHN, 2015; YODIM; EDMONDSON; TIPTON, 2006).

Uma ampla gama de estudos têm revelado diferenças na distribuição das duas isoformas da MAO em encéfalos de humanos e de roedores (YODIM; EDMONDSON; TIPTON, 2006). A isoforma MAO-A é predominantemente encontrada em regiões com alta densidade de neurônios catecolaminérgicos como a substância negra, locus ceruleus, e hipotálamo. Já em relação à MAO-B, estudos imunohistoquímicos demonstram que neurônios serotoninérgicos do núcleo dorsal da rafe e principalmente astrócitos e células da glia possuem esta isoforma (NAOI; MARUYAMA; INABA-HASEGAWA, 2012; YODIM; EDMONDSON; TIPTON, 2006).

A neurodegeneração da SNpc observada na DP tem sido correlacionada com o envelhecimento e o aumento da expressão e da atividade da MAO-A e da MAO-B em pacientes com DP (ZHOU et al, 2001). Tem sido demonstrado que o aumento da atividade da MAO-A dirige a ativação das vias pró-apoptóticas relacionadas à proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), o aumento da formação de ROS e ao comprometimento estrutural e funcional da mitocôndria (NAOI; MARUYAMA; INABA-HASEGAWA, 2012). Já a maior atividade da MAO-B, com um mecanismo muito semelhante ao do MPTP, provoca o aumento da metabolização da DA pelas células da glia e pelos astrócitos desencadeando a formação de DA-quinona, a qual migra para neurônios dopaminérgicos e se liga às subunidades proteicas do complexo I da cadeia respiratória, interrompendo a transferência de elétrons para a ubiquinona (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; NAOI; MARUYAMA; INABA-HASEGAWA, 2012). Além disso, tem sido demonstrado em pacientes com DP que a concentração da MAO-B nas células da glia e astrócitos, mas não nos neurônios dopaminérgicos, é o dobro em relação ao grupo controle, o que leva à facilitação da neurodegeneração pela maior produção de ROS (NAOI; MARUYAMA; INABA-HASEGAWA, 2012) Estudos clínicos e básicos têm evidenciado a grande eficácia dos inibidores da MAO-A e da MAO-B relacionado à neuroproteção e ao tratamento da DP (NAOI; MARUYAMA; INABA-HASEGAWA, 2012). Dentre os efeitos relatados estão à diminuição da produção de radicais livres, aumento da expressão e atividade de enzimas antioxidantes e de fatores neurotróficos, potencialização da resposta à DA dos neurônios estriatais e diminuição do metabolismo deste neurotransmissor e do MPTP (NAOI; MARUYAMA; INABA-HASEGAWA, 2012; ROBAKIS; FAHN., 2015).

Nesse contexto, uma das possíveis hipóteses para a neuroproteção indireta induzida pelo AE estaria baseada na diminuição da atividade e/ou da expressão da MAO-A e da MAO-B. A menor atividade das enzimas induzida pelo AE poderia levar a uma diminuição compensatória do metabolismo da DA pelos neurônios dopaminérgicos remanescentes e pelas células da glia e astrócitos, afim de reestabelecer os níveis adequados de DA estriatais. Como consequência dessa menor metabolização, a DA permaneceria maior tempo nas sinapses estriatais, desencadeando um aumento temporal de sua concentração. Esse aumento temporal de DA poderia ser suficiente para manter a transmissão dopaminérgica ideal na modulação dos processos motores mediados pelas vias direta e indireta.

Adicionalmente, e modo mais específico para a MAO-B, sua menor atividade reduziria a metabolização do MPTP em MPP⁺. O MPP⁺ é o metabólito tóxico do MPTP que adentra, por meio do DAT, nos neurônios dopaminérgicos e desencadeia a morte destes pela inibição do complexo I da cadeia respiratória (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). A diminuição do metabolismo do MPTP levaria a uma menor oferta e captação de MPP⁺ pelos neurônios dopaminérgicos. Desse modo, a concentração de MPP⁺ nesses neurônios estaria diminuída e a morte celular induzida pelo MPTP seria atenuada por um menor bloqueio do complexo I da cadeia respiratória, menor produção de ROS e menor liberação de fatores neuroinflamatórios (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; KHAN et al, 2013; KHAN et al, 2015). Assim, a população neuronal remanescente também seria capaz contribuir para a manutenção dos níveis adequados de DA nos gânglios da base. Embora nenhuma alteração tenha sido relatada no metabolismo relativo (*turnover*) da DA, o retardo e a prevenção, respectivamente, da depleção de DOPAC e HVA poderia sugerir que o AE seja capaz de reestabelecer o tônus dopaminérgico por meio dos efeitos compensatórios citados e da diminuição da morte neuronal.

A incapacidade do AE de prevenir a depleção de DA poderia parecer contraditória, todavia, Crocker et al 2003 demonstraram, no mesmo modelo utilizado neste estudo, neuroproteção da SNpc e recuperação motora sem necessariamente haver prevenção da depleção de DA no estriado. Além de concordar com nossos resultados, esses achados sustentam, de certo modo, nossa hipótese ao sugerir que a integridade parcial da SNpc, *per se*, é capaz de modular a atividade dos gânglios da base e coordenar o correto movimento (CROCKER et al, 2003). Portanto esses mecanismos poderiam explicar, pelo menos em parte, a prevenção mediada pelo AE do déficit de força e do aumento da atividade locomotora voluntária induzida pelo MPTP.

Nos últimos anos, o estudo dos diversos fatores, tanto pró e anti-inflamatórios quanto pró e antioxidantes, expressos pelas células da glia e astrócitos têm chamado atenção como promissores alvos para intervenção terapêutica na DP (BÉRAUD et al, 2013; CHEN et al, 2009; GAN et al, 2012; KHAN et al, 2015). Estudos revelam que o aumento da expressão e dos níveis de certos fatores pró-inflamatórios, em modelos da doença induzidos pelo MPTP, estão diretamente relacionados à neurodegeneração dos neurônios dopaminérgicos da SNpc e, conseqüentemente, ao comprometimento motor em testes, como por exemplo, *grip*

test, rotarod e beam walking. (LIM; MILLER; ZAHEER, 1989; LIM; ZAHEER; LANE, 1990; ZAHEER et al, 2007; ZAHEER et al, 2011). Recentemente, tem sido demonstrado que a ausência completa ou parcial desses fatores, por silenciamento gênico ou *knockout*, é capaz de prevenir os déficits motores e atenuar significativamente a neurodegeneração da SNpc (KHAN et al, 2013; KHAN et al, 2014; KHAN et al, 2015). Além disso, o processo neurodegenerativo induzido pelo MPTP induz processos compensatórios de neuroproteção intrínseca (CALKINS et al, 2009; CHEN et al, 2009; PETRI; KÖRNER; KIAEI, 2012). Esses processos envolvem o combate ao estresse oxidativo e a neuroinflamação por meio do aumento da transcrição dos genes contendo elementos de resposta antioxidantes (ARE's) (CALKINS et al, 2009; PETRI; KÖRNER; KIAEI, 2012). A maior transcrição desses elementos leva o aumento de expressão de genes de detoxificação de fase dois, como por exemplo, o gene da heme-oxidase 1 (HO-1), NAD(P)H-quinona-oxirredutase-1 (NQO1) e o da glutatona S-transferase (GST) e suas subunidades, que neutralizam os produtos gerados pelos processos oxidativos e neuroinflamatórios (BARONE; SYKIOTIS; BOHMANN, 2011; CALKINS et al, 2009; CHEN et al, 2009; KOBAYASHI et al, 2004). No contexto da DP, tem sido demonstrado que em encéfalos *post-mortem* a principal via que desencadeia o aumento de expressão desses genes está preferencialmente aumentada nos astrócitos (CHEN et al., 2009; JOHNSON et al, 2002; SCHIPPER; LIBERMAN; STOPA, 1998). Estudos demonstram que o *knockin* para o fator nuclear 2 semelhante ao fator eritróide 2 (Nrf2), que é o principal ativador da transcrição dos ARE's, exclusivamente nos astrócitos é capaz de prevenir a SNpc da lesão induzidas pelo MPTP e a depleção estriatal de DA, DOPAC e HVA (CHEN et al, 2009). Esse padrão sustenta a ideia da neuroproteção indireta dependente das células da glia e dos astrócitos (CHEN et al, 2009; GAN et al, 2012).

Nesse contexto e, de modo mais especulativo, a modulação pelo AE por meio da depleção das vias que facilitam a neurodegeneração e pelo aumento dos mecanismos de neuroproteção intrínsecos poderiam também explicar, pelo menos em parte, a recuperação motora e a prevenção parcial e total dos níveis de DOPAC e HVA, respectivamente, relatada em nosso estudo.

Em nosso estudo o MPTP induziu a diminuição da expressão da ChAT e o aumento da expressão da AChE e dos M1R na região mesencefálica. A exposição a

um AE foi capaz de atenuar a diminuição da expressão da ChAT e prevenir o aumento da expressão dos M1R nessa mesma região.

Os efeitos primários da ACh na regulação dos gânglios da bases e, conseqüentemente, da função motora se dá pela liberação tônica deste neurotransmissor pelos ChIs. OS ChIs se ramificam em centenas de milhares de projeções que modulam fortemente a atividade das vias direta, indireta e de outras estruturas dos gânglios da base como o STN, a SNpc, SNpr e GPi (XIANG et al, 2012, STRAUB et al, 2014 LIM; KANG; McGEHEE, 2014). Estudos têm demonstrado que a neurodegeneração dos neurônios dopaminérgicos da SNpc desencadeia um aumento do tônus colinérgico no estriado e nos gânglios da base capaz de gerar um aumento da atividade da via indireta e diminuição da atividade da via direta (DEBOER et al, 1993; HRISTOVA; KOLLER, 2000; LIM; KANG; McGEHEE, 2014). Esse fato, juntamente com a eficácia comprovada dos agentes anticolinérgicos no tratamento da DP, sustenta a ideia de que a ACh age de maneira oposta à DA ao inibir a via direta e estimular a via indireta (CHEN; SWOPE, 2007; LIM; KANG; McGEHEE, 2014; XIANG et al, 2012). Por outro lado, tem sido relatado que o sistema colinérgico pode estar suprimido em decorrência da depleção dopaminérgica observada na DP tanto nos gânglios da base quanto em outras regiões menos subcorticais do cérebro (CHUNG et al, 2010; BOHNEN; ALBIN, 2011; MÜLLER; BOHNEN, 2013; HAGINO et al, 2015). Evidências sugerem que a elevação dos níveis de ACh, com o uso de anticolinesterásicos em pacientes com PD, aumentaria a transmissão dopaminérgica por meio dos receptores nicotínicos nos terminais dos neurônios dopaminérgicos recuperando a função motora destes pacientes (LIM; KANG; McGEHEE, 2014; CHUNG et al, 2010).

Primariamente, a diminuição da expressão de ChAT e o aumento da AChE e dos M1R nos leva a sugerir que a depleção do sistema colinérgico induzida pelo MPTP é o principal correlato subjacente às anormalidades motoras observados em nosso estudo. Concordando com nossos achados comportamentais e moleculares e sustentando a ideia apresentada acima, Hagino et al (2015) demonstraram que camundongos deficientes em dopamina (DDA) exibem hiperlocomoção no campo aberto atrelada a baixos níveis de ACh e de expressão gênica da ChAT nos gânglios da base (HAGINO et al, 2015). Interessante ressaltar ainda, que oxotreonina, um agonista muscarínico, e o donepezil, um anti-colinesterásico, foram capazes de reverter completamente a hiperlocomoção dos camundongos DDA (HAGINO et al,

2015). A atenuação da diminuição da expressão de ChAT pela exposição a um AE juntamente com a prevenção do aumento de expressão dos M1R pode sugerir que o AE seja capaz de reestabelecer os níveis adequados de ACh e, conseqüentemente, prevenir o comprometimento motor induzido pelo MPTP.

Por outro lado, nós não descartamos a possibilidade de que a depleção dopaminérgica e a neurodegeneração da SNpc induzidas pelo MPTP conduzam um aumento do tônus colinérgico no estriado e nos gânglios da base, como comumente é relatado pela literatura. A diminuição da expressão de ChAT e o aumento da AChE poderiam refletir uma tentativa compensatória de reestabelecimento do tônus colinérgico por meio da diminuição da síntese e aumento da degradação da ACh. Já o aumento de expressão dos M1R poderia ser reflexo de um processo de dessensibilização devido aos altos níveis de ACh. Assim, o comprometimento motor estaria relacionado com o aumento da atividade da via indireta (LIM; KANG; McGEHEE, 2014; XIANG et al, 2012). Concordando com essa ideia, Xiang et al (2012) demonstraram que o aumento do tônus colinérgico nos gânglios da base aumenta e diminui, respectivamente, os potenciais pós sinápticos excitatórios e inibitórios no STN e na SNpr. Além disso, o grupo mostrou que tais manifestações eletrofisiológicas, assim como a catalepsia e a acinesia induzidas por haloperidol e reserpina nos modelos de DP propostos, podem ser revertidas com o uso de antagonistas muscarínicos (XIANG et al, 2012). Portanto, a prevenção do aumento de expressão dos M1R observada no grupo AEM poderia significar uma prevenção do aumento do tônus colinérgico induzida pelo AE.

De fato, nossos resultados sugerem que as alterações do sistema colinérgico induzidas pelo MPTP, bem como a modulação deste sistema pela exposição a um AE são os principais componentes relacionados ao comprometimento e à prevenção dos aspectos motores avaliados neste estudo. Contudo, a investigação futura dos níveis de ACh é fundamental para averiguar se nossos achados estão associados à depleção ou ao aumento do tônus do sistema colinérgico na região mesencefálica. Adicionalmente, tal investigação contribuiria para melhor compreensão dos efeitos modulatórios induzidos pelo AE sobre esse sistema no contexto da DP.

Num estudo anterior, nosso laboratório demonstrou hiperlocomoção exacerbada induzida por metanfetamina num modelo de DP com a dose de 30 mg/Kg de MPTP via i.p. por cinco dias consecutivos (MORAES et al, dados ainda não publicados). Esse estudo sugeriu que o aumento relativo da inervação

serotoninérgica da via retículo-estriatal, na tentativa de compensar a deficiência de DA causado pela deservação da via nigroestriatal, estaria por trás desse comportamento (FOX; BROTHIE, 2000; CHIA et al, 1996; HAGINO et al, 2015; MORAES et al, dados ainda não publicados). De fato, uma ampla gama de estudos relatam hiperlocomoção induzida pelo MPTP e em camundongos deficientes em DA (DDA) (CHIA et al, 1996; CHIA et al, 1999; COLOTLA et al, 1990; HAGINO et al., 2015; LUCHTMAN et al, 2009; ROUSSELET et al, 2003). Esse comportamento tem sido associado a altas concentrações de 5-HT no estriado e pode ser revertido com a deservação e antagonistas serotoninérgicos (CHIA et al, 1996; CHIA et al, 1999; HAGINO et al., 2015).

Portanto, esse aumento compensatório do tônus serotoninérgico estriatal e sua possível normalização induzida pelo AE poderia ser outra hipótese plausível para explicar, respectivamente, a hiperlocomoção induzida pelo MPTP e a prevenção deste comportamento observada em nosso estudo. A necessidade de investigações futuras relacionadas ao tema é evidente e de fundamental importância para a confirmação dessa hipótese e melhor compreensão dos mecanismos que levam a hiperlocomoção induzida pelo MPTP.

Surpreendentemente, na região mesencefálica, nenhuma alteração na expressão gênica do sistema dopaminérgico foi observada. Estudos têm revelado, em vários modelos de DP que utilizam o MPTP, uma recuperação espontânea (*recovery*) dos neurônios dopaminérgicos da SNpc e do estriado (ANDERSON; BRADBURY; SCHNEIDER, 2008; ANSAH et al, 2011). Os prováveis mecanismos que dirigem o processo de *recovery* incluem o aumento compensatório da expressão, da atividade e do nível de TH nos neurônios remanescentes dessas regiões (ANDERSON; BRADBURY; SCHNEIDER, 2008; SERRA et al, 2002). Tem sido demonstrado que camundongos jovens (dois a três meses) têm uma alta capacidade de *recovery*, ou seja, é um processo estritamente relacionado com a idade. (ANSAH et al, 2011; SERRA et al, 2002). Em nosso estudo, as administrações de MPTP foram iniciadas quando os camundongos apresentavam cerca de dois meses (62 dias), o que corrobora com o possível processo de *recovery*. Portanto, esse processo seria uma hipótese explicativa para a ausência de alterações na expressão gênica do sistema dopaminérgico no mesencéfalo.

6.2. Parâmetros cognitivos

Classicamente, o AE tem sido definido como uma complexa combinação de estímulos inanimados e sociais (ROSENZWEIG et al, 1978). A manipulação das condições de moradia de ratos e camundongos, por meio da oferta de túneis, abrigos, gangorras, rodas de correr e o maior número de animais em gaiolas mais amplas, governa os estímulos definidos por Rosenzweig et al (1978) (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006; PANG; HANNAN, 2013; SALE; BERARDI; MAFFEI, 2010). Um componente essencial e típico do AE é a oportunidade dos animais de alcançarem altos níveis de atividade física voluntária, cognitiva e exploratória, além de experiências visuais, sociais, e somatossensoriais (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006; SALE; BERARDI; MAFFEI, 2010). Os profundos efeitos da exposição a um AE associados à facilitação cognitiva, tanto em animais saudáveis quanto em modelos animais de diversas desordens, têm sido extensivamente demonstrados e correlacionados às mudanças morfológicas, bioquímicas, moleculares e epigenéticas (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006; PANG; HANNAN, 2013; SALE; BERARDI; MAFFEI, 2010; SOLINAS et al, 2010).

No nível comportamental, utilizando vários paradigmas como o labirinto aquático de Morris, o labirinto radial de oito braços, o labirinto de Barnes e testes de reconhecimento, tem sido relatado melhor desempenho dos animais expostos a um AE em tarefas de aprendizado, memória de referência, MT e reconhecimento social e de objetos (COSTA et al, 2007, VALERO et al, 2011; PANG; HANNAN, 2013). Nas estruturas relacionadas com essas tarefas, observa-se aumento do peso relativo, do comprimento e arborização das espinhas dendríticas e do número e complexidade sináptica (VAN PRAAG et al, 2000, SALE; BERARDI; MAFFEI, 2010; SALE; BERARDI; MAFFEI, 2014). A modulação neuroquímica e gênica de muitos sistemas de neurotransmissores como, por exemplo, o dopaminérgico, o colinérgico, o serotoninérgico e o glutamatérgico acompanham as alterações comportamentais e morfológicas induzidas pelo AE (DEL ARCO et al, 2007a; DEL ARCO et al, 2007b; LERGER et al, 2014; NAKA et al, 2002; PANG et al, 2009; SEGOVIA et al, 2006). As neurotrofinas, representadas principalmente pelo BDNF, pelo fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) e pelo fator de crescimento do nervo (NGF), são outro grupo de moléculas particularmente sensíveis a um AE (SOLINAS et al, 2010). O aumento da expressão dessas moléculas tem se mostrado essencial nos processos

de proliferação neuronal, plasticidade sináptica e neuroproteção induzidos pelo AE (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006; NOVKOVIC; MITTMANN. MANAHAN-VAUGHAN, 2015; SALE; BERARDI; MAFFEI, 2014; SOLINAS et al, 2010). Adicionalmente, as alterações do perfil de metilação do DNA, a remodelagem da cromatina por acetilação e outros mecanismos epigenéticos facilitam a ativação e/ou o silenciamento de muitos genes relacionados a esses fatores neurotróficos (TURNER, 2009; KUZUMAKI et al, 2010).

Em nosso estudo foi utilizado o labirinto aquático de Morris para avaliar a memória de referência e a MT. Atrelado a essas análises comportamentais, o perfil de expressão gênica dos sistemas dopaminérgico e colinérgico cortical foi analisado. Intrigantemente, a facilitação e o déficit cognitivo induzido, respectivamente, pelo AE e pelo MPTP, bem como as alterações moleculares, não foram observados como geralmente é relatado pela literatura (BEZARD et al, 2003; DEGUIL et al, 2010; FAHERTY et al, 2005; LEGER et al, 2014; MORIGUCHI; YABUKI; FUKUNAGA, 2012; PANG; HANNAN, 2013; PREDIGER et al, 2010; YABUKI et al, 2014).

A utilização de múltiplos protocolos envolvendo a exposição a um AE tem levado a uma grande heterogeneidade de resultados aparentemente controversos (HATTORI et al, 2007; SILVA et al, 2011). Muitas variáveis parecem ter influência sobre os efeitos facilitatórios induzidos pelo AE como, por exemplo, o tempo de exposição a um AE, a idade do início desta exposição e gênero dos animais (ARENDASH et al, 2004; CRACCHIOLO et al, 2007; JANKOWSKY et al, 2005; LAZAROV et al, 2005; REDOLAT; MESA-GRESA, 2012).

No que se refere às doenças neurodegenerativas, essa grande heterogeneidade de resultados frente a aspectos cognitivos, bioquímicos e moleculares é notória e amplamente descrita na literatura (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006; PANG; HANNAN, 2013).

Evidências têm mostrado que os processos de facilitação cognitiva induzidos pelo AE dependem majoritariamente do tempo de exposição do animal a este ambiente (BENNETT et al, 2006; LEGER et al, 2014). Utilizando o labirinto aquático de Morris e o labirinto radial aquático para avaliar, respectivamente, a memória de referência e a MT, Bennett et al (2006) demonstraram que camundongos expostos por três horas diárias a um AE durante um mês não exibem melhor desempenho do que seu grupo controle (BENNETT et al, 2006). Indo de encontro a esse resultado, foi demonstrado nesse mesmo estudo, que camundongos submetidos à exposição

contínua tiveram melhor desempenho tanto na tarefa de memória de referência quanto na tarefa de MT (BENNETT et al, 2006). Interessantemente, a facilitação cognitiva observada foi correlacionada à diminuição da sinaptofisina no estriado, hipocampo e córtex (BENNETT et al, 2006). Recentemente, Leger et al (2014) analisaram detalhadamente como o tempo de exposição a um AE pode influenciar e alterar inúmeros aspectos relacionados à cognição e à ansiedade. Além disso, foram pesquisadas quais mudanças neuroquímicas e morfológicas estariam por trás das alterações comportamentais observadas no estudo (LEGER et al, 2014). Os camundongos foram submetidos à exposição a um AE por 24 horas, uma, três, cinco e seis semanas. Utilizando o teste de reconhecimento de objetos, o grupo demonstrou um efeito de facilitação cognitiva “máxima” nos camundongos expostos por uma e três semanas (LEGER et al, 2014). Embora essa facilitação tenha perdurado até a sexta semana, observou-se um declínio desse efeito “máximo” a partir da quinta semana (LEGER et al, 2014). No labirinto em cruz elevado e no teste de esquiva passiva, parâmetros utilizados para avaliar o comportamento do tipo ansioso, nenhum efeito ansiolítico foi observado com 24 horas e uma semana de exposição. Todavia, na exposição por três semanas foi relatado um efeito ansiolítico, o qual foi completamente perdido a partir da quinta semana (LEGER et al, 2014). Interessantemente, nenhuma alteração dos níveis de DA e seus metabólitos foi relatada na amígdala, hipocampo e no CPF, entretanto, nesta última região observou-se aumento dos níveis de 5-HT apenas nos camundongos expostos por três semanas a um AE (LEGER et al, 2014). Os resultados apresentados evidenciam o papel do tempo e sugerem uma relação de “dose dependência” com padrão em “U invertido” para os processos de facilitação cognitiva induzida pelo AE (BENNETT et al, 2006; LAZAROV et al, 2005; PANG; HANNAN, 2013; LEGER et al, 2014). Sustentando essa ideia, outro estudo neuroquímico que triou os níveis de DA, 5-HT e NA em inúmeras partes do encéfalo de roedores, revelou que após cinco semanas e meia de exposição (40º dia) os níveis destes neurotransmissores retornam ou tendem a retornar para os níveis basais (NAKA et al, 2002). Adicionalmente, um estudo anterior de nosso laboratório, em que os camundongos foram expostos por quatro semanas a um AE, sugeriu facilitação da aprendizagem na mesma tarefa de memória de referência, porém, nem a MT e nenhum parâmetro molecular foram avaliados. (AREAL et al, dados ainda não publicados). Além disso, muitos achados sugerem que essa relação de “dose dependência” se estenda para

os níveis bioquímicos e moleculares (LAZAROV et al, 2005; LEGER et al, 2014; NAKA et al, 2002).

Em nosso estudo os camundongos foram expostos a um AE por sete semanas (49 dias) antes do início dos testes de memória de referência e MT e, conseqüentemente, por oito semanas e meia (60 dias) antes das análises de expressão gênica. Portanto, a relação de “dose-dependência” relatada e o declínio dos efeitos facilitatórios induzidos pelo AE relacionado ao tempo poderiam explicar a ausência de efeito do nosso protocolo de enriquecimento ambiental sobre os parâmetros cognitivos avaliados no labirinto aquático de Morris e na expressão gênica dos sistemas dopaminérgico e colinérgico do córtex. Além disso, o processo de *recovery*, como já mencionado na sessão anterior, poderia explicar a ausência do déficit cognitivo e das alterações na expressão gênica dos sistemas dopaminérgico e colinérgico induzidos pelo MPTP no grupo APM.

O fato dos animais do grupo APM permanecerem mais tempo no quadrante alvo em relação aos animais do grupo AES e AEM nos levou a hipotetizar uma possível inflexibilidade cognitiva induzida pelo MPTP, a qual se refletiria num comportamento do tipo perseverante. Embora a confirmação da nossa hipótese tenha falhado pelo método empregado nós não descartamos essa possibilidade. Assim, investigações futuras utilizando métodos mais sensíveis e específicos para detecção desse tipo de comportamento são requeridas para confirmação de nossa hipótese e melhor compreensão dos resultados aqui apresentados.

No que se referem às manifestações motoras, bioquímicas e moleculares, os resultados aqui apresentados sustentam de fato o possível efeito neuroprotetor que a exposição a um AE tem em relação à DP. Já em relação aos parâmetros cognitivos, nossos achados levantam a questão da influencia do tempo de exposição, que precisa ser melhor compreendida por meio de estudos futuros, na indução dos processos de facilitação cognitiva e das modificações moleculares induzidas por este ambiente.

7. Conclusões

De acordo com os resultados apresentados neste estudo, pode-se concluir que:

- ◆ O MPTP gerou déficit de força e induziu hiperlocomoção os quais foram prevenidos pela exposição a um AE;
- ◆ A administração de MPTP, na dose de 25 mg/Kg via i.p. por cinco dias consecutivos, resultou na depleção de aproximadamente 70% dos níveis estriatais de DA, DOPAC e HVA. O AE não alterou a depleção dopaminérgica induzida pelo MPTP no estriado, entretanto, reduziu a depleção de DOPAC e HVA nesta região;
- ◆ A administração de MPTP assim como a exposição a um AE não induziram alterações na expressão gênica do sistema dopaminérgico na região mesencefálica;
- ◆ O MPTP induziu a diminuição da expressão gênica da ChAT e aumento da AChE e do M1R. O AE preveniu a diminuição da expressão da ChAT e o aumento do M1R;
- ◆ O MPTP e a exposição a um AE não induziram déficit e facilitação cognitiva respectivamente nas tarefas de memória de referência e MT no labirinto aquático de Morris;
- ◆ A administração de MPTP assim como a exposição a um AE não induziram alterações na expressão gênica do sistema dopaminérgico e colinérgico no córtex.

8. Perspectivas e metas futuras

Com o intuito de confirmar e consolidar as hipóteses apresentadas e galgando a publicação de nossos dados, nosso grupo almeja avaliar dentro do delineamento experimental proposto:

- ◆ A reatividade à enzima tirosina hidroxilase da SNpc por meio de imunohistoquímica para verificar o nível de lesão cerebral desses animais e a possível neuroproteção induzida pelo AE;
- ◆ A atividade da enzima AChE na região mesencefálica, estriado, hipocampo e córtex;
- ◆ Os níveis dos neurotransmissores DA e ACh na região mesencefálica, estriado, hipocampo e córtex;
- ◆ A análise do perfil de expressão gênica dos sistemas dopaminérgico e colinérgico do estriado e hipocampo;
- ◆ A atividade de HO-1, NQO1 e GST na região mesencefálica;
- ◆ A análise da expressão gênica de Nrf2, HO-1, NQO1 e GST na região mesencefálica.

9. Referências

- AJIMA, A.; YAMAGUCHI, T.; KATO, T. Modulation of acetylcholine release by D1, D2 dopamine receptors in rat striatum under freely moving conditions. **Brain Research**, v. 518, p. 193-98, 1990.
- ANDERSON, D. W.; BRADBURY, K. A.; SCHNEIDER, J. S. Broad neuroprotective profile of nicotinamide in different mouse models of MPTP-induced parkinsonism. **European Journal of Neuroscience**, v. 28, n. March, p. 610–17, 2008.
- ANSAH, T. A.; FERGUSON, M. C.; NAYYAR, T.; et al. Age-and duration dependent effects of MPTP on cortical serotonin systems. **Neuroscience Letters**, v. 504, n. 2, p. 160–64, 2011.
- ARENDASH, G.W.; GARCIA, M. F.; COSTA, D. A.; et al. Environmental enrichment improves cognition in aged Alzheimer's transgenic mice despite stable beta-amyloid deposition. **NeuroReport**, v. 15 n. 11, p.1751–54, 2004.
- BARBOSA, L. F.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: O que aprendemos com animais transgênicos e nocautes? **Química Nova**, v. 29, n.6, 2006.
- BARONE, M. C.; SYKIOTIS, G. P.; BOHMANN, D. Genetic activation of Nrf2 signaling is sufficient to ameliorate neurodegenerative phenotypes in a Drosophila model of Parkinson's disease. **Disease models & mechanisms**, v. 4, n. 5, p. 701–7, 2011.
- BARTELS, A. L.; LEENDERS, K. L. Parkinson's disease: the syndrome, the pathogenesis and pathophysiology. **Cortex; a journal devoted to the study of the nervous system and behavior**, v. 45, n. 8, p. 915–21, 2009.
- BATTISTI, C.; FORMICHI, P.; RADI, E.; et al. Oxidative-stress-induced apoptosis in PBLs of two patients with Parkinson disease secondary to alpha-synuclein mutation. **Journal of the neurological sciences**, v. 267, n. 1-2, p. 120–24, 2008.
- BEAULIEU, J. M.; GAINETDINOV, R. R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. **Pharmacology Review**, v. 63, p. 182-217, 2011.
- BENAROYA-MILSHTEIN, N.; HOLLANDER, N.; APTER, A; et al. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. **The European journal of neuroscience**, v. 20, n. 5, p. 1341–47, 2004.
- BENBIR, G.; OZEKMEKÇI, S.; APAYDIN, H.; et al. hospital-based study: risk factors in development of motor complications in 555 Parkinson's patients on levodopa therapy. **Clinical neurology and neurosurgery**, v. 108, n. 8, p. 726–32, 2006.
- BENNETT, J. C.; MCRAE, P. A.; LEVY, L. J.; et al. Long-term continuous, but not daily, environmental enrichment reduces spatial memory decline in aged male mice. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 85, p. 139–52, 2006.

BÉRAUD, D.; HATHAWAY, H. A.; TRECKI, J.; et al. Microglial activation and antioxidant responses induced by the Parkinson's disease protein α -synuclein. **Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology**, v. 8, n. 1, p. 94–117, 2013.

BERTORELLI, R.; CONSOLO, S. D1 and D2 dopaminergic regulation of acetylcholine release from striata of freely moving rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 54, p. 2145-48, 1990.

BEZARD, E.; DOVERO, S.; BELIN, D.; et al. Enriched Environment Confers Resistance to 1-Methyl-4- Involvement of Dopamine Transporter and Trophic Factors. **The journal of neuroscience**, v. 23, n. 35, p. 10999–11007, 2003.

BIRCH, A. M.; MCGARRY, N. B.; KELLY, Á. M. Short-term environmental enrichment, in the absence of exercise, improves memory, and increases NGF concentration, early neuronal survival, and synaptogenesis in the dentate gyrus in a time-dependent manner. **Hippocampus**, v. 23, p. 437–50, 2013.

BLANDINI, F.; NAPPI, G.; TASSORELLI, C.; et al. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 62, n. 1, p. 63–88, 2000.

BOGGIO, P. S.; FERRUCCI, R.; RIGONATTI, S. P.; et al. Effects of transcranial direct current stimulation on working memory in patients with Parkinson's disease. **Journal of the neurological sciences**, v. 249, n. 1, p. 31–38, 2006.

BOHNEN, N. I.; ALBIN, R. L. The cholinergic system and Parkinson disease. **Behavioural Brain Research**, v. 221, n. 2, p. 564–73, 2011.

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

CALABRESI, P.; GHIGLIERI, V.; MAZZOCCHETTI, P.; et al. Levodopa-induced plasticity : a double- edged sword in Parkinson's disease? **Philosophical transactions of the Royal Society of London: Series B, Biological sciences**, v. 370, p. 1–14, 2015.

CALKINS, M. J.; JOHNSON, D. A.; TOWNSEND, J. A.; et al. The Nrf2 / ARE Pathway as a Potential Therapeutic Target in Neurodegenerative Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 3, p. 497 – 508, 2009.

CHEN, J. J.; SWOPE, D. M. (2007) Pharmacotherapy for Parkinson's disease, **Pharmacotherapy** v.27, n. 12P2, p.161S–173S, 2007.

CHEN, P.; VARGAS, M. R.; PANI, A. K.; et al. Nrf2-mediated neuroprotection in the MPTP mouse model of Parkinson ' s disease : Critical role for the astrocyte. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 8, p. 1–6, 2009.

CHEN, S.; LE, W. Neuroprotective Therapy in Parkinson Disease. **American Journal of Therapeutics**, v.13, n. 5, pg. 445-57, 2006.

CHIA, L.G.; NI D.R.; CHENG F.C. et al. Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 5,7 dihydroxytryptamine on the locomotor activity and striatal amines in C57BL/6 mice. **Neuroscience Letters**, v. 218, n. 1, p. 67–71, 1996.

CHIA, L.G.; NI D.R.; CHENG F.C. et al. Intrastratial injection of 5,7dihydroxytryptamine decreased 5-HT levels in the striatum and suppressed locomotor activity in C57BL/6 mice. **Neurochemical research**, v. 24, n. 6, p. 719–22, 1999.

CHUNG, K. A.; LOBB, B. M.; NUTT, J. G. et al. Effects of a central cholinesterase inhibitor on reducing falls in Parkinson disease. **Neurology**, v. 15 n. 14, p.1263–69, 2010.

CICCHETTI, F.; DROUIN-OUELLET, J.; GROSS, R. E. Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, n. 9, p. 475-82, 2009.

COLOTLA, V.A; FLORES, E.; OSCOS.; et al. Effects of MPTP on Locomotor Activity in Mice. **Neurotoxicology and teratology**, v. 12, n. 4, p. 405–7, 1990

COSTA, D. A.; CRACCHIOLO, J. R.; BACHSTETTER, A. D.; et al. Enrichment improves cognition in AD mice by amyloid-related and unrelated mechanisms. **Neurobiology of Aging**, v. 28, p. 831–44, 2007.

CRACCHIOLO, J. R.; MORI, T.; NAZIAN, S. J. et al. Enhanced cognitive activity-over and above social or physical activity-is required to protect Alzheimer's mice against cognitive impairment, reduce beta amyloid deposition, and increase synaptic immunoreactivity. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 88, p. 277–94, 2007.

CRAMER, S. C.; SUR, M.; DOBKIN, B. H.; et al. Harnessing neuroplasticity for clinical applications. **Brain**, v. 134, p. 1591–1609, 2011.

CROCKER, S. J.; SMITH, P. D.; JACKSON-LEWIS, V.; et al. Inhibition of calpains prevents neuronal and behavioral deficits in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. **The Journal of neuroscience: The official journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 10, p. 4081–91, 2003.

D'ESPOSITO, M. From cognitive to neural models of working memory. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 362, n. 1481, p. 761–72, 2007.

DAMSMA, G.; THAM, C.S.; ROBERTSON, G.S.; et al. Dopamine D1 receptors stimulation increases striatal acetylcholine release in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 186, p. 335-38, 1990.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's Disease : Mechanisms and Models. **Neuron**, v. 39, p. 889–909, 2003.

DEBOER, P.; ABERCROMBIE, E. D.; HEERINGA, M.; et al. Differential effect of systemic administration of bromocriptine and L-dopa on the release of acetylcholine from striatum of intact and 6-OHDA-treated rats. **Brain Research**, v. 608, p. 198-203, 1993.

DEGUIL, J.; CHAVANT, F.; LAFAY-CHEBASSIER, C.; et al. Neuroprotective effect of PACAP on translational control alteration and cognitive decline in MPTP parkinsonian mice. **Neurotoxicity research**, v. 17, n. 2, p. 142–55, 2010.

DEL ARCO, A.; SEGOVIA, G.; CANALES, J. J.; et al. Environmental enrichment reduces the function of D1 dopamine receptors in the prefrontal cortex of the rat. **Journal of Neural Transmission**, v. 114, p. 43–48, 2007a.

DEL ARCO, A.; SEGOVIA, G.; GARRIDO, P.; et al. Stress, prefrontal cortex and environmental enrichment: studies on dopamine and acetylcholine release and working memory performance in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 176, n. 6, p. 267–73, 2007b.

DUCAN, R. P.; EARHART, G. M. Randomized controlled trial of community-based dancing to modify disease progression in Parkinson disease. **Neurorehabilitation and neural repair**, v. 26, n. 2, p. 132–43, 2012.

DUNNETT, S. B. Environmental enrichment affects striatal graft morphology and functional recovery. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, p. 159–68, 2004.

DUVOISIN, R. C. **Parkinson's disease**, 6. ed. New York, USA: Raven Press, 1991.

EHRINGER, H.; HORNYKIEWICZ, O. Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system. **Parkinsonism & related disorders**, v. 4, n. 2, p. 53–57, 1998.

ELBAZ, A.; TRANCHANT, C. Epidemiologic studies of environmental exposures in Parkinson's disease. **Journal of the neurological sciences**, v. 262, n. 1-2, p. 37–44, 2007.

FAHERTY, C. J.; SHEPHERD, R. K.; HERASIMTSCHUK, A.; et al. Environmental enrichment in adulthood eliminates neuronal death in experimental Parkinsonism. **Molecular brain research**, v. 134, n. 1, p. 170–79, 2005.

FOX, C.; MERALI, Z.; HARRISON, C. Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. **Behavioural brain research**, v. 175, n. 1, p. 1–8, 2006.

FOX, S.H.; BROTCHE, J.M. 5-HT_{2C} receptor binding is increased in the substantia nigra pars reticulata in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 15, p. 1064–1069, 2000.

FRANTSEVA, M. V.; FITZGERALD, P. B.; CHEN, R.; et al. Evidence for impaired long-term potentiation in schizophrenia and its relationship to motor skill learning. **Cerebral Cortex**, v. 18, n. May, p. 990–996, 2008.

FREDRIKSSON, A.; STIGSDOTTER, I. M.; HURTIG, A.; et al. Running wheel activity restores MPTP-induced functional deficits. **Journal of neural transmission**, v. 118, n. 3, p. 407–20, 2011.

FREGNI, F.; SANTOS, C. M.; MYCZKOWSKI, M. L.; et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation is as effective as fluoxetine in the treatment of depression in

patients with Parkinson's disease. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 75, n. 8, p. 1171–74, 2004.

FRISINA, P. G.; HAROUTUNIAN, V.; LIBOW, L. S. The neuropathological basis for depression in Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v.15, n, 2 p. 144-48, 2009

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia clinica fundamentos da terapêutica racional**, 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

FUNAHASHI, S. Prefrontal cortex and working memory processes. **Neuroscience**, v. 139, n. 1, p. 251–61, 2006.

GAN, L.; VARGAS, M. R.; JOHNSON, D. A.; et al. Astrocyte-specific overexpression of Nrf2 delays motor pathology and synuclein aggregation throughout the CNS in the alpha-synuclein mutant (A53T) mouse model. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 32, n. 49, p. 17775–87, 2012.

GAO, H. M.; LIU, B.; ZHANG, W.; et al. Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. **Trends in pharmacological sciences**, v. 24, n. 8, p. 395–401, 2003.

GERECKE, K. M.; JIAO, Y.; PANI, A.; PAGALA, V.; SMEYNE, R. J. Exercise protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. **Brain research**, v. 1341, p. 72–83, 2010.

GERFEN, C.R.; ENGBER, T.M.; MAHAN, L.C.; et al. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. **Science**, vol. 250, n. 4986, p. 1429-1232, 1990.

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

GOLAN, D.; TASHJIAN, A. H. **Princípios de farmacologia: A base fisiopatológica da farmacoterapia**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GOLDMAN-RAKIC, P. S. Cellular Basis of Working Memory Review. **Neuron**, v. 14, p. 477–485, 1995.

GOMES, M.; DEL BEL, E. A. Effects of electrolytic and 6-hydroxydopamine lesions of rat nigrostriatal pathway on nitric oxide synthase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase. **Brain Research Bulletin**, v. 62, n. 2, p. 107–115, 2003.

GOMEZA, J.; ZHANG, L.; KOSTENIS, E.; et al. Enhancement of D1 dopamine receptor-mediated locomotor stimulation in M4 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. **Neurobiology**, v. 96, p. 10483-88, 1999.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**, Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

GORELL, J. M.; JOHNSON, C. C.; RYBICKI, B. A.; et al. Occupational exposure to manganese, copper, lead, iron, mercury and zinc and the risk of Parkinson's disease. **Neurotoxicology**, v. 20, n. 2-3, pg. 239-47, 1999.

GORELL, J. M.; JOHNSON, C. C.; RYBICKI, B. A.; et al. The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. **Neurology**, v.50, n.5, pg. 1346-50, 1998.

GRAYBIEL, A. M. The basal ganglia: Learning new tricks and loving it. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 15, n. 6, p. 638–44, 2005.

GUIMARÃES, J.; ALEGRIA, P. O Parkinsonismo. **Medicina Interna**, v. 11, n. 2, pg. 109-14, 2004.

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

HAGINO, Y.; KASAI, S.; FUJITA, M. et al. Involvement of Cholinergic System in Hyperactivity in Dopamine-Deficient Mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 40, n. 5, p. 1141–1150, 2015. Nature Publishing Group.

HALD, A.; LOTHARIUS, J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: Is there a causal link? **Experimental Neurology**, v. 193, n. 2, 279-90, 2005.

HATTORI, S.; HASHIMOTO, R.; MIYAKAWA, T.; et al. Enriched environments influence depression-related behavior in adult mice and the survival of newborn cells in their hippocampi. **Behavioural Brain Research**, v.180, n. 1, p. 69–76, 2007.

HEBB, D. O. The effects of early experience on problem-solving at maturity. **American Psychologist**, v.2, pg.306-7, 1947.

HERNÁNDEZ-MONTIEL, H. L. Aspectos moleculares y prospectos de terapias en la enfermedad de Parkinson. **Bioquímica**, v. 31, n. 4, pg. 146-58, 2006.

HORNYKIEWICZ O. The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain. **Journal of Neural Transmission**, n. 70, pg. 9-15, 2006.

HRISTOVA, A. H.; KOLLER, W. C. Early Parkinson's disease: what is the best approach to treatment. **Drugs Aging**, v. 17, p. 165- 81, 2000.

HUTCHINSON, K. M.; MCLAUGHLIN, K. J.; WRIGHT, R. L.; et al. Neurobiology of Learning and Memory Environmental enrichment protects against the effects of chronic stress on cognitive and morphological measures of hippocampal integrity. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 97, n. 2, p. 250–60, 2012.

HUTTER-SAUNDERS, J. A L.; GENDELMAN, H. E.; MOSLEY, R. L. Murine motor and behavior functional evaluations for acute 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) intoxication. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 7, p. 279–88, 2012.

JADAVJI, N. M.; KOLB, B.; METZ, G.A. Enriched environment improves motor function in intact and unilateral dopamine-depleted rats. **Neuroscience**, v. 140, n. 4, 1127 – 1138, 2006.

JANKOWSKY, J. L.; MELNIKOVA, T.; FADALE, D. J.; et al. Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 25, n. 21, p. 5217–5224, 2005.

JOHNSON, D. A.; ANDREWS, G. K.; XU, W.; et al. Activation of the antioxidant response element in primary cortical neuronal cultures derived from transgenic reporter mice. **Journal of Neurochemistry**, v. 81, p. 1233–1241, 2002.

KHAN, M. M.; KEMPURAJ, D.; ZAHEER, S. et al. Glia Maturation Factor Deficiency Suppresses 1-Methyl-4-Phenylpyridinium-Induced Oxidative Stress in Astrocytes. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 53, p. 590–99, 2014.

KHAN, M. M.; KEMPURAJ, D.; ZAHEER, S. et al. Protection of MPTP-induced neuroinflammation and neurodegeneration by Pycnogenol. **Neurochemistry International**, v. 62, n. 4, p. 379–88, 2013.

KHAN, M. M.; ZAHEER, S.; THANGAVEL, R. et al. Absence of Glia Maturation Factor Protects Dopaminergic Neurons and Improves Motor Behavior in Mouse Model of Parkinsonism. **Neurochemical Research**, v. 40, p. 980–90, 2015.

KOBAYASHI, A.; KANG, M.; OKAWA, H.; et al. Oxidative Stress Sensor Keap1 Functions as an Adaptor for Cul3-Based E3 Ligase To Regulate Proteasomal Degradation of Nrf2. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 16, p. 7130–7139, 2004.

KORCZYN, AD. **Psychopharmacology: The fourth generation of progress**. New York USA: Raven Press, 1995.

KURKOWSKA-JASTRZE, I.; WRON, A. The Inflammatory Reaction Following. **Experimental neurology**, v. 156, p. 50–61, 1999.

KUZUMAKI, N.; IKEGAMI, D.; TAMURA, R.; et al. Hippocampal epigenetic modification at the brain-derived neurotrophic factor gene induced by an enriched environment. **Hippocampus**, v. 21, p. 127–32, 2011.

LAMPRECHT, R.; LEDOUX, J. Structural plasticity and memory. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 45-54, 2004.

LAZAROV, O.; ROBINSON, J.; TANG, Y. P.; et al. Environmental enrichment reduces A β levels and amyloid deposition in transgenic mice. **Cell**, v. 120, p. 701–13, 2005.

LEE, F. J. S.; LIU, F. Genetic factors involved in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Brain Research Reviews**, v. 58, n. 2, pg. 354-64, 2008.

LEES, A. J.; HARDY, J.; REVESZ, T. Parkinson's disease. **Lancet**, v. 373, n. 9680, p. 2055–2066, 2009

LEGER, M.; PAIZANIS, E.; DZAHINI, K.; et al. Environmental Enrichment Duration Differentially Affects Behavior and Neuroplasticity in Adult Mice. **Cerebral cortex**, v. 24, n. 7, p. 1–8, 2014.

LEV, N.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Apoptosis and Parkinson's disease. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 27, n. 2, p. 245–50, 2003.

LIM, R.; MILLER, J. F.; ZAHEER, A. Purification and characterization of glia maturation factor f8: A growth regulator for neurons and glia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. May, p. 3901–3905, 1989.

LIM, R.; ZAHEER, A.; LANE, W. S. Complete amino acid sequence of bovine glia maturation factor beta. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. July, p. 5233–5237, 1990.

LIM, S. A. O.; KANG, U. J.; MCGEHEE, D. S. Striatal cholinergic interneuron regulation and circuit effects. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, v. 6, n. 22, p. 1–23, 2014.]

LIMA, M. S.; REKSIDLER, A. B.; ZANATA, S. M.; et al. Different parkinsonism models produce a time-dependent induction of COX-2 in the substantia nigra of rats. **Brain research**, v. 1101, n. 1, p. 117–25, 2006.

LLORENS-MARTÍN, M.; TEJEDA, G. S.; TREJO, J. L. Differential regulation of the variations induced by environmental richness in adult neurogenesis as a function of time: A dual birthdating analysis. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, p. 2–15, 2010.

LUCHTMAN, D.W.; SHAO, D.; SONG, C. Behavior, neurotransmitters and inflammation in three regimens of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Physiology & Behavior**, v. 98, n. 1-2, p. 130-38, 2009.

LUNDBLAD, M.; PICCONI, B.; LINDGREN, H.; CENCI, M. A. A model of L-DOPA-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned mice: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. **Neurobiology of disease**, v. 16, n. 1, p. 110–23, 2004.

MANOR, Y.; BALAS, M.; GILADI, N.; et al. Anxiety, depression and swallowing disorders in patients with Parkinson's disease. **Parkinsonism & related disorders**, v. 15, n. 6, p. 453–56, 2009.

MÁRMOL, F.; RODRÍGUEZ, C. A.; SÁNCHEZ, J.; et al. Anti-oxidative effects produced by environmental enrichment in the hippocampus and cerebral cortex of male and female rats. **Brain Research**, v. 1613, p. 120–29, 2015.

MCGEER, P. L.; MCGEER, E. G. Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease. **Neurobiology of aging**, v. 22, n. 6, p. 799–809, 2001

MENESES, M.S.; TEIVE, H. A. **Doença de Parkinson: Aspectos Clínicos e cirúrgicos**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

MLADENOVIĆ, A.; PEROVIĆ, M.; RAIČEVIĆ, N.; et al. 6-Hydroxydopamine increases the level of TNF α and bax mRNA in the striatum and induces apoptosis of dopaminergic neurons in hemiparkinsonian rats. **Brain Research**, v. 996, n. 2, p. 237–45, 2004.

MORIGUCHI, S.; YABUKI, Y.; FUKUNAGA, K. Reduced calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in the hippocampus is associated with impaired

cognitive function in MPTP-treated mice. **Journal of neurochemistry**, v. 120, n. 4, p. 541–51, 2012.

MOSLEY, R. L.; et al. Neuroinflammation, oxidative stress, and the pathogenesis of Parkinson's disease. **Clinical Neuroscience Research**, v.6, n.1, 261-81, 2006.

MÜLLER, M. L. T. M.; BOHNEN, N. I. Cholinergic dysfunction in parkinson's disease. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 13, 2013.

NAKA, F.; SHIGA, T.; YAGUCHI, M.; et al. An enriched environment increases noradrenaline concentration in the mouse brain. **Brain Research**, v. 924, n. 1, p. 124–126, 2002.

NAOI, M.; MARUYAMA, W.; INABA-HASEGAWA, K. Type A and B Monoamine Oxidase in Age-Related Neurodegenerative Disorders : Their Distinct Roles in Neuronal Death and Survival. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2177–2188, 2012.

NEELY, K. A; KURANI, A. S.; SHUKLA, P. et al. Functional Brain Activity Relates to 0-3 and 3-8 Hz Force Oscillations in Essential Tremor. **Cerebral cortex**, v. 24, n. 6, p. 1–12, 2014.

NEELY, K. A; PLANETTA, P. J.; PRODOEHL, J. et al. Force control deficits in individuals with Parkinson's disease, multiple systems atrophy, and progressive supranuclear palsy. **Force Control and Cognition**, v. 8, n. 3, p. 1-8, 2013.

NEVE, K.A., SEAMANS, J.K., TRANTHAM-DAVIDSON, H. Dopamine receptor signaling. **Journal of Receptors and Signal Transduction Research**, v. 24, p. 165–205, 2004.

NICHOLSON, G.; PEREIRA, A.C.; HALL, G.M. Parkinson's Disease and Anaesthesia. **British Journal of Anaesthesia**, v. 89, n. 06, p. 904-16, 2002.

NITHIANANTHARAJAH, J.; BARKUS, C.; MURPHY, M.; et al. Gene-environment interactions modulating cognitive function and molecular correlates of synaptic plasticity in Huntington's disease transgenic mice. **Neurobiology of disease**, v. 29, n. 3, p. 490–504, 2008.

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

NOVIKOVA, L.; GARRIS, B. L.; GARRIS, D. R.; et al. Early signs of neuronal apoptosis in the substantia nigra pars compacta of the progressive neurodegenerative mouse 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine/probenecid model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 140, n. 1, p. 67–76, 2006.

NOVKOVIC, T.; MITTMANN, T.; MANAHAN-VAUGHAN, D. BDNF contributes to the facilitation of hippocampal synaptic plasticity and learning enabled by environmental enrichment. **Hippocampus**, v. 25, p. 1–15, 2015.

PALOP, J. J.; CHIN, J.; ROBERSON, E. D.; et al. Aberrant Excitatory Neuronal Activity and Compensatory Remodeling of Inhibitory Hippocampal Circuits in Mouse Models of Alzheimer's Disease. **Neuron**, v. 55, p. 697–711, 2007.

PANG, T. Y. C.; HANNAN, A. J. Enhancement of cognitive function in models of brain disease through environmental enrichment and physical activity. **Neuropharmacology**, v. 64, p. 515–28, 2013.

PANG, T. Y.; DU, X.; ZAJAC, M. S.; et al. Altered serotonin receptor expression is associated with depression-related behavior in the R6/1 transgenic mouse model of Huntington's disease. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n. 4 p.753– 766, 2009.

PETRI, S.; KÖRNER, S.; KIAEI, M. Nrf2/ARE Signaling Pathway: Key Mediator in Oxidative Stress and Potential Therapeutic Target in ALS. **Neurology research international**, v. 2012, p. 1–8, 2012.

PFEIFFER, H. C. V; LØKKEGAARD, A; ZOETMULDER, M.; et al. Cognitive impairment in early-stage non-demented Parkinson's disease patients. **Acta neurologica Scandinavica**, v. 129, n.5 p. 307–18, 2013.

PIRES, R. G. W.; PEREIRA, S. R. C.; OLIVEIRA-SILVA, I. F. et al. Cholinergic parameters and the retrieval of learned and re-learned spatial information: a study using a model of Wernicke-Korsakoff Syndrome. **Behavioural brain research**, v. 162, n. 1, p. 11–21, 2005.

PLANETTA, P. J.; KURANI, A. S.; SHUKLA, P. et al. Distinct functional and macrostructural brain changes in Parkinson's disease and multiple system atrophy. **Human Brain Mapping**, v. 36, p. 1165–1179, 2015.

PRADHAN, S.; SCHERER, R.; MATSUOKA, Y. et al. Grip Force Modulation Characteristics as a Marker for Clinical Disease Progression in Individuals With Parkinson Disease: Case-Control Study. **Physical Therapy**, v. 95, n. 3, p. 369–79, 2014.

PREDIGER, R. D. S.; AGUIAR, A. S.; ROJAS-MAYORQUIN, A. E.; et al. Single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57BL/6 mice models early preclinical phase of Parkinson's disease. **Neurotoxicity research**, v. 17, n. 2, p. 114–29, 2010

RAJPUT, A. H. Levodopa prolongs life expectancy and is non-toxic to substantia nigra. **Parkinsonism & related disorders**, v. 8, n. 2, p. 95–100, 2001.

REALE, M.; IARLORI, C.; THOMAS, A; et al. Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease. **Brain, behavior, and immunity**, v. 23, n. 1, p. 55–63, 2009.

REDOLAT, R.; MESA-GRESA, P. Potential benefits and limitations of enriched environments and cognitive activity on age-related behavioural decline, v. 10, p. 293–316, 2012.

ROBAKIS, D.; FAHN, S. Defining the Role of the Monoamine Oxidase-B Inhibitors for Parkinson ' s Disease. **CNS Drugs**, v. 29, n. 6, p. 433–441, 2015.

ROBINSON, L.; GOONAWARDENA, A. V.; PERTWEE, R. et al. WIN55 , 212-2 induced deficits in spatial learning are mediated by cholinergic hypofunction. **Behavioural Brain Research**, v. 208, n. 2, p. 584–92, 2010.

ROSENZWEIG, M. R.; BENNETT, E. L.; HEBERT, M.; et al. 1978. Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments. **Brain Research**, v. 153, n. 3, 563–76, 1978.

ROSSI, C.; ANGELUCCI, A.; COSTANTIN, L.; et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. **European Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 1850–1856, 2006.

ROUSSELET, E.; JOUBERT, C.; CALLEBERT, J. et al. Behavioral changes are not directly related to striatal monoamine levels, number of nigral neurons, or dose of parkinsonian toxin MPTP in mice. **Neurobiology of Disease**, v. 14, p. 218–28, 2003.

SAIRAM, K.; SARAVANAN, K. S.; BANERJEE, R.; et al. Non-steroidal anti-inflammatory drug sodium salicylate, but not diclofenac or celecoxib, protects against 1-methyl-4-phenyl pyridinium-induced dopaminergic neurotoxicity in rats. **Brain research**, v. 966, n. 2, p. 245–52, 2003.

SALE, A.; BERARDI, N.; MAFFEI, L. Enrich the environment to empower the brain. **Trends in Neurosciences**, v. 32, n. 4, p. 233–39, 2009.

SALE, A.; BERARDI, N.; MAFFEI, L. Environment and brain plasticity: towards an endogenous pharmacotherapy. **Physiological reviews**, v. 94, p. 189–34, 2014.

SAYKIN, A. J.; WISHART, H. A; RABIN, L. A; et al. Cholinergic enhancement of frontal lobe activity in mild cognitive impairment. **Brain: A journal of neurology**, v. 127, n. 7, p. 1574–1583, 2004.

SCHAPIRA, A. H. V; BEZARD, E.; BROTCHE, J.; et al. Novel pharmacological targets for the treatment of Parkinson's disease. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 5, n. 10, p. 845–54, 2006

SCHIPPER, H. M.; LIBERMAN, A.; STOPA, E. G.; Neural Heme Oxygenase-1 Expression in Idiopathic Parkinson's Disease. **Experimental Neurology**, v. 68, n. 150, p. 60–68, 1998.

SEGOVIA, G.; YAGUE, A. G.; GARCIA-VERDUGO J. M.; et al. Environmental enrichment promotes neurogenesis and changes the extracellular concentrations of glutamate and GABA in the hippocampus of aged rats. **Brain Research Bulletin**, v. 70, n.1, p. 8–14, 2006.

SERRA, P. A.; SCIOLA, L.; DELOGU, M. R.; et al. The neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine induces apoptosis in mouse nigrostriatal glia. Relevance to nigral neuronal death and striatal neurochemical changes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 37, p. 34451–34461, 2002.

SILVA, C. F.; DUARTE, F. S.; LIMA, T. C.; et al. Effects of social isolation and enriched environment on behavior of adult Swiss mice do not require hippocampal neurogenesis. **Behavioural Brain Research**, v. 225, n.1, p. 85–90, 2011.

SINGH, S.; DIKSHIT, M. Apoptotic neuronal death in Parkinson's disease: involvement of nitric oxide. **Brain research reviews**, v. 54, n. 2, p. 233–50, 2007.

SOLINAS, M.; THIRIET, N.; CHAUVET, C. et al. Progress in Neurobiology Prevention and treatment of drug addiction by environmental enrichment. **Progress in Neurobiology**, v. 92, n. 4, p. 572–92, 2010.

SPRAKER, M. B.; PRODOEHL, J.; CORCOS, D. M.; et al. Basal ganglia hypoactivity during grip force in drug naive Parkinson's disease. **Human Brain Mapping**, v. 31, p. 1928–1941, 2010.

STRAUB, C.; TRITSCH, N. X.; HAGAN, N. A. et al. Multiphasic modulation of cholinergic interneurons by nigrostriatal afferents. **The Journal of neuroscience: The official journal of the Society for Neuroscience**, v. 34, n. 25, p. 8557–8569, 2014.

TEISMANN P.; FERGER B. Inhibition of the cyclooxygenase isoenzymes COX-1 and COX-2 provide neuroprotection in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Synapse**, v.39, n.2, pg. 167-74, 2001.

TEISMANN, P.; TIEU, K.; CHOI, D. K. et al. Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 9, p. 5473–5478, 2003

TEIVE, H. A. G.; MENEZES, M. S. **Doença de Parkinson**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

TSUKADA, H.; HARADA, N.; NISHIYAMA, S. et al. Cholinergic neuronal modulation alters dopamine D2 receptor availability in vivo by regulation receptor affinity induced by facilitated synaptic dopamine turnover. positron emission tomography studies with microdialysis in the conscious monkey brain, **The Journal of Neuroscience**, v. 20, p. 7067-73, 2000.

TURNER, B. M. Epigenetic responses to environmental change and their evolutionary implications. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 364, p. 3403–3418, 2009.

VALERO, J.; ESPAÑA, J.; PARRA-DAMAS, A.; et al. Short-term environmental enrichment rescues adult neurogenesis and memory deficits in APPSw,Ind transgenic mice. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. 29–32, 2011.

VAN DELLEN, A.; BLAKEMORE, C.; ANDERSON, R. T.; et al. Delaying the onset of Huntington's in mice. **Nature**, v. 404, n. April, p. 721–22, 2000.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Neural consequences of environmental enrichment. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 1, n. 3, p. 191–98, 2000.

VILA, M.; PRZEDBORSKI, S. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 5, p. 365-75, 2003.

WICHMANN, T.; DELONG, M.R. Neurobiology: Oscillations in the basal ganglia. **Nature**, v. 400, n. 6745, p. 621-22, 1999.

WILL, B.; GALANI, R.; KELCHE, C.; et al. Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990-2002). **Progress in neurobiology**, v. 72, n. 3, p. 167–82, 2004.

XIANG, Z.; THOMPSON, A. D.; JONES, C. K. et al. Roles of the M1 muscarinic acetylcholine receptor subtype in the regulation of basal ganglia function and implications for the treatment of Parkinson's disease. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 340, n. 3, p. 595–603, 2012.

YABUKI, Y.; OHIZUMI, Y.; YOKOSUKA, A. et al. Nobiletin treatment improves motor and cognitive deficits seen in MPTP-induced Parkinson model mice. **Neuroscience**, v. 259, p. 126–41, 2014.

YANG, Y.; ZHANG, J.; XIONG, L.; et al. Cognitive Improvement Induced by Environment Enrichment in Chronic Cerebral Hypoperfusion Rats: a Result of Upregulated Endogenous Neuroprotection? **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 56, p. 278–89, 2015.

YOUDIM, M. B. H.; EDMONDSON, D.; TIPTON, K. F. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. April, p. 295–309, 2006.

ZABORSZKY, L.; VADASZ, C. The Midbrain Dopaminergic System: Anatomy and Genetic Variation in Dopamine Neuron Number of Inbred Mouse Strains. **Behavior Genetics**, v. 31, n. 1, p. 47-59, 2001.

ZAHEER, A.; ZAHEER, S.; SAHU, S. K.; et al. A novel role of glia maturation factor: Induction of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and pro-inflammatory cytokines. **Journal of Neurochemistry**, v. 101, p. 364–76, 2007.

ZAHEER.; S, THANGAVEL, R.; SAHU, SK.; et al. Augmented expression of glia maturation factor in Alzheimer's disease. **Neuroscience**, v. 194, p. 227–33, 2011.

ZAPATA, A. et al. Detection and Quantification of Neurotransmitters in Dialysates. **Current Protocols in Neuroscience**, CHAPTER: Unit–7.430, 2009.

ZHOU, G.; MIURA, Y.; SHOJI, H.; et al. Platelet monoamine oxidase B and plasma -phenylethylamine in Parkinson ' s disease. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 9, n. Sd 4, p. 229–231, 2001.