

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DA CAFEÍNA EM UM
MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE PARKINSON**

MARIANA COUTO GAMA

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
junto à disciplina BIO5156-Estágio II, Centro
de Ciências Biológicas da UFSC, como requisito
parcial para obtenção do título de bacharel em
Ciências Biológicas.**

Orientador: Prof. Dr. Rui Daniel S. Prediger (FMC,
CCB, UFSC)

Florianópolis – SC

Dezembro/2008

*“Cantar canções que ninguém cantou,
Conceber pensamentos que nenhum cérebro pensou,
Andar por caminhos nunca antes palmilhados,
Chorar lágrimas por Deus que ninguém jamais chorou,
Levar a todos a paz que ninguém jamais levou,
Abraçar os que são pelos outros desprezados,
Amar a todos com um amor por ninguém jamais sentido,
E enfrentar a batalha da vida com vigor incontido.”*

Paramahansa Yogananda

**Aos meus pais, pelo incentivo,
ensinamentos, valores éticos, pelo
porto seguro e por nunca medirem
esforços para me fazer feliz.**

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Rui, pela ótima orientação, pelo tempo dedicado a este trabalho e pela confiança em mim depositada. Agradeço de coração sua paciência, atenção e acessibilidade, que me proporcionaram um aprendizado imensurável.

Aos colegas de laboratório, Aderbal e Daniel pela grande ajuda e contribuição neste projeto, e ao Sandro pelo apoio no início deste trabalho.

A toda equipe do Laboratório dos Professores Leandro e Rui, que dividiram comigo o espaço, o dia a dia e me ajudaram na manutenção dos meus animais.

Aos meus pais e família, base de tudo, por dividirem comigo a vida, as alegrias e tristezas e estarem sempre do meu lado, incondicionalmente.

Ao meu amor, que mesmo tão distante, esteve sempre tão presente ao longo desses anos.

Aos ex-colegas de laboratório, Elayne e Geison, que assistiram meus primeiros passos na caminhada científica e com quem muito aprendi. Às queridas amigas, Ana Paula, Ligia e Natália, com quem dividi a experiência no ingresso da Iniciação Científica, e que comigo compartilharam todas as angústias e realizações de estar neste meio, além de momentos únicos e inesquecíveis.

A todos os professores, colegas e amigos que fizeram parte desta longa jornada que se encerra, de quem levarei para sempre boas lembranças. A convivência ao longo desses 5 anos, contribuiu para a minha formação acadêmica e pessoal e fez de mim uma pessoa melhor.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
RESUMO	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Histórico	1
1.2 Neuropatologia	1
1.3 Epidemiologia e etiologia	2
1.4 Sintomas	4
1.5 Tratamento	10
1.6 Modelos Animais	11
2. JUSTIFICATIVA	14
3. OBJETIVOS	15
3.1 Objetivos Gerais	15
3.2 Objetivos Específicos	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1 Animais	16
4.2 Drogas	16
4.3 Desenho Experimental	17
4.4 Testes Comportamentais	17
4.4.1 Campo aberto	18
4.4.2 Caixa de atividades	18
4.4.3 Rota-Rod	19
4.4.4 Teste do labirinto aquático de Morris	19
4.4.5 Teste da esquiwa inibitória do tipo “ <i>step-down</i> ”	20
4.4.6 Teste de reconhecimento social	21
4.4.7 Teste de discriminação olfatória	22
4.5 Análise Estatística	23

5. RESULTADOS	25
5.1 Efeitos da reserpina sobre a função motora dos animais	25
5.2 Efeitos da reserpina sobre a função olfatória dos animais	28
5.3 Efeitos da reserpina sobre a função cognitiva dos animais	29
5.4 Efeitos da administração aguda de cafeína sobre os prejuízos da função olfatória induzida pela reserpina em ratos	34
5.5 Efeitos da administração aguda de cafeína sobre os prejuízos da função cognitiva induzida pela reserpina em ratos	36
5.6 Efeitos da administração aguda de cafeína sobre os prejuízos da função motora induzida pela reserpina em ratos	40
6. DISCUSSÃO	42
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina tri-fosfato
DA	Dopamina
DP	Doença de Parkinson
EI	Esquiva Inibitória
i.p.	via intraperitoneal
L-DOPA	Levodopa
MAO-B	Enzima monomina oxidase – B
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
6-OHDA	6-hidroxi-dopamina
RPM	Rotações por minuto
SNc	Substância negra parte compacta
SNC	Sistema nervoso central
THS	Droga antagonista muscarínico triexifenidil
VMAT	Transportadores vesiculares de monoaminas

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma das doenças neurodegenerativas relacionadas à idade mais prevalentes na população. Ela é caracterizada por uma perda progressiva e gradual de neurônios dopaminérgicos da substância negra, o que resulta em um grande decréscimo nos níveis de dopamina no estriado, prejudicando, entre outras, as funções olfatórias, cognitivas e motoras do indivíduo. O aumento da população idosa prevista para os próximos anos implicará um aumento na incidência da DP na população mundial, fazendo-se cada vez mais necessária a busca por novas alternativas farmacológicas. Estudos recentes têm sugerido um potencial terapêutico da cafeína para a DP. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os possíveis prejuízos motores, olfatórios e cognitivos de ratos tratados com reserpina em diferentes doses, utilizada como um modelo animal para a DP; bem como investigar os efeitos da cafeína em ratos pré-tratados com reserpina. Para isso, foram realizados testes comportamentais motores (campo aberto, caixa de atividades e rota-rod), cognitivos (memória social, esquiva inibitória tipo “*step-down*” e labirinto aquático de Morris) e olfatórios (discriminação olfatória). Os resultados demonstraram um significativo prejuízo motor dos animais 24 h após a administração intraperitoneal (i.p.) da maior dose testada de reserpina (5 mg/kg). Embora a menor dose testada de reserpina (1 mg/kg, i.p.) não tenha causado alterações motoras significativas, ela causou um prejuízo na discriminação olfatória e memórias operacional e de procedimento dos animais. Mais importante, a administração aguda de cafeína (3-10 mg/kg, i.p.) foi capaz de reverter os prejuízos olfatórios e cognitivos induzidos pela reserpina, sem, todavia, melhorar os déficits motores. Assim sendo, o presente estudo reforça o modelo da reserpina como um bom modelo preditivo para a investigação de novos fármacos para a DP. Além disso, os resultados encontrados

reforçam o potencial da cafeína como uma alternativa terapêutica para sintomas cognitivos e olfatórios verificados no modelo experimental da DP.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

A doença de Parkinson (DP) é um distúrbio neurodegenerativo relacionado à idade caracterizado principalmente por seus sintomas motores e cognitivos. A descrição original da DP foi feita em 1817 pelo médico inglês James Parkinson. Em sua monografia, intitulada “*Essay on the Shaking Palsy*” (“Ensaio da paralisia agitante”), James Parkinson definiu a enfermidade, determinou os sintomas patognomônicos, descreveu o diagnóstico diferencial e fez considerações a respeito da etiologia e do tratamento desta doença (Duvoisin, 1991). Posteriormente, em 1875, o neurologista francês Jean Martin Charcot sugeriu o nome doença de Parkinson, reconhecendo o mérito do médico inglês que pioneiramente descreveu a doença. Charcot também contribuiu no estudo da doença, relatando a presença de outros sintomas, o diagnóstico diferencial e o tratamento da doença. Charcot identificou as disfunções cognitivas presentes na doença, acabando com a idéia de que a doença se tratava apenas de um distúrbio motor (Meneses & Teive, 1996).

1.2 Neuropatologia

A característica neuropatológica mais marcante da DP é a lesão dos neurônios dopaminérgicos na substância negra parte compacta (SNc), a qual passa a exibir macroscopicamente uma despigmentação na porção ventrolateral desta estrutura (Jellinger, 1988; Standaert & Young, 1996). A despigmentação da SNc é consequência da degeneração dos neurônios dopaminérgicos que contém a neuromelanina (Gerlach & Riederer, 1996), o que resulta em uma diminuição dos níveis de dopamina (DA) no estriado (Jellinger, 1988, Lindner et al., 1999). A degeneração do sistema

dopaminérgico nos pacientes com a DP pode prejudicar também a integridade funcional do córtex pré-frontal (Marié et al., 1999). O grau da redução dos níveis de DA está relacionado com a severidade da doença. A perda celular na SNc em um indivíduo saudável é de aproximadamente 5% por década, em função do processo normal de envelhecimento, enquanto um paciente parkinsoniano tem uma redução drástica e acelerada da perda neural com um padrão de aproximadamente 45% por década (Hornykiewicz, 1975).

Outra característica neuropatológica observada em pacientes da DP é o aparecimento dos corpos de Lewy nos neurônios remanescentes. Trata-se de inclusões eosinofílicas intracelulares de origem protéica que se acumulam em neurônios em processo de degeneração, especialmente nos neurônios dopaminérgicos da SNc (Korczyn, 1995; Hagan et al., 1997; Blandini et al., 2000). A presença dos corpos de Lewy tem sido utilizada como marcador da DP, uma vez que estes são encontrados em aproximadamente 85% das autópsias de pacientes diagnosticados como portadores da DP (Korczyn, 1995; Hagan et al., 1997). Apesar da alta probabilidade de se encontrar essas inclusões em parkinsonianos, os corpos de Lewy não são exclusivos dos portadores desta doença, sendo também encontrados no cérebro de idosos normais e portadores de outras doenças degenerativas, portanto, torna-se necessária uma análise conjunta de outros fatores para a confirmação da doença.

1.3 Epidemiologia e etiologia

A prevalência da DP é estimada em 0,15% da população mundial, sendo que, a partir dos 50 anos, esse número cresce para 0,5% (Stoof et al., 1999). Com a melhora da qualidade de vida da população mundial nas últimas décadas, a população idosa (pessoas com 60 anos ou mais) vem crescendo significativamente. Este fenômeno de

envelhecimento populacional vem ocorrendo também no Brasil, onde já se contabilizam 14 milhões de idosos, e, de acordo com o IBGE, esse número deve crescer significativamente nos próximos 20 anos, podendo atingir a faixa de 30 milhões de habitantes, o que equivaleria a 13% da população brasileira (IBGE, 2000). Nos próximos anos, o aumento da população idosa implicará um aumento da prevalência da DP na população mundial, fazendo-se cada vez mais necessário o estudo da doença para proporcionar aos seus portadores tratamentos mais adequados e, conseqüentemente, melhor qualidade de vida.

O desenvolvimento da DP é lento e progressivo, sendo o envelhecimento o principal fator de risco. A causa primária da DP ainda não está elucidada, porém estudos epidemiológicos têm identificado fatores externos que podem aumentar a incidência da doença, tais como: vida rural, exposição a herbicidas, pesticidas e algumas toxinas presentes no ambiente (Hagan et al., 1997). Sendo esses fatores cumulativos, a relação entre idade e evolução da doença se torna clara, pois quanto maior a exposição a esses componentes, maiores os prejuízos. Contudo, a exposição repetida a esses agentes não é o fator determinante para o desenvolvimento da DP, haja vista que existem pessoas que são expostas a esses fatores a vida inteira e não desenvolvem a doença. Além disso, estudos apontam que traumas no crânio, pescoço ou espinha cervical aumentam as chances de desenvolver a doença (Stern et al., 1991). Os fatores internos associados ao processo neurodegenerativo da DP estão intimamente relacionados ao envelhecimento cerebral, anomalias mitocondriais e produção de radicais livres (Langston, 1996). Atualmente a etiopatogenia da DP tem sido explicada por uma associação de diversos fatores, combinando-se fatores genéticos a fatores ambientais (Langston, 1996).

1.4 Sintomas

Os sintomas motores clássicos da DP são a bradicinesia, rigidez muscular, tremores de repouso, anomalias posturais e episódios de paradas motoras (Gerlach & Riederer, 1996; Postle et al., 1997; Lindner et al., 1999; Obeso et al., 2000), sendo que os três primeiros sintomas precisam estar presentes no paciente para que se confirme o diagnóstico clínico da doença. A bradicinesia corresponde à dificuldade em iniciar o movimento, à lentidão e pobreza de movimentos que os parkinsonianos exibem. Os movimentos voluntários e automáticos estão reduzidos em sua velocidade, alcance e amplitude. As atividades diárias passam a ser realizadas à custa de muito esforço. Os passos tornam-se lentos, e o equilíbrio fica comprometido. É considerado o sintoma que mais incapacita o paciente (Limongi, 1995).

A rigidez muscular decorre do aumento da resistência que os músculos oferecem quando um segmento do corpo é deslocado passivamente. O resultado é uma fragmentação dos movimentos (sintoma conhecido como movimento de “roda dentada”), que, ao invés de serem executados de maneira contínua, tornam-se entrecortados (Duvoisin, 1991; Meneses & Teive, 1996; Youdim & Riederer, 1997).

O tremor se apresenta de forma característica: é rítmico, relativamente lento e ocorre principalmente quando o membro está em repouso. Quando o paciente movimenta um membro, o tremor ali presente cessa de imediato para retornar logo após o fim do movimento (Meneses & Teive, 1996). Durante o relaxamento ou sono o tremor desaparece (Korczyń, 1995).

A anomalia postural se caracteriza principalmente pela instabilidade, consequência da perda do reflexo postural. As quedas podem se tornar frequentes e, em estágios mais avançados da doença, o paciente pode apresentar dificuldades em

permanecer de pé (Meneses & Teive, 1996). Outro sintoma bastante observado é a alteração na caligrafia, que se torna menos legível e de tamanho reduzido, fenômeno conhecido por micrografia.

Não obstante, deve ser ressaltado que os sintomas motores na DP (utilizados no diagnóstico clínico da DP) somente se manifestam quando aproximadamente 60-70% dos neurônios da SNc encontram-se degenerados e os níveis estriatais de DA são reduzidos em 70-80% nesta região (Lindner et al., 1999). O fato mostra a importância do desenvolvimento de um teste-diagnóstico mais precoce para a DP, permitindo que o tratamento seja iniciado antes que os sintomas motores se estabeleçam. A grande maioria dos portadores da DP só é diagnosticada quando os sintomas motores se desenvolvem, e começam a ser medicados relativamente tarde, o que torna a farmacoterapia pouco efetiva.

Embora a DP seja definida e caracterizada como uma doença do movimento, e contrariando a descrição inicial feita por James Parkinson (1817), atualmente é amplamente aceito que os pacientes parkinsonianos manifestem também prejuízos cognitivos. A deficiência cognitiva é um sintoma comum em pacientes com a DP e tem sido frequentemente descrita nos estágios iniciais da doença, antes mesmo do aparecimento dos sintomas motores clássicos, sendo que, com o avanço da doença, a magnitude desses sintomas aumenta (Dubois & Pillon, 1997; Faglioni et al., 1997; Pillon et al., 1998). Por essa razão, os sintomas cognitivos da DP podem representar um importante aliado na detecção precoce da doença, já que sua manifestação ocorre frequentemente nos seus estágios iniciais (Pillon et al., 1998). Alguns dos sintomas cognitivos da DP são: perda das memórias implícitas e operacionais (Dubois e Pillon, 1997), demência e depressão (Cummings, 1992, Meneses e Teive, 1996; Miguel et al., 1998).

Antes de apresentar os principais prejuízos cognitivos observados na DP, faz-se necessário uma breve descrição dos conceitos básicos referentes aos processos de aprendizado e memória. “Memória” é a aquisição (adquirir, aprender), consolidação (armazenar, guardar) e a evocação (lembrar, recordar, recuperar) de informações (Izquierdo, 2002). Pelo fato das memórias, tanto dos homens quanto dos demais animais, serem provenientes das suas experiências, é mais sensato falar em “memórias” ou processos de memória do que simplesmente em “memória”, uma vez que podem existir tantas memórias quanto o número de experiências possíveis (Izquierdo, 2002). Como a natureza das experiências vivenciadas é a mais variada possível, é de se esperar que existam diferentes tipos de memórias e que as mesmas estejam relacionadas a diferentes áreas cerebrais. Atualmente, existem dezenas de diferentes classificações para os processos de aprendizado e memória, que sofrem grande variação conforme o enfoque utilizado pelo autor. De maneira geral, os tipos de memória podem ser classificados de acordo com o seu tempo de retenção e sua natureza ou conteúdo.

Memórias explícitas ou declarativas são aquelas que registram fatos, eventos ou conhecimentos, sendo chamadas declarativas pelo fato de nós, seres humanos, podermos declará-las e relatá-las como as adquirimos (evocadas conscientemente). Entre elas, as referentes a eventos datados (na maioria das vezes autobiográficos) são denominadas episódicas (ex.: recordações do nosso primeiro beijo, do nosso aniversário de 15 anos); já as de conhecimentos gerais, não relacionadas ao tempo (conhecimentos de português, medicina, etc), são chamadas semânticas.

Memórias implícitas (ou não-declarativas) se referem à capacidade de aprender novas habilidades motoras, perceptuais ou cognitivas. Estas não são descritas através de palavras e, muitas vezes, somente percebemos que as possuímos quando somos requisitados a executar determinada ação ou demonstrarmos uma habilidade. Um

subtipo de memória implícita é a memória de procedimento (ou procedural) que corresponde àquelas capacidades ou habilidades motoras ou sensoriais, que são corriqueiramente chamadas de “hábitos”. As memórias implícitas são dependentes de áreas cerebrais também envolvidas com o controle dos movimentos, como os gânglios da base (principalmente o estriado) e o cerebelo (Dubbois & Pillon, 1997; Milner et al., 1998).

Já as memórias operacionais (ou de trabalho) consistem no arquivamento temporário da informação para o desempenho de uma diversidade de tarefas cognitivas. A memória de trabalho ou operacional é muito breve e fugaz e serve para o armazenamento temporário (segundos ou poucos minutos) de informações que serão úteis apenas para o raciocínio imediato e resolução de problemas, podendo ser descartadas (esquecidas) logo a seguir (Baddeley, 1986; Izquierdo & Medina, 1991). Ao contrário dos demais tipos de memória, a memória operacional não deixa traços e não produz arquivos. Usamos a memória operacional, por exemplo, para gravar números de telefones, realizar contas matemáticas, planejar compras etc.

Pelo fato dos pacientes parkinsonianos apresentarem uma depleção nos níveis de DA nos gânglios da base (Gerlach & Riederer, 1996; Barrio et al., 1997; Bezard et al., 1997; Lindner et al., 1999) e em outras áreas cerebrais, como o córtex pré-frontal (Marie et al., 1999; Stebbins et al., 1999), seria esperado um prejuízo específico nas memórias implícitas e operacionais, respectivamente. Apesar de existirem divergências na literatura quanto aos tipos de memória que estariam comprometidos na DP, a hipótese mencionada acima parece ser verdadeira. Desta forma, tanto as memórias implícitas (Bondi & Kaszniak, 1991; Ferraro et al., 1993; Roncacci et al., 1996) quanto às memórias operacionais (Dubois & Pillon, 1997; Stebbins et al., 1999; Costa et al., 2003; Crucian & Okun, 2003) mostram-se prejudicadas em pacientes parkinsonianos.

Por outro lado, tem sido demonstrado que as memórias declarativas, normalmente associadas ao hipocampo e o córtex entorrinal, encontram-se mais preservadas na DP (Flowers et al., 1984; Knowlton et al., 1996; Dubois & Pillon, 1997; Riekkinen et al., 1998).

Os casos de demência são mais comuns em pacientes nos quais a doença já está avançada, e esse sintoma ainda não está bem compreendido (Meneses & Teive, 1996; Miguel et al., 1998). Também, aproximadamente 40% dos pacientes da DP apresentam depressão em graus variados (Cummings, 1992; Tandberg et al., 1996). Além de poderem apresentar desinteresse nas atividades diárias, objetos pessoais ou familiares, podem desenvolver outros sintomas, como melancolia, perda de apetite, fadiga, ansiedade e perda da auto-estima (Duvoisin, 1991).

Além dos prejuízos motores e cognitivos apresentados, há ainda um comprometimento nas funções olfatórias em pacientes com a DP. Há pelo menos 30 anos tem se observado uma deficiência na percepção, discriminação e reconhecimento de odores, porém esses sintomas foram pouco explorados pelos clínicos especializados na área. Hoje já se sabe que este sintoma pode ter uma grande importância na detecção precoce da doença, por se tratar de um dos primeiros sintomas a ser apresentado, porém ainda faltam recursos capazes de mensurar esses comprometimentos olfatórios específicos da DP em humanos. Os estudos científicos relativos ao assunto são pouco explorados, devido às dificuldades de reproduzir esses sintomas em modelos animais da DP (Hawkes et al., 1999). Existem várias evidências patológicas, fisiopatológicas, neurofisiológicas e genéticas que relacionam essas alterações olfatórias com outros sintomas clássicos da DP (Doty et al., 1984; Hawkes, et al., 1999). Através de análises “*post mortem*” em pacientes parkinsonianos, já foram encontradas, por exemplo, uma significativa quantidade de corpos de Lewy no bulbo olfatório, bem como nas células

mitrais (Daniel & Hawkes, 1992). Posteriormente, observou-se uma correlação positiva entre a morte neuronal em áreas olfatórias com o tempo que o paciente apresentava a doença (Pearce et al., 1995). Ainda há controvérsias entre os pesquisadores com relação à parte qualitativa dos prejuízos olfatórios, já que estes não se referem à somente um único odor específico, e ao contrário dos sintomas motores e cognitivos, não progridem com o avanço da doença (Doty et al., 1984, 1988, 1995; Quin et al., 1987; Hawkes et al., 1997). Acredita-se que os prejuízos olfatórios são causados logo no início da doença, através da exposição do indivíduo a uma toxina ou agente causador da DP. O epitélio olfatório está exposto ao meio ambiente, e a cavidade nasal representaria uma porta de entrada do organismo a esses agentes, que supostamente podem vir a causar a DP (Doty et al., 1984; Roberts, 1986; Harrison & Person, 1989; Hawkes et al., 1999). Com esse raciocínio, pode-se entender como as alterações olfatórias precederiam as cognitivas e motoras, resultadas do comprometimento dos gânglios da base (Hawkes et al., 1999). As etapas da doença foram definidas temporal e espacialmente, sendo que as áreas olfatórias e o tronco cerebral são as primeiras áreas acometidas, seguidas pelo comprometimento da SNC e outros núcleos do mesencéfalo, iniciando a fase sintomática clássica. Mais adiante o processo neurodegenerativo alcança o córtex estabelecendo-se assim todas as dimensões da doença (Braak et al., 2004). Assim sendo, a criação de técnicas que permitam mensurar o prejuízo olfatório precocemente, pode vir a representar uma importante ferramenta no diagnóstico da doença logo em seus estágios iniciais, possibilitando o tratamento no começo da doença, antes que o processo neurodegenerativo se acelere e se distribua para outras áreas cerebrais (Doty et al., 1984; Daniel & Hawkes, 1992; Becker et al., 2002).

1.5 Tratamento

Existem atualmente diferentes tratamentos farmacológicos para a DP, como fármacos precursores de dopamina (ex: levodopa - L-DOPA), inibidores das enzimas de degradação de dopamina (ex: selegelina – inibidor da monoamino-oxidase-B - MAO-B) e agonistas dopaminérgicos (ex: bromocriptina). Entretanto, esses medicamentos representam uma alternativa meramente paliativa à DP, uma vez que atuam restabelecendo temporariamente a função dopaminérgica no sistema nervoso central (SNC), sem apresentarem, todavia, uma ação neuroprotetora comprovada sobre o processo neurodegenerativo que continua a progredir. A medicação disponível atualmente para a DP apresenta uma eficácia relativa e temporária, além de estar associada a um grande número de efeitos colaterais. Nesse sentido, é evidente o crescente interesse de pesquisadores e das indústrias farmacêuticas para a descoberta de novos alvos terapêuticos e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de novos e eficazes medicamentos para o tratamento da patologia.

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o consumo de café pode estar associado a um menor risco de desenvolvimento futuro da DP, sendo a cafeína o constituinte responsável pelo efeito (Hellenbrand et al., 1996; Fall et al., 1999; Ross et al., 2000; Ascherio et al., 2001; Tan et al., 2003). O mecanismo de ação da cafeína na neuroproteção ainda não está bem esclarecido. Porém, sabe-se que a cafeína atua como um antagonista não-seletivo dos receptores para a adenosina no cérebro, sendo capaz de ligar-se nesses receptores, bloqueando-os. A adenosina é um subproduto da degradação do ATP, desempenhando diferentes funções na modulação da atividade de tecidos periféricos e centrais (Fredholm, 1995). Várias evidências mostram que a adenosina apresenta efeitos opostos aos da DA no SNC. A ativação motora induzida por antagonistas dos receptores adenosinérgicos (como a cafeína) é inibida pela depleção de

DA ou pelo bloqueio dos receptores dopaminérgicos. Ademais, agonistas adenosinérgicos inibem, enquanto antagonistas adenosinérgicos potencializam a estimulação motora induzida por agonistas dopaminérgicos (Ferre et al., 1997, 2001; Franco et al., 2000). Além disso, o potencial terapêutico da cafeína e de antagonistas seletivos do receptor A2A para adenosina no tratamento da DP tem sido confirmado em estudos com modelos animais (Svenningsson et al., 1999; Chen et al., 2001; Prediger et al., 2005 a, b).

Estudos recentes em ratos têm mostrado que a cafeína pode ser um importante adjuvante no tratamento da DP. Quando associada ao THS (a droga antagonista muscarínico triexifenidil), por exemplo, a cafeína potencializa o seu efeito, o que permite uma menor dosagem da droga e conseqüentemente efeitos colaterais mais brandos (Moo-Puc et al., 2004).

1.6 Modelos Animais da DP

Deve ser ressaltado que muitos dos avanços obtidos até o momento pelos cientistas no tratamento e compreensão da patofisiologia da DP só foram possíveis graças à utilização de modelos animais. Dessa forma, o emprego de modelos representativos torna-se necessário para a investigação de novos fármacos. Assim como tantas outras, a DP é uma doença exclusivamente humana, ainda não identificada naturalmente em nenhum outro animal. No entanto, existem algumas características da doença que podem ser simuladas em roedores através da administração de diferentes compostos: reserpina, 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), paraquat, maneb, rotenona e ferro (para revisão ver Gerlach & Riederer, 1996; Beal, 2001; Shimohama et al., 2003).

Ainda não existe um modelo animal ideal da DP, que seja capaz de mimetizar todas as características associadas à condição clínica, como a fácil detecção das alterações motoras associadas ao parkinsonismo, perda seletiva e gradual dos neurônios dopaminérgicos, e a produção dos corpos de Lewy. Porém, a utilização dos modelos vigentes, permitiu grandes conquistas na elucidação dos mecanismos moleculares relacionados à neurodegeneração, bem como a avaliação de novos agentes terapêuticos (Shimohama et al., 2003). Segundo Willner (1986), a validade de um modelo animal pode ser avaliada por três conjuntos de critérios: **(I) validade preditiva** (“*predictive validity*”), que é avaliada com base na sua capacidade de diferenciar entre drogas que são, ou não são, clinicamente eficazes na patologia humana que está sendo estudada; **(II) validade analógica ou por semelhança** (“*face validity*”), que é avaliada com base nas qualidades comportamentais e farmacológicas cujas semelhanças com o distúrbio humano podem ser demonstradas; **(III) validade teórica ou por homologia** (“*construct validity*”), onde os mesmos processos psicobiológicos responsáveis pela etiologia e fisiopatologia dos sintomas clínicos estejam atuando no modelo.

Por outro lado, grande parte dos estudos realizados até o presente momento utilizando estes modelos animais da DP tem sido focada em seus efeitos sobre a via dopaminérgica nigrostriatal e a indução de comprometimentos motores nos animais. Entretanto, como a DP está associada com alterações em uma variedade de funções, incluindo alterações afetivas (Santa Maria et al., 1986; Cummings, 1992); cognitivas (Owen et al., 1995; Dubois & Pillon, 1997; Goldman et al., 1998) e olfatórias (Doty et al., 1988, 1995; Hawkes et al., 1997, 1999), torna-se importante avaliar se estes modelos animais são também capazes de reproduzir algumas destas alterações.

Não nos aprofundaremos na descrição dos diferentes modelos animais da DP, em virtude deste não ser o objetivo do presente trabalho (para revisão ver Gerlach &

Riederer, 1996; Beal, 2001, Shimohama et al., 2003). Entretanto, descreveremos o modelo da administração de reserpina, em razão deste ter sido utilizado ao longo do presente estudo.

A reserpina é um alcalóide isolado das raízes da planta *Rauwolfia serpentina*, é uma droga hipotensora e sedativa do SNC, antigamente prescrita no tratamento da hipertensão. Atualmente, a sua utilização clínica está suspensa e a droga passou a ser utilizada como um modelo experimental da DP. O início da utilização da reserpina como um modelo experimental da DP se deu em 1957 quando Carlsson e colaboradores observaram que a administração sistêmica de reserpina em ratos causava um estado de acinesia e que esse estado podia ser revertido pela L-DOPA, precursor de DA utilizada no tratamento da DP. Essa observação foi o ponto de partida para a descoberta de que a depleção de DA no estriado é responsável pelos sintomas motores da DP. A partir daí, a administração sistêmica de reserpina tem se mostrado um bom modelo farmacológico para o estudo da DP, podendo simular alguns sintomas motores e cognitivos da doença. No caso dos sintomas motores, observa-se a rigidez muscular e a hipolocomoção, consequência da depleção temporária de níveis de monoaminas nas terminações nervosas que a reserpina promove. A reserpina tem alta afinidade pelo transportador vesicular de monoaminas (VMAT), que tem como função transportar a DA presente no citoplasma celular para dentro da vesícula. Ao se ligar no VMAT, a reserpina impede a ligação DA-VMAT, o que resulta em um acúmulo de DA no meio extra-vesicular. Recentemente, o uso de doses mais baixas de reserpina (1 mg/kg, contra 5 mg/kg para induzir sintomas motores) tem sido indicado para o estudo de sintomas cognitivos e depressivos (Alves et al., 2000; Skalisz et al., 2002; Prediger et al., 2005 b). A reserpina é capaz de gerar esses sintomas pelo fato da DA, através da atuação em diferentes áreas cerebrais, modular as funções motoras, cognitivas e olfatórias, sendo que a depleção

temporária desta monoamina compromete essas funções (validade analógica ou por semelhança). Além disso, a reserpina pode ser considerada um bom modelo para a investigação de novas drogas (validade preditiva), uma vez que drogas anti-parkinsonianas são capazes de reduzir os prejuízos motores induzidos pela reserpina (Menzaghi, et al. 1997). Apesar de ser considerada um bom modelo para diversos estudos, a reserpina apresenta certas limitações. Ela falha em simular os mesmos processos psicobiológicos responsáveis pela etiologia e fisiopatologia dos sintomas clínicos (não apresenta validade teórica ou por homologia), pois a administração de reserpina induz uma redução nos níveis de monoaminas de maneira inespecífica e não reproduz o avanço gradual do processo neurodegenerativo (Gerlach & Riederer, 1996). Isso por que a reserpina é rapidamente metabolizada no organismo, sendo seus prejuízos apenas temporários. Apesar dessas limitações, a reserpina é amplamente utilizada, especialmente para a investigação de novos fármacos, no caso do presente trabalho, a cafeína.

2. JUSTIFICATIVA

Considerando a doença de Parkinson como uma das principais doenças neurodegenerativas associadas ao avanço da idade e ao possível aumento no número de pacientes nos próximos anos em razão do envelhecimento populacional, a procura por novas alternativas farmacológicas para o seu tratamento torna-se imperativa.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Investigar os efeitos da cafeína sobre os prejuízos motores, cognitivos e olfatórios induzidos pela reserpina em ratos, que foi utilizada como modelo experimental da doença de Parkinson.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos da administração intraperitoneal (i.p.) de reserpina sobre as funções motoras, cognitivas e olfatórias de ratos.
- Investigar os efeitos da administração intraperitoneal (i.p.) da cafeína sobre os prejuízos locomotores induzidos pela administração i.p. de reserpina em ratos avaliados através dos seguintes testes comportamentais: campo aberto, rota-rod e caixa de atividade.
- Investigar os efeitos da administração i.p. da cafeína sobre os prejuízos cognitivos induzidos pela administração i.p. de reserpina em ratos avaliados através dos testes cognitivos: labirinto aquático de Morris, reconhecimento social e esquiva inibitória do tipo “*step-down*”.
- Investigar os efeitos da administração i.p. da cafeína sobre os prejuízos olfatórios induzidos pela administração i.p. da reserpina em ratos avaliados através do teste de discriminação olfatória.

- **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

4.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos com aproximadamente 3 meses de idade provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), que foram mantidos no biotério do Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas (Depto. Farmacologia, CCB-UFSC) no período dos experimentos. Os animais foram alojados em caixas (42 x 34 x 17 cm), cada qual contendo 5 indivíduos, forradas com serragem, trocadas a cada dois dias. Os ratos foram mantidos em condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C), com ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas das 7h às 19h), com livre acesso à água e comida. Todos os procedimentos experimentais foram realizados cuidadosamente de acordo com as normas previstas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA/UFSC, Protocolo PP00111).

4.2. Drogas

A reserpina foi utilizada na dose de 5 mg/kg de peso corporal, para induzir sintomas motores, e 1 mg/kg para a indução de sintomas cognitivos e olfatórios. A dose de 1mg/kg também foi testada para as tarefas motoras, a fim de verificar se nesta dose, haveria algum prejuízo motor dos animais que comprometeria a interpretação dos resultados obtidos nos testes olfatório e cognitivos. Ambas as doses foram diluídas em salina (NaCl 0,9%) e em 50µl de ácido acético glacial. A droga foi administrada pela via intraperitoneal (i.p.) (1 ml/kg), 24 horas antes do início de cada teste comportamental. O tratamento foi agudo, sendo apenas uma administração necessária para a indução dos sintomas desejados. A solução-controle consiste em salina (NaCl 0,9%) e 50 µl de ácido acético glacial.

A cafeína foi testada nas doses de 3 e 10 mg/kg de massa corpórea, diluídas em salina. A administração foi feita 15 minutos antes dos testes comportamentais por via i.p. (1 ml/kg). A solução-controle para este grupo foi somente salina 0,9%. A seleção das doses de reserpina e cafeína foram baseadas em trabalhos prévios da literatura (Breysse et al., 2002; Prediger et al., 2005a)

4.3. Desenho Experimental

A primeira etapa dos testes consistiu em uma seqüência de experimentos, buscando padronizar o modelo da reserpina nas condições do nosso laboratório, selecionados a fim de detectar possíveis prejuízos olfatórios, cognitivos e motores induzidos pela reserpina (1 ou 5 mg/kg, i.p.). Os experimentos que revelaram resultados estatisticamente significantes foram selecionados para a segunda etapa dos testes, que incluiu a administração sistêmica da cafeína. Os animais foram divididos em seis grupos, baseados nos diferentes pré-tratamentos (controle ou reserpina) e tratamentos (controle ou cafeína): (1) controle/controle; (2) controle/cafeína 3 mg/kg; (3) controle/cafeína 10 mg/kg; (4) reserpina/controle; (5) reserpina/cafeína 3 mg/kg; (6) reserpina/cafeína 10 mg/kg. Cada grupo consistia de 8 a 10 animais, sendo utilizados grupos independentes de animais para os testes olfatórios, cognitivos e motores, totalizando 183 animais utilizados no presente estudo.

4.4. Testes Comportamentais

4.4.1 Campo Aberto

O teste do campo aberto é um dos testes comportamentais mais utilizados no mundo, e foi desenvolvido em 1934 por Calvin Hall. O aparato é feito de madeira impermeável, o chão é branco dividido em 25 quadrantes de 20 x 20 cm cada, totalizando uma superfície de 100 x 100 cm. Em volta de cada lado do quadrado há uma parede branca de 40 cm de altura. A sala onde o teste foi realizado possuía uma iluminação vermelha e uma câmera que filmava o desempenho dos ratos. O observador se localizava fora da sala onde a caixa estava, para que sua presença não fosse percebida pelo animal. Uma televisão mostrava as imagens do campo aberto para que o observador fizesse suas anotações. O início do teste se dá quando o rato é colocado no centro do campo aberto, e a partir deste momento começa a contagem do tempo estabelecido: 5 minutos. Durante este tempo foram contabilizados o número de quadrantes cruzados e o número de vezes que o animal se levantou (“*rearing*”). Estes dados permitiram a avaliação das possíveis alterações locomotoras dos seis grupos.

4.4.2. Caixa de Atividade

A avaliação da atividade locomotora dos ratos foi também realizada em uma caixa de madeira medindo 70 x 30 x 22 cm durante um período de 30 minutos. Esta apresenta três células fotoelétricas instaladas a 3 cm de altura do chão em grade, espaçadas igualmente ao longo de sua extensão e acopladas a um contador digital que registra o número de vezes que o animal interrompe os feixes de luz (cada interrupção do feixe de luz consiste em uma medida de atividade). Assim, somente os movimentos horizontais dos animais foram detectados pelas fotocélulas.

4.4.3. Rota-Rod

A coordenação motora dos animais foi avaliada no teste do rota-rod. O aparelho consiste de uma barra rotacional, que pode girar com velocidade constante ou com aceleração regulável de 1 rpm/s. A barra é dividida em quatro compartimentos, porém apenas um animal foi avaliado por vez. O animal foi posicionado na barra e assim que começou a caminhar, o tempo foi marcado. À medida que o tempo passa, a velocidade da barra aumentava. O tempo em que o animal permaneceu caminhando na barra foi registrado, sendo que o tempo máximo de permanência no aparelho era de 2 minutos. A velocidade em que a barra se encontrava no momento da queda também foi verificada.

4.4.4. Teste do Labirinto Aquático de Morris

O labirinto aquático consiste em um tanque circular de cor preta (1,7 m de diâmetro e 80 cm de altura), baseado no modelo proposto por Morris e colaboradores (1982) e localizado no interior de uma sala com várias pistas visuais fixadas nas paredes. O tanque foi preenchido com água até a altura de 60 cm, sendo a temperatura da água mantida à temperatura constante ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Foram estabelecidas quatro posições de partida (Norte, Sul, Leste e Oeste), que dividiram a superfície do labirinto em quatro quadrantes (Nordeste, Noroeste, Sudeste e Sudoeste). A plataforma utilizada foi de acrílico transparente (10x10cm) e foi submersa 1 cm da superfície da água.

- **Versão memória de procedimento** (com pista visual): uma bola de cor branca (7 cm de diâmetro) foi fixada sobre a superfície superior da plataforma submersa, permitindo que a bola permanecesse visível sobre a superfície da água. Os animais foram submetidos a quatro treinos por dia, durante quatro dias, no labirinto aquático. Em cada treino os animais foram liberados dos quatro pontos de partida diferentes (Norte, Sul, Leste, Oeste) e a plataforma visível foi sendo trocada de posição em cada

treino entre os quatro diferentes quadrantes (Nordeste, Noroeste, Sudeste, Sudoeste). O animal foi liberado para nadar até encontrar a plataforma ou até um tempo máximo de 60 segundos. Caso o animal não encontrasse a plataforma nesse tempo, ele era levado manualmente até a plataforma onde permanecia por 10 segundos. Os tempos de latência até o animal encontrar a plataforma foram registrados. Após os 10 segundos, o animal era retirado da plataforma e colocado em uma caixa fora do labirinto aquático por 20 segundos. Nesse intervalo era efetuada a troca de posição da plataforma para o treino seguinte. A posição de partida e a posição da plataforma foram arranjadas de modo que as distâncias (proximal e distal) fossem contrabalançadas entre os treinos. A reserpina (1 mg/kg, i.p.) foi administrada 24 horas antes dos experimentos, e a cafeína (3 ou 10 mg/kg, i.p.) 15 min antes do início dos treinamentos.

4.4.5. Teste da Esquiva Inibitória do tipo “*step-down*”

A memória aversiva foi avaliada através do modelo de esquiva inibitória (EI). Na tarefa de EI do tipo “*step-down*”, o animal aprende a relacionar a descida de uma plataforma com um leve choque aplicado nas patas. Com isso, numa segunda exposição à caixa de esquiva, o mesmo evita um comportamento inato de descer da plataforma para explorar a caixa. O aprendizado de EI envolve vários estímulos, incluindo percepção espacial e visual, sensibilidade à dor etc., acompanhados de um componente emocional amplamente modulado por hormônios relacionados ao estresse.

O aparelho é constituído por uma caixa medindo 50 cm de comprimento 25 cm de largura e 25 cm de altura. A parte do chão é formada por barras paralelas de metal (1 mm de diâmetro). Os espaços entre as barras medem 1 cm e possui uma plataforma com 7 cm de largura e 2,5 cm de comprimento colocada junto à parede esquerda do aparelho (Izquierdo & Medina, 1991). O animal foi colocado sobre a plataforma e sua latência

para descer sobre a grade (com as quatro patas) foi registrada. Na sessão de treino, imediatamente após o animal descer sobre a grade, ele foi estimulado com um leve choque nas patas (0.4 mA) durante 1 segundo. Cada animal foi re-exposto duas vezes: 1h 30min após o treino para verificar aquisição de memória de curta duração, e 24h após o treino para avaliação de memória de longa duração, realizando-se o mesmo procedimento, mas omitindo-se o choque, sendo registrada a latência para a descida da plataforma. O aprendizado consiste em o animal não descer da plataforma, ou fazê-lo após um período de tempo maior que o observado quando desce a plataforma pela primeira vez (Walz et al., 1999). A reserpina (1 mg/kg, i.p.) foi administrada 24 horas antes dos experimentos, e a cafeína (3 ou 10 mg/kg, i.p.) 15 min antes do treinamento.

4.4.6. Teste de reconhecimento social

O experimento foi realizado utilizando o procedimento descrito por Dantzer e colaboradores (1987) e padronizado em nosso laboratório (Prediger & Takahashi, 2003; Prediger et al., 2004). Para o experimento foram utilizados ratos adultos de 3 meses que foram isolados em caixas de plástico individuais por 7 dias antes do experimento e ratos jovens de 1 mês de idade. O teste de reconhecimento social consiste de duas apresentações sucessivas de 5 minutos cada, sendo que a segunda apresentação é feita depois de um intervalo de tempo de 30 minutos. O animal adulto em sua caixa é apresentado a um animal jovem no dia do experimento, e observou-se o tempo que o animal adulto passou investigando o rato jovem, durante 5 minutos. Por investigar entendem-se os atos de cheirar, lambe, se aproximar, etc., que foram medidos em segundos. Após os 5 minutos, o animal jovem é retirado da caixa, e então o rato adulto fica isolado por 30 minutos, até que é reapresentado ao rato jovem por mais 5 minutos, onde o tempo de investigação é novamente registrado. A diminuição do tempo de

investigação na segunda apresentação demonstra o reconhecimento social, já que reconhecendo o animal jovem, o rato adulto perde o interesse em investigá-lo novamente. Essa diminuição no tempo de investigação não é decorrente da habituação por parte do rato adulto, e sim do reconhecimento, uma vez que quando um rato jovem diferente do que o foi apresentado na primeira exposição é introduzido na caixa, o tempo de investigação não diminui. Além disso, se o intervalo de tempo entre as duas apresentações é estendido por duas horas, o rato adulto perde a capacidade de reconhecer o rato jovem a qual foi primeiramente exposto, não sendo observada uma diferença significativa no comportamento investigatório entre as duas apresentações. (Dantzer et al., 1987; Prediger & Takahashi, 2003; Prediger et al., 2004). Por esta razão, o teste de reconhecimento social vem sendo utilizado como um modelo válido para o estudo da memória olfatória de curta duração, sendo que um intervalo reduzido (30 minutos) entre as duas apresentações ao rato jovem é utilizado para demonstrar possíveis efeitos “amnésicos” de diferentes drogas e procedimentos (Dantzer et al., 1987; Prediger & Takahashi, 2003; Prediger et al., 2004). A reserpina (1 mg/kg, i.p.) foi administrada 24 horas antes dos experimentos, e a cafeína (3 ou 10 mg/kg, i.p.) 15 min antes da primeira apresentação do rato jovem.

4.4.7. Teste de discriminação olfatória

A capacidade de discriminar odores foi avaliada através do teste de discriminação olfatória, previamente descrito por Soffié e Lamberty (1988) e recentemente adaptado por Prediger e colaboradores (2005a,b). Os animais foram isolados em caixas de plástico contendo serragem, 48 horas antes do início dos testes, para que seu odor pudesse impregná-la. A caixa utilizada para a tarefa de discriminação olfatória consiste de dois compartimentos iguais (30 x 30 x 20) separados por uma porta

aberta que permite a circulação dos animais em ambos os compartimentos. No dia do teste, cada compartimento é preenchido com serragem, um deles com a serragem pertencente à caixa do animal contendo o seu cheiro, e a outra com serragem limpa e inodora. Então, o animal era colocado nesta caixa, onde era observado por 5 minutos. O tempo que o animal gastou investigando cada um dos compartimentos foi mensurado (em segundos). O teste se baseia na preferência inata do rato por locais impregnados por seu próprio cheiro, como mostraram estudos prévios (Carr et al., 1976; Prediger et al., 2005a, b). A reserpina (1 mg/kg, i.p.) foi administrada 24 antes dos experimentos, e a cafeína (3 ou 10 mg/kg, i.p.) 15 min antes da exposição a caixa de discriminação olfatória.

4.5. Análise Estatística

Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (e.p.m.). As comparações estatísticas dos resultados foram realizadas por análise de variância (ANOVA), em uma (fase de padronização) ou duas vias (tratamento e fator de repetição como variáveis independentes) adequadas ao protocolo experimental. Posteriormente, os grupos foram comparados entre si, empregando-se o teste *post-hoc* de Newman-Keuls. A probabilidade aceita como indicativo da existência de diferença estatisticamente significativa foi de $P \leq 0.05$. Todas as comparações estatísticas foram efetuadas utilizando-se o pacote estatístico *Statistic 5.0*.

O tempo de latência no teste de esquiva inibitória do tipo *step-down* não obedece a uma distribuição normal e não preenche completamente a suposição de homocedasticidade com a imposição de um teto de 180 segundos para o tempo de latência de retenção. Dessa forma, para análise dos dados contínuos de distribuição não normal realizamos uma análise não paramétrica onde são demonstradas as medianas

(intervalo interquartis) das latências de descida da plataforma e analisados através do teste Kruskal-Walis seguido do teste *post hoc* de Dunn, dependendo no número de grupos estudados através do Graph Pad Prism 4® GraphPad Software Inc. Para comparação dos tempos de latência de descida da sessão treino versus o teste (medidas dependentes) envolvendo o mesmo animal, foram analisadas pelo teste da soma de postos de Wilcoxon, um teste não paramétrico equivalente ao teste T pareado.

5. RESULTADOS

5.1. Efeitos da reserpina sobre a função motora dos animais

Como pode ser observado na Figura 1, os ratos tratados com reserpina na dose de 1 mg/kg (i.p) não apresentaram prejuízos motores nos testes campo aberto (Fig. 1A,B) ou caixa de atividade (Fig. 1C.). Por outro lado, na dose de 5 mg/kg (i.p.), foi observada uma redução significativa ($P \leq 0.05$) no número de cruzamentos e atos de levantar no campo aberto (Fig. 1A e Fig. 1B, respectivamente), e no número de cruzamentos na caixa de atividade (Fig. 1C).

Os resultados obtidos no teste do rota-rod são ilustrados na Figura. 2. Como pode ser observado, não foram verificadas diferenças significativas no desempenho dos animais tratados com a solução controle em comparação aos animais tratados com a maior dose testada de reserpina (5 mg/kg i.p), indicando que a reserpina na presente dose, não foi capaz de causar prejuízos na realização desta tarefa (Fig. 2).

A partir destes resultados, foram selecionados a dose de 5 mg/kg (i.p.) de reserpina e o teste do campo aberto para posterior avaliação dos efeitos da administração da cafeína sobre os prejuízos motores induzidos pela reserpina em ratos. Além disso, a menor dose de reserpina testada (1 mg/kg, i.p.) foi selecionada para investigar possíveis alterações nas funções olfatória e cognitivas, uma vez que esta dose não interferiu com a função motora dos animais.

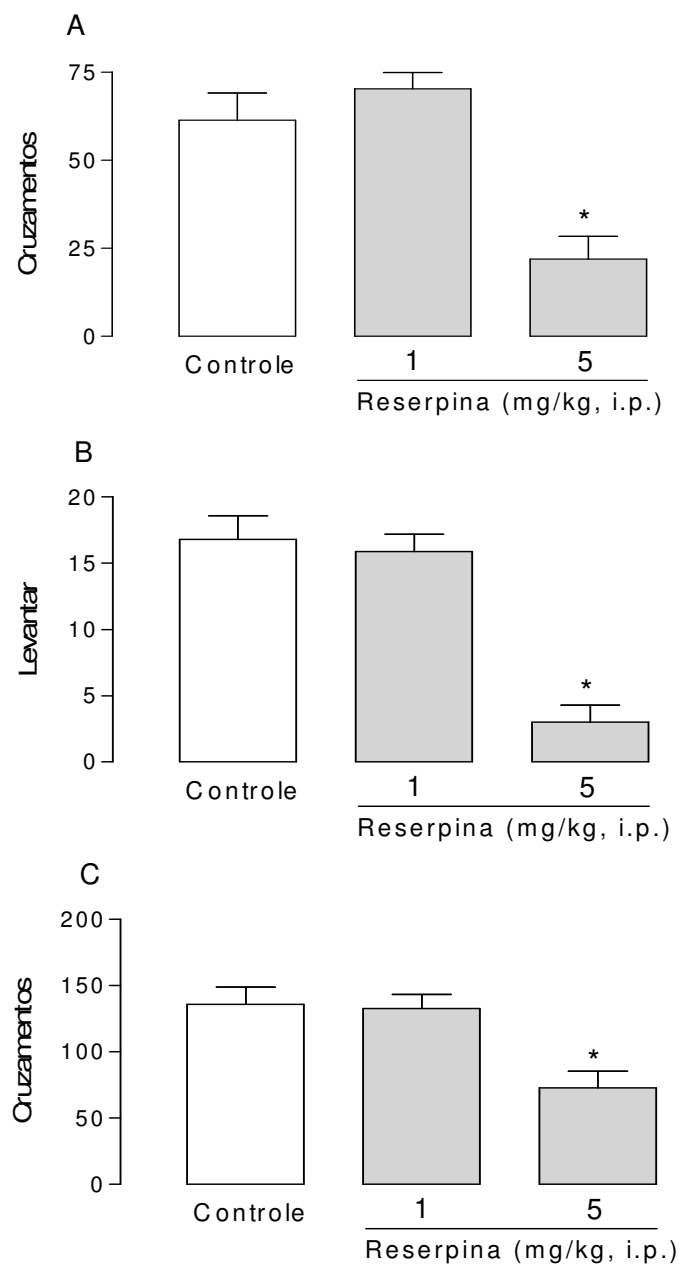


Figura 1. Efeito do tratamento com reserpina (1 ou 5 mg/kg, i.p.) ou solução controle (i.p.) (24 horas antes dos experimentos) nos parâmetros comportamentais de ratos testados no campo aberto (A-cruzamentos, B-atos de levanta) (5 min) e caixa de atividade (C-cruzamentos) (30 min). Os valores são expressos pela média \pm E.P.M. de 8-10 animais por grupo. * $P \leq 0.05$ comparado ao grupo controle (Teste de Newman-Keuls).

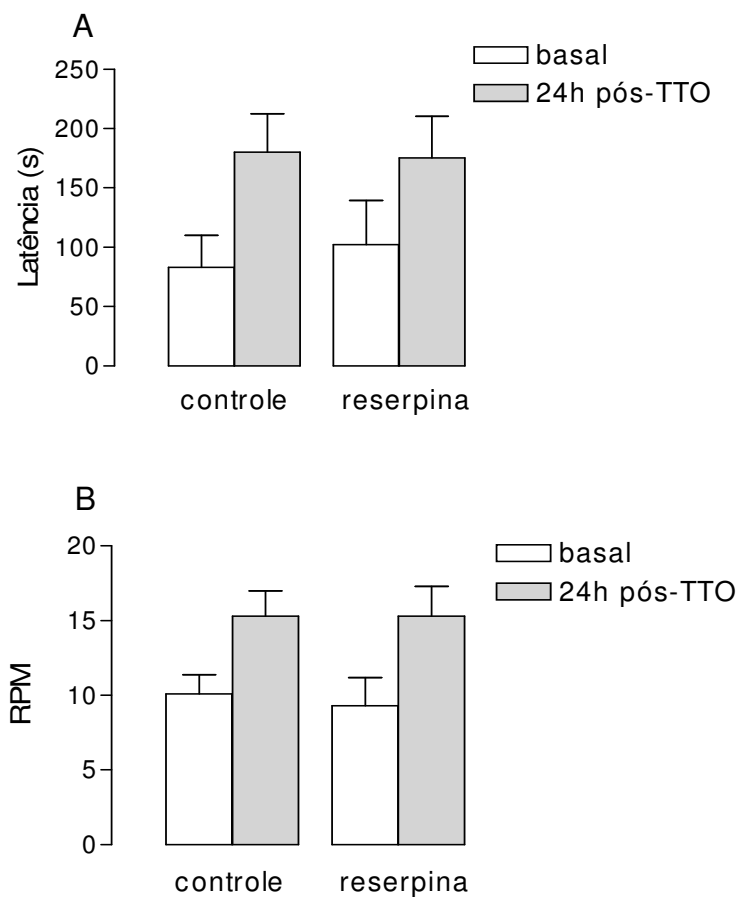


Figura 2. Efeito do tratamento com reserpina (5 mg/kg, i.p.) ou solução controle (i.p.) (24 horas antes dos experimentos) nos parâmetros comportamentais de ratos testados no rota-rod. Os valores são expressos pela média \pm E.P.M. da latência (A) e velocidade (RPM) de queda (n=8-10 animais por grupo).

5.2. Efeitos da reserpina sobre a função olfatória dos animais

A Figura 3 mostra os resultados dos efeitos da administração de reserpina (1 mg/kg, i.p.) sobre a discriminação olfatória de ratos adultos. Como esperado, os animais tratados com a solução controle (i.p.) apresentaram um bom desempenho nessa tarefa, sendo capazes de discriminar o ambiente familiar do ambiente não-familiar, passando um tempo significativamente maior no compartimento familiar (impregnado com o seu próprio odor). Entretanto, os ratos que receberam reserpina (1 mg/kg i.p) apresentaram um prejuízo na discriminação olfatória, não sendo capazes de distinguir os dois compartimentos, passando tempos semelhantes nos dois ambientes.

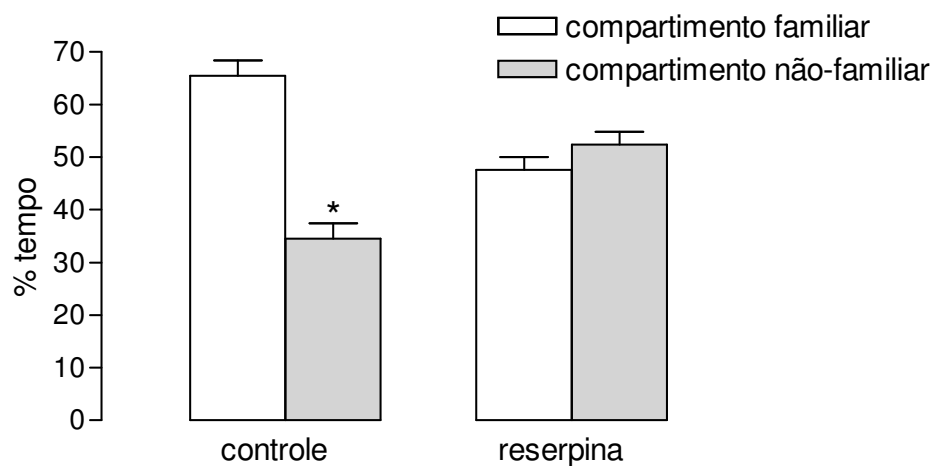


Figura 3. Efeito do tratamento com reserpina (1 mg/kg, i.p.) ou solução controle (i.p.) (24 horas antes dos experimentos) na discriminação olfatória de ratos. As barras representam a porcentagem do tempo (média \pm E.P.M.) gasto em cada um dos compartimentos (n= 8 animais por grupo). * $P \leq 0.05$ comparado a % do tempo gasto no compartimento familiar (Teste de Newman-Keuls).

5.3. Efeitos da reserpina sobre a função cognitiva dos animais

No teste de memória social, utilizado como um modelo válido para o estudo da memória operacional de roedores, os resultados obtidos demonstram que os animais tratados com reserpina (1 mg/kg i.p.) não foram capazes de reconhecer os animais jovens a que foram previamente apresentados (30 min antes). Como pode ser observado na Figura 4A,B, os animais tratados com a solução controle ou reserpina apresentaram tempos de investigação semelhantes durante a primeira apresentação dos animais jovens.

Na segunda exposição, o tempo de investigação dos animais controle diminuiu significativamente quando o mesmo animal jovem foi reapresentado, enquanto os ratos tratados com reserpina investigaram o rato jovem de maneira semelhante à primeira exposição (Fig.4A). Estes resultados parecem estar associados a um prejuízo específico na memória social dos animais tratados com reserpina, uma vez que quando um animal jovem diferente do utilizado na primeira exposição foi apresentado ao rato adulto, não foi observada uma redução significativa no tempo de investigação, independente do tratamento (Fig. 4B).

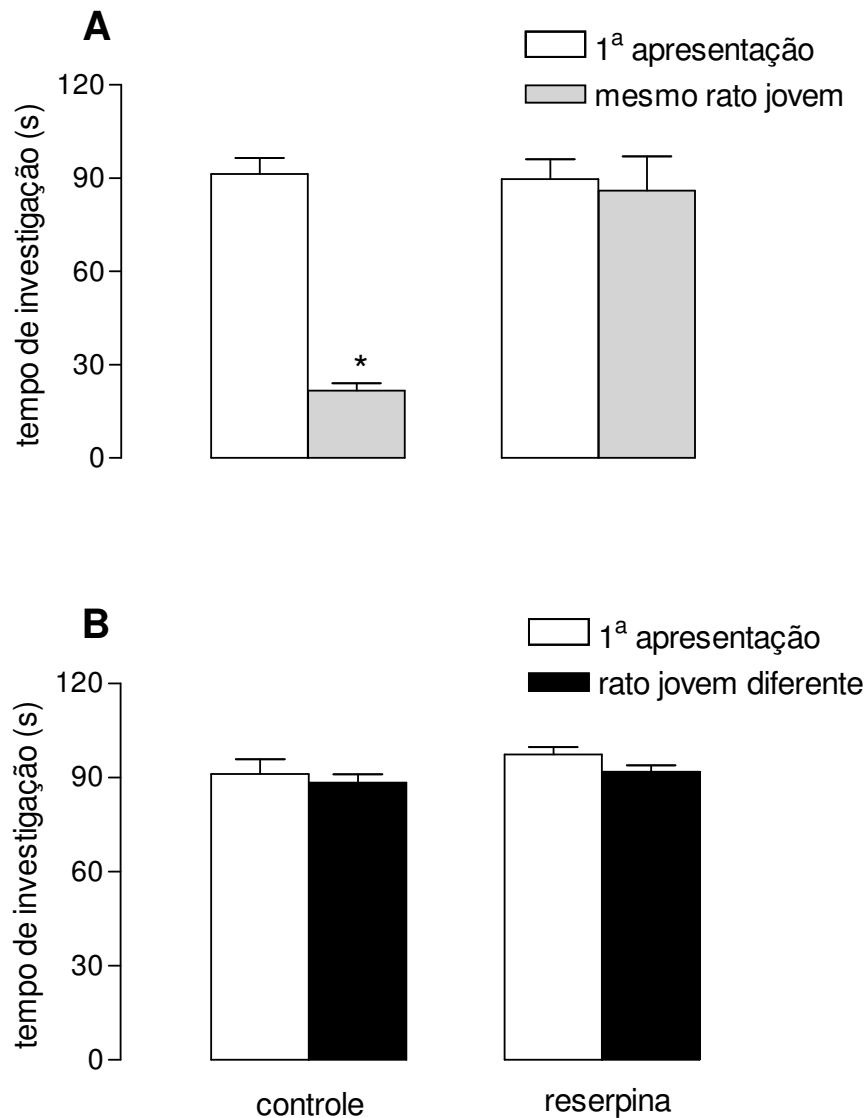


Figura 4. Efeito do tratamento com reserpina (1 mg/kg, i.p.) ou solução controle (i.p.) (24 horas antes dos experimentos) no tempo de investigação quando o mesmo rato jovem (A) ou um rato jovem diferente (B) daquele utilizado durante a 1^a apresentação foi exposto ao rato adulto após um intervalo de 30 min. As barras representam o tempo de investigação (média \pm E.P.M.) de 8 animais por grupo. * $P \leq 0.05$ comparado ao tempo de investigação gasto durante a 1^a apresentação do rato jovem do mesmo grupo (Teste de Newman-Keuls).

A Figura 5 ilustra os resultados do efeito da administração de reserpina (1 mg/kg, i.p.) sobre a memória de procedimento dos animais avaliada através do teste do labirinto aquático de Morris. Os resultados obtidos indicam que ambos os grupos apresentaram curvas características de aprendizagem ao longo dos quatro dias de treino, verificando-se uma redução progressiva nas latências para encontrar a plataforma. Entretanto, os animais que receberam reserpina apresentaram latências significativamente maiores (2^a – 4^a sessões) para encontrar a plataforma, indicando que a reserpina causou um prejuízo no desempenho da tarefa de memória de procedimento (Fig. 5).

Por outro lado, como ilustrado na Figura 6, a reserpina (1 mg/kg,i.p.) não prejudicou a memória espacial dos animais, avaliada através da esquiiva inibitória do tipo “*step-down*”. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos no tempo de latência para descer da plataforma. Ambos os grupos aprenderam a tarefa, apresentando um aumento significativo na latência de descida durante os testes em relação ao dia do treino (Fig. 6).

Em conjunto, os resultados obtidos indicam que o tratamento com reserpina (1 mg/kg, i.p.) promoveu um prejuízo nas memórias operacional e de procedimento dos animais, sem alterar a memória espacial destes.

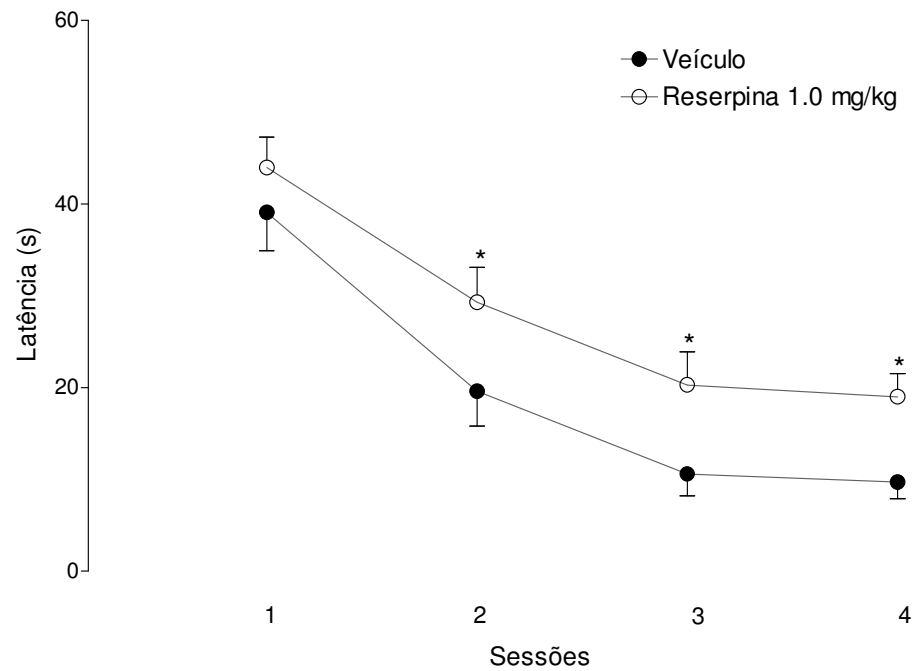


Figura 5. Efeito do tratamento com reserpina (1 mg/kg, i.p.) ou solução controle (i.p.) (24 horas antes dos experimentos) sobre o desempenho dos animais na versão de memória de procedimento do labirinto aquático. Os valores são expressos pela latência para encontrar a plataforma (média \pm E.P.M.) de 7-8 animais por grupo. $*P \leq 0.05$ comparado ao grupo controle (Teste de Newman-Keuls).

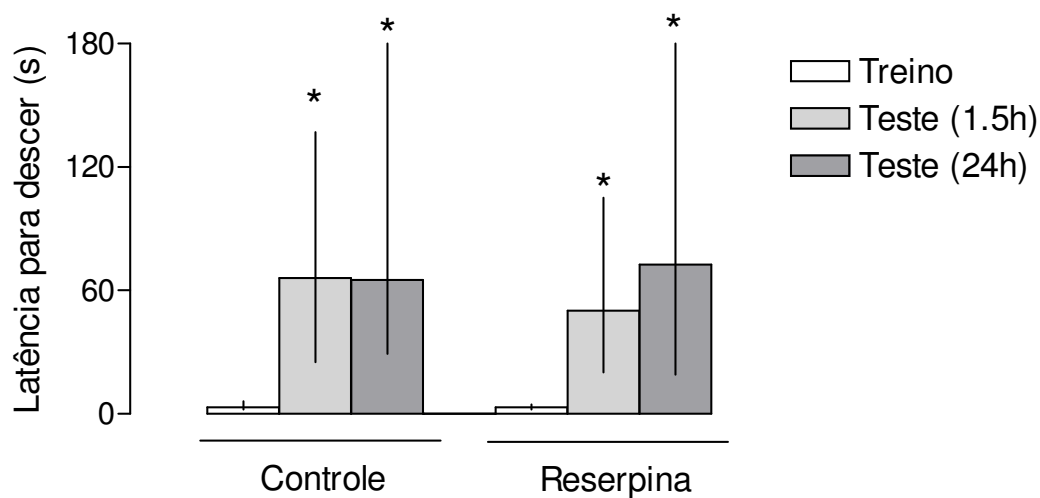


Figura 6. Efeito do tratamento com reserpina (1 mg/kg, i.p.) ou solução controle (i.p.) (24 horas antes dos experimentos) sobre a retenção de memória de curto (1.5 h) e longo prazo (24 h) no teste de esquiva inibitória do tipo *step-down*. Os dados são demonstrados como mediana (intervalos interquartis) dos tempos de latência para descida da plataforma nas seções de treino (branco) e teste (cinza) (n = mínimo de 9 animais por grupo). As comparações estatísticas foram analisadas através do teste de Kruskal–Wallis seguidas pelo teste de Wilcoxon. $*P \leq 0.05$ comparado as sessões de treino e teste no mesmo grupo.

5.4. Efeitos da administração aguda de cafeína sobre os prejuízos da função olfatória induzida pela reserpina em ratos

A Figura 7 ilustra os efeitos da administração aguda de cafeína (3 ou 10 mg/kg, i.p.) sobre a discriminação olfatória de ratos previamente tratados com reserpina (1 mg/kg i.p.). Reforçando os resultados obtidos durante a fase de padronização, o grupo previamente tratado com reserpina (24 h antes) e que recebeu a injeção i.p. da solução controle 15 min antes dos experimentos não foi capaz de discriminar o ambiente familiar do ambiente não-familiar, permanecendo tempos semelhantes nos compartimentos durante os 5 minutos de teste. De maneira semelhante, os animais tratados com reserpina e cafeína (3 mg/kg, i.p.), também não foram capazes de discriminar os compartimentos, indicando que a cafeína nesta dose não foi capaz de reverter os prejuízos olfatórios causados pela reserpina. Entretanto, quando administrada na dose de 10 mg/kg (i.p.), a cafeína reverteu os prejuízos olfatórios induzidos pela reserpina, sendo que os animais permaneceram um tempo significativamente maior no compartimento familiar (impregnado com o seu odor) (Fig. 7).

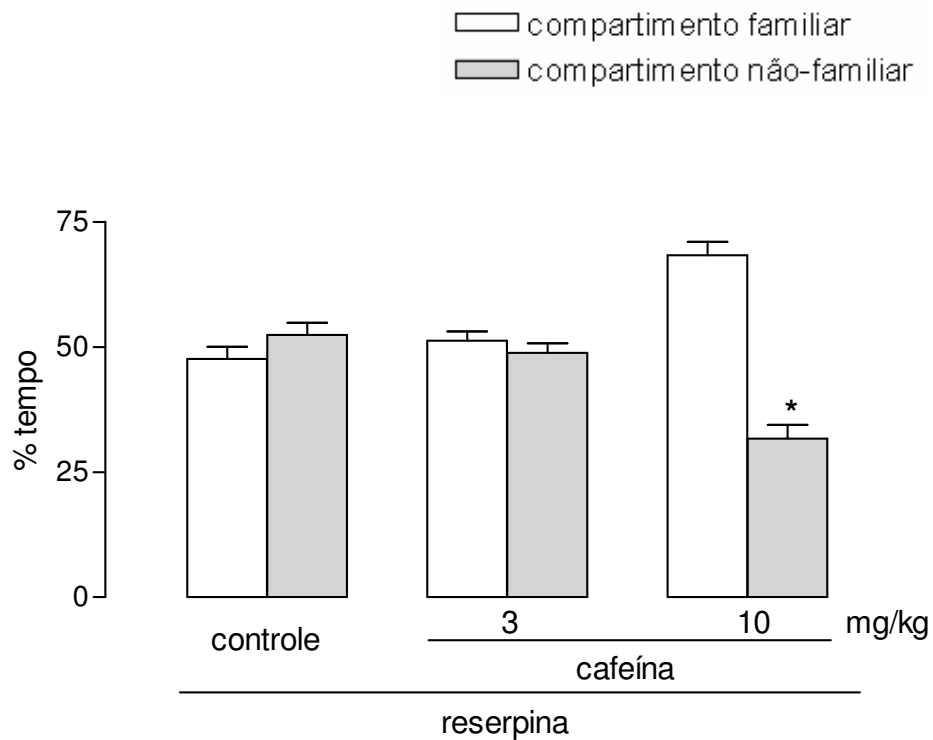


Figura 7. Efeito do tratamento (15 min antes dos experimentos) com cafeína (3 ou 10 mg/kg, i.p.) na discriminação olfatória de ratos previamente tratados com reserpina (1 mg/kg, i.p.) 24 horas antes dos experimentos. As barras representam a porcentagem do tempo (média \pm E.P.M.) gasto em cada um dos compartimentos (n=7-8 animais por grupo). * $P \leq 0.05$ comparado a % do tempo gasto no compartimento familiar do respectivo grupo (Teste de Newman-Keuls).

5.5. Efeitos da administração aguda de cafeína sobre os prejuízos da função cognitiva induzida pela reserpina em ratos

Na Figura 8 é possível observar os efeitos do tratamento agudo com a cafeína (3 ou 10 mg/kg, i.p.) sobre o tempo de investigação social de ratos adultos previamente tratados (24 h antes) com reserpina (1 mg/kg, i.p.). Novamente confirmando os resultados obtidos durante a fase de padronização, os animais que receberam reserpina e solução controle apresentaram um significativo déficit na memória social, não sendo capazes de reconhecer o animal jovem durante a segunda apresentação. De maneira interessante, o tratamento agudo com cafeína (nas duas doses testadas) promoveu uma redução significativa no tempo de investigação durante a 2^a apresentação do rato jovem familiar (Fig. 8A). Estes resultados da cafeína parecem ser específicos sobre a memória social de ratos, uma vez que a redução no tempo de investigação não foi observada quando um rato jovem diferente daquele utilizado durante o 1^o encontro foi apresentado na 2^a exposição (Fig. 8B).

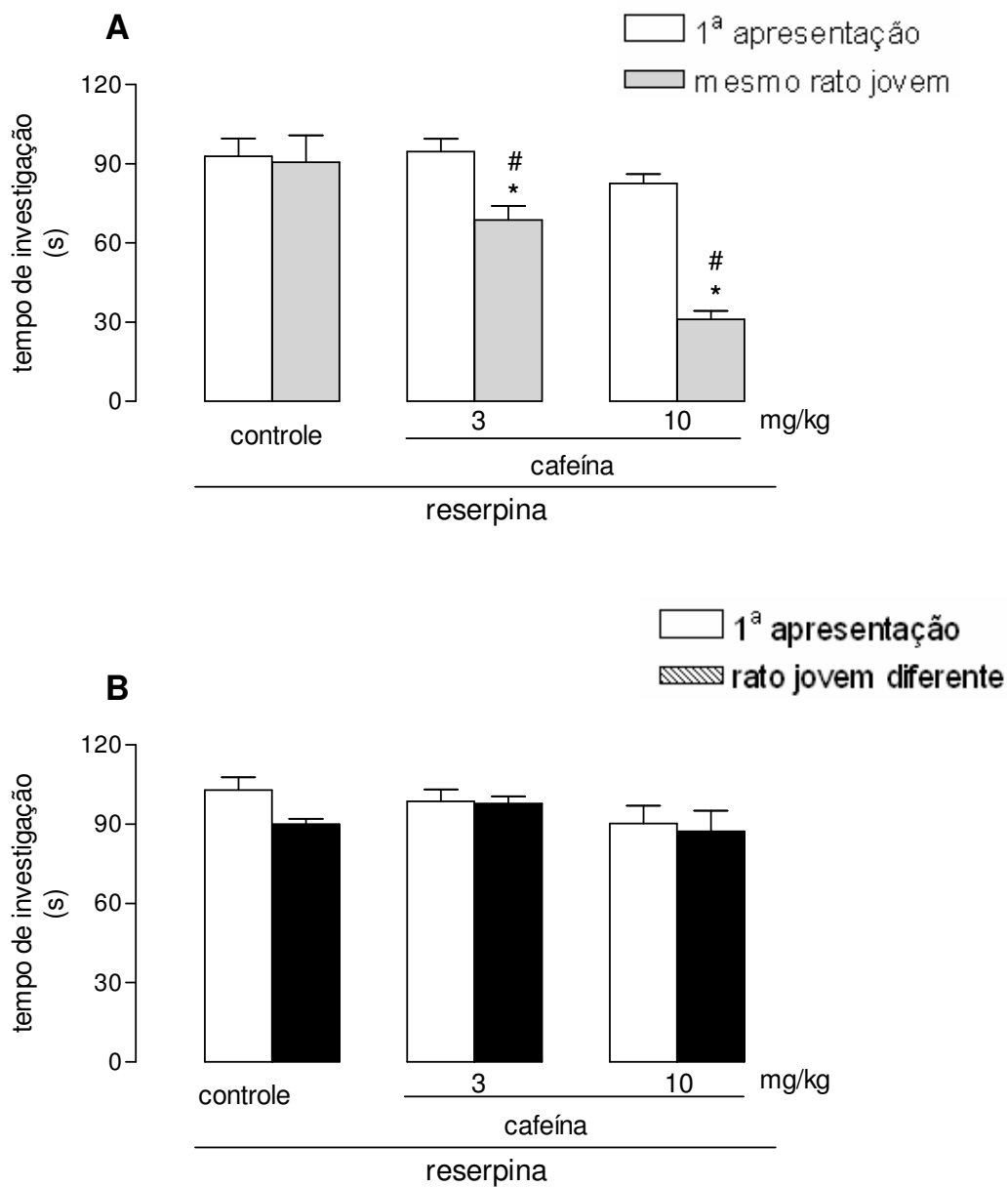


Figura 8. Efeito do tratamento agudo (15 min antes dos experimentos) com cafeína (3 ou 10 mg/kg, i.p.) no tempo de investigação de ratos adultos previamente (24 h) tratados com reserpina (1 mg/kg, i.p.) quando o mesmo rato jovem (A) ou um rato jovem diferente (B) foi apresentado ao rato adulto após um intervalo de 30 min. As barras representam o tempo de investigação (média \pm E.P.M.) de 7-9 animais por grupo. * $P \leq 0.05$ comparado ao tempo de investigação gasto durante a 1ª apresentação do rato jovem do mesmo grupo. # $P \leq 0.05$ comparado ao tempo de investigação gasto durante a 2ª apresentação do rato jovem do grupo controle (Teste de Newman-Keuls).

A Figura 9 mostra os resultados obtidos no teste do labirinto aquático, versão memória de procedimento. Os valores do gráfico são expressos pelo tempo (em segundos) que o animal demora a encontrar a plataforma (latência). É possível visualizar a curva de aprendizagem em todos os 6 grupos, indicando que os animais aprenderam a tarefa, independente do tratamento. Porém, a análise estatística efetuada pela ANOVA de duas vias (tratamento x fator de repetição) mostra que há uma diferença significativa na latência dos animais tratados somente com reserpina (1 mg/kg i.p.). O teste post-hoc de Newman-Keuls indicou que o grupo tratado com reserpina e solução controle apresentou latências significativamente maiores (3^a e 4^a sessões) para encontrar a plataforma em comparação aos demais grupos (Fig. 9). Estes resultados indicam que a administração aguda de cafeína (das duas doses testadas) foi capaz de reverter os prejuízos na memória de procedimento induzidas pela reserpina em ratos.

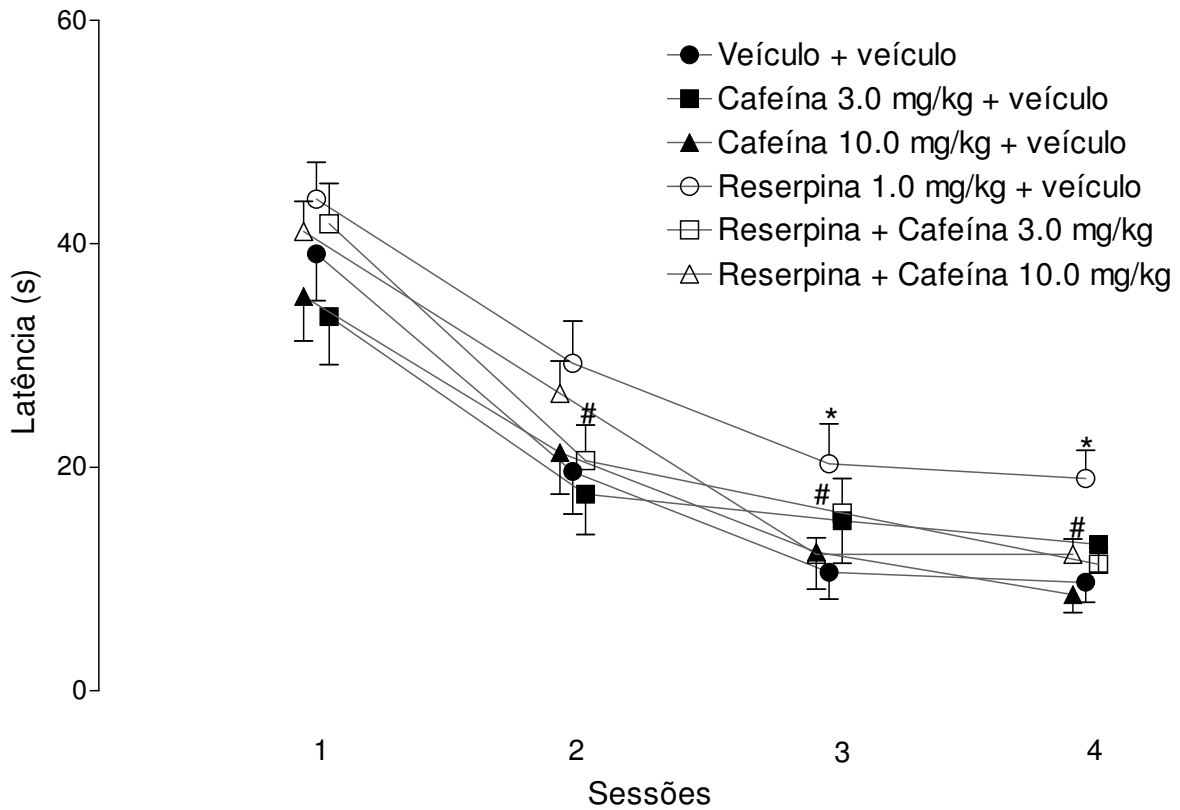


Figura 9. Efeito do tratamento agudo (15 min antes dos experimentos) com cafeína (3 ou 10 mg/kg, i.p.) sobre o desempenho de ratos previamente (24 h) tratados com reserpina (1 mg/kg, i.p.) na versão de memória de procedimento do labirinto aquático de Morris. Os valores são expressos pela latência para encontrar a plataforma (média \pm E.P.M.) de 7-8 animais por grupo. * $P \leq 0.05$ comparado ao grupo veículo + veículo. # $P \leq 0.05$ comparado ao grupo reserpina + veículo (Teste de Newman-Keuls).

5.6. Efeitos da administração aguda de cafeína sobre os prejuízos da função motora induzida pela reserpina em ratos

Os resultados dos efeitos da administração aguda de cafeína (3 ou 10 mg/kg, i.p.) sobre os prejuízos motores induzidos pelo pré-tratamento com reserpina (5 mg/kg, i.p.) avaliados no teste do campo aberto são ilustrados na Figura 10. Replicando os resultados da etapa de padronização, os animais que receberam reserpina e solução controle apresentaram uma redução significativa no número de cruzamentos no campo aberto. Nenhuma das doses testadas de cafeína foi capaz de reverter este prejuízo motor induzido pela reserpina (Fig. 10A). Por outro lado, contrastando dos resultados obtidos durante a etapa de padronização, a reserpina não alterou o número de atos de levantar (“*rearing*”) no teste do campo aberto, sendo que a administração de cafeína também não alterou este parâmetro (Fig. 10B).

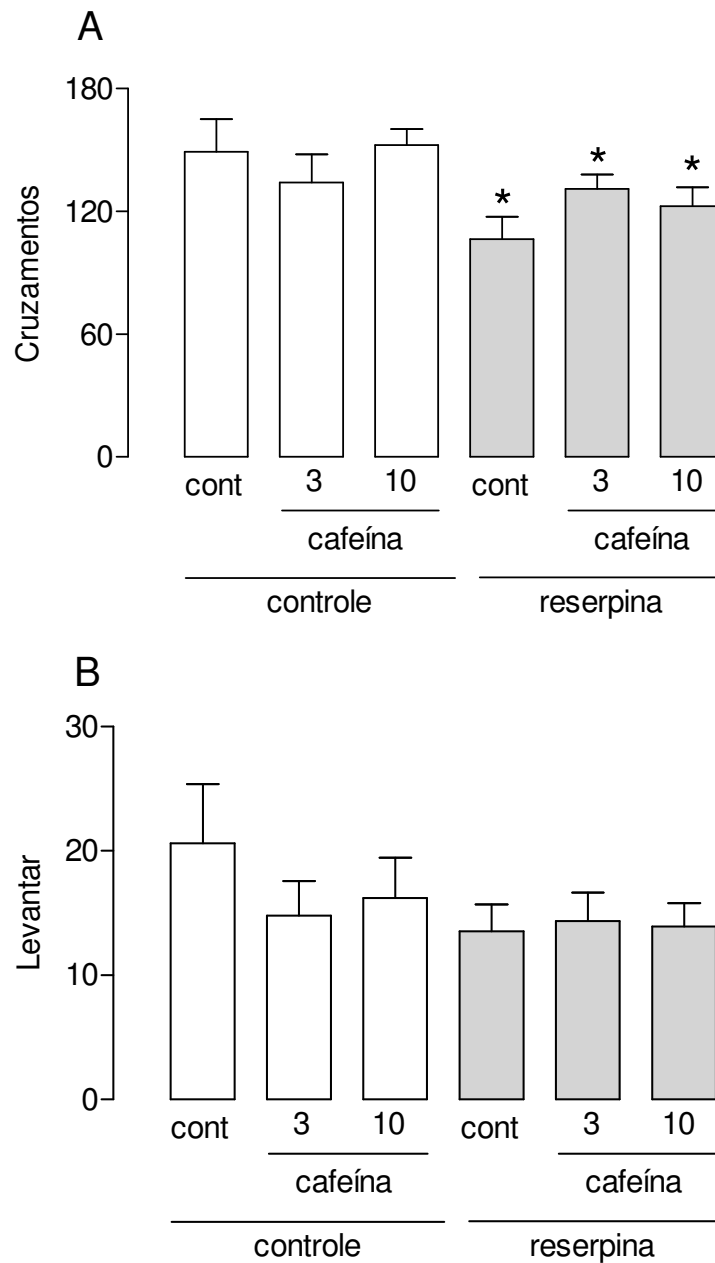


Figura 10. Efeito do tratamento (30 min antes dos experimentos) com cafeína (3 ou 10 mg/kg, i.p.) sobre o desempenho de ratos previamente (24 h) tratados com reserpina (5 mg/kg, i.p.) avaliados no teste do campo aberto (5 min). Os valores são expressos pela média \pm E.P.M. do número de cruzamentos (A) e atos de levantar (B) de 8-10 animais por grupo. * $P \leq 0.05$ comparado ao grupo controle (Teste de Newman-Keuls).

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que administração i.p. de reserpina na dose de 5 mg/kg é capaz de promover prejuízos motores, sendo estes verificados pela redução dos parâmetros do teste do campo aberto e caixa de atividades. Embora na menor dose testada (1 mg/kg, i.p.), a reserpina não altere a função motora dos animais, ela é capaz de causar danos cognitivos específicos, relacionados às memórias do tipo procedural e operacional, como examinado nos testes labirinto aquático de Morris e memória social, respectivamente. Nesta mesma dose, observou-se um efeito prejudicial da reserpina sobre a discriminação olfatória em ratos. De maneira interessante, os resultados do presente estudo indicam ainda a propriedade da cafeína em reverter os danos cognitivos e olfatórios induzidos pela reserpina em ratos, não interagindo em contrapartida com os sintomas motores.

A administração de reserpina em roedores tem sido proposta como um modelo experimental para o estudo dos sintomas motores (Carlsson, 1975; Colpaert, 1987), cognitivos (Alves et al, 2000; Prediger et al., 2005 b) e depressivos (Skalisz et al, 2002) associados à DP. A alta afinidade da reserpina pelos transportadores vesiculares de monoaminas (VMAT) faz com que haja o acoplamento desta droga ao VMAT impedindo a ligação de outras monoaminas a este sítio. Isso impossibilita a liberação das monoaminas da célula para as sinapses, pelo processo de exocitose, prejudicando então as atividades dependentes dessas substâncias. No caso deste modelo, a interrupção da transmissão dopaminérgica, acaba por danificar as funções motoras, cognitivas e olfatórias, dependendo da concentração da droga (Colpaert 1987; Gerlach & Riederer, 1996).

Para os testes motores, foram utilizadas duas doses de reserpina (1 e 5 mg/kg, i.p.). A dose de 1 mg/kg foi utilizada para verificar sua capacidade de induzir algum tipo de prejuízo motor, já que esta dose foi posteriormente utilizada em testes cognitivos que exigem um desempenho motor satisfatório. Corroborando com resultados prévios da literatura (Prediger et al., 2005 b), os resultados obtidos no presente estudo no teste campo aberto demonstraram que não há redução significativa na locomoção dos animais que receberam a dose de 1 mg/kg, confirmando a inexistência de dano motor. Entretanto, quando a dose de 5 mg/kg foi avaliada neste mesmo teste, os resultados demonstraram uma diminuição significativa do número de cruzamentos e atos de levantar no campo aberto em relação ao grupo controle e ao grupo reserpina 1 mg/kg, indicando o prejuízo motor nesta dose de 5 mg/kg. Utilizou-se então a caixa de atividades para confirmar essa hipótese. Durante os 30 minutos que o animal permaneceu dentro da caixa, sua locomoção foi mensurada e os resultados mostraram diminuição da atividade locomotora na dose de 5 mg/kg, enquanto a dose de 1 mg/kg não prejudicou a atividade dos animais. Assumindo-se que a DA é um neurotransmissor muito importante para o bom funcionamento das funções motoras do animal é possível que o prejuízo motor observado neste estudo seja consequência da depleção de dopamina nos gânglios da base (Marsden, 2006). Não foi observado prejuízo motor da dose de 1 mg/kg nos testes da caixa de atividades e campo aberto, provavelmente pela quantidade de monoaminas depletada por esta baixa dose de reserpina não ter sido suficiente para causar os mesmos danos observados na dose de 5 mg/kg. Esses resultados estão de acordo com o observado em humanos, pois na DP, os danos motores só se manifestam quando aproximadamente 60-70% dos neurônios da substância negra encontram-se degenerados e os níveis de DA são reduzidos em 70-80% nessa mesma região (Lindner et al. 1999). O último teste motor realizado foi o do rota-rod, e nele a

reserpina parece não ter causado nenhuma alteração, uma vez que os animais tratados com reserpina na dose de 5 mg/kg não mostraram uma diferença significativa na latência para cair da roda em relação aos animais controle. Neste teste não foi utilizada a dose de 1 mg/kg, devido seu uso nos testes locomotores prévios, que nos permitiram concluir que a reserpina em baixas concentrações não causa danos motores. Esses resultados contrastam com os resultados até então obtidos, que mostraram um prejuízo motor causado pela reserpina na dose de 5 mg/kg. Neste sentido, é importante ser ressaltado que embora os três testes serem considerados motores, os testes do campo aberto e da caixa de atividades exigem uma locomoção simples e horizontal, a qual o rato está acostumado a realizar. A tarefa envolvida no teste do rota-rod associa a coordenação motora, que está bastante associada com outras áreas do cérebro, como o cerebelo, com fatores cognitivos, visto que o animal é exposto duas vezes ao mesmo paradigma (Gasbarri et al., 2003). Como o cerebelo não é uma área tão acometida na DP em humanos, talvez a reserpina não tenha conseguido danificar suas funções, sendo essa uma hipótese para explicar o sucesso de ratos tratados com reserpina ao executar essa atividade.

Na segunda etapa dos testes, utilizou-se somente o teste do campo aberto para avaliar o efeito da cafeína nos prejuízos motores observados. Esse teste foi escolhido devido a sua ampla utilização como teste motor, além de sua capacidade de mensurar a atividade vertical do animal, o que não ocorre na caixa de atividades, onde só a locomoção horizontal é detectada. A cafeína foi utilizada nas doses de 3 e 10 mg/kg, 15 minutos antes do início dos testes. Os resultados obtidos demonstraram que nenhuma das doses foi capaz de reverter os danos motores induzidos pela reserpina, já que os grupos tratados com ela não aumentaram significativamente o número de cruzamentos, comparados aos animais tratados somente com a reserpina. A locomoção vertical

exploratória, não sofreu nenhum prejuízo. A impossibilidade de reverter os prejuízos motores utilizando a cafeína pode ter ocorrido pelo fato da cafeína não possuir qualidades terapêuticas suficientes para recuperar os danos causados pelo efeito da alta dose de reserpina utilizada. A dose de 5 mg/kg deve provocar uma depleção drástica de dopamina nos gânglios da base, o que prejudica o sistema motor, altamente dependente deste neurotransmissor. Apesar de não ter melhorado significativamente os prejuízos, é possível observar um leve aumento do número de cruzamentos dos ratos tratados com a cafeína, sugerindo haver alguma propriedade terapêutica, e se associada a outras drogas talvez a cafeína sinergicamente possibilitasse uma melhora significativa na locomoção dos animais. Estudos prévios reforçam essa hipótese, mostrando que quando associada a drogas específicas, a cafeína restaura as atividades motoras e exploratórias em ratos tratados com reserpina (Moo-Puc et al., 2004) Contrastando com nossos resultados, alguns trabalhos da literatura haviam mostrado uma melhora nas atividades motoras de animais submetidos a diferentes modelos animais de DP, quando tratados com a cafeína. Chen e colaboradores (2001) mostraram um efeito neuroprotetor da cafeína em ratos tratados com MPTP, uma vez que animais pré-tratados com cafeína que posteriormente receberam MPTP apresentaram melhor desempenho motor em relação aos ratos que só receberam MPTP. A cafeína também parece melhorar as funções motoras de animais tratados com 6-OHDA (Aguiar et al., 2006). Uma possível explicação para esta discrepância com resultados prévios da literatura é que, ao contrário dos outros trabalhos em que a cafeína foi administrada antes da injeção das toxinas (MPTO ou 6-OHDA), no presente estudo buscamos avaliar o efeito terapêutico (e não preventivo) da cafeína sobre a função motora dos animais injetados com reserpina. Além disso, são necessários experimentos adicionais com outros regimes de

tratamentos (doses, tempos, etc) para descartarmos completamente um efeito da cafeína sobre a atividade motora de animais reserpinizados.

Além dos prejuízos motores apresentados pelos indivíduos acometidos pela DP, há também um comprometimento nas funções olfatórias. Há pelo menos 30 anos tem se observado uma deficiência na percepção, discriminação e reconhecimento de odores, porém esses sintomas foram pouco explorados pelos clínicos especializados na área. Hoje já se sabe que este sintoma pode ter uma grande importância na detecção precoce da doença, já que é um dos primeiros sintomas a ser apresentado, porém ainda faltam recursos capazes de mensurar especificamente esse comprometimento olfatório em pacientes parkinsonianos, visto que a olfação pode ser prejudicada por diversos fatores, como o envelhecimento, tabagismo, etc. O bulbo olfatório de mamíferos contém um grande número de interneurônios dopaminérgicos que são muito importantes no processamento de odores (Halasz et al., 1977; Halasz & Shepherd, 1983; Doty & Rissler, 1989; Davila et al., 2003).

O teste de discriminação olfatória utilizado, adaptado das descrições prévias feitas por Soffié e Lamberty (1988) e recentemente modificado em nosso laboratório (Prediger et al., 2005a,b), baseia-se na preferência de ratos adultos em permanecer em ambientes impregnados com seu cheiro (ambiente familiar) em detrimento de ambientes inodoros ou com cheiros desconhecidos (ambiente não-familiar) (Carr et al., 1976). A administração aguda de reserpina (1 mg/kg, i.p.) induziu um prejuízo significativo na discriminação olfatória dos animais, uma vez que eles não conseguiram reconhecer o ambiente familiar, pois exploraram ambos os ambientes de maneira semelhante. Reforçando estes resultados, estudos prévios em roedores têm demonstrado um prejuízo nas funções olfatórias em consequência de tratamentos que reduzem a neurotransmissão dopaminérgica, como MPTP (Dluzen & Kreutzberg, 1993, Prediger et al., 2006) e

reserpina (Prediger et al., 2004). A DA parece ser também importante para os processos de aprendizado e memória olfatória, uma vez que seus níveis cerebrais aumentam durante o aprendizado olfatório (Kendrick et al., 1988; Coopersmith et al., 1991; Keverne et al., 1993), sendo que a depleção de DA ou a administração de antagonistas dopaminérgicos prejudicam a memória olfatória (Weldon et al., 1991; Dluzen e Kreutzberg, 1993; Prediger et al., 2004).

No presente estudo, foram realizados três testes cognitivos, o teste de reconhecimento social, labirinto aquático e esQUIVA inibitória do tipo “*step-down*”, abordando três tipos diferentes de memória, a memória operacional, procedural e espacial, respectivamente. No teste de memória social, os resultados mostram que ratos adultos tratados com reserpina (1 mg/kg, i.p.) apresentaram um prejuízo na capacidade de reconhecer um rato jovem, quando este foi re-apresentado após um curto intervalo de tempo (30 minutos), sugerindo um prejuízo na memória social. O teste de reconhecimento social é um modelo de memória olfatória de curta duração que pode ser facilitada por drogas que melhoram os processos de aprendizado e memória (Perio et al., 1989; Terranova et al., 1996; Prediger et al., 2005b), e prejudicada por processos fisiopatológicos (como isquemia, envelhecimento, etc) que sabidamente interferem com os processos de aprendizado e memória (Terranova et al., 1994, Prediger et al., 2005a). Os presentes resultados estão de acordo com trabalhos prévios da literatura, indicando a importância das monoaminas na memória social de ratos, já que existem evidências que áreas do cérebro envolvidas nos mecanismos de alguns tipos de memórias são bastante inervadas por neurônios dopaminérgicos (Baulac et al., 1986; Seamans et al., 1998). A memória operacional ou de trabalho cumpre o papel de gerenciadora de nosso contato com a realidade, mantendo as informações por alguns segundos, no máximo de um a dois minutos, variando de instante a instante. Este tipo de memória utiliza poucas vias

nervosas, não deixa traços neuroquímicos ou comportamentais e não produz arquivos de registro (Izquierdo, 2002). Vários trabalhos sugerem que a principal área funcional cerebral relacionada à memória operacional é o córtex pré-frontal (Baddeley, 1986; Goldman-Rakic et al., 1990). Segundo Williams (1995), déficits de memória operacional são encontrados em pacientes com a DP e estes têm sido relacionados a uma deficiência na função do córtex pré-frontal acompanhada de redução de DA nesta região. A redução da atividade dopaminérgica no estriado e no lobo frontal na DP pode provocar prejuízo na memória operacional (Stebbins et al., 1999). Os receptores dopaminérgicos D1 contribuem na função cognitiva por atuação direta em áreas da memória em neurônios pré-frontais, tendo participação na memória operacional (Williams, 1995). É interessante ressaltar, que o prejuízo observado neste teste pode ter sido causado por danos no sistema olfatório do animal. Como mostrado anteriormente, no teste de discriminação olfatória, a reserpina na mesma dose utilizada neste teste (1 mg/kg) prejudicou a capacidade do animal de discernir o ambiente familiar, o que revela o déficit olfatório. O teste de memória social é altamente dependente da olfação, já que o animal depende dela para reconhecer ou não o animal mais jovem. Tendo isto em mente, não é possível inferir se o comprometimento na atividade de memória social induzido pela reserpina foi causado por danos olfatórios, cognitivos ou por uma associação de danos nos dois sistemas.

A memória procedural foi avaliada no teste do labirinto aquático de Morris. Nossos resultados mostram que os animais tratados com a reserpina na dose de 1 mg/kg tiveram mais dificuldade em aprender a tarefa do que os ratos controle. Esses resultados refletem a importância da presença de DA na formação deste tipo de memória, que provavelmente foi depletada em quantidades significativas, resultando em uma alteração no aprendizado. A memória procedural ou de procedimento pode ser definida como a

aquisição gradual de uma habilidade motora ou cognitiva através de regular exposição a um procedimento específico. A aquisição é implícita, isto é, ocorre sem a percepção, e a memória é refletida através da redução do tempo de resposta e dos erros durante a execução repetida do procedimento (Dujardin & Laurent, 2003). A formação da memória de procedimento depende da integridade do sistema dopaminérgico da via nigroestriatal, já que é uma parte do cérebro bastante inervada por neurônios dopaminérgicos. No presente trabalho, o prejuízo observado neste tipo de memória, está de acordo com a literatura, onde vários autores já mostraram um prejuízo na memória implícita de animais lesados e submetidos ao teste do labirinto aquático (Packard & White, 1990; Packard & Teather, 1998).

Por fim, avaliamos o desempenho dos animais no teste da esquiiva inibitória do tipo “*step-down*”, a fim de detectar possíveis alterações na memória espacial dos ratos tratados com reserpina na dose de 1 mg/kg. Os resultados mostraram que os ratos tratados com reserpina não apresentaram dificuldades neste tipo de aprendizado, já que seu desempenho foi similar ao dos ratos controle. Ainda existem divergências com relação aos tipos de memórias prejudicadas na doença de Parkinson. Vários estudos têm demonstrado que tanto as memórias implícitas (Bondi e Kaszniak, 1991; Ferraro et al., 1993; Roncacci et al., 1996), quanto às memórias operacionais (Dubois & Pillon, 1997; Stebbins et al., 1999), encontram-se prejudicadas, enquanto memórias declarativas estariam mais preservadas na DP (Flowers et al., 1984; Knowlton et al., 1996; Dubois & Pillon, 1997). Este resultado está de acordo com trabalhos prévios da literatura que sugerem não haver danos na memória espacial de ratos submetidos a modelos experimentais da DP (Packard & White, 1990; Packard & McGaugh, 1992), provavelmente porque a área do cérebro responsável por este tipo de memória, o hipocampo, possui pouca inervação de neurônios dopaminérgicos.

A observação de alterações nas funções olfatórias e cognitivas em ratos tratados com reserpina na dose de 1 mg/kg parece coerente, já que estes sintomas são os primeiros a serem observados em pacientes da DP (Coopersmith et al., 1991; Owen et al., 1992). Com isso, é possível inferir que os sintomas cognitivos e olfatórios aparecem antes dos níveis de dopamina estarem drasticamente reduzidos, e no caso deste modelo experimental, uma dose mais baixa de reserpina foi capaz de simular esses sintomas, enquanto foi necessária uma dose maior (5 mg/kg) para provocar alterações motoras.

Apesar do grande número de trabalhos relatando os diferentes efeitos farmacológicos e comportamentais da cafeína, o envolvimento da cafeína e dos receptores adenosinérgicos em funções olfatórias tem sido praticamente ignorado. Resultados recentes obtidos em nosso laboratório têm indicado que a adenosina parece modular a memória social em ratos através da ativação dos receptores A1 e A2A, com agonistas e antagonistas dos receptores para adenosina, respectivamente, prejudicando e facilitando a memória social (Prediger & Takahashi, 2005).

No presente estudo, o teste de discriminação olfatória mostrou que a administração aguda de cafeína na dose de 10 mg/kg reverteu os prejuízos olfatórios induzidos pela reserpina, já que o grupo que recebeu a cafeína passou mais tempo investigando o compartimento familiar em comparação ao o grupo tratado apenas com reserpina. Porém, quando tratados na dose de 3 mg/kg, os animais não conseguiram reconhecer o ambiente familiar do não-familiar, já que passaram tempos semelhantes em ambos os compartimentos, o que revela que a cafeína nesta dose não pôde reverter os sintomas induzidos pela reserpina. Esses resultados mostram a importância da aplicação de doses diferentes da mesma droga em um estudo, para que se possa estabelecer a dose satisfatória para determinado tratamento. No caso destes resultados foi preciso uma concentração mais alta de cafeína (10 mg/kg) para amenizar os

prejuízos olfatórios conseqüentes da administração de reserpina. Os mecanismos pela qual a cafeína ameniza os sintomas olfatórios ainda não são bem compreendidos, porém, trabalhos de diferentes grupos de pesquisa têm demonstrado uma elevada expressão dos receptores A2A para adenosina (Kaelin-Lang et al., 1999) e D2 para dopamina (Coronas et al., 1997) no bulbo olfatório de ratos. Além disso, Hadfield (1997) demonstrou que a cafeína, através do bloqueio dos receptores A2A, é capaz de modular a liberação de diferentes neurotransmissores (incluindo a dopamina) no bulbo olfatório de roedores. Desta forma, uma possível co-localização e interação antagônica entre os receptores A2A/D2 no bulbo olfatório, de maneira semelhante ao observado no estriado, pode ser responsável pelo efeito somatório observado pela administração da cafeína na dose de 10 mg/kg na discriminação olfatória de ratos.

Vários trabalhos têm demonstrado que a cafeína melhora as funções cognitivas avaliadas em diferentes modelos de aprendizagem e memória em animais (Castellano, 1996; Angelucci et al., 1999) Os resultados dos testes cognitivos aqui observados reforçam o potencial terapêutico da cafeína na amenização dos sintomas cognitivos induzidos pela reserpina. Ambas as doses de cafeína administradas foram capazes de atenuar significativamente os prejuízos na memória social de ratos tratados com reserpina (1mg/kg), já que os grupos que receberam cafeína conseguiram reconhecer o rato jovem quando lhes reapresentados. Os efeitos benéficos da cafeína também foram observados em ratos pré-tratados com reserpina, que melhoraram seu desempenho no labirinto aquático depois do tratamento. Os grupos tratados com cafeína nas doses de 3 mg/kg e 10 mg/kg apresentaram um desempenho semelhante ao grupo controle e significativamente melhor que os animais tratados somente com reserpina, já que estes tiveram reduzido o tempo de latência para encontrar a plataforma.

O potencial da cafeína e de antagonistas seletivos dos receptores A2A para adenosina no tratamento da DP tem sido demonstrado em estudos realizados em humanos (Hellenbrand et al., 1996; Fall et al., 1999; Ross et al., 2000; Ascherio et al., 2001; Tan et al., 2003) e animais de laboratório (Svenningsson et al., 1999; Hauber et al., 2001; Chen et al., 2001; Gevaerd et al., 2001). Estes estudos sugerem que a cafeína pode estar associada a um menor risco no desenvolvimento futuro da DP (Fall et al., 1999; Tan et al., 2003), bem como redução na perda de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal (Chen et al., 2001) em modelos animais da DP. Diversos estudos têm demonstrado que a adenosina apresenta efeitos opostos aos da DA no SNC. Quando a cafeína se liga ao receptor adenosinérgico (A2A), ocorre uma atração deste receptor a um receptor dopaminérgico adjacente, havendo a ligação física entre eles, o que resulta em uma estrutura chamada heterodímero. Estudos prévios demonstraram a existência deste fenômeno especificamente nos receptores adenosinérgicos/dopaminérgicos (Fuxe et al., 1998; Ferre et al., 2007). Esta ligação resulta em uma cascata de reações que irão estimular os receptores dopaminérgicos, modulando as atividades dependentes de DA (Fuxe et al., 1998; Ferre et al., 2007). Uma descoberta chave neste processo é a co-localização dos receptores D1/A1 e D2/A2A no estriado, inicialmente observado em ratos (Ferre et al., 1991), mas posteriormente também descrito em humanos (Diaz-Cabiale et al., 2001).

Em conclusão, os resultados do presente estudo confirmam o uso da reserpina como um bom modelo animal para a doença de Parkinson, já que foi possível observar prejuízos motores, olfatórios e prejuízos nas memórias do tipo procedural e operacional. Nossos resultados também reforçam o potencial terapêutico da cafeína na DP, uma vez que sua administração aguda foi capaz de reverter os déficits cognitivos e olfatórios induzidos pela reserpina em ratos, porém falhou em aliviar os sintomas motores.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, L.M.; NOBRE, H.V; MACEDO, D.S.; OLIVEIRA, A.A; FREITAS, R.M.; VASCONCELOS, S.M; CUNHA, G.M; SOUSA, F.C; VIANA, G.S. Neuroprotective effects of caffeine in the model of 6-hydroxydopamine lesion in rats. **Pharmacol Biochem Behav.**, 84(3):415-9, 2006

ANGELUCCI, M.E.M; VITAL, M.A.B.F.; CESÁRIO, C., ZADUSKY, C.A.; ROSALEN, P.L.; DA CUNHA, C. The effect of caffeine in animal models of learning and memory. **Eur. J. Pharmacol.**, 373: 135-140; 1999

ALVES, C.S.D.; ANDREATINI, R.; DA CUNHA, C.; TUFIK, S.; VITAL, M.A.B.F. Phosphatidylserine reverses reserpine-induced amnesia. **Eur. J. Pharmacol.**, 404: 161–167, 2000.

ASCHERIO, A.; ZHANG, S.M.; HERNAN, M.A.; KAWACHI, I.; COLDITZ, G.A.; SPEIZER, F.E.; WILLETT, W.C. Prospective study of caffeine consumption and risk of Parkinson's disease in men and women. **Ann. Neurol.**, 50: 56–63, 2001.

BADDELEY, A.D. **Working memory**. Oxford University Press, Oxford, 1986.

BARRIO, J.R.; HUANG, S.C.; PHELPS, M.E. Biological imaging and molecular basis of dopaminergic disease. **Biochem. Pharmacol.**, 54: 341–348, 1997.

BAULAC, M.; VERNEY, C.; BERGER, B. Dopamine innervation of the parahippocampal and hippocampal regions in the rat. **Rev. Neurol.**, 142: 895-905, 1986.

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

BECKER, G.; MULLER, A.; BRAUNE, S.; BUTTNER, T.; BENECKE, R.; GREULICH, W.; KLEIN, W.; MARK, G.; RIEKE, J.; THUMLER, R. Early diagnosis of Parkinson's disease. **J. Neurol.**, 249 (Suppl. 3): 40-48, 2002.

BEZARD, E.; IMBERT, C.; DELOIRE, X.; BIOULAC, B.; GROSS, C.E. A chronic MPTP model reproducing the slow evolution of Parkinson's disease: Evolution of motor symptoms in the monkey. **Brain Res.**, 766: 107-112, 1997.

BLANDINI, F.; NAPPI, G.; TASSORELLI, C.; MARTIGNONI, E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. **Prog. Neurobiol.**, 62: 63 – 88, 2000.

BONDI, M.W., KASZNIAK, A.W. Implicit and explicit memory in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **J. Clin. Exp. Neuropsychol.**, 13: 339-358, 1991.

BRAAK H, GHEBREMEDHIN E, RUB U, BRATZEK H, DEL TREDICI K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. **Cell Tissue Res.**, 318: 121-134, 2004.

BREYSSE, N.; BAUNEZ, C.; SPOOREN, W.; GASPARINI, F.; AMALRIC, M. Chronic but not acute treatment with a metabotropic glutamate 5 receptor antagonist reverses the akinetic deficits in a rat model of parkinsonism **J. Neurosci.**, 22(13), 5669-5678, 2002

CARLSSON, A. Monoamine-depleting drugs. **Pharmacol. Ther.**, 1: 393–400, 1975.

CARR, W.J.; YEE, L.; GABLE, D.; MARASCO, E. Olfactory recognition of conspecifics by domestic Norway rats. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, 90: 821–828, 1976.

CASTELLANO, C.; CABIB, S.; PUGLISIALLEGRA, S. Psychopharmacology of memory modulation: Evidence for multiple interaction among neurotransmitters and hormones, **Behav Brain. Res.**, 77: 1-21, 1996

CHEN, J.F.; XU, K.; PETZER, J.P.; STAAL, R.; XU, Y.H.; BEILSTEIN, M.; SONSALLA, P.K.; CASTAGNOLI, K.; CASTAGNOLI JR., N.; CHWARZSCHILD, M.A. Neuroprotection by caffeine and A2A adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. **J. Neurosci.**, 21: RC143, 2001.

COLPAERT, F.C. Pharmacological characteristics of tremor, rigidity and hypokinesia induced by reserpine in rats. **Neuropharmacology**, 26: 1431–1440, 1987.

COOPERSMITH, R.; WEIHMULLER, F.B.; KIRSTEIN, C.L.; MARSHALL, J.F.; LEON, M. Extracellular dopamine increase in neonatal olfactory bulb during odor preference training. **Brain Res.**, 564: 149–153, 1991.

CORONAS, V.; SRIVASTAVA, L.K.; LIANG, J.J.; JOURDAN, F.; MOYSE, E. Identification and localization of dopamine receptor subtype in rat olfactory mucosa and

bulb: a combined in situ hybridization and ligand binding radioautographic approach. **J. Chem. Neuroanat.**, 12: 243–257, 1997.

COSTA, A.; PEPPE, A.; DELL'AGNELLO, G.; CARLESIMO, G.A.; MURRI, L., BONUCCELLI, U.; CALTAGIRONE, C. Dopaminergic modulation of visuospatial working memory in Parkinson's disease. **Dement. Geriatr. Cogn. Disord.**, 15: 55–66, 2003.

CRUCIAN, G.P.; OKUN, M.S. Visual-spatial ability in Parkinson's disease. **Front. Biosci.**, 8: s992–997, 2003.

CUMMINGS, J.L. Depression and Parkinson's disease: a review. **Am. J. Psychiatry**, 49: 443–454, 1992.

DANIEL, S.E.; HAWKES, C.H. Preliminary diagnosis of Parkinson's disease using olfactory bulb pathology. **Lancet**, 18: 186, 1992.

DANTZER, R.; BLUTHE, R.M.; KOOB, G.F.; LE MOAL, M. Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides. **Psychopharmacology**, 91: 363–368, 1987.

DAVILA, N.G.; BLAKEMORE, L.J.; TROMBLEY, P.Q. Dopamine modulates synaptic transmission between rat olfactory bulb neurons in culture. **J. Neurophysiol.**, 90: 395–404, 2003.

DIAZ-CABIALE, Z.; HURD, Y.; GUIDOLIN, D.; FINNMAN, U.B.; ZOLI, M.; AGNATI, L.F.; VANDERHAEGHEN, J.J.; FUXE, K.; FERRE, S. Adenosine A2A agonist CGS 21680 decreases the affinity of dopamine D2 receptors for dopamine in human striatum. **NeuroReport**, 12: 1831–1834, 2001.

DLUZEN, D.E.; KREUTZBERG, J.D. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) disrupts social memory/recognition processes in the male mouse. **Brain Res.**, 609: 98–102, 1993.

DOTY, R.L.; SHAMAN, P.; DANN, M. Development of the University of Pennsylvania Smell Identification Test: a standardized microencapsulated test of olfactory function. **Physiol. Behav.**, 32: 489–502, 1984.

DOTY, R.L.; DEEMS, D.; STELLAR, S. Olfactory dysfunction in Parkinson's disease:

A general deficit unrelated to neurologic signs, disease state, or disease duration. **Neurology**, 38: 1237–1244, 1988.

DOTY, R.L.; RISSER, J.M. Influence of the D2 dopamine receptor agonist quinpirole on the odor detection performance of rat before and after spiperone administration. **Psychopharmacology**, 98: 310–315, 1989.

DOTY, R.L.; BROMLEY, S.M.; STERN, M. Olfactory testing as an aid in the diagnosis of Parkinson's disease: development of optimal discrimination criteria. **Neurodegeneration**, 4: 93–97, 1995.

DUBOIS, B.; PILLON, B. Cognitive deficits in Parkinson's disease. **J. Neurol.**, 244: 2–8, 1997.

DUJARDIN, K.; LAURENT, B. Dysfunction of the human memory systems: role of the dopaminergic transmission. **Curr Opin Neurol.** 2:s11-6 Review, 2003

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

FAGLIONI, P.; BOTTI, C.; SCARPA, M.; FERRARI, V.; SAETTI, M.C. Learning and forgetting processes in Parkinson's disease: a model-based approach to disentangling storage, retention and retrieval contributions. **Neuropsychologia**, 35: 767-769, 1997.

FALL, P.A.; FREDRIKSON, M.; AXELSON, O.; GRANERUS, A.K. Nutritional and occupational factors influencing the risk of Parkinson's disease: a case-control study in southeastern Sweden. **Mov. Disord.**, 14: 28-37, 1999.

FERRARO, F.R.; BALOTA, D.A.; CONNOR, L.T. Implicit memory and the formation of new association in nondemented Parkinson's disease individuals and individuals with senile dementia of the Alzheimer type: a serial reaction time (SRT) investigation. **Brain Cogn.**, 21: 163-180, 1993.

FERRE, S.; FREDHOLM, B.B.; MOELLI, M.; POPOLI, P.; FUXE, K. Adenosinedopamine eceptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. **Trends Neurosci.**, 20: 482-487, 1997.

FERRE, S.; POPOLI, P.; GIMÉNEZ-LLORT, L.; RIMONDINI, R.; MÜLLER, C.E.; STRÖMBERG, I.; OGREN, S.O.; FUXE, K. Adenosine/dopamine interaction:

implications for the treatment of Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat. Disord.**, 7: 235-241, 2001.

FERRE, S.; CIRUELA, F.; QUIROZ, C.; LUIÁN, R.; POPOLI, P.; CUNHA, RA.; AGNATI, L.F.; FUXE, L.; WOODS, A.S.; LLUIS, C.; FRANCO, R. Adenosine receptor heteromers and their integrative role in striatal function. **ScientificWorldJournal.**, 2;7:48-57, 2007

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

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

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

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

GASBARRI, A.; POMPILI, A.; PACITTI, C.; CICIRATA F. Comparative effects of lesions to the ponto-cerebellar and olivo-cerebellar pathways on motor and spatial learning in the rat. **Neuroscience**, 116(4):1131-40, 2003

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

GEVAERD, M.S.; TAKAHASHI, R.N.; DA CUNHA, C. Caffeine reverses the memory disruption induced by intra-nigral MPTP-injection in rats. **Brain Res. Bull.**, 55: 101-106, 2001

GOLDMANN-RAKIC, P.S.; FUNAHASHI, S.; BRUCE, C.J. Neocortical memory circuit. **Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology**, v.55, p. 1025-1038, 1990.

- HADFIELD, M.G. Caffeine and the olfactory bulb. **Mol. Neurobiol.**, 15: 31–39, 1997.
- HAGAN, J.J.; MIDDLEMISS, D.N.; SHARPE, P.C.; POSTE, G.H. Parkinson's disease: prospects for improved drug therapy. **Trends Pharmacol. Sci.**, 18: 156-163, 1997.
- HALASZ, N.; LJUNDGAHL, A.; HÖKFELT, T.; JOHANSSON, O.; GOLDSTEIN, M.; PARK, D.; BIBERFIELD, P. Transmitter histochemistry of the rat olfactory bulb. I. Immunohistochemical localization of monoamine synthesizing enzymes. Support for intrabulbar, periglomerular dopamine neurons. **Brain Res.**, 126: 455–474, 1977.
- HALASZ, N.; SHEPHERD, G.M. Neurochemistry of the vertebrate olfactory bulb. **Neuroscience**, 10: 759–619, 1983.
- HALL, C. S. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, p. 385-403, 1934.
- HARRRISON, P.J.; PEARSON, R.C.A. Environmental toxins and Parkinson's disease. **Trends. Neurosci.**, 12: 182, 1989.
- HAUBER, W.; NEUSCHELER, P.; NAGEL, J.; MULLER, C.E. Catalepsy induced by a blockade of dopamine D1 or D2 receptors was reversed by a concomitant blockade of adenosine A2A receptors in the caudate-putamen of rats. **J. Neurosci.**, 14: 1287– 1293, 2001.
- HAWKES, C.H.; SHEPHARD, B.C.; DANIEL, S.E. Olfactory dysfunction in Parkinson's disease. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, 62: 436-446, 1997.
- HAWKES, C.H.; SHEPHARD, B.C.; DANIEL, S.E. Is Parkinson's disease a primary olfactory disorder? **Q. J. Med.**, 92: 473-480, 1999.
- HELLENBRAND, W.; SEIDLER, A.; BOEING, H.; ROBRA, B.P.; VIEREGGE, P.; NISCHAN, P.; JOERG, J.; OERTEL, W.H.; SCHNEIDER, E.; ULM, G. Diet and Parkinson's disease. I: a possible role for the past intake of specific foods and food groups. Results from a self-administered food-frequency questionnaire in a casecontrol study. **Neurology**, 47: 636–643, 1996.
- HORNYKIEWICZ, O. Parkinson's disease and its chemotherapy. **Biochem. Pharmacol.**, 24: 1061-1065, 1975

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

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. GABA A receptor modulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines. **Trends. Pharmacol. Sci.**, 12: 260-265, 1991.

IZQUIERDO, I. **Memória**. Editora Artmed, Porto Alegre, 2002.

JELLINGER, K.A. Pathology of Parkinson's syndrome. In: CALNE, D.B. (ed). **Handbook of experimental pharmacology**, vol. 88. Springer, New York, pp. 47- 112, 1988.

KAELIN-LANG, A.; LAUTERBURG, T.; BURGUNDER, J.M. Expression of adenosine A2A receptor genes in the olfactory bulb and spinal cord of rat and mouse. **Neurosci. Lett.**, 261: 189-191, 1999.

KENDRICK, K.M.; KEVERNE, E.B.; CHAPMAN, C.; BALDWIN, B.A. Intracranial dialysis measurement of oxytocin, monoamine and uric acid release from the olfactory bulb and substantia nigra of sheep during parturition, suckling, separation from lambs and eating. **Brain Res.**, 439: 1-10, 1988

KEVERNE, E.B.; LEVY, F.; GHEVARA-GUZMAN, R.; KENDRICK, K.M. Influence of birth and maternal experience on olfactory bulb neurotransmitter release. **Neuroscience**, 56: 557-565, 1993.

KNOWLTON, B.J.; MANGELS, J.A.; SQUIRE, L.R. A neostriatal habit learning system in humans. **Science**, 273: 1399-1402, 1996.

KORCZYN, AD. Parkinson's disease. In: BLOOM, F.E.; KUPFER, D.J. (ed). **Psychopharmacology: the fourth generation of progress**. Raven Press, New York, pp. 1479-1484, 1995.

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

LIMONGI, J.C.P. Doença de Parkinson: Aspectos diagnósticos. In: Congresso Neuropsiquiatria dos gânglios da base. Protoc, HCFMUSP, São Paulo. **Anais**. v.1, p. 194-195, 1995

LINDNER, M.D.; CAIN, C.K.; PLONE, M.A.; FRYDEL, B.R.; BLANEY, T.J.; EMERICH, D.F.; HOANE, M.R. Incomplete nigrostriatal dopaminergic cell loss and partial reductions in striatal dopamine produce akinesia, rigidity, tremor and cognitive deficits in middle-aged rats. **Behav. Brain Res.**, 102: 1-16, 1999.

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

MARSDEN, C., Dopamine: the rewarding yearsarsden, **British Journal of Pharmacology**, 147, S136-S144, 2006

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

MENZAGHI, F.; WHELAN, K.T.; RISBROUGH, V.B.; RAO, T.S.; LLOYD, G.K. Interactions between a novel cholinergic ion channel agonist SIB-1765F and LDOPA in the reserpine model of Parkinson's disease in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 280: 393-401, 1997.

MIGUEL, E.C; RAUCH, S.L.; LECKMAN, J.F. **Neuropsiquiatria dos Gânglios da Base**. São Paulo: Lemos Editorial, 1998.

MILNER, B.; SQUIRE, L.R.; KANDEL, E.R. Cognitive neuroscience and the study of memory. **Neuron**, 20: 445-468, 1998.

MOO-PUC, R.E., VILLANUEVA-TOLEDO, J.; ARANKOWSKY-SANDOVAL, G.; ALVAREZ-CERVERA, F.; GONGORA-ALFARO, J.L. Treatment with subthreshold doses of caffeine plus trihexyphenidyl fully restores locomotion and exploratory activity in reserpinized rats. **Neurosci. Lett.**, 367: 327-331, 2004.

MORRIS, R.G.M.; GARRUD, P.; RAWLINS, J.N.P.; O'KEEFE, J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature**, 297: 681-683, 1982.

OBESO, J.A.; RODRIGUEZ-OROZ, M.C.; RODRIGUEZ, M.;LANCIEGO, J.L.;ARTIEDA, J.; GONZALO, N.; OLANOW, C.W. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. **Trends Neurosci.**, (Suppl.), 23: S8-S19, 2000.

OWEN, A.M.; SAHAKIAN, B.J.; HODGES, J.R.; SUMMERS, B.A.; POLKEY, C.E.;

ROBINS, T.W. Dopamine-dependent frontostriatal planning in early Parkinson's disease. **Neuropsychology**, 9: 126–140, 1995.

PACKARD, M.G.; WHITE, N.M. Lesions of the caudate nucleus selectively impair "reference memory" acquisition in the radial maze. **Behavioral and Neural Biology**, v.53, p.39-50, 1990.

PACKARD, M.G.; McGAUGH, J.L. Double dissociation of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: Further evidence for multiple memory systems. **Behav. Neurosci.**, 106: 439-446, 1992.

PACKARD, M.G.; TEATHER, L.A. Amygdale modulation of multiple memory systems: hippocampus and caudate-putamen. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.69, p.163-203, 1998.

PEARCE, R.K.B.; HAWKES, C.H.; DANIEL, S.E. The anterior olfactory nucleus in Parkinson's disease. **Mov. Disord.**, 10: 283-287, 1995.

PERIO, A.; TERRANOVA, J.P.; WORMS, P.; BLUTHE, R.M.; DANTZER, R.; BIZIERE, K. Specific modulation of social memory in rats by cholinomimetic and nootropic drugs, by benzodiazepine inverse agonists, but not by psychostimulants. **Psychopharmacology**, 97: 262–268, 1989.

PILLON, B.; DEWEER, B.; VIDALHET, M.; BONNET, A.M.; HARN-BARMA, V.; DUBOIS, B. Impaired for spatial location in Parkinson's disease domain specific or ependent on "strategic"processes? **Neuropsychologia**, 36: 1-9, 1998.

POSTLE, B.R.; LOCASCIO, J.J.; CORKIN, S.; GROWDON, J.H. The time course of spatial and object learning in Parkinson's disease. **Neuropsychol.**, 35: 1413-1422, 1997.

PREDIGER, R.D.S.; TAKAHASHI, R.N. Ethanol improves short-term social memory in rats. Involvement of opioid and muscarinic receptors. **Eur. J. Pharmacol.**, 462: 115–123, 2003.

PREDIGER, R.D.S.; BATISTA, L.C.; MIYOSHI, E.; TAKAHASHI, R.N. Facilitation of short-term social memory by ethanol in rats is mediated by dopaminergic receptors. **Behav. Brain Res.**, 153:149–157, 2004.

PREDIGER, R.D.S., TAKAHASHI, R.N. Modulation of short-term social memory in rats by adenosine A1 and A2A receptors. **Neurosci. Lett.**, 376: 160–165, 2005.

PREDIGER, R.D.S.; BATISTA, L.C.; TAKAHASHI, R.N. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. **Neurobiol. Aging**, 26: 957-964, 2005 a.

PREDIGER R.D., DA CUNHA, C., TAKAHASHI R.N. Antagonistic interaction between adenosine A2A and dopamine D2 receptors modulates the social recognition memory in reserpine-treated rats. *Behav Pharmacol.*, 16(4):209-18 2005 b

PREDIGER, R.D.S.; Batista, L.C.; Medeiros, R.; Pandolfo, P.; Florio, J.C.; Takahashi, R.N. The risk is in the air: intranasal administration of MPTP reproducing clinical features of Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, 202(2):391-403, 2006

QUINN, N.P.; ROSSOR, M.N.; MARSDEN, C.D. Olfactory threshold in Parkinson's disease. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, 50: 88-89, 1987.

RIEKKINEN, M.; KEJONEN, K.; JAKALA, P.; SOININEN, H.; RIEKKINEN, P. Jr. Reduction of noradrenaline impairs attention and dopamine depletion slows responses in Parkinson's disease. **Eur. J. Neurosci.**, 10: 1429-1435, 1998.

ROBERTS, E. Alzheimer disease may begin in the nose and may be caused by aluminosilicates. **Neurobiol. Aging**, 7: 561-567, 1986.

RONCACCI, S.; TROISI, E.; CARLESIMO, G.A.; NOCENTINI, U.; CALTAGIRONE, C. Implicit memory in Parkinsonian patients: evidence for deficits skill learning. **Eur. Neurol.**, 36: 154-159, 1996.

ROSS, G.W.; ABBOTT, R.D.; PETROVITCH, H.; MORENS, D.M.; GRANDINETTI, A.; TUNG, K.H.; TANNER, C.M.; MASAKI, K.H.; BLANCHETTE, P.L.; CURB, J.D.; POPPER, J.S.; WHITE, L.R. Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson's disease. **JAMA**, 283: 2674-2679, 2000.

SANTAMARIA, J.; TOLOSA, E.; VALLES, A. Parkinson's disease with depression: a possible subgroup of idiopathic Parkinsonism. **Neurology**, 36: 1130-1133, 1986.

SEAMANS, J.K.; FLORESCO, S.B.; PHILLIPS, A.G. D1 receptor modulation of hippocampal-prefrontal cortical circuits integrating spatial memory with executive functions in the rat. **J. Neurosci.**, 18: 1613-1621, 1998.

SHIMOHAMA, S.; SAWADA, H.; KITAMURA, Y.; TANIGUCHI, T. Disease model: Parkinson's disease. **Trends Mol. Med.**, 9: 360-365, 2003.

SKALISZ, L.L.; BEIJAMINI, V.; JOCA, S.L.; VITAL, M.A.B.F.; DA CUNHA, C.; ANDREATINI, R. Evaluation of the face validity of reserpine administration as an animal model of depression–Parkinson's disease association. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, 26: 879–883, 2002.

SOFFIÉ, M.; LAMBERTY, Y. Scopolamine effects on juvenile conspecific recognition in rats: possible interaction with olfactory sensitivity. **Behav. Process.**, 17: 181-90, 1988.

STANDAERT, D.G.; YOUNG, A.B. Tratamento dos distúrbios degenerativos do sistema nervoso central. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. (Ed). **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill,. p 367-378, 1996

STEBBINS, G.T.; GABRIELI, J.D.E.; MASCHIARI, F.; MONTI, L.; GOETZ, C.G. Delayed recognition memory in Parkinson's disease: a role for working memory? **Neuropsychol.**, 37: 503-510, 1999.

STERN S., DULANEY E, GRUBER SB, et al. The epidemiology of Parkinson's disease. A case-control study of young-onset and old-onset patients. **Arch Neurol.**, 48:903-907, 1991.

STOOF, J.C.; WINOGRODZKA, A.; VAN MUISWINKEL, F.L.; WOLTERS, E.C.; VOORN, P.; GROENEWEGEN, H.J.; BOOIJ, J.; DRUKARCH, B. Leads for the development of neuroprotective treatment in Parkinson's disease and brain imaging methods for estimating treatment efficacy. **Eur. J. Pharmacol.**, 375: 75-86, 1999.

SVENNINGSSON, P.; LE MOINE, C.; FISONE, G.; FREDHOLM, B.B. Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A2A receptors. **Prog. Neurobiol.**, 59: 355-396, 1999.

TAN, E-K.; TAN, C.; FOOK-CHONG, S.M.C.; LUM, S.Y.; CHAI, A.; CHUNG, H.; SHEN, H.; ZHAO, Y.; TEOH, M.L.; YIH, Y.; PAVANNI, R.; CHANDRAN, V.R.; WONG, M.C. Dose-dependent protective effect of coffee, tea, and smoking in Parkinson's disease: a study in ethnic Chinese. **J. Neurol. Sci.**, 216: 163–167, 2003.

TANBERG, E.; LARSEN, J.P; AARSLAND, D.; CUMMINGS, J.L. The occurrence of depression in Parkinson's disease. **Arch. Neurol.**, 53: 175-179, 1996.

TERRANOVA, J.P.; PÉRIO, A.; WORMS, P.; LE FUR, G.; SOUBRIÉ, P. Social olfactory recognition in rodents: deterioration with age, cerebral ischaemia and septal lesion. **Behav. Pharmacol.**, 5: 90–98, 1994.

TERRANOVA, J.P.; STORME, J.J.; LAFON, N.; PÉRIO, A.; RINALDI-CARMONA, M.; LE FUR, G.; SOUBRIÉ, P. Improvement of memory in rodents by the selective CB1 cannabinoid receptor antagonist, SR141716. **Psychopharmacology**, 126: 165–172, 1996.

WALZ R., ROESLER R., QUEVEDO J., ROCKENBACH, I.C., VIANNA M.R., LENZ G., MEDINA J.H., IZQUIERDO I. Dose-dependent impairment of inhibitory avoidance retention in rats by immediate post-training infusion of a mitogen-activated protein kinase inhibitor into cortical structures. **Behav Brain Res.**, 15;105(2):219-23, 1999.

WELDON, D.A.; TRAVIS, M.L.; KENNEDY, D.A. Posttraining D1 receptor blockade impairs odor conditioning in neonatal rats. **Behav. Neurosci.**, 105: 450–458, 1991.

WILLIAMS, G.V.; RAKIC, P.S.G. Modulation of memory fields by dopamine D1 receptors in prefrontal cortex. **Nature**, v.376, p.572-575, 1995.

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

YOUDIM, M.B.H.; RIEDERER, P. Understanding Parkinson's Disease. **Scientific American**, 38-45, 1997.