

MEIGY TAVARES TADAIESKY

**EFEITOS DOS INIBIDORES DA NOS NO MODELO  
DE PARKINSONISMO INDUZIDO POR RESERPINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal  
do Paraná – Setor de Ciências Biológicas –  
Departamento de Farmacologia, para a obtenção  
do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Maria A. B. F. Vital.  
Co-orientador: Roberto Andreatini.

CURITIBA

2005

*“A provação vem, não só para testar o nosso valor, mas para aumentá-lo;  
o carvalho não é apenas testado, mas enrijecido pelas tempestades.”*

*Lettie Cowman*

## AGRADECIMENTOS

- ◇ Aos deuses. Que me iluminaram nos momentos de tristeza e que sorriram comigo nos momentos de alegria.
- ◇ À orientadora e amiga Maria Vital. Pela paciência e dedicação. Por me mostrar que trabalho, perseverança e honestidade são as ferramentas ideais para atingirmos nossas metas.
- ◇ Ao co-orientador Roberto Andreatini, pela orientação e sugestões. E por ajudar a tornar este trabalho possível.
- ◇ Às minhas irmãs Liany e Nayara, que mesmo longe me apoiaram e ajudaram a superar os limites e dificuldades.
- ◇ Às tias: Izete, Ivete, Iolete, Helena, Regina e Conceição. À vovó Odília e ao vovô Cajuta. Por acreditarem em mim e terem me mostrado, ao longo de tantos anos, o sentido da palavra família.
- ◇ Às amigas de Belém: Sibelle, Beth e Gizelle, pela amizade sincera. E por me lembrar que existem vínculos que não são apagados pelo tempo ou distância.
- ◇ Às amigas de Curitiba: Viviana (Muchacha), Lenise, Camila, Fabi, Gabi e Cris. Pelas longas conversas. Pela paciência. Pelo suporte emocional e presença nos momentos mais difíceis.

- ◇ À colega de mestrado Rosicler Seberino, que foi de extrema importância na realização deste trabalho.
- ◇ Aos colegas e amigos de mestrado, em especial a Viviani, Adriana, Marcelo, Eduardo, Tony, Ivana, Lucélia, Márcia e Inara. Obrigada pelo apoio e incentivo.
- ◇ À professora Lia Rieck, pelos reagentes utilizados na quantificação dos níveis de glutathione.
- ◇ À farmacêutica Silvia Nardi Cordazzo Genari, pelo auxílio e eficiência profissional.
- ◇ Aos funcionários do Biotério Central, pelo fornecimento dos animais utilizados neste trabalho.
- ◇ Aos ratos e camundongos que, embora não tenham tido alternativa, sacrificaram suas vidas para que essa dissertação pudesse ser realizada.
- ◇ Aos demais professores e funcionários do Departamento de Farmacologia, por toda a ajuda na realização deste trabalho.
- ◇ Às demais pessoas, que, de uma maneira ou outra, me deram crédito e apoio para tornar este sonho possível. A minha eterna gratidão a todos.
- ◇ À CAPES pelo suporte financeiro.

## *DEDICATÓRIA*

Aos meus pais... Niltomiro (Cabeção) e Izabel. Que me ensinaram a confiar em mim mesma e que, com muita dedicação e amor me deram a educação sem a qual eu não teria chegado a lugar algum. Vocês me deram simplesmente tudo e vão estar eternamente em tudo o que eu fizer.

# CONTEÚDO

<b>RESUMO.....</b>	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>XII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 DOENÇA DE PARKINSON (DP) .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1.1 ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1.2 ESTRESSE OXIDATIVO NA DP.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1.2.1 ÓXIDO NÍTRICO (NO).....</b>	<b>21</b>
<b>1.1.3 MECANISMOS COMPENSATÓRIOS NA DP.....</b>	<b>25</b>
<b>1.1.4 O MODELO ANIMAL DA RESERPINA.....</b>	<b>27</b>
<b>1.1.5 A LINHAGEM DE CAMUNDONGOS C57BL/6.....</b>	<b>28</b>
<b>1.1.6 INIBIDORES DA NOS.....</b>	<b>29</b>
<b>1.1.7 TRANSTORNOS COMPORTAMENTAIS E PSIQUIÁTRICOS....</b>	<b>31</b>
<b>1.1.7.1 DEPRESSÃO.....</b>	<b>31</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
<b>2.1 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>36</b>
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>36</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
<b>3.1 ANIMAIS.....</b>	<b>38</b>
<b>3.2 DROGAS.....</b>	<b>38</b>
<b>3.3 REGIMES DE TRATAMENTO.....</b>	<b>38</b>
<b>3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GERAL EM CAMPO ABERTO.....</b>	<b>39</b>
<b>3.5 TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA.....</b>	<b>40</b>
<b>3.6 TESTE DE PREFERÊNCIA POR SACAROSE.....</b>	<b>41</b>
<b>3.7 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS ESTRIATAIS DE GLUTATIONA.....</b>	<b>41</b>
<b>3.7.1 PREPARO DA AMOSTRA.....</b>	<b>41</b>
<b>3.7.2 ENSAIO ENZIMÁTICO.....</b>	<b>41</b>

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
4 RESULTADOS.....	44
4.1 COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE GERAL EM CAMPO ABERTO ENTRE CAMUNDONGOS DAS LINHAGENS SWISS E C57BL/6 TRATADOS COM RESERPINA.....	44
4.2 EFEITOS DO 7-NI NA ATIVIDADE GERAL DE CAMUNDONGOS SWISS TRATADOS COM RESERPINA.....	46
4.3 EFEITOS DO 7-NI NA ATIVIDADE GERAL DE CAMUNDONGOS C57BL/6 TRATADOS COM RESERPINA.....	51
4.4 EFEITOS DO 7-NI NO TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA EM CAMUNDONGOS SWISS TRATADOS COM RESERPINA.....	56
4.5 EFEITOS DO 7-NI NO TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA EM CAMUNDONGOS C57BL/6 TRATADOS COM RESERPINA.....	57
4.6 EFEITOS DA AMINO Guanidina NA ATIVIDADE GERAL DE CAMUNDONGOS SWISS TRATADOS COM RESERPINA.....	58
4.7 EFEITOS DA AMINO Guanidina NA ATIVIDADE GERAL DE CAMUNDONGOS C57BL/6 TRATADOS COM RESERPINA.....	61
4.8 EFEITOS DA AMINO Guanidina NO TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA EM CAMUNDONGOS SWISS TRATADOS COM RESERPINA.....	64
4.9 EFEITOS DA AMINO Guanidina NO TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA EM CAMUNDONGOS C57BL/6 TRATADOS COM RESERPINA.....	65
4.10 EFEITOS DO 7-NI NO TESTE DE PREFERÊNCIA POR SACAROSE EM CAMUNDONGOS SWISS TRATADOS COM RESERPINA (1mg/Kg).....	66
4.11 EFEITOS DO 7-NI NO TESTE DE PREFERÊNCIA POR SACAROSE EM CAMUNDONGOS SWISS TRATADOS COM RESERPINA (2mg/Kg).....	67
4.12 EFEITOS DO 7-NI E AMINO Guanidina NOS NÍVEIS ESTRIATAIS DE GLUTATIONA DE RATOS TRATADOS COM RESERPINA.....	68
5 DISCUSSÃO.....	70
6 CONCLUSÕES.....	81
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	84

## RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é um distúrbio progressivo do movimento cujos principais sintomas são bradicinesia, tremor e rigidez muscular. Além dos sintomas motores, existe um amplo espectro de distúrbios psiquiátricos associados à DP, sendo a depressão o mais comum deles. A fisiopatologia da DP não é bem conhecida. No entanto, tem sido proposta a possibilidade de contribuição do estresse oxidativo, através da participação do óxido nítrico (NO), na patogênese da DP. Nesse contexto, diversos estudos demonstram que inibidores da óxido nítrico sintase (NOS) são capazes de proteger contra a perda de dopamina e degeneração celular nigral em modelos animais de parkinsonismo.

O objetivo deste estudo foi investigar a influência dos inibidores da NOS no modelo animal de DP induzido por reserpina nas linhagens de camundongos Swiss e C57BL/6.

Os efeitos da administração de 7-nitroindazol (7-NI-25mg/Kg), um inibidor da óxido nítrico sintase (NOS) neuronal e de aminoguanidina (50mg/Kg), um inibidor da NOS induzida, em camundongos tratados com reserpina (1mg/Kg) na atividade geral desses animais foram avaliados através do teste do campo aberto. Neste teste, foram registrados os tempos de latência e imobilidade e as frequências de locomoção e levantar dos animais.

O ensaio de atividade geral no campo aberto mostrou que a administração de 7-NI promoveu uma reversão da hipolocomoção induzida pela reserpina em camundongos Swiss, porém não na linhagem C57BL/6.

A administração de aminoguanidina não foi capaz de restaurar a hipolocomoção causada pela administração de reserpina e avaliada pelo teste do campo aberto em nenhuma das linhagens testadas.

O efeito da administração de 7-NI e aminoguanidina nos animais tratados com reserpina foi avaliado no teste da natação forçada, onde foi registrado o tempo de imobilidade dos animais.

A administração de reserpina levou a um aumento no tempo de imobilidade nas duas linhagens de camundongos no teste da natação forçada. A administração de 7-NI aboliu esse efeito na linhagem de camundongos Swiss. No entanto, o 7-NI não foi capaz de reverter o aumento no tempo de imobilidade na linhagem C57BL/6.



A administração de aminoguanidina em camundongos tratados com reserpina e avaliados no teste da natação forçada indicou que esse inibidor da NOS induzida não reverteu o aumento do tempo imobilidade induzido pela administração de reserpina.

Com o objetivo de avaliar os efeitos do 7-NI e aminoguanidina em camundongos tratados com reserpina sobre as defesas antioxidantes cerebrais, foi realizada a quantificação dos níveis estriatais de glutathione (GSH). No entanto, nossos resultados mostram que a reserpina não causou alteração significativa na concentração de GSH.

Em conjunto, nossos resultados sugerem a participação da isoforma neuronal de NOS em um modelo animal de parkinsonismo. Mais ainda, a comparação das linhagens de camundongos utilizadas nestes experimentos podem fornecer informações com bases genéticas quanto à diferente sensibilidade às drogas empregadas neste estudo.

## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a progressive disorder whose main symptoms are bradykinesia, tremor and muscular rigidity. Besides the motor symptoms, an ample aspect of psychiatric disorders is associated to PD, being depression the most common of them. The physiopathology of PD is not well understood. However, it has been proposed the possibility of contribution of oxidative stress, through the participation of nitric oxide (NO), in pathogenesis of PD. In this context, several studies demonstrate that nitric oxide synthase (NOS) inhibitors are able to protect against dopamine loss and cellular nigral degeneration in animal models of parkinsonism.

The aim of this study was to investigate the influence of NOS inhibitors in the reserpine-induced animal model of PD in Swiss and C57BL/6 mouse strains.

The effects of administration of 7-nitroindazole (7-NI-25mg/Kg), an neuronal NOS inhibitor and aminoguanidine (50mg/Kg), an inducible NOS inhibitor, in mice treated to reserpine (1mg/Kg) in general activity were evaluated in the open field test. In this test, there were registered latency and immobility time and locomotion and rearing frequencies of animals.

Evaluation of general activity in open field showed that administration of 7-NI promoted an improvement of reserpine-induced hypolocomotion in Swiss mice, but not in C57BL/6 mouse strain.

Aminoguanidine administration was not able to restore the hypolocomotion caused by reserpine administration in any of the mouse strains.

The effects of 7-NI and aminoguanidine administration in animals treated to reserpine were evaluated in the forced swimming test. In this test, the immobility time of the animals was registered.

Reserpine administration led to an increase in the immobility time in both mouse strains. 7-NI administration abolished this effect in the Swiss strain. However, 7-NI was not able to revert the increase in the immobility time in C57BL/6 mouse strain.

Evaluation of aminoguanidine administration in reserpine-treated mice in forced swimming test indicated that this inducible NOS inhibitor did not revert the increased immobility time induced by reserpine administration.

With the objective to evaluate the effect of 7-NI and aminoguanidine in reserpine-treated mice on cerebral antioxidant defenses, the quantification of striatal levels of glutathione (GSH) was carried out. However, our results show that reserpine was not able to cause significant alteration in GSH concentration.

Taken together, our results suggest the participation of NOS neuronal isoform in an animal model of parkinsonism. Furthermore, the comparison of such mouse strains may provide information on genetic basis for strains differences in different sensitivity to the drugs used in this study.

## LISTA DE ABREVIATURAS

3-NT – 3-nitrotirosina  
5-HIAA – Ácido-5-hidroxiindolacético  
5-HT – 5-hidroxi-triptamina  
6-OHDA – 6-hidroxidopamina  
7-NI – 7-nitroindazol  
AADC – Aminoácido aromático descarboxilase  
Ach – Acetilcolina  
AchE – Acetilcolinesterase  
AMPc – Adenosina-monofosfato cíclico  
ATP – Adenosina-tri-fosfato  
CAT – Colina-acetil-transferase  
cNOS – Óxido nítrico sintase constitutiva  
DA - Dopamina  
DAT – Transportador da captação de dopamina  
DNA – Ácido-desoxi-ribonucléico  
DOPA - Diidroxifenilalanina  
DOPAC – Ácido diidroxifenilacético  
DP – Doença de Parkinson  
eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial  
GABA – Ácido-gama-amino-butírico  
GMPc – Guanidina-monofosfato cíclico  
GSH – Glutathiona reduzida  
IFN $\gamma$  – Interferon- $\gamma$   
IL-1 – Interleucina-1  
IL-1-L – Interleucina-1L  
IL-6 – Interleucina-6  
IMI – imipramina  
iNOS – Óxido nítrico sintase induzida  
i.p - Intraperitoneal

L-NAME -  $N^{\omega}$ -nitro-L-arginina metil ester  
LPS – Lipopolissacarídeo  
MA – Ácido malônico  
MAO-B – monoamino-oxidase-B  
MPP<sup>+</sup> - N-metil-4-fenilpiridínio  
MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina  
NMDA – N-metil-D-aspartato  
nNOS – Óxido nítrico sintase neuronal  
NO – Óxido nítrico  
NOS – Óxido nítrico sintase  
OM – Óleo de milho  
PET – Tomografia por emissão de positrons  
RES - Reserpina  
RNS – Espécie reativa do nitrogênio  
ROS – Espécie reativa do oxigênio  
SMT - S-metilisotiourea  
SN – Substância negra  
SNc – Substância negra parte compacta  
SNC – Sistema nervoso central  
SSRI – Inibidor específico da recaptação de serotonina  
TCA – Antidepressivo tricíclico  
TH – Tirosina hidroxilase  
TIR - Tirosina  
TNF – Fator de necrose tumoral  
TNF-K – Fator de necrose tumoral-K  
VEI - Veículo

# **1. INTRODUÇÃO**

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DOENÇA DE PARKINSON (DP)

A Doença de Parkinson (DP) idiopática, que foi descrita pela primeira vez em 1817 por James Parkinson, é um distúrbio progressivo do movimento cujos principais sintomas são: tremor em repouso, que geralmente começa nas mãos (tremor semelhante a “rolar pílulas”), que tende a diminuir durante a atividade voluntária; rigidez muscular, detectável na forma de aumento da resistência ao movimento passivo dos membros; supressão dos movimentos voluntários (hipocinesia) devida à rigidez muscular e a uma inércia inerente do sistema motor, o que significa que é sempre difícil interromper ou iniciar a atividade motora (bradicinesia); incapacidade de iniciar um movimento desejado (acinesia), instabilidade postural (STOFFERS *et al.*, 2003), além de expressão facial “semelhante a máscara” (ALEXI *et al.*, 2000), além de complicações não-motoras menos frequentes, tais como demência, depressão e disfunção autonômica (MAGUIRE-ZEISS *et al.*, 2005). Os pacientes parkinsonianos exibem uma marcha característica, arrastando os pés. Têm dificuldade para começar e, uma vez iniciada a marcha, não podem parar ou mudar a direção rapidamente.

Existem quatro grupos gerais de síndromes com características parkinsonianas: DP idiopática, DP secundária (e.g., induzida por drogas, tóxica, vascular), DP familiar e outras síndromes parkinsonianas (e.g., atrofia sistêmica múltipla, degeneração estriadonigral, degeneração corticobasal e a variante de corpúsculo de Lewy da doença de Alzheimer) (MOORE, 2003).

A DP é a doença neurodegenerativa mais comum depois da doença de Alzheimer. Ocorre no mundo todo em todos os grupos étnicos. Os homens são mais frequentemente afetados que as mulheres (LANG e LOZANO, 1998). A prevalência de DP é de 0,3% da população geral; essa

proporção aumenta com a idade, de modo que a doença afeta mais de 1% das pessoas com idade acima de 65 anos (TANNER, 1992).

O período de latência para o desenvolvimento da doença não é conhecido, porém acredita-se que esteja entre 5 e 7 anos, embora possa variar de acordo com a etiologia.

O conhecimento atual acerca da etiologia da doença sugere que a DP resulta provavelmente de uma combinação de fatores genéticos e ambientais. Em alguns casos, entretanto, pode resultar de isquemia cerebral, encefalite viral ou outros tipos de lesão patológica. Os sintomas também podem ser induzidos por drogas, sendo as principais drogas envolvidas aquelas que reduzem a quantidade de dopamina no cérebro (p.ex., reserpina), ou que bloqueiam os receptores de dopamina (p.ex., agentes antipsicóticos, como a clorpromazina).

Numerosos estudos familiares de casos controlados foram realizados e, em sua maioria, demonstraram um aumento no risco para o desenvolvimento da doença entre parentes de primeiro grau. Em média, um indivíduo com parente de primeiro grau com DP tem aproximadamente uma chance de 1:20 de desenvolver a doença. Indivíduos com dois parentes de primeiro grau possuem uma chance de 1:5.

Estudos epidemiológicos sugerem que o uso de herbicidas, exposição a pesticidas, consumo de água de poço e exposição ocupacional a certos metais, mais notavelmente o manganês (GORELL *et al.*, 1999), podem aumentar o risco de desenvolvimento da DP, através do aumento do estresse oxidativo (THIRUCHELVAM *et al.*, 2004).

### **1.1.1 ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS**

A DP afeta os gânglios da base. Sua origem neuroquímica foi descoberta por HORNYKIEWICZ, em 1960, que demonstrou a existência de um conteúdo extremamente baixo de dopamina na substância negra e no corpo estriado (em geral, menos de 10% do normal) em cérebros *post-mortem* de pacientes com DP. Mais tarde, esse achado foi correlacionado com uma perda quase completa dos neurônios dopaminérgicos pigmentados da substância negra parte compacta (SNc) lateral e ventral no mesencéfalo e com a degeneração das terminações nervosas do estriado. Foi verificada, também, a presença de corpos de Lewy, inclusões citoplasmáticas tipicamente observadas *post-mortem* em alguns neurônios dopaminérgicos remanescentes na substância negra em casos de DP idiopática e familiar (SPILLANTINI *et al.*, 1997).



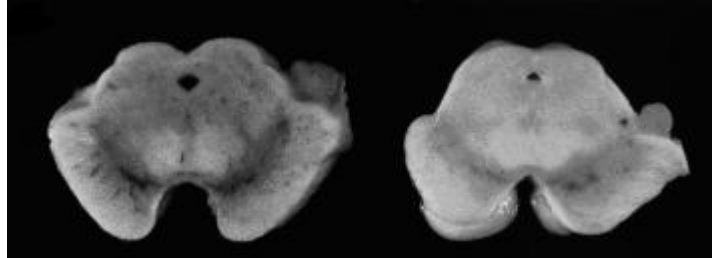


FIGURA1. Neurônios dopaminérgicos melanizados da SN em cérebros humanos *post-mortem*. Secções cerebrais retiradas do mesencéfalo de um indivíduo normal (esquerda) e de um indivíduo com DP (direita). O mesencéfalo à direita apresenta uma perda de neurônios melanizados na substância negra. Retirado de ORR *et al.* (2002)<sup>1</sup>.

Uma degeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos nigrais melanizados <sup>1</sup> ocorre na DP, bem como dos neurônios dopaminérgicos da área tegmentar ventral e dos neurônios dopaminérgicos do *locus coeruleus* (GREENAMYRE e HASTINGS, 2004). A perda da via nigroestriatal na DP resulta em deficiência na dopamina estriatal devido à degeneração nos neurônios dopaminérgicos que se projetam a partir da substância negra (MAGUIRE-ZEISS e FEDEROFF, 2003). Os neurônios dopaminérgicos da substância negra no mesencéfalo ventral desempenham um papel no controle motor e no comportamento afetivo nos gânglios basais (WILLNER e SCHEEL-KRUGER, 1991; KALIVAS e BARNES, 1993). Tanto a substância negra quanto o estriado possuem conexões com estruturas motoras e límbicas.

Outras monoaminas, como a noradrenalina e a serotonina (5-HT), são muito menos afetadas do que a dopamina. As estimativas sugerem que o aparecimento dos sintomas da DP ocorre quando houve redução de 70% do conteúdo estriatal de dopamina (BEZARD *et al.*, 2001).

---

<sup>1</sup> Os neurônios que se projetam a partir da substância negra parte compacta têm como neurotransmissor a dopamina e contêm melanina (pigmento que lhes confere a cor negra).

Os neurônios colinérgicos do corpo estriado (que possui o conteúdo mais elevado de acetilcolina (Ach), colina acetil transferase (CAT) e acetilcolinesterase (AchE) no cérebro também estão envolvidos na DP. Em condições normais, a neurotransmissão colinérgica e dopaminérgica estão em equilíbrio no estriado, com uma influência dopaminérgica inibitória sobre a liberação de Ach. A perda de terminais dopaminérgicos estriatais que ocorre na DP reduz esse controle inibitório. Esse desequilíbrio leva a uma hiperatividade dos interneurônios colinérgicos, que são a fonte de Ach estriatal, o que, associado à falta de dopamina, resulta nos sintomas da DP (PISANI *et al.*, 2003).

A severidade da inabilidade da DP reflete o grau de perda neuronal da substância negra (ALVORD *et al.*, 1974). Os pacientes com inabilidade avançada são mais propensos a desenvolver complicações que levam à morte prematura (MOSEWICH *et al.*, 1994).

### **1.1.2 ESTRESSE OXIDATIVO NA DP**

Foi sugerido que a patogênese do parkinsonismo pode envolver dois processos: uma alteração específica à doença combinada com mudanças associadas com o envelhecimento normal. Um dos mecanismos básicos propostos para a perda de células nigroestriatais na DP é o estresse oxidativo resultante da produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) excedendo a capacidade celular antioxidante (KOUTSILIERI *et al.*, 2002; FAHN e COHEN, 1992; CALNE, 1992; DAWSON e DAWSON, 2003; JENNER, 2003; HASHIMOTO *et al.*, 2003, FISKUM *et al.*, 2003).

Por suas características anatômicas e fisiológicas, o sistema nervoso central (SNC) é especialmente sensível ao estresse oxidativo. Um dos motivos é o alto consumo de oxigênio (O<sub>2</sub>): em humanos o cérebro representa apenas uma pequena porcentagem do peso corporal, porém processa 20% do consumo basal de O<sub>2</sub>. Um neurônio utiliza muito O<sub>2</sub> para produzir, via mitocôndria, ATP necessário para manter os gradientes elétricos (alto K<sup>+</sup> intracelular, baixo Na<sup>+</sup>, baixo Ca<sup>++</sup>) (HALLIWELL, 2001). Por essa razão, a disfunção mitocondrial pode ser particularmente dramática para as células pós-mitóticas, tais como neurônios, que recebem a maior parte de sua energia a partir da cadeia transportadora de elétrons (JELLINGER, 2003). É compreensível, portanto, que inibidores da cadeia respiratória tais como rotenona e 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) possam causar morte celular.

A cadeia respiratória da mitocôndria é responsável pela produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) e notavelmente do ânion superóxido nos tecidos humanos. Em condições fisiológicas, 1-2% do O<sub>2</sub> consumido é convertido a ROS.

Os eventos que culminam na degeneração dos neurônios dopaminérgicos incluem estresse oxidativo, como resultado da produção aumentada e remoção insuficiente de espécies reativas do oxigênio (ROS), disfunção mitocondrial (SCHAPIRA e COOPER, 1989), excitotoxicidade com excesso de formação de NO e processos gliais e inflamatórios (HUNOT *et al.*, 1997). Esses eventos culminam provavelmente na indução de apoptose dos neurônios dopaminérgicos nigrais. A apoptose consiste em um programa de “morte celular”, de forma que a célula ativa (ou é forçada a ativar devido a um estímulo danoso) um mecanismo de autodestruição que leva a sua retração e por último à fagocitose pela micróglia. De fato, um estudo mostrou a presença de marcadores para morte celular apoptótica em locais de neurodegeneração neuronal no cérebro de pacientes com DP (MOCHIZUKI *et al.*, 1996).

A presença de excesso de ferro, diminuição de glutathiona reduzida (GSH), aumento da atividade da superóxido desmutase, peroxidação lipídica, modificação de proteínas e DNA e lesão oxidativa na substância negra de pacientes com DP sugerem que a substância negra se encontra em um estado de estresse oxidativo e que ocorreu lesão oxidativa. Os neurônios dopaminérgicos da substância negra parte compacta (SNc) parecem ser especialmente vulneráveis a ROS (HEIKKILA e COHEN, 1972). A citotoxicidade dos radicais livres está relacionada com a habilidade dessas moléculas de oxidar constituintes celulares, particularmente membranas lipídicas, proteínas e DNA e sinalizar a iniciação de apoptose. As ROS são geradas durante o funcionamento celular normal, principalmente durante a respiração mitocondrial e são inativadas por antioxidantes endógenos. Estes incluem moléculas de baixo peso molecular tais como GSH e vitaminas C e E e enzimas antioxidantes tais como superóxido dismutase, glutathiona peroxidase e catalase. No entanto, o acúmulo de altos níveis de ROS causa prejuízo à célula. A ocorrência de estresse oxidativo na DP é demonstrada por aumento na quantidade de ROS e RNS e deficiência em substâncias antioxidantes (ALEXI *et al.*, 2000). Foi proposto que o processo de envelhecimento possa estar associado aos efeitos crônicos de ROS em várias macromoléculas biológicas (DROGE, 2003).

Sabe-se que os complexos I, III e IV da cadeia respiratória mitocondrial bombeiam prótons a partir da mitocôndria e nesse sentido representam um importante papel na manutenção do potencial de membrana mitocondrial. A mitocôndria é especialmente sensível a ROS (WALLACE, 2001;

INOUE *et al.*, 2003; SADEK *et al.*, 2003; KLAIDMAN *et al.*, 2003; BEAL, 2003; CHOMYN e ATTARDI, 2003). Um defeito no complexo I, como ocorre na DP, pode levar a defeito no bombeamento de prótons, diminuição do potencial de membrana mitocondrial e aumento do risco de apoptose (ANNUNZIATO *et al.*, 2003). Foi demonstrado que a redução na atividade enzimática do complexo I é de aproximadamente 40% e que essa redução resulta em diminuição de 40% da produção de ATP na mitocôndria sináptica. Esses efeitos podem levar à ativação de receptores do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), que estão ligados via  $Ca^{2+}$ /calmodulina à síntese de NO (GARTHWAITE *et al.*, 1989; MCCALL e VALLANCE, 1992), levando a morte neuronal por excitotoxicidade. Essas observações sugerem que a disfunção mitocondrial, o estresse oxidativo e a diminuição do metabolismo podem ser uma via comum para diversas condições neurodegenerativas, incluindo o envelhecimento normal do cérebro e a DP (JORDAN *et al.*, 2003, PARADIS *et al.*, 2003).

O poro mitocondrial está situado em locais de contato entre as membranas interna e externa da mitocôndria. O poro contém diversas proteínas incluindo o transportador do nucleotídeo adenina, porina, o receptor benzodiazepínico periférico e Bax, uma proteína pró-apoptótica. A abertura do poro permite a liberação de moléculas menores que 1500 dA entre as quais se encontram fatores iniciadores de apoptose. Isto também leva ao colapso do potencial de membrana. Dessa forma, a perda do potencial de membrana também leva à abertura do poro. Outros fatores que resultam em abertura do poro incluem inibição da fosforilação oxidativa, geração de radicais livres e aumento dos níveis de cálcio intramitocondrial. O fechamento do poro é mantido por um alto potencial de membrana, baixos níveis de cálcio intramitocondrial e uma variedade de ligantes incluindo BCL2, uma proteína anti-apoptótica. Quando o poro se abre, o citocromo c é liberado a partir do espaço intramembranoso para o citosol e inicia-se a cascata da caspase, a qual, por sua vez, resulta em alterações morfológicas associadas com a apoptose. A abertura do poro também está associada com a liberação de  $Ca^{++}$ , o qual pode ativar proteases e outros fatores levando à morte celular (DYKENS, 1994; NICOTERA e ORRENIUS, 1992). Dessa forma, a abertura do poro pode fornecer o mecanismo a partir do qual a inibição do complexo I e produção de ROS leva a morte neuronal. Foi proposto que o declínio na função mitocondrial devido ao estresse oxidativo relacionado à idade desempenhe um importante papel nas alterações funcionais que ocorrem no envelhecimento do cérebro e em desordens neurodegenerativas associadas à idade (SZIBOR e HOLTZ, 2003; SASTRE *et al.*, 2003).

A ativação microglial e aumento da expressão de TNF, IL-1 e IL-6 também são achados comuns no cérebro de pacientes com DP (MCGEER *et al.*, 1988; BOKA *et al.*, 1994; MOGI *et al.*, 1994a,b, 1995). Em um estudo, foi demonstrado que a liberação de NO e peróxido de hidrogênio a partir da micróglia medeia danos celulares neuronais e que os neurônios dopaminérgicos são o tipo celular mais suscetível (LE *et al.*, 2001). Isto pode indicar que a inflamação, com liberação microglial de substâncias tóxicas, pode contribuir para o processo degenerativo (GEBICKE-HAERTER, 2001). Além disso, a substância negra exibe a mais alta concentração de micróglia do cérebro (LAWSON *et al.*, 1990) e os cérebros de pacientes com DP contêm micróglia excepcionalmente ativa (MCGEER *et al.*, 1988; YODIM e RIEDERER, 1997). Embora a ativação microglial no cérebro constitua a maior defesa contra o desafio imune, a ativação da micróglia resulta na liberação de várias citocinas e radicais livres tais como radicais superóxido e NO (LEE *et al.*, 1993; MINGHETTI *et al.*, 1999). Esses fatores da micróglia provavelmente aumentam a neurotoxicidade e podem contribuir para a neurodegeneração e doenças mediadas por inflamação (MCGEER *et al.*, 1988; JENNER, 1996). Alternativamente, a ativação microglial pode representar uma resposta reparadora malsucedida à lesão neuronal.

Diversos estudos têm proposto a possibilidade de contribuição de glutamato, um aminoácido excitatório no estresse oxidativo (BONDY e LEE, 1993; DAWSON *et al.*, 1991; MICHAELIS, 1997). A liberação excessiva de glutamato causa influxo intracelular de cálcio (BERDICHEVSKY *et al.*, 1983), ativação de enzimas cálcio dependentes tais como a óxido nítrico sintase (NOS) (DAWSON *et al.*, 1993) e produção de radicais de oxigênio tóxicos. O estriado é uma região que recebe influxos glutamatérgicos e, portanto, possui receptores para o glutamato. Dessa forma, o glutamato é possivelmente também um agente citotóxico que causa degeneração neuronal dopaminérgica na DP.

#### **1.1.2.1 ÓXIDO NÍTRICO (NO)**

O óxido nítrico, um radical livre de vida curta (1-5 s), é uma molécula gasosa membrana-permeável que tem sido implicada em várias condições fisiológicas e patológicas, estando envolvido em processos de sinalização e comunicação celular em uma variedade de sistemas (MARTINEZ-RUIZ e LAMAS, 2004). No cérebro atua como neurotransmissor e segundo mensageiro mediando uma variedade de funções neuronais (DAWSON e SNIDER, 1994). O NO é sintetizado a partir de L-arginina pela NOS, que oxidativamente remove o terminal guanidino-

nitrogenio da L-arginina a L-citrulina e NO (KNOWLES e MONCADA, 1994). Três isoformas principais dessa enzima foram identificadas e caracterizadas no SNC: a forma neuronal (nNOS; tipo I), a forma induzida (iNOS; tipo II), que é produzida em grande quantidade pela micróglia ativada (macrófagos) e a forma endotelial (eNOS; tipo III). A nNOS e a eNOS são enzimas cálcio/calmodulina-dependentes constitutivas (BREDT *et al.*, 1991), enquanto a expressão de iNOS é cálcio/calmodulina-independente e requer estimulação apropriada por LPS e/ou citocinas (HENEKA *et al.*, 2000; POSSEL *et al.*, 2000). A ativação de NOS constitutiva (cNOS) libera níveis relativamente baixos de NO por curtos períodos de tempo enquanto a indução de iNOS libera altos níveis de NO por períodos de tempo longos (NATHAN e XIE, 1994). No SNC, a nNOS é responsável pela maior produção de NO (MAYER e HEMMENS, 1997).

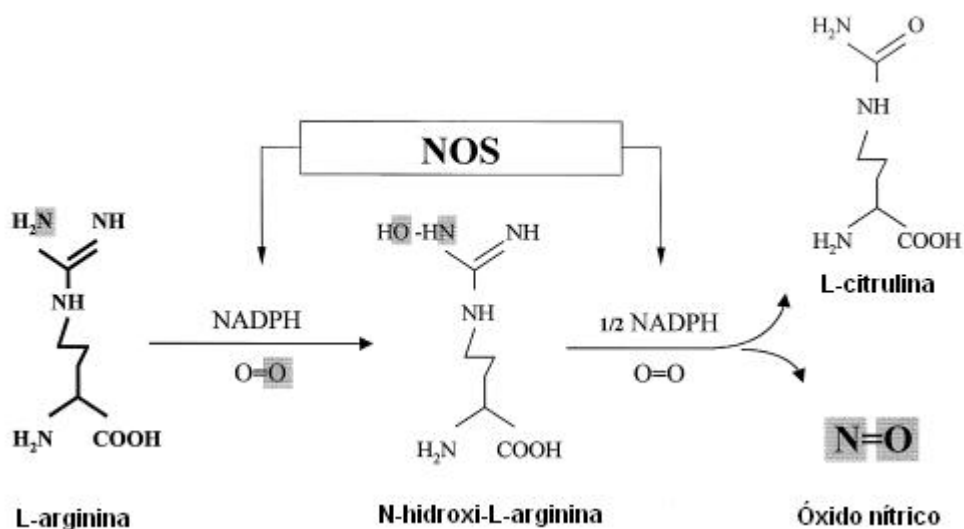


FIGURA 2. Representação esquemática da síntese de óxido nítrico.

Adaptado de TORREILLES *et al.* (1999).

Essa importante molécula, que é responsável pela sinalização intra - e intercelular em uma variedade de sistemas, ativa a guanilil ciclase solúvel gerando o segundo mensageiro GMPc (SNYDER e BREDT, 1992). No entanto, a produção aumentada de NO pode causar prejuízo à célula (BECKMAN *et al.*, 1994).

Sob condições de estresse oxidativo, NO reage com o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) para formar peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) (a forma mais reativa de RNS), o qual por sua vez leva à produção de radicais hidroxila (OH) altamente tóxicos (BECKMAN *et al.*, 1990). Na DP e outras doenças

neurodegenerativas, existem evidências de que o alvo do NO e seus metabólitos de radical livre seja a mitocôndria, levando à inibição da cadeia respiratória (HEALES *et al.*, 1999).

Questões acerca do papel protetor ou neurotóxico do NO têm sido debatidos. Diversos estudos sugerem que o NO é um fator tóxico mediador de morte celular (DAWSON *et al.*, 1992; PRZEDBORSKI *et al.*, 1996; SMITH *et al.*, 1994). Além disso, foi reportado que doadores de NO induzem morte celular apoptótica em células de neuroblastoma humano (KITAMURA *et al.*, 1998). Em contraste, outros estudos demonstram que o NO é um antioxidante em situações de estresse oxidativo (RAUHALA *et al.*, 1996; RUBANYI *et al.*, 1991; WINK *et al.*, 1995; WINK *et al.*, 1996). O NO, sintetizado pela nNOS, possivelmente modula a neurotoxicidade induzida por glutamato e MPTP (PRZEDBORSKI *et al.*, 1996; DAWSON *et al.*, 1991; SCHULZ *et al.*, 1995). Portanto, é possível que a geração do radical livre seguida por peroxinitrito possa estar implicada na morte celular neuronal (DAWSON *et al.*, 1991; BEAL *et al.*, 1997; FERRANTE *et al.*, 1997). Além disso, foi demonstrada superexpressão de nNOS nos gânglios basais de pacientes com DP (EVE *et al.*, 1998).

De modo inverso, neurônios contendo NOS são menos suscetíveis à neurotoxicidade mediada por NMDA (DAWSON *et al.*, 1993) e são relativamente poupados nos cérebros parkinsonianos (BOCKELMANN *et al.*, 1994; MUFSON e BRANDABUR, 1994).

Além disso, dados de microdiálise mostram que o NO possui influência inibitória sobre a liberação de dopamina no estriado de ratos (GUEVARA-GUZMAN *et al.*, 1994).

Acredita-se que a severa perda de neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal não seja inteiramente responsável pela diminuição nos níveis de dopamina na DP. Alguns estudos indicam que a síntese de dopamina é prejudicada mesmo antes da morte celular de neurônios dopaminérgicos (PAKKENBERG *et al.*, 1991) e que a redução no metabolismo da dopamina é muito maior que a perda de corpos celulares neuronais (SENIUK *et al.*, 1990; JACKSON-LEWIS *et al.*, 1995; PRZEDBORSKI *et al.*, 1995). Esses resultados sugerem que o prejuízo na síntese e metabolismo da dopamina nos neurônios seja importante no mecanismo de degeneração seletiva de neurônios dopaminérgicos na DP.

Na biossíntese de dopamina, a enzima inicial e limitante é a tirosina-hidroxilase (TH), cuja atividade é regulada pela fosforilação de várias proteínas quinases (KUMER e VRANA, 1996). O papel do NO na atividade da tirosina-hidroxilase (TH) é controverso. Um estudo demonstrou que o óxido nítrico levou ao aumento na atividade dessa enzima. Em contraste foi demonstrado que a TH

pode ser desativada pelo NO através da produção do seu derivado peroxinitrito (ARA *et al.*, 1998). Estudos *in vivo* (GONZALES *et al.*, 1998) e *in vitro* (ABREU *et al.*, 2000) demonstraram que a atividade da TH foi inibida pelo doador de NO nitroprussiato de sódio. Nesta linha, a inativação da TH pode ser responsável pela diminuição da formação de dopamina induzida por peroxinitrito (ISCHIROPOULOS *et al.*, 1995; ABREU *et al.*, 2000).

Uma das fontes de NO provavelmente envolvida na neurotoxicologia da DP é a forma induzida de NOS. Uma vez induzida, iNOS produz níveis aumentados sustentados de NO (MURPHY *et al.*, 1993; GROSS e WOLIN, 1995), o qual é responsável pelos efeitos tóxicos de macrófagos ativados *in vitro* (DAWSON *et al.*, 1994; HEWETT *et al.*, 1994). No cérebro, os astrócitos e a micróglia compartilham muitas propriedades com os macrófagos, produzindo ROS, NO e citocinas pró-inflamatórias, incluindo interleucina -1L (IL-1L), interferon-Q (IFN-Q) e fator de necrose tumoral-K (TNF-K) (CHAO *et al.*, 1996). As citocinas são, por si próprias, indutores muito potentes de iNOS (NATHAN, 1992). Em pacientes com DP, um aumento na densidade de células gliais expressando TNF-K, IL-1L, e IFN-Q e iNOS tem sido observado (MOGI *et al.*, 1988; HUNOT *et al.*, 1996, 1999). Além disso, foi reportado que a expressão de iNOS durante o processo inflamatório no SNC tenha um papel na neurodegeneração na DP (MCGEER *et al.*, 1988; HUNOT *et al.*, 1996; JENNER, 1996).

Em análise *post-mortem* de cérebros de pacientes com DP, o processo inflamatório foi evidente na SN e coincidiu com a proliferação de micróglia expressando iNOS (MCGEER *et al.*, 1988a,b; HUNOT *et al.*, 1996). Um estudo demonstrou que a injeção intranigral de lipopolissacarídeo (LPS) induziu expressão concentração - e tempo-dependente de iNOS na micróglia da substância negra (SN) de ratos adultos, aumentando a produção de metabólitos finais de NO, com conseqüente perda de neurônios dopaminérgicos .

Dois estudos independentes demonstraram que em camundongos selvagens tratados com MPTP, uma neurotoxina utilizada experimentalmente por sua capacidade de produzir sinais de parkinsonismo, ocorreu intensa gliose e *upregulation* de iNOS porém os camundongos com ausência do gene para iNOS foram significativamente mais resistentes ao MPTP que os da mesma ninhada do tipo selvagem (LIBERATORE *et al.*, 1999; DEHMER *et al.*, 2000).

Por outro lado, o NO pode ser produzido por astrócitos, constitutivamente ou sobre indução de NOS por endotoxina/citocina. A função de NO derivado de astrócitos não é clara. Sabe-se que os astrócitos contêm um sistema antioxidante efetivo (MARKAR *et al.*, 1994; SAGARA *et al.*, 1993)



e são altamente resistentes a altas concentrações do oxidante deletério derivado de NO, peroxinitrito (BOLANOS *et al.*, 1995). No entanto, os astrócitos não são imunes à neurotoxicidade por N-metil-4-fenilpiridínio (MPP<sup>+</sup>, o metabólito ativo do MPTP) ou MPTP. Lesão astrocítica tem sido freqüentemente observada em ratos tratados agudamente com MPTP (ADAMS *et al.*, 1989; TER HORST *et al.*, 1992) ou em culturas tratadas com MPP<sup>+</sup> e/ou MPTP (TSAI e LEE, 1994; WU *et al.*, 1992; DI MONTE *et al.*, 1992).

Diversos efeitos do óxido nítrico são mediados possivelmente através da ativação da guanilato ciclase e aumento dos níveis de GMPc nas células alvo (IGNARRO *et al.*, 1981).

O estresse oxidativo clássico é descrito como desequilíbrio entre a geração e eliminação de ROS e RNS. Quando ocorre estresse oxidativo, as células trabalham para atenuar os efeitos oxidantes resultantes e para restaurar o equilíbrio redox. Todos os organismos possuem respostas adaptativas ao estresse, tais como a ativação de genes de codificam enzimas de defesa, fatores de transcrição e proteínas estruturais. Os neurônios, no entanto, são células pós-mitóticas. A inabilidade geral de dividir-se explica a perda de função relacionada ao envelhecimento em doenças neurodegenerativas.

### **1.1.3 MECANISMOS COMPENSATÓRIOS NA DP**

O sistema nervoso de indivíduos normais responde adaptativamente a eventos no ambientes externo e interno com alterações no sistema molecular, celular e a níveis comportamentais. Tem se tornado cada vez mais evidente que muitos dos mesmos mecanismos são invocados em resposta a doenças incluindo as doenças neurodegenerativas do sistema nervoso.

Estudos em modelos animais de DP indicam que a perda de componentes no sistema nigroestriatal resulta em uma resposta compensatória nos neurônios dopaminérgicos intactos com aumento no *turnover* de dopamina (ZIGMOND *et al.*, 1990). Dados recentes de tomografia por emissão de positrons (PET) indicam que o mesmo processo provavelmente ocorre na DP (SOSSI *et al.*, 2002). O resultado da resposta compensatória é a produção aumentada de dopamina produzida por neurônios da via nigroestriatal remanescentes intactos com manutenção de níveis sinápticos de dopamina mais próximos do normal

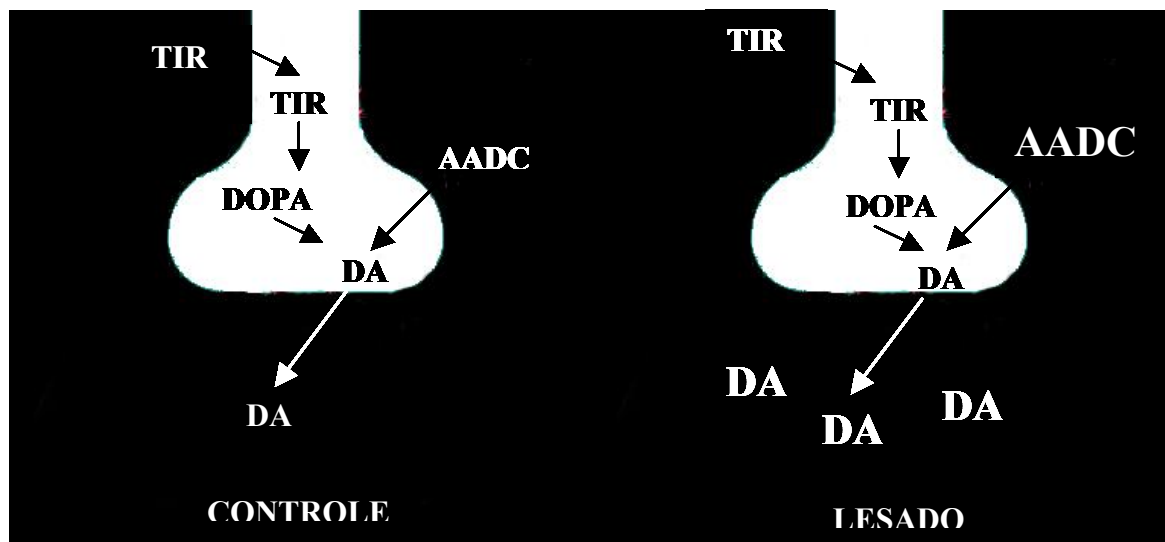


FIGURA 3. Diagrama representando as alterações compensatórias em terminais axônicos individuais de neurônios dopaminérgicos na DP. Com perda dos terminais nervosos ocorre aumento da atividade da AADC (aminoácido aromático descarboxilase) nos terminais restantes com aumento da produção e liberação de dopamina.

Estudos de PET demonstram que o início dos sintomas não ocorre até que a degeneração da via nigroestriatal esteja avançada com perda do transportador de dopamina (um marcador dopaminérgico) abaixo de 50% dos níveis do controle no putamen (JENNINGS *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2000; MORRISH *et al.*, 1998; RIBEIRO *et al.*, 2002; TABANO *et al.*, 2003; TEDROFF *et al.*, 1999) e perda da captação de dopamina abaixo de 50% dos níveis encontrados no grupo controle do putamen caudal.

A manutenção da função motora a níveis normais ou assintomáticos com perda de menos de 50% de dopamina no putamen reflete diversos processos. O primeiro é o aumento na síntese e liberação de dopamina a partir dos terminais nigroestriatais intactos como demonstrado nos modelos animais (SOSSI *et al.*, 2002). Se isso for acompanhado por *down-regulation* do transportador de dopamina, sua efetividade seria aumentada. O segundo é provavelmente resultado de desenvolvimento colateral a partir dos axônios dos neurônios dopaminérgicos em uma tentativa de reconstituir o terminal lesado. O terceiro é devido a respostas compensatórias em outros componentes do sistema nigroestriatal. Não está claro se isso representa *upregulation* da síntese de dopamina, desenvolvimento colateral ou uma combinação dessas respostas, porém sugeriu-se que esta resposta poderia melhorar significativamente os efeitos da neurodegeneração no neurônio

nigroestriatal no início do curso da doença (WHONE *et al.*, 2002). Uma quarta resposta compensatória observada foi o aumento da captação de 18-fluorodopa (18F-dopa) por neurônios serotoninérgicos do núcleo da rafe do mesencéfalo indicando uma *upregulation* funcional desses neurônios (RAKSHI *et al.*, 1999). Existe uma inervação densa do neostriado por neurônios serotoninérgicos no mesencéfalo e a liberação aumentada de 5-HT poderia compensar a perda de dopamina. O quinto processo compensatório seria uma reorganização da atividade dos componentes do sistema motor tálamo-cortical (EIDELBERG e EDWARDS, 2000).

#### **1.1.4 O MODELO ANIMAL DA RESERPINA**

As alterações motoras (bradicinesia, tremor e rigidez) são os principais sintomas da DP. A administração de reserpina induz hipocinesia, tremor e rigidez muscular transitória (COLPAERT, 1987; MENZAGHI *et al.*, 1997). Dessa forma, o efeito da reserpina na atividade locomotora espontânea é frequentemente utilizado como modelo de desordem motora na DP (COLPAERT, 1987; KAUR e STARR, 1995; MENZAGHI *et al.*, 1997; DAWSON *et al.*, 2000; DUTRA *et al.*, 2002), e diversas drogas antiparkinsonianas utilizadas clinicamente (p.ex., agonistas dopaminérgicos, levodopa, amantadina) demonstraram ser capazes de causar reversão das alterações locomotoras induzidas pela reserpina (MENZAGHI *et al.*, 1997). Esse fato sugere que o modelo da reserpina demonstra boa validade preditiva. A reserpina age a nível intraneuronal impedindo o armazenamento intravesicular de monoaminas (dopamina, 5HT e noradrenalina) através de mecanismos magnésio- e ATP- dependentes, com conseqüente depleção das monoaminas dos terminais nervosos (CARLSSON, 1975).

A reserpina possui ainda a capacidade de induzir estado depressivo em humanos. Dessa forma, o modelo da reserpina também pode ser utilizado para mimetizar a depressão. Alguns efeitos da reserpina, como ptose e hipertermia, são utilizados para predizer a atividade antidepressiva de drogas (BOURIN, 1990; ALMEIDA *et al.*, 1998). Além disso, um estudo do nosso grupo (SKALISZ *et al.*, 2002) mostrou que a administração de reserpina a camundongos induziu redução na preferência por sacarose, o que pode ser considerado como indicação de anedonia e aumento do estado depressivo (MONLEON *et al.*, 1995; WILLNER, 1997), além de redução na atividade locomotora espontânea, um índice de alteração motora frequentemente utilizado em estudos experimentais de DP. A hipocinesia induzida pela reserpina parece estar relacionada ao decréscimo na transmissão dopaminérgica (BOURIN, 1990) e a anedonia também pode estar relacionada ao

sistema dopaminérgico (WILLNER, 1997). Assim, a administração de reserpina constitui um modelo útil para mimetizar a associação entre depressão e DP.

O modelo da reserpina foi o primeiro modelo disponível pelos pesquisadores para avaliar tratamentos potenciais para DP. No entanto, a principal desvantagem desse modelo é a de que os déficits motores são temporários e não ocorrem danos ao trato nigroestriatal, como na DP. Além disso, uma crítica ao modelo da reserpina é o fato de esta causar efeitos não-específicos sobre a neurotransmissão monoaminérgica (GERLACH e RIDERER, 1996). Por outro lado, foi proposto que, além da dopamina, outros neurotransmissores monoaminérgicos, como serotonina e noradrenalina, estão envolvidos na associação entre depressão e DP (MAYEUX *et al.*, 1984; CHAN-PALAY e ASAN, 1989; BARBOSA *et al.*, 1997).

### **1.1.5 A LINHAGEM DE CAMUNDONGOS C57BL/6**

Estudos comportamentais e neuroquímicos (GIOVANNI *et al.*, 1991; MITRA *et al.*, 1994; MUTHANE *et al.*, 1994; SMEYNE *et al.*, 2000; SUNDSTROM *et al.*, 1987; SEDELIS *et al.*, 2000; HAOBAM *et al.*, 2005) envolvendo camundongos *inbred* C57BL/6 demonstram que essa linhagem é mais suscetível ao modelo de parkinsonismo do MPTP do que outras linhagens de camundongos, constituindo um modelo animal representativo de DP idiopática. A razão para a maior sensibilidade dessa linhagem de camundongos ao MPTP não é clara. No entanto, parece ser devida à pigmentação de melanina (HOSKINS e DAVIS, 1989), sugerindo o envolvimento de fatores genéticos na susceptibilidade a essa neurotoxina.

GIOVANNI *et al.* (1991) observaram que o tratamento com MPTP não induziu depleção de dopamina estriatal em camundongos Swiss, enquanto que em camundongos C57BL/6 houve 92% de depleção de dopamina após o tratamento. Além disso, HAOBAM *et al.*, (2005) mostraram que, 23 dias após tratamento com MPTP, os animais dessa linhagem não apresentaram recuperação dos níveis estriatais de dopamina, enquanto que em camundongos da linhagem Balb/c a recuperação foi de 38%. Neste mesmo estudo, a ausência de recuperação do conteúdo de dopamina estriatal na linhagem C57BL/6 foi acompanhada de incapacidade de recuperação da função motora. Em um estudo similar, SEDELIS *et al.* (2000) demonstraram que, após tratamento com MPTP, observou-se uma maior depleção de dopamina estriatal e aumento nos níveis de DOPAC em camundongos C57BL/6 em comparação à linhagem Balb/c. Mais ainda, apenas os animais C57BL/6 apresentaram perda neuronal na substância negra neste estudo.

Um importante fator que tem sido considerado para explicar a susceptibilidade dessa linhagem ao MPTP é a atividade enzimática da MAO-B. Utilizando métodos histoquímicos para o estudo da MAO, ZIMMER e GENESER (1987) sugeriram que diferenças na atividade da MAO-B entre camundongos C57BL/6 e NMRI poderiam explicar os diferentes efeitos do MPTP nestas linhagens. A MAO-B oxida o MPTP a MPP<sup>+</sup>, íon que é responsável por sua neurotoxicidade (SINGER *et al.*, 1987). MITRA *et al.*, (1994), demonstraram que camundongos C57BL/6 possuem maior conteúdo de MAO-B do que espécies resistentes aos efeitos do MPTP, além de apresentarem menor índice de MAO-A/MAO-B. Nesse sentido, foi demonstrado que o nível estriatal de MPP<sup>+</sup> é 30% maior em camundongos C57BL/6 do que nas linhagens menos suscetíveis FVB/N (GERMAN *et al.*, 1996) e CD-1 (GIOVANNI *et al.*, 1991).

Estudos demonstram diferenças no sistema dopaminérgico entre a linhagem C57BL/6 e outras menos suscetíveis. Dessa forma, observou-se que os camundongos C57BL/6 apresentam níveis de dopamina estriatal maiores que os da linhagem Balb/c (SEDELIS *et al.*, 2000), além de possuírem um número menor de neurônios dopaminérgicos (-20 a 33%) na SNc do que camundongos CD-1 (TAKADA *et al.*, 1993; MUTHANE *et al.*, 1994), o que poderia explicar a maior sensibilidade dessa linhagem ao MPTP. Além disso, comparações entre as linhagens DBA e C57BL/6 demonstraram que, embora não exista diferença na densidade de receptores D1 na SN dessas linhagens, os camundongos C57BL/6 apresentam maior densidade de receptores D2 nos neurônios da SN (PUGLISI-ALLEGRA e CABIB, 1997) e nos gânglios da base (CIARANELLO e BOHEME, 1982; ERWIN *et al.*, 1993; KANES *et al.*, 1993; NG *et al.*, 1994) do que a linhagem DBA.

### **1.1.6 INIBIDORES DA NOS**

O inibidor da NOS 7-nitroindazol (7-NI) é considerado relativamente específico para a isoforma neuronal de NOS *in vivo*, pois verificou-se que causou inibição da NOS cerebral sem causar aumento na pressão sanguínea (CONNOP *et al.*, 1994; MOORE *et al.*, 1993).

Diversos estudos demonstraram que o 7-NI protegeu contra a perda de dopamina estriatal e degeneração celular nigral em diversas espécies tratadas com MPTP (SCHULZ *et al.*, 1995; PRZEDBORSKI *et al.*, 1996; HANTRAYE *et al.*, 1996), anfetamina (DI MONTE *et al.*, 1996) e MPP<sup>+</sup> (MATTHEWS *et al.*, 1997a). Isto foi confirmado pela demonstração de que camundongos

deficientes na forma neuronal de NOS, porém não camundongos deficientes na forma não-neuronal, são resistentes à neurotoxicidade por MPTP (PRZEDBORSKI *et al.*, 1996).

O 7-NI, que é efetivo sistemicamente, também produziu reversão dos déficits motores e cognitivos parkinsonianos em macacos (HANTRAYE *et al.*, 1996). Além disso, tanto o 7-NI quanto um inibidor não seletivo da NOS, o  $N^{\omega}$ -nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), causaram reversão da perda da atividade da TH estriatal causada por injeção intranigral de ácido malônico (MA) (CONNOP *et al.*, 1996).

O 7-NI ganha rápido acesso ao cérebro (CASTAGNOLI *et al.*, 1997) onde seu mecanismo de ação está relacionado à inibição da nNOS (BABBEDGE *et al.*, 1993; PRZEDBORSKI *et al.*, 1996) e da atividade da MAO-B (CASTAGNOLI *et al.*, 1997; DI MONTE *et al.*, 1997; DESVIGNES *et al.*, 1997), de forma reversível. Ambos mecanismos de ação podem atenuar a deficiência de energia induzida por MPTP. Nesta linha de raciocínio, a inibição da produção de NO pode prevenir a toxicidade mitocondrial causada pelo NO ou por seu derivado peroxinitrito (CLEETER *et al.*, 1994; RADI *et al.*, 1994). Dessa forma, há evidências da relação entre o efeito neuroprotetor do 7-NI contra a neurotoxicidade por MPTP com sua habilidade de prevenir a depleção de energia (ROYLAND *et al.*, 1999). Por outro lado, o bloqueio do metabolismo do MPTP dependente de MAO-B atenuou a deficiência da fosforilação oxidativa mitocondrial (CHAN *et al.*, 1993).

Em concordância com o potencial neurotóxico do NO, outro inibidor da nNOS, a S-metilcitrulina, restaurou parcialmente as concentrações de dopamina estriatal em camundongos que receberam MPTP (MATTHEWS *et al.*, 1997b). Além disso, foi relatado que a S-metilcitrulina protegeu contra a perda neuronal em camundongos e macacos que receberam MPTP (SCHULZ *et al.*, 1995, HANTRAYE *et al.*, 1996, MATHEWS *et al.*, 1997).

A perda de neurônios dopaminérgicos na DP também está relacionada com o processo inflamatório, o qual é caracterizado por proliferação da micróglia e macrófagos reativos (MCGEER *et al.*, 1988a,b). Na DP ocorre inflamação disseminada no cérebro (MCGEER *et al.*, 1988a,b; AKIYAMA *et al.*, 1988; HIRSCH *et al.*, 1998) e aparecem células gliais ativadas expressando iNOS na substância negra (CHAO *et al.*, 1996; HUNOT *et al.*, 1996, 1999). Dessa forma, BRONSTEIN *et al.* (1995) demonstraram que em uma cultura de células neuronal/gliol mesencefálica, a morte celular induzida por LPS foi prevenida pela administração de aminoguanidina, um inibidor da iNOS relativamente seletivo. Além disso, Um estudo realizado por

SOUTHAN *et al.* (1995) demonstrou que a morte celular induzida por LPS foi significativamente atenuada por *S*-metilisotiourea (SMT), um inibidor da iNOS seletivo e potente.

### 1.1.7 TRANSTORNOS COMPORTAMENTAIS E PSIQUIATRICOS

A sintomatologia do paciente com DP não está restrita às alterações motoras tais como rigidez, tremor e bradicinesia. Trata-se na realidade de uma experiência multidimensional, incluindo não apenas a sintomatologia dos movimentos, mas também problemas no domínio funcional, cognitivo e psicossocial (GUPTA e BATHIA, 2000).

Existe um amplo espectro de distúrbios comportamentais associados à DP, incluindo depressão (CUMMINGS, 1992; TANDBERG *et al.*, 1996; MINDHAM, 1970; STARKSTEIN *et al.*, 1990; SHULMAN *et al.*, 1996), ansiedade (RICHARD *et al.*, 1996), fadiga (FRIEDMAN e FRIEDMAN, 1993), desordens do sono (PARTINEN, 1997), disfunções cognitivas (BROWN e MARSDEN, 1984; FRIEDMAN e BARCIKOWSKA, 1994) e psicose relacionada ao tratamento (MINDHAM, 1970). Coletivamente estes sintomas afetam mais de um terço e provavelmente mais da metade dos pacientes com DP. Existem evidências de que o tratamento precoce e agressivo da depressão pode ter impacto no desempenho desses pacientes (KUZIS *et al.*, 1997; STARKSTEIN *et al.*, 1990). Algumas, se não todas as manifestações não-motoras da DP flutuam da mesma maneira que as inabilidades motoras em pacientes *on-off*<sup>2</sup> (BODIS-WOLLNER *et al.*, 1987; NISSENBAUM *et al.*, 1987; MENZA *et al.*, 1990; WITJAS *et al.*, 2002).

Enquanto a DP é tradicionalmente descrita como uma desordem motora, tem ocorrido uma maior consciência que os sintomas não-motores comportamentais constituem uma importante forma de redução das habilidades funcionais dos pacientes com DP, resultando em deterioração da sua qualidade de vida.

#### 1.1.7.1 DEPRESSÃO

A depressão é o distúrbio neuropsiquiátrico mais comum na DP e é mais comum nesta doença que em outras desordens crônicas e desabilitantes e se correlaciona com alterações motoras e cognitivas. A prevalência de depressão na DP tem variado consideravelmente dependendo da metodologia diagnóstica empregada (CHOW *et al.*, 2000). Uma revisão de literatura mostra uma

---

<sup>2</sup> Na doença de Parkinson, especialmente nas fases mais avançadas e nos pacientes que utilizam o medicamento levodopa, costumam ocorrer oscilações do desempenho motor ao longo do dia. Essas oscilações são conhecidas como efeito *on-off* e estão presentes em mais de 50% dos pacientes com mais de 5 anos de doença.

frequência de cerca de 40% incluindo pacientes com depressão maior, menor e distímia (RABINSTEIN e SHULMAN, 2001).

A depressão pode ser difícil de ser reconhecida em pacientes com DP porque os sinais de ambas as desordens podem se sobrepor. Lentidão, aparência triste, insônia, perda de peso, apatia, anedonia, insatisfação sexual, perda de memória e perda de energia são manifestações tanto de depressão quanto da própria DP (VALDERIOLA *et al.*, 1997; GOTHAM *et al.*, 1986; MAYBERG e SOLOMON, 1995). Portanto, sinais e sintomas depressivos são comumente negligenciados, e sintomas emergentes da DP podem ser confundidos com depressão.

Foi demonstrado repetidamente que o perfil e a evolução dos sintomas depressivos na DP não são idênticos aos reportados na depressão idiopática (GOTHAM *et al.*, 1986; BROWN *et al.*, 1988; LEVIN *et al.*, 1988; HUBER *et al.*, 1990). Pacientes com DP parecem apresentar maior disforia, tristeza, irritabilidade e pessimismo. Em contraste, eles também apresentam menor sentimento de culpa, suicídio e sentimento de fracasso. Sintomas de ansiedade apresentam comorbidade com sintomas depressivos em 67%, e 97% dos pacientes com DP que apresentam desordem de ansiedade devem apresentar sintomas depressivos.

Fatores de risco para depressão na DP incluem: acinesia, inabilidade severa, ansiedade (BARBER *et al.*, 1985; TOM e CUMMINGS, 1998), sexo feminino, parkinsonismo no lado direito (COLE *et al.*, 1996), alteração da função cognitiva e presença de psicose (TANDBERG *et al.*, 1997), início precoce dos sintomas da DP, maior duração da doença, déficit motor severo, bradicinesia axial e alterações de marcha e equilíbrio (CHIA *et al.*, 1995; CUBO *et al.*, 2000; OERTEL *et al.*, 2001).

Até o momento, a fisiopatologia da depressão na DP não é totalmente conhecida. O próprio diagnóstico e o processo de conscientização de ter uma doença progressiva e inabilitante pode ser suficiente para causar depressão. Em qualquer estágio, uma deterioração rápida ou o desenvolvimento ou piora das complicações do tratamento pode levar ao estresse (GUPTA e BHATIA, 2000) O estresse expõe o paciente a níveis maiores de negatividade e seu desenvolvimento pode levar à depleção dos níveis de dopamina, portanto piorando o nível dos sintomas nos pacientes (GREENE e GRIFFIN, 1998). Portanto, uma combinação de fatores físicos e psicológicos pode levar a um esclarecimento maior da severidade da depressão.

Se a depressão é parte da patologia da DP ou se é desenvolvida como reação a uma doença incurável, é um tema que tem sido profundamente debatido. No entanto, tem sido reportado que a



depressão pode preceder as alterações motoras e de fato proposto que os indivíduos que inicialmente desenvolvem depressão podem representar um subgrupo de pacientes com parkinsonismo (SANTAMARIA, 1986). Além disso, a depressão na DP não parece estar relacionada com o estágio da doença e medicamentos dopaminérgicos geralmente não melhoram os sintomas de depressão.

Embora as alterações motoras, bem como os fatores sociais e psicológicos tenham influência no estado de humor na DP, existem evidências relacionadas a fatores orgânicos envolvidos na DP. Déficits de dopamina, 5HT e noradrenalina têm sido implicados nas bases neuroquímicas da desordem. Degeneração do sistema mesolímbico, área tegmental ventral, *locus coeruleus* e núcleo da rafe têm sido reportada. A depressão na DP tem sido associada com baixos níveis de 5-HIAA (ácido 5-hidroxiindolacético) no fluido cerebrospinal (ASBERG *et al.*, 1984).

A natureza endógena da depressão na DP explica sua ocorrência comum antes do início de sintomas motores detectáveis (LEVIN *et al.*, 1988; CELESIA e WANAMAKER, 1972), bem como a piora da depressão durante os períodos de “*off*” nos últimos estágios (LIU *et al.*, 1997).

Estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem que a alteração na função glutamatérgica está relacionada com a depressão (SKOLNICK, 1999; RADA *et al.*, 2003) e que antagonistas do receptor NMDA exibem atividade antidepressiva (TRULLAS e SKOLNICK, 1990; ROGÓ *et al.*, 2002; WATKINS e OLVERMAN, 1987; MARVIZON *et al.*, 1989; WATSON e LANTHORN, 1990; WONG *et al.*, 1986). O estímulo do receptor resulta em abertura dos canais de  $Ca^{++}$ , resultando em entrada de cálcio extracelular no neurônio. O cálcio se liga e estimula um complexo cálcio-calmodulina, que, por sua vez, estimula a síntese de óxido nítrico. Dessa forma, estudos têm sugerido que NO pode ser capaz de controlar a liberação de neurotransmissores, tais como dopamina e noradrenalina (ZHU e LUO, 1992; STRASSER *et al.*, 1994).

Diversos estudos demonstraram que inibidores da NOS reduzem de forma dose-dependente o tempo de imobilidade em camundongos no teste da natação forçada a um nível comparável ao do antidepressivo imipramina (HARKIN *et al.*, 1999) e que a inibição da NOS causa *down-regulation* dos  $\beta$ -adrenoreceptores corticais, com magnitude comparável ao tratamento crônico com imipramina (KAROLEWICZ *et al.*, 1999).

A primeira evidência de relação bioquímica entre medicamentos antidepressivos e atividade da NOS foi descrita por MITCHELL *et al.*, (1996). Estes autores observaram que a paroxetina, um

inibidor seletivo da captação de 5HT, inibiu a atividade da isoforma constitutiva de NOS em animais laboratoriais e humanos.

De acordo com essa evidência que inibidores da NOS possuem atividade antidepressiva, foi proposto um papel potencial para o NO em distúrbios afetivos (HARVEY, 1996). O NO é um regulador de alterações adaptativas neuronais de curto e longo prazo e, conseqüentemente, pode desempenhar um papel na adaptação neuronal a drogas antidepressivas. Os alvos para o NO incluem a guanilato ciclase, proteínas G, aminoácidos, liberação e transporte de neuropeptídeos. A síntese de GMPc induzida por NO também medeia a indução da expressão de genes de expressão imediata que estão implicados em alterações sinápticas de longo prazo e no mecanismo de ação de drogas antidepressivas (HARVEY, 1996; DUMAN *et al.*, 1997).

A escolha de antidepressivos na DP é realizada de acordo com a diferença no perfil de efeitos colaterais entre os agentes. Efeitos adversos típicos que limitam o uso de antidepressivos tricíclicos (TCAs) em pacientes com DP incluem hipotensão ortostática e efeitos antimuscarínicos. Os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (SSRIs) são particularmente úteis devido à relativa ausência de efeitos anticolinérgicos e cardiovasculares. Um estudo realizado por STEUR (1993), no entanto, descreve piora reversível do parkinsonismo após 10-14 dias de tratamento com fluoxetina.

Diante do exposto, torna-se evidente que o NO participa dos processos neurodegenerativos envolvidos na DP. Dessa forma, o presente trabalho buscou investigar os efeitos da inibição de duas isoformas de NOS (a nNOS e a iNOS) no modelo animal de parkinsonismo induzido pela reserpina, enfatizando-se as alterações motoras e a depressão associada à doença. Mais ainda, baseado em estudos que demonstram que a linhagem C57BL/6 é mais sensível ao modelo de parkinsonismo do MPTP que outras linhagens de camundongos, os efeitos da inibição das duas isoformas de NOS no modelo de parkinsonismo da reserpina foi realizado comparando-se as linhagens de camundongos Swiss e C57BL/6.

## **2. OBJETIVOS**

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar a influência dos inibidores da NOS no modelo animal de DP induzido por reserpina.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Verificar:

1. Os efeitos da administração de reserpina na atividade locomotora em camundongos Swiss e C57BL/6 através do teste do campo aberto.
2. Os efeitos da administração de reserpina na avaliação comportamental em camundongos Swiss e C57BL/6 no teste da natação forçada.
3. Os efeitos da administração do inibidor da óxido nítrico sintase neuronal 7-nitroindazol no modelo da reserpina em relação à atividade motora e avaliação comportamental em camundongos Swiss e C57BL/6.
4. Os efeitos da administração de 7-nitroindazol no modelo da reserpina em relação à avaliação comportamental no teste do consumo de sacarose em camundongos Swiss.
5. Os efeitos da administração do inibidor da óxido nítrico sintase induzida aminoguanidina no modelo da reserpina em relação à atividade motora e avaliação comportamental em camundongos Swiss e C57BL/6
6. Os efeitos da administração de 7-nitroindazol e aminoguanidina nos níveis de glutathione reduzida (GSH) em ratos, um índice de estresse oxidativo.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 ANIMAIS**

Foram utilizadas as seguintes espécies animais para a realização dos testes farmacológicos: camundongos machos, das linhagens Swiss e C57BL/6 e ratos da linhagem Wistar, mantidos em temperatura constante ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) com livre acesso a alimentação e água e em um ciclo de claro-escuro de 12h (7:00 -19:00h). Os animais foram obtidos através de cruzamentos sucessivos de matrizes provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

#### **3.2 DROGAS**

Reserpina (1mg/Kg) (Sigma)

7-NI (25mg/Kg) (Sigma)

Aminoguanidina (50mg/Kg) (Sigma)

Imipramina (25mg/Kg) (Sigma)

Veículo da reserpina: 50 $\mu$ l de ácido acético e água destilada

Veículo do 7-NI: óleo de milho

Veículo da aminoguanidina: solução salina

#### **3.3 REGIMES DE TRATAMENTO**

Para o teste do campo aberto, os animais foram divididos em quatro grupos com 10 camundongos. Os camundongos receberam inicialmente reserpina (1mg/kg - i.p) ou veículo e retornaram para suas gaiolas. Após 30 min receberam o 7-NI (25mg/kg - i.p), aminoguanidina (50mg/Kg - i.p) ou veículo. A função motora dos animais foi avaliada em todos os grupos 24 h, 48 h e 7 dias após o tratamento.

Para a avaliação dos efeitos do 7-NI, os grupos foram divididos da seguinte forma: (a) veículo da reserpina (VEI) + óleo de milho (OM); (b) VEI + 7-NI; (c) reserpina (RES) + (OM); (d) RES + 7-NI.

Para a avaliação dos efeitos da aminoguanidina, os grupos foram divididos da seguinte maneira: (a) VEI + solução salina (SAL); (b) VEI + aminoguanidina (AG); (c) RES + SAL; (d) RES + AG.

Para o teste da natação forçada, os animais foram divididos em seis grupos com 10 camundongos. Os animais receberam inicialmente reserpina (1mg/kg) ou veículo e retornaram para suas gaiolas. Após 30 min os animais receberam 7-NI (25mg/Kg), aminoguanidina (50mg/Kg) ou imipramina (25mg/Kg). Deste modo, os animais foram divididos nos seguintes grupos, para a avaliação dos efeitos do 7-NI: (a) VEI + OM; (b) VEI + 7-NI; (c) VEI + imipramina (IMI); (d) RES + OM; (e) RES + 7-NI; (f) RES + IMI.

Para se avaliar os efeitos da administração de aminoguanidina no teste da natação forçada, os animais foram divididos nos seguintes grupos: (a) VEI + SAL, (b) VEI + AG; (c) VEI + IMI; (d) RES + SAL; (e) RES + AG; (f) RES + IMI. O teste da natação forçada foi realizado em todos os grupos 24h após o tratamento.

Para o teste do consumo de sacarose, os animais foram divididos em quatro grupos com 10 camundongos Swiss. Os animais receberam inicialmente reserpina ou veículo e retornaram para suas gaiolas. Após 30 min os animais receberam 7-NI. Deste modo, os animais foram divididos nos seguintes grupos: (a) VEI + OM; (b) VEI + 7-NI; (c) RES + OM; (d) RES + 7-NI.

Para a análise dos níveis estriatais de glutathiona, os animais foram divididos em oito grupos com 6 ratos. Os animais receberam inicialmente reserpina ou veículo e retornaram para suas gaiolas. Após 30 min, receberam 7-NI (25mg/Kg) ou aminoguanidina (50mg/kg). Os grupos foram divididos da seguinte forma: (a) VEI + OM; (b) VEI + SAL; (c) VEI + 7-NI; (d) VEI + AG; (e) RES + OM; (f) RES + SAL; (g) RES + 7-NI; (h) RES + AG. Vinte e quatro horas após o tratamento, os animais foram sacrificados e seus cérebros retirados para quantificação dos níveis de glutathiona estriatal.

### **3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GERAL EM CAMPO ABERTO**

A análise da atividade locomotora espontânea foi realizada 24 h, 48 h e 7 dias após a administração de reserpina através do teste do campo aberto, que foi utilizado para detectar alterações motoras. O campo aberto consiste em uma arena circular de madeira com 40 cm de diâmetro e 30 cm de altura, pintada de branco. O fundo da arena é dividido em círculos concêntricos, em três partes que por sua vez são subdivididas através de segmentos de retas em 19 partes aproximadamente iguais. O aparelho foi construído de acordo com o sugerido por BROADHURST (1960).

Os animais foram colocados individualmente, no centro da arena e seu comportamento foi avaliado por 5 min. Durante a observação, os parâmetros indicativos da atividade geral registrados foram os seguintes:

1 – Frequência de locomoção: corresponde ao ato do animal cruzar, com as quatro patas, uma das divisões do chão da arena.

2 – Frequência de levantar: corresponde ao ato do animal de permanecer apoiado somente nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao chão da arena tendo a cabeça dirigindo para cima e tocando, ou não, as patas anteriores nas paredes do campo aberto.

3 – Duração de imobilidade: corresponde ao período de tempo, em segundos, durante o qual o animal não apresenta atividade motora, permanecendo estático no que diz respeito à cabeça, tronco e membros.

4 – Duração de latência: corresponde ao período de tempo, em segundos, que o animal leva para sair do círculo central do campo aberto.

Foram utilizados cronômetros para controle da duração de imobilidade, e duração de latência. A arena foi limpa com solução inodora de álcool 5% após a observação de cada animal para eliminar possíveis alterações decorrentes do odor deixados pelos animais.

### **3.5 TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA**

O teste da natação forçada é o método farmacológico mais amplamente empregado para se avaliar atividade antidepressiva (BOURIN, 1990). O teste mede o tempo que o animal gasta em comportamento de fuga em relação ao tempo gasto em comportamento de imobilidade em um cilindro preenchido com água.

A avaliação da atividade antidepressiva dos inibidores da NOS nos camundongos tratados com reserpina foi realizada 24h após o tratamento.

Os camundongos foram colocados individualmente em um cilindro preenchido com água à temperatura de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  durante seis minutos. Nos últimos quatro minutos foram medidos o tempo em que o camundongo ficou imóvel (definido como parado, ou com o mínimo de movimento necessário para manter o focinho fora da água) ou nadando (definido como movimento ativo).

Ao término dos seis minutos, os camundongos foram removidos da água e retornaram para suas gaiolas.



### **3.6 TESTE DE PREFERÊNCIA POR SACAROSE**

Os animais foram separados individualmente e habituados ao consumo de solução de sacarose (2%), estando expostos por 48h a duas garrafas, uma contendo água e outra contendo a solução de sacarose. O teste do consumo de sacarose foi desenvolvido através da avaliação do consumo dos conteúdos das duas garrafas (água e solução de sacarose) colocadas ao mesmo tempo nas gaiolas por um período de 24 h (modificado a partir de MONLEON *et al.*, 1995). O consumo foi medido pesando-se as garrafas antes e após o teste. A porcentagem de preferência por sacarose foi calculada de acordo com a fórmula: Porcentagem de preferência por sacarose x 100 / Consumo total, onde o consumo total = Consumo de solução de sacarose + Consumo de água.

### **3.7 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS ESTRIATAIS DE GLUTATIONA**

#### **3.7.1 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA**

Vinte e quatro horas após o tratamento com reserpina, os animais foram sacrificados e os cérebros foram removidos. Em seguida, os estriados foram dissecados, pesados e armazenados a uma temperatura de -70°C até a análise da glutaciona.

#### **3.7.2 ENSAIO ENZIMÁTICO**

A glutaciona foi quantificada no estriado usando o método de SEDLAK e LINDSAY (1968) com algumas modificações. Foi adicionado 200µL de ácido tricloroacético a 50% ao homogenato 8% EDTA. Os tubos foram agitados vigorosamente e centrifugados a 3000 rpm por 15 min. Alíquotas de sobrenadante foram adicionadas com 04 M de tampão Tris HCL (pH 8,9) e 0.01M 5,5-ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzoíco) (Sigma and Co, Saint Louis, MO, USA) em 96 poços de microplaca. As absorbâncias foram determinadas a 412 nm através de leitor de Elisa e os níveis de NP-SH (ligação do reagente DTNB ao grupo sulfidril do GSH) foram calculados usando uma curva padrão de glutaciona (0.375-3.0 µg).

### **3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados em cada experimento foram analisados através de ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey. Os dados que apresentaram heterogeneidade de variância foram analisados através da análise não-paramétrica de Kruskal Wallis seguida por comparação *post hoc* de Dunns.

As diferenças foram consideradas significantes com  $P < 0.05$ . Os dados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

## **4. RESULTADOS**

## 4 RESULTADOS

### 4.1 COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE GERAL EM CAMPO ABERTO ENTRE CAMUNDONGOS DAS LINHAGENS SWISS E C57BL/6 TRATADOS COM RESERPINA.

Como mostra a FIGURA 1, a análise estatística indica diferença entre as linhagens nos parâmetros locomotores do campo aberto. Os animais da linhagem Swiss apresentaram maior atividade locomotora do que os animais da linhagem C57BL/6. Como pode ser observado, as frequências de locomoção ( $F(4,72) = 24.84$ ;  $P < 0.01$ ) e levantar ( $F(4,74) = 20.88$ ;  $P < 0.001$ ) foram significativamente maiores nos animais da linhagem Swiss quando comparados aos animais C57BL/6, enquanto que a duração de latência ( $H = 16.34$ ;  $P < 0.01$ ) foi maior nos animais C57BL/6 do que nos animais da linhagem Swiss. Não houve diferença entre as linhagens na duração de imobilidade. O tratamento com reserpina causou redução da atividade motora nas duas linhagens de camundongos. Assim, houve redução nas frequências de locomoção (Swiss:  $P < 0.001$ ; C57BL/6:  $P < 0.001$ ) e levantar (Swiss:  $P < 0.01$ ; C57BL/6:  $P < 0.05$ ) e aumento nos tempos de imobilidade ( $H = 29.13$ ; Swiss:  $P < 0.01$ ; C57BL/6:  $P < 0.001$ ) e latência (Swiss:  $P < 0.05$ ; C57BL/6:  $P < 0.05$ ) nas duas linhagens de camundongos tratados com reserpina quando comparados a seus respectivos grupos controles. Os animais da linhagem C57BL/6 apresentaram maior redução da função motora quando comparados aos animais Swiss, após o tratamento com reserpina. De fato, as frequências de locomoção ( $P < 0.01$ ) e levantar ( $P < 0.001$ ) foram estatisticamente significante maiores nos animais da linhagem Swiss quando comparados aos animais C57BL/6, enquanto que os tempos de imobilidade ( $P < 0.05$ ) e latência ( $P < 0.01$ ) foram maiores nos animais C57BL/6 do que nos animais da linhagem Swiss.

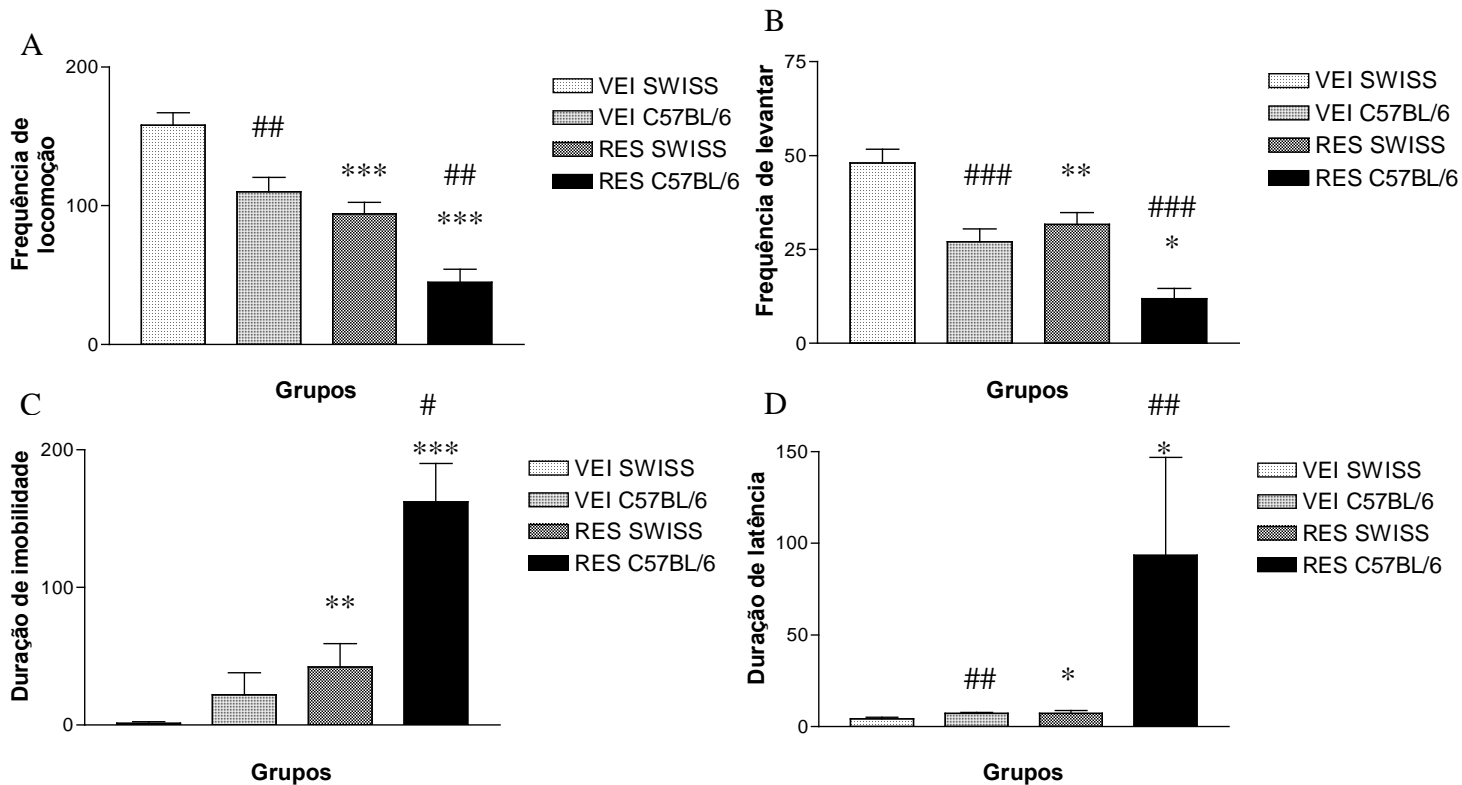


FIGURA 1. Efeitos da administração de reserpina (1mg/kg) na atividade geral de camundongos Swiss e C57BL/6 observados em um campo aberto 24h após o tratamento (n=20/grupo). (A) freqüência de locomoção, (B) freqüência de levantar, (C) duração de imobilidade, (D) duração de latência para início do movimento. \*P<0.05 comparado ao grupo veículo correspondente. \*\*P<0.01 comparado ao grupo veículo correspondente. \*\*\*P<0.001 comparado ao grupo veículo correspondente. #P<0.05 comparado ao grupo Swiss. ##P<0.01 comparado ao grupo Swiss.###P<0.001 comparado ao grupo Swiss.

#### **4.2 EFEITOS DO 7-NI NA ATIVIDADE GERAL DE CAMUNDONGOS SWISS TRATADOS COM RESERPINA.**

Como mostra a FIGURA 2, o tratamento com reserpina causou hipolocomoção nos animais do grupo RES+OM quando comparado ao grupo VEI+OM 24 h após a injeção de reserpina. De fato, a reserpina (1mg/Kg) induziu uma diminuição significativa nas freqüências de locomoção ( $F(4,34) = 3.69; P < 0.05$ ) e levantar ( $F(4,34) = 3.10; P < 0.05$ ) e um aumento significativo na duração de imobilidade ( $H = 12.29; P < 0.05$ ). Por outro lado, o tratamento com 7-NI aboliu esse efeito. Como pode ser observado, as freqüências de locomoção e levantar e a duração de imobilidade dos animais do grupo RES+7-NI não foram diferentes das freqüências apresentadas pelo grupo VEI+OM. Finalmente, nenhum grupo experimental apresentou diferença no tempo de latência quando comparados ao grupo VEI+OM.

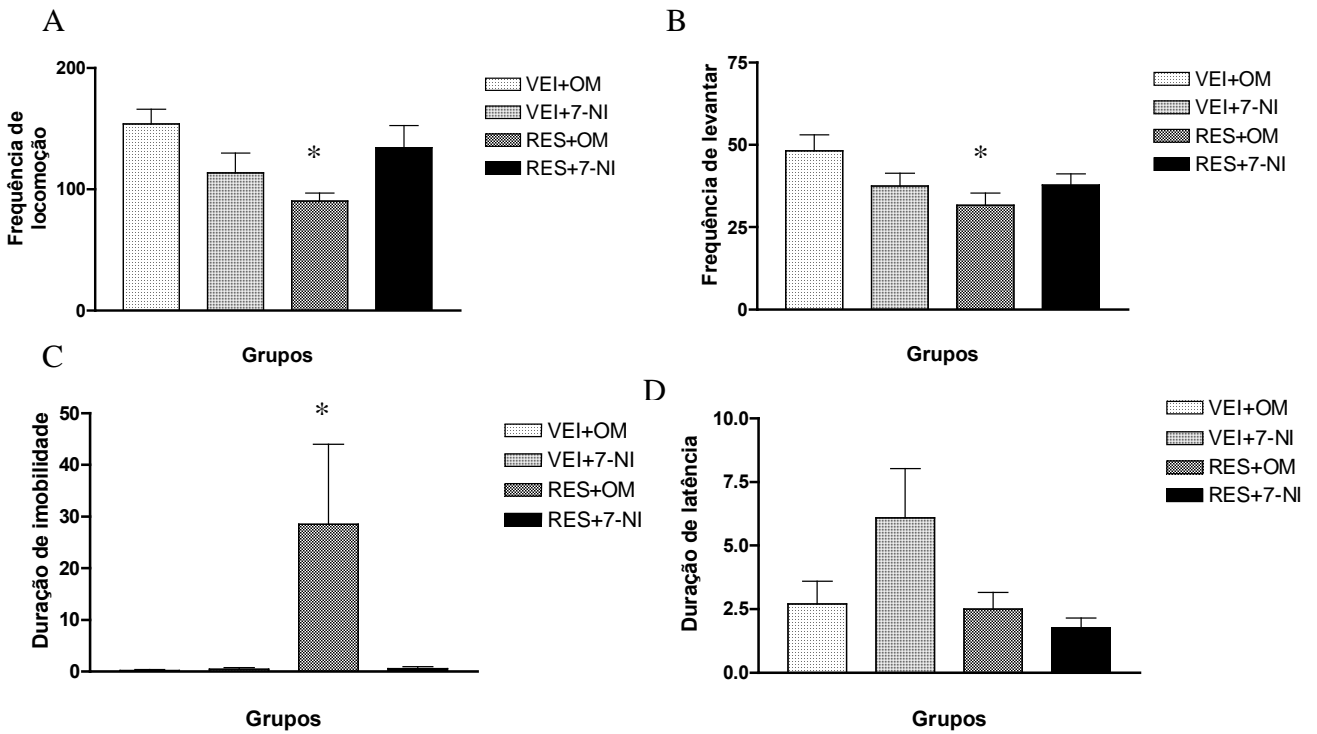


FIGURA 2. Efeitos da administração de 7-NI (25mg/kg) na atividade geral de camundongos Swiss tratados com reserpina (1mg/Kg) e observados em um campo aberto 24h após os tratamentos (n=10/grupo). (A) frequência de locomoção, (B) frequência de levantar, (C) duração de imobilidade, (D) duração de latência para início do movimento. \*P<0.05 comparado ao grupo VEI+OM.

Como pode ser observado na FIGURA 3, a administração de reserpina também causou redução da atividade geral no campo aberto no grupo RES+OM 48 h após a injeção de reserpina. Em comparação ao grupo VEI+OM, o tratamento com reserpina (grupo RES+OM) causou diminuição na atividade geral, como demonstrado pela diminuição nas frequências de locomoção ( $H = 8.21$ ;  $P < 0.05$ ) e levantar ( $H = 9.64$ ;  $P < 0.05$ ) e aumento no tempo de imobilidade ( $H = 10.02$ ;  $P < 0.05$ ). O tratamento com 7-NI reverteu a hipolocomoção induzida pela administração de reserpina. De fato, as frequências de locomoção e levantar e o tempo de imobilidade dos animais no grupo RES+7-NI não foram diferentes daquelas apresentadas pelo grupo VEI+OM. Novamente, não houve diferenças entre os grupos com relação à latência quando comparados ao grupo VEI+OM.



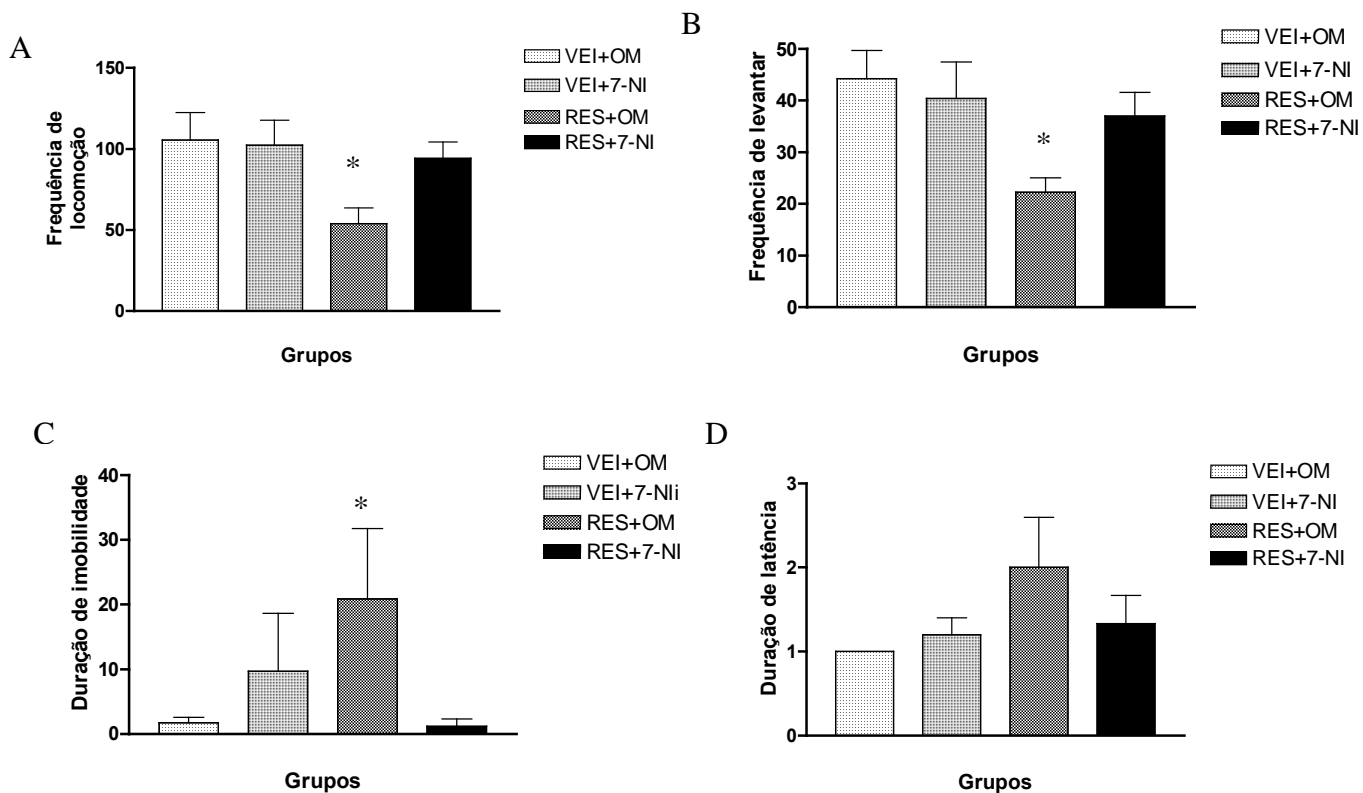


FIGURA 3. Efeitos da administração de 7-NI (25mg/kg) na atividade geral de camundongos Swiss tratados com reserpina (1mg/Kg) e observados em um campo aberto 48h após os tratamentos (n=10/grupo). (A) freqüência de locomoção, (B) freqüência de levantar, (C) duração de imobilidade, (D) duração de latência para início do movimento. \*P<0.05 comparado ao grupo VEI+OM.

Sete dias após a administração de reserpina, nenhum grupo apresentou diferenças nos parâmetros analisados no campo aberto, como mostra a FIGURA 4.

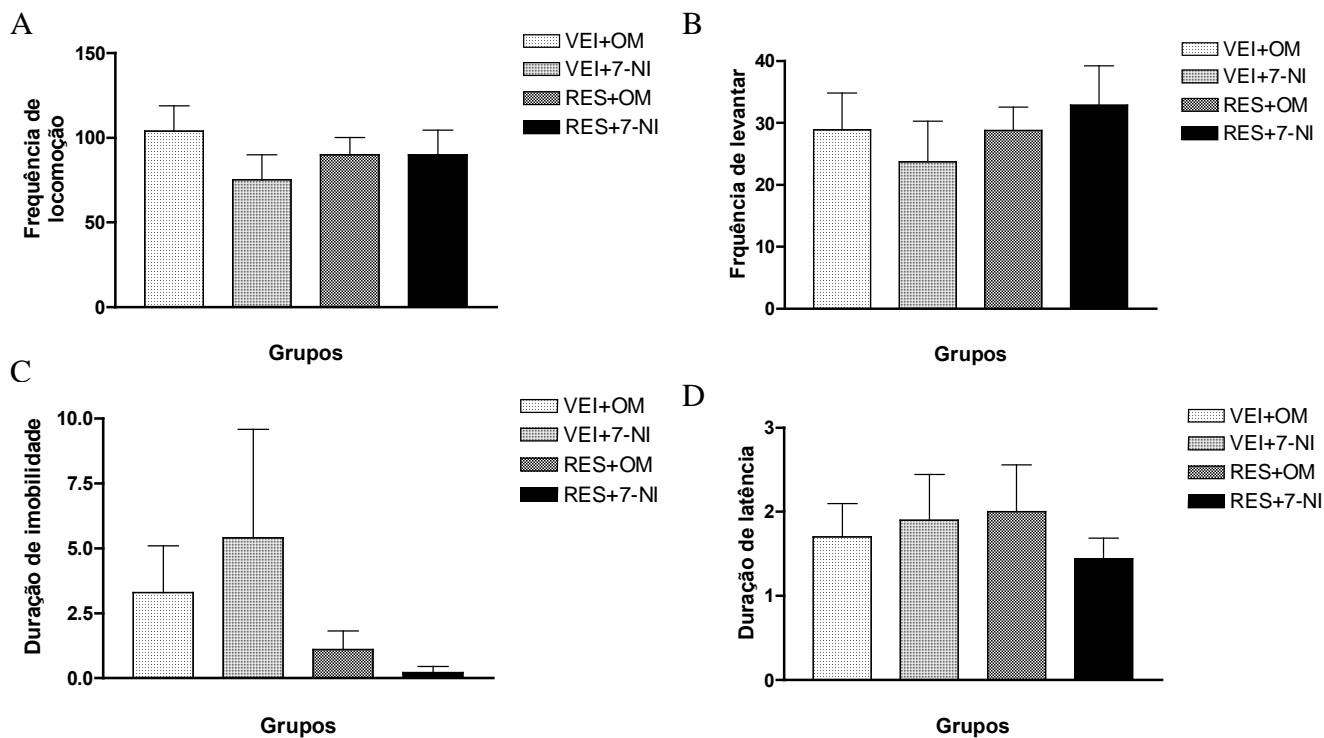


FIGURA 4. Efeitos da administração de 7-NI (25mg/kg) na atividade geral de camundongos Swiss tratados com reserpina (1mg/Kg) e observados em um campo aberto 7 dias após os tratamentos (n=10/grupo). (A) freqüência de locomoção, (B) freqüência de levantar, (C) duração de imobilidade, (D) duração de latência para início do movimento. \*P<0.05 comparado ao grupo VEI+OM.

### **4.3 EFEITOS DO 7-NI NA ATIVIDADE GERAL DE CAMUNDONGOS C57BL/6 TRATADOS COM RESERPINA.**

Vinte e quatro horas após o tratamento, os camundongos que receberam reserpina (RES+OM) apresentaram atividade locomotora significativamente menor do que o grupo VEI+OM no teste do campo aberto. O grupo RES+OM apresentou uma diminuição significativa nas freqüências de locomoção ( $F(4,39) = 10,35$ ;  $P < 0.01$ ) e levantar ( $F(4,42) = 3,65$ ;  $P < 0.05$ ) e um aumento nos tempos de imobilidade ( $H = 20,69$ ;  $P < 0.01$ ) e latência ( $H = 8,71$ ;  $P < 0.05$ ), como demonstrado na FIGURA 5. O tratamento com 7-NI não foi capaz de reverter a diminuição nas freqüências de locomoção e levantar causada pelo tratamento com reserpina. De fato, houve diferenças estatisticamente significantes nas freqüências de locomoção ( $p < 0.01$ ) e levantar ( $p < 0.05$ ) nos animais do grupo RES+7-NI quando comparados ao grupo VEI+OM. Os camundongos tratados com 7-NI (grupo RES+7-NI), no entanto, não apresentaram diferenças significantes em relação aos grupos VEI+OM e VEI+7-NI nos parâmetros imobilidade e latência 24 h após o tratamento, refletindo uma reversão na hipocinesia causada pela reserpina nestes parâmetros do campo aberto.

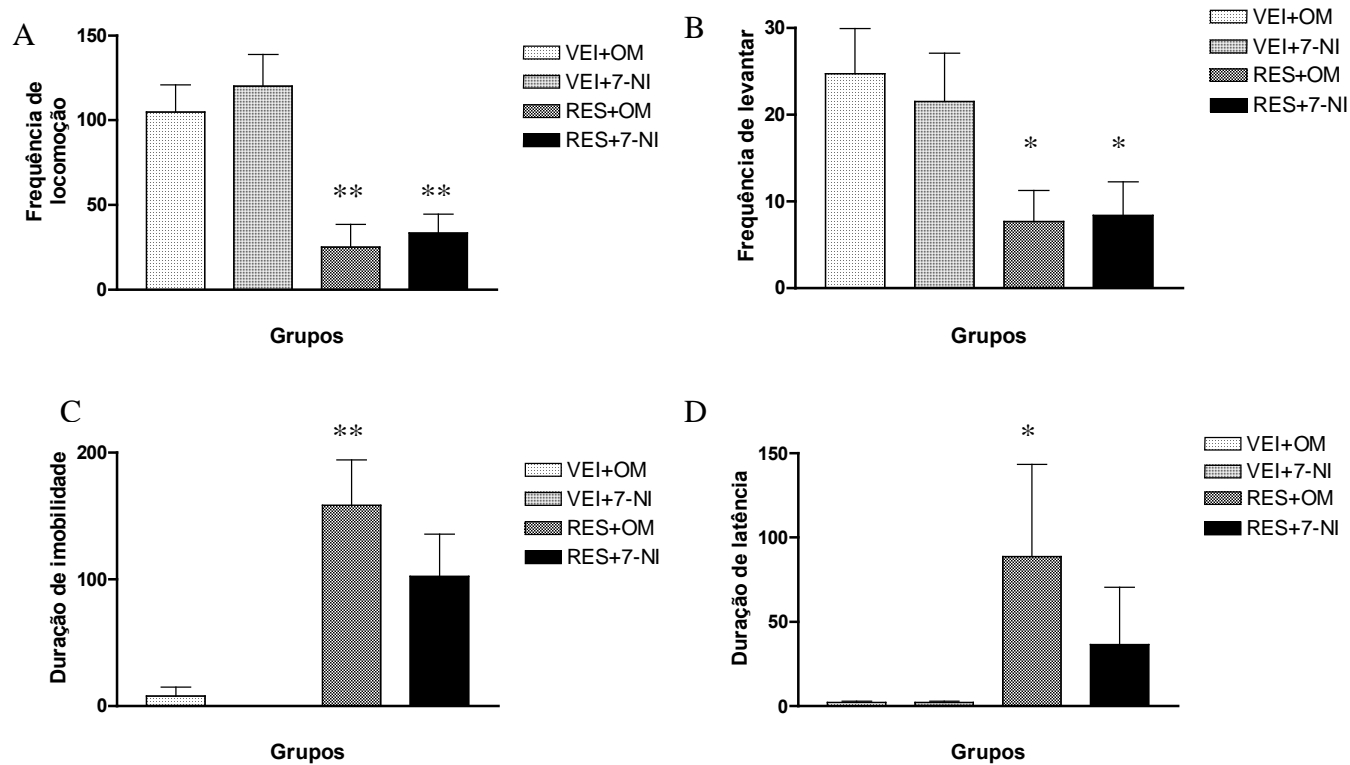


FIGURA 5. Efeitos da administração de 7-NI (25mg/kg) na atividade geral de camundongos C57BL/6 tratados com reserpina (1mg/Kg) e observados em um campo aberto 24 h após os tratamentos (n=10/grupo). (A) freqüência de locomoção, (B) freqüência de levantar, (C) duração de imobilidade, (D) duração de latência para início do movimento. \*P<0.05 comparado ao grupo VEI+OM. \*\*P<0.01 comparado ao grupo VEI+OM.

Como pode ser observado na FIGURA 6, 48 h após os tratamentos, o grupo RES+OM ainda apresentou uma atividade geral diminuída no teste do campo aberto. O tratamento com reserpina diminuiu as freqüências de locomoção ( $F(4,42) = 11,04$ ;  $P < 0.05$ ) e levantar ( $F(4,34) = 3,13$ ;  $P < 0.05$ ) e aumentou o tempo de latência ( $F(4,42) = 4.31$ ;  $P < 0.05$ ). Não houve mais alterações significativas no tempo de imobilidade 48h após a administração de reserpina. No grupo tratado com 7-NI (RES+7-NI) houve redução estatisticamente significativa na freqüência de locomoção quando comparada ao grupo controle (VEI+OM), demonstrando uma ausência de efeito do 7-NI na diminuição da freqüência de locomoção causada pela reserpina. Nos outros parâmetros (levantar, imobilidade e latência), no entanto, não houve diferença entre os grupos RES+7-NI e controle (VEI+OM).

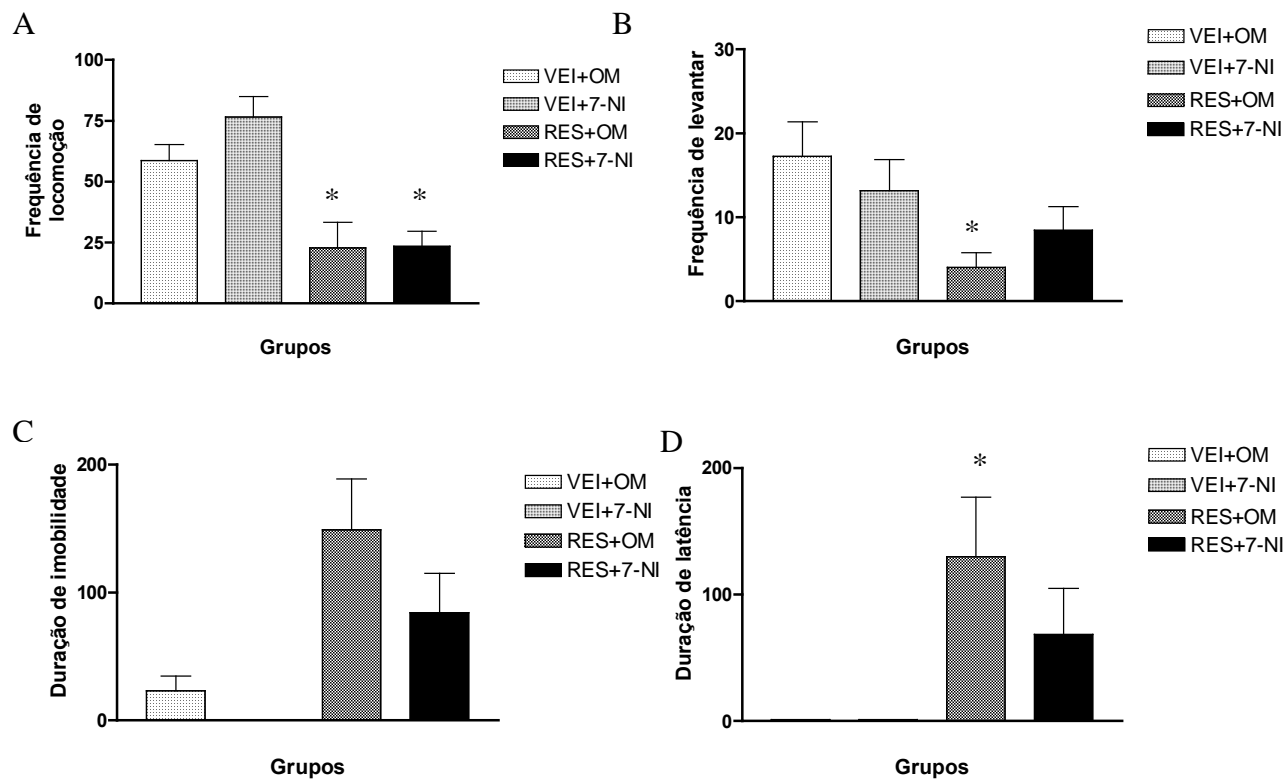


FIGURA 6. Efeitos da administração de 7-NI (25mg/kg) na atividade geral de camundongos C57BL/6 tratados com reserpina (1mg/Kg) e observados em um campo aberto 48h após os tratamentos (n=10/grupo). (A) frequência de locomoção, (B) frequência de levantar, (C) duração de imobilidade, (D) duração de latência para início do movimento. \*P<0.05 comparado ao grupo VEI+OM.

Como mostra a FIGURA 7, sete dias após o tratamento, a frequência de levantar ainda estava significativamente reduzida ( $H = 10.06$ ;  $P < 0.05$ ) nos camundongos tratados com reserpina (grupo RES+OM) quando comparados ao grupo VEI+OM. Não houve diferenças significantes nos outros parâmetros do campo aberto (locomoção, imobilidade e latência). Não houve diferença entre os grupos RES+7-NI e controle (VEI+OM) na frequência de levantar, demonstrando um efeito de reversão pelo 7-NI na diminuição do parâmetro levantar causada pela reserpina.

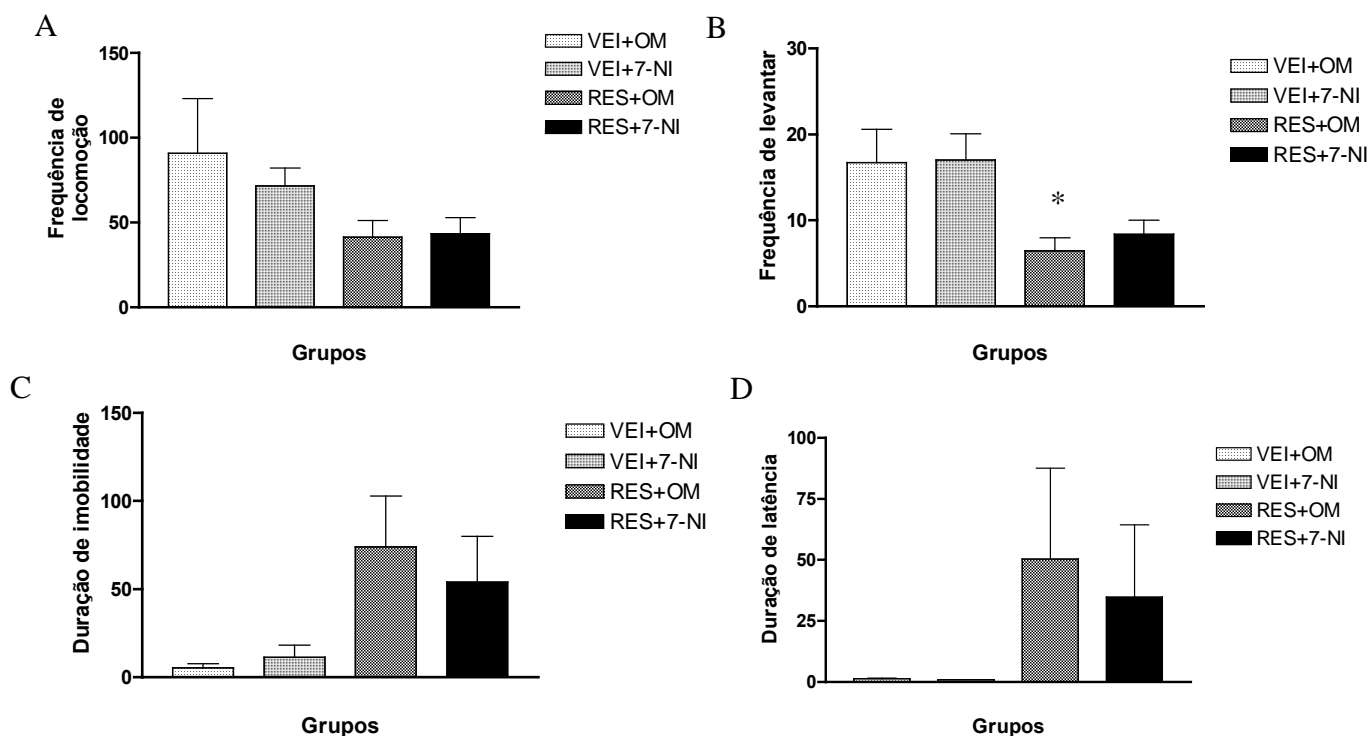


FIGURA 7. Efeitos da administração de 7-NI (25mg/kg) na atividade geral de camundongos C57BL/6 tratados com reserpina (1mg/Kg) e observados em um campo aberto 7 dias após os tratamentos (n=10/grupo). (A) frequência de locomoção, (B) frequência de levantar, (C) duração de imobilidade, (D) duração de latência para início do movimento. \* $P < 0.05$  comparado ao grupo VEI+OM.

#### 4.4 EFEITOS DO 7-NI NO TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA EM CAMUNDONGOS SWISS TRATADOS COM RESERPINA.

A FIGURA 8 mostra os efeitos da administração de 7-NI em camundongos Swiss tratados com reserpina no teste da natação forçada 24 h após o tratamento. Como pode ser observado, a administração de reserpina (1mg/Kg) (grupo RES+OM) causou aumento significativo ( $F(6,100) = 7,77$ ;  $P < 0.01$ ) no tempo de imobilidade quando comparado ao grupo controle (VEI+OM). O tratamento com 7-NI, por outro lado, aboliu esse efeito. De fato, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos RES+OM e RES+7-NI ( $P < 0.05$ ), enquanto que o grupo RES+7-NI não diferiu dos controles (VEI+OM e VEI+7-NI).

No que diz respeito ao controle positivo, os dados indicam que a imipramina não foi capaz de reverter o aumento na imobilidade causado pela administração de reserpina, uma vez que, como pode ser observado, houve diferença estatística ( $P < 0.05$ ) entre os grupos RES+IMI e VEI+OM, enquanto que o grupo RES+IMI não diferiu do grupo RES+OM.

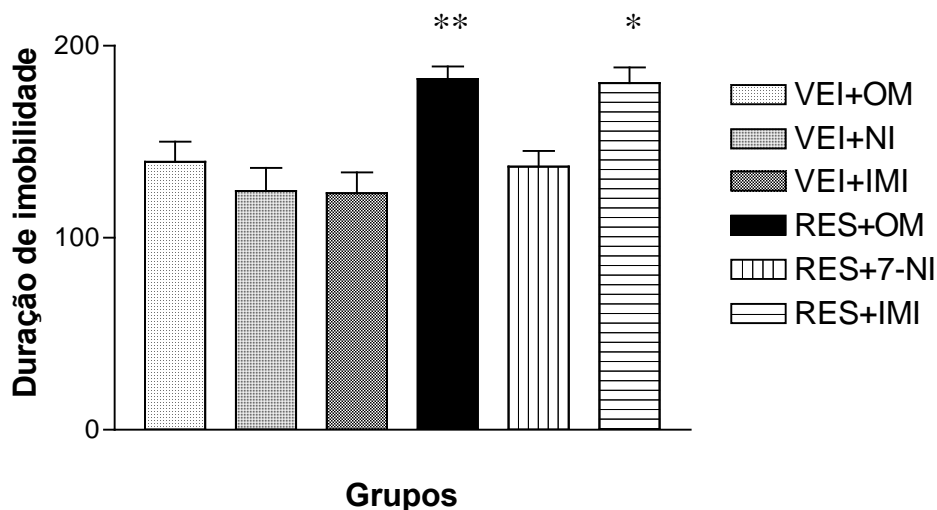


FIGURA 8. Efeitos da administração de 7-NI (25mg/kg) no tempo de imobilidade de camundongos Swiss tratados com reserpina (1mg/Kg) e avaliados no teste da natação forçada 24h após os tratamentos (n=10/grupo). \* $P < 0.05$  comparado ao grupo VEI+OM. \*\* $P < 0.01$  comparado ao grupo VEI+OM.



#### 4.5 EFEITOS DO 7-NI NO TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA EM CAMUNDONGOS C57BL/6 TRATADOS COM RESERPINA.

A FIGURA 9 mostra os efeitos da administração de 7-NI em camundongos C57BL/6 tratados com reserpina no teste da natação forçada 24 h após os tratamentos. Os dados indicam que a reserpina causou aumento significativo ( $F(6,61) = 14,67$ ;  $P < 0.01$ ) no tempo de imobilidade (grupo RES+OM) quando comparado ao grupo controle (VEI+OM).

A administração de 7-NI não foi capaz de reverter o aumento no tempo de imobilidade causado pela administração de reserpina. De fato, houve diferença estatística entre os animais dos grupos RES+7-NI e VEI+OM.

Em relação ao controle positivo, a análise estatística mostrou que embora a administração de imipramina (25mg/Kg) tenha revertido o aumento de imobilidade causado pela reserpina, os animais tratados com imipramina não apresentaram alteração estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (VEI+OM).

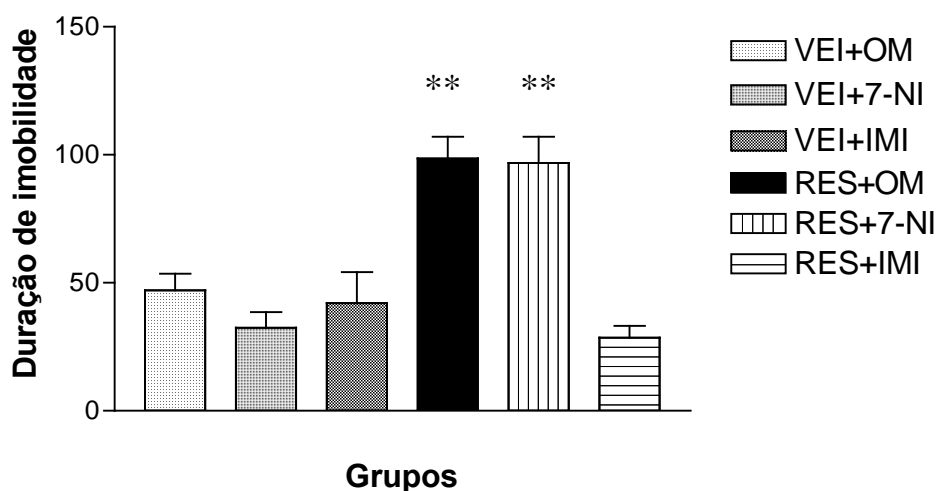


FIGURA 9. Efeitos da administração de 7-NI (25mg/kg) no tempo de imobilidade de camundongos C57BL/6 tratados com reserpina (1mg/Kg) e avaliados no teste da natação forçada 24 h após os tratamentos (n=10/grupo). \*\* $P < 0.01$  comparado ao grupo VEI+OM.

#### **4.6 EFEITOS DA AMINO Guanidina Na Atividade Geral De Camundongos Swiss Tratados Com Reserpina.**

Vinte e quatro horas após o tratamento, os camundongos tratados com reserpina (RES+SAL) apresentaram locomoção significativamente menor que o grupo VEI+SAL no teste do campo aberto. O grupo RES+SAL apresentou uma diminuição significativa nas freqüências de locomoção ( $F(4,39) = 12,08$ ;  $P < 0.01$ ) e levantar ( $F(4,39) = 9,98$ ;  $P < 0.05$ ), como demonstra a FIGURA 10.

O tratamento com aminoguanidina não foi capaz de reverter a diminuição nas freqüências de locomoção e levantar causada pelo tratamento com reserpina. De fato, houve diferenças estatisticamente significantes nas freqüências de locomoção ( $p < 0.01$ ) e levantar ( $p < 0.001$ ) nos animais do grupo RES+AG quando comparados ao grupo VEI+SAL.

Não houve diferença significativa entre os grupos nos outros parâmetros do campo aberto (duração de imobilidade e latência).

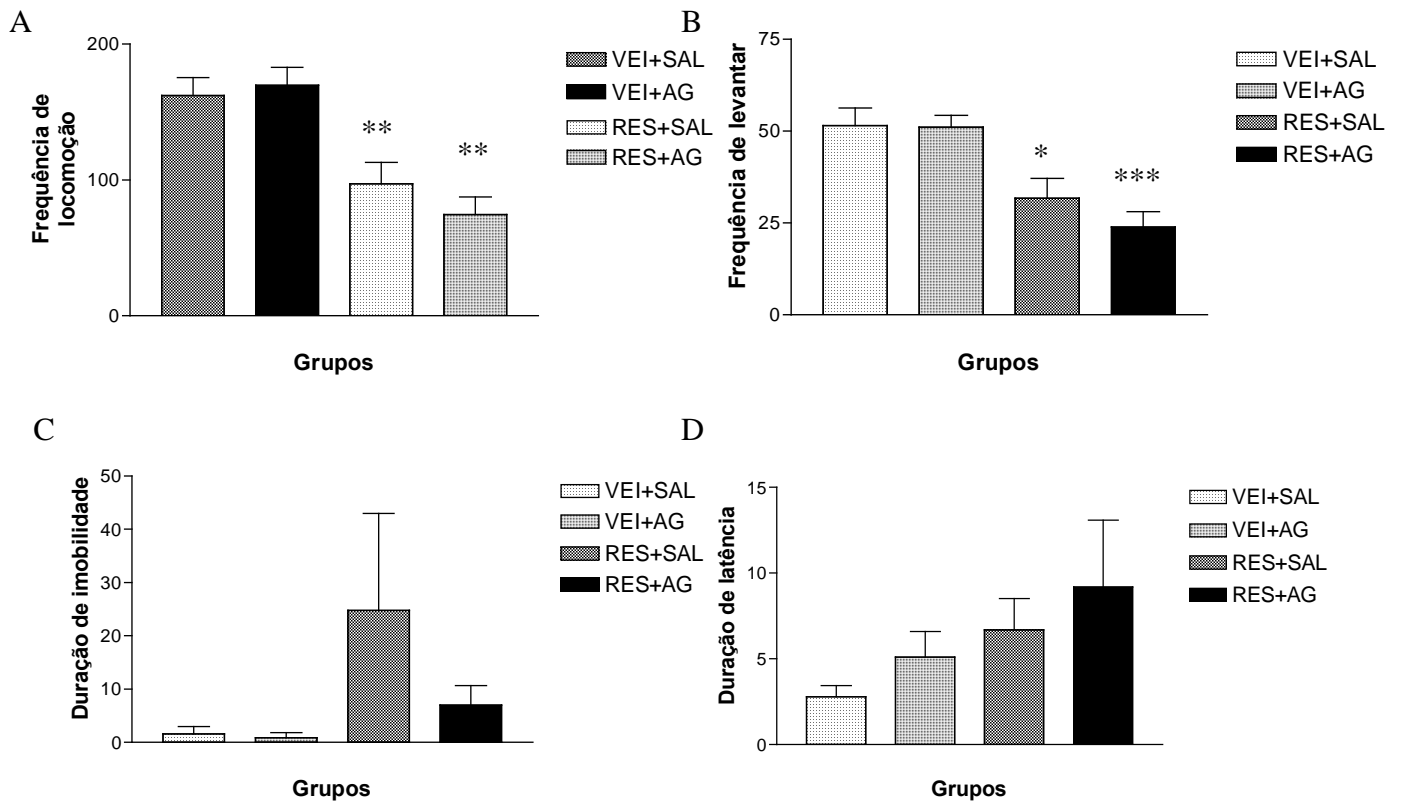


FIGURA 10. Efeitos da administração de aminoguanidina (50mg/kg) na atividade geral de camundongos Swiss tratados com reserpina (1mg/Kg) e observados em um campo aberto 24h após os tratamentos (n=10/grupo). (A) frequência de locomoção, (B) frequência de levantar, (C) duração de imobilidade, (D) duração de latência para início do movimento. \*P<0.05 comparado ao grupo VEI+SAL. \*\*P<0.01 comparado ao grupo VEI+SAL. \*\*\*P<0.001 comparado ao grupo VEI+SAL.

Na sessão de observação realizada 48 h após o tratamento, nenhum grupo apresentou diferença estatisticamente significativa nos parâmetros analisados no campo aberto, como ilustra a FIGURA 11. Como a reserpina não causou diminuição na atividade geral no campo aberto 48h após sua administração, este teste não foi repetido 7 dias após o tratamento.

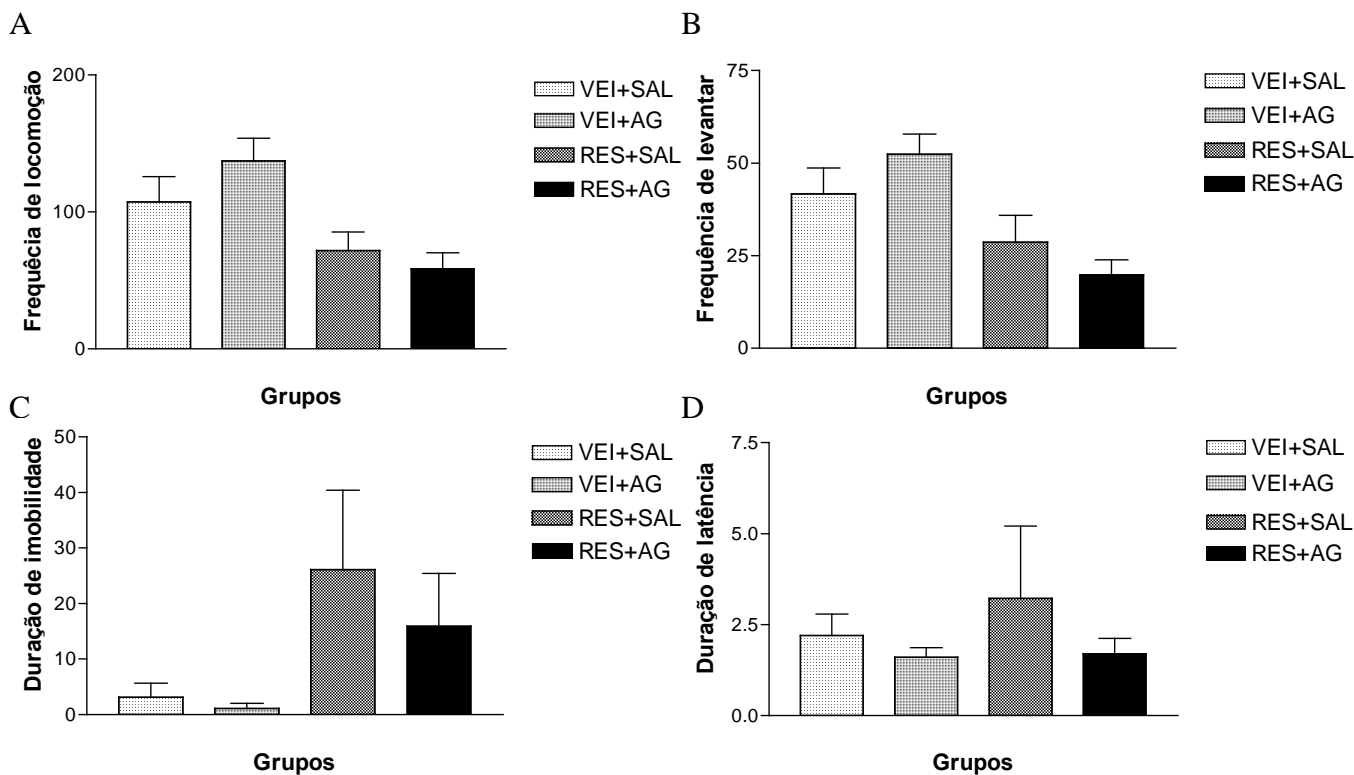


FIGURA 11. Efeitos da administração de aminoguanidina (50mg/kg) na atividade geral de camundongos Swiss tratados com reserpina (1mg/Kg) e observados em um campo aberto 48 h após os tratamentos (n=10/grupo). (A) freqüência de locomoção, (B) freqüência de levantar, (C) duração de imobilidade, (D) duração de latência para início do movimento.

#### **4.7 EFEITOS DA AMINO Guanidina NA ATIVIDADE GERAL DE CAMUNDONGOS C57BL/6 TRATADOS COM RESERPINA.**

O grupo RES+SAL apresentou uma diminuição significativa nas freqüências de locomoção ( $F(4,38) = 8,05$ ;  $P < 0.01$ ) e levantar ( $F(4,30) = 5,07$ ;  $P < 0.05$ ), como mostra a FIGURA 12.

O tratamento com aminoguanidina não foi capaz de reverter a diminuição na freqüência de locomoção causada pelo tratamento com reserpina. De fato, houve diferença estatisticamente significativa nas freqüências de locomoção ( $p < 0.05$ ) nos animais do grupo RES+AG quando comparados ao grupo VEI+SAL. A administração de aminoguanidina, no entanto, causou reversão do aumento na freqüência de levantar causada pela reserpina. Como pode ser observado na FIGURA 12, não houve diferença estatística entre os grupos RES+AG e VEI+SAL.

Nos outros parâmetros do campo aberto (duração de imobilidade e latência) não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

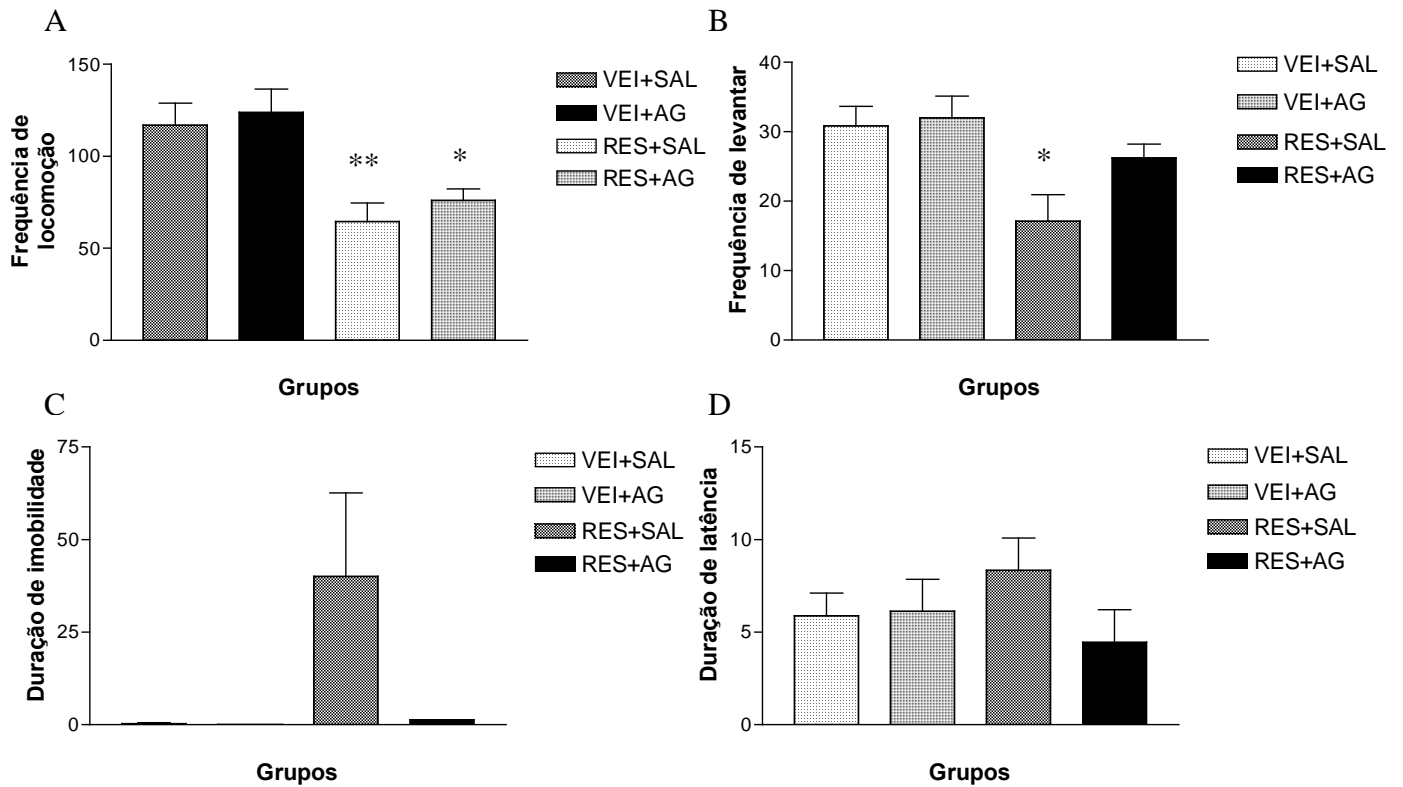


FIGURA 12. Efeitos da administração de aminoguanidina (50mg/kg) na atividade geral de camundongos C57BL/6 tratados com reserpina (1mg/Kg) e observados em um campo aberto 24 h após os tratamentos (n=10/grupo). (A) freqüência de locomoção, (B) freqüência de levantar, (C) duração de imobilidade, (D) duração de latência para início do movimento. \*P<0.05 comparado ao grupo VEI+SAL. \*\*P<0.01 comparado ao grupo VEI+SAL.

Quarenta e oito horas após o tratamento, nenhum grupo apresentou diferença estatisticamente significativa nos parâmetros investigados no campo aberto, como demonstra a FIGURA 13. Como a reserpina não causou diminuição na atividade geral no campo aberto 48h após sua administração, este teste não foi repetido 7 dias após o tratamento.

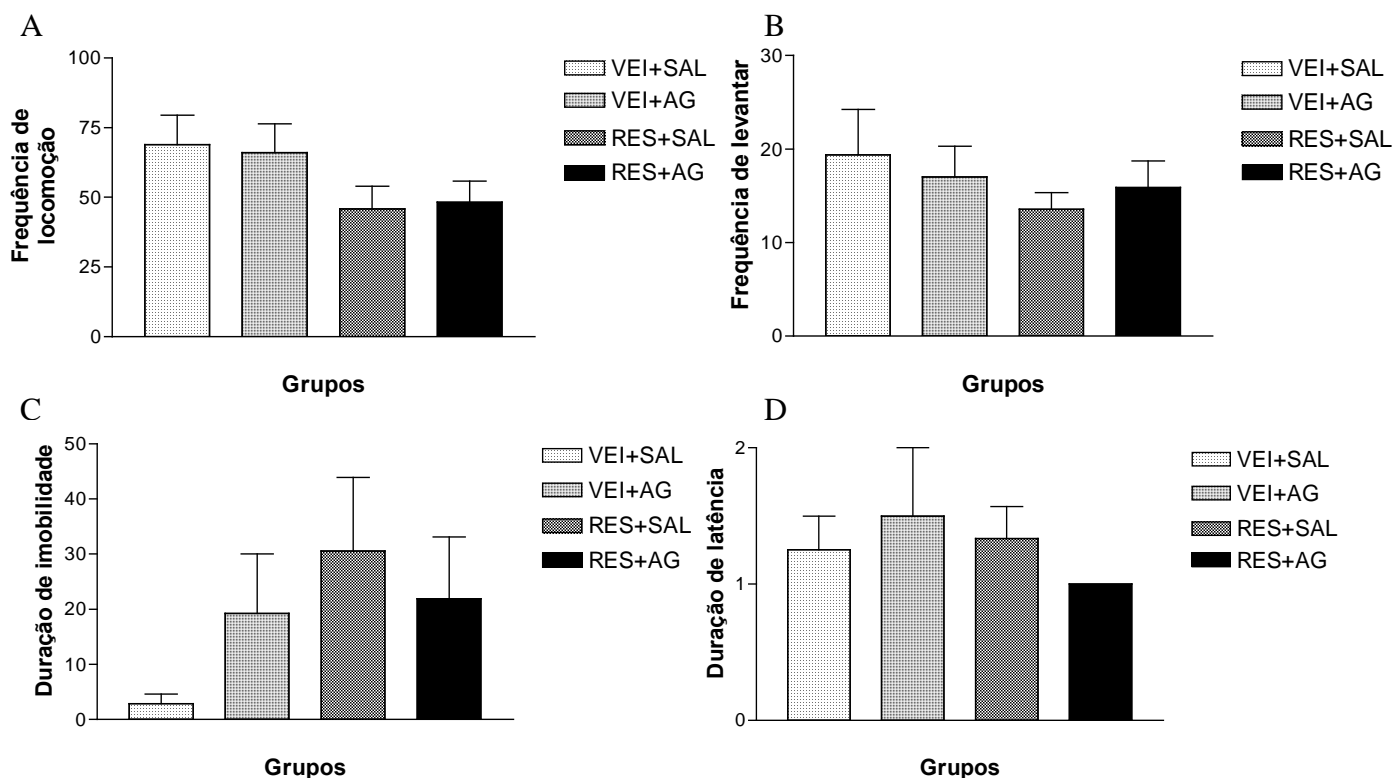


FIGURA 13. Efeitos da administração de aminoguanidina (50mg/kg) na atividade geral de camundongos C57BL/6 tratados com reserpina (1mg/Kg) e observados em um campo aberto 48h após o tratamento (n=10/grupo). (A) freqüência de locomoção, (B) freqüência de levantar, (C) duração de imobilidade, (D) duração de latência para início do movimento.

#### 4.8 EFEITOS DA AMINOGUANIDINA NO TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA EM CAMUNDONGOS SWISS TRATADOS COM RESERPINA.

A FIGURA 14 mostra os efeitos da administração de aminoguanidina em camundongos Swiss tratados com reserpina e avaliados no teste da natação forçada 24 h após os tratamentos. Os dados indicam aumento significativo ( $F(6,46) = 4,36$ ;  $P < 0.05$ ) do tempo de imobilidade nos animais tratados com reserpina (grupo RES+SAL) em comparação ao grupo controle (VEI+SAL).

A administração de aminoguanidina não causou reversão do aumento no tempo de imobilidade induzido pela administração de reserpina. Como pode ser observado, houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0.01$ ) entre os grupos RES+AG e VEI+SAL.

Em relação ao controle positivo, a análise estatística mostra que embora a administração de imipramina tenha revertido o aumento de imobilidade causado pela administração de reserpina, os animais tratados com imipramina não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle (VEI+SAL).

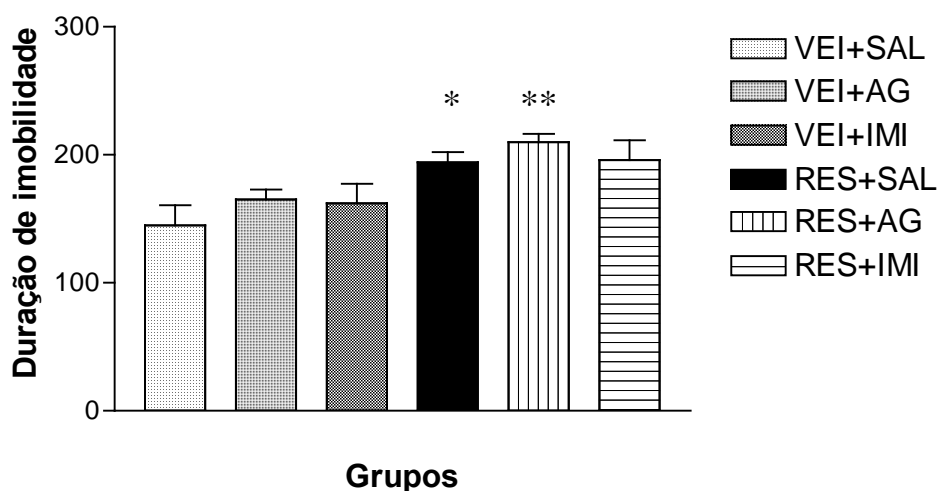


FIGURA 14. Efeitos da administração de aminoguanidina (50mg/kg) no tempo de imobilidade de camundongos Swiss tratados com reserpina (1mg/Kg) e avaliados no teste da natação forçada 24 h após os tratamentos (n=10/grupo). \* $P < 0.05$  comparado ao grupo VEI+SAL. \*\* $P < 0.01$  comparado ao grupo VEI+SAL.



#### 4.9 EFEITOS DA AMINOGUANIDINA NO TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA EM CAMUNDONGOS C57BL/6 TRATADOS COM RESERPINA.

A FIGURA 15 mostra os efeitos da administração de aminoguanidina em camundongos C57BL/6 tratados com reserpina e observados no teste da natação forçada 24 h após os tratamentos. Os dados indicam que a reserpina causou aumento significativo ( $F(6,47) = 4,65$ ;  $P < 0.05$ ) no tempo de imobilidade (grupo RES+SAL) quando comparado ao grupo controle (VEI+SAL).

A administração de aminoguanidina não foi capaz de reverter o aumento no tempo de imobilidade causado pela administração de reserpina. Como pode ser observado, houve diferença estatística ( $p < 0.05$ ) entre os animais dos grupos RES+AG e VEI+SAL.

Em relação ao controle positivo, os dados indicam que a imipramina não foi capaz de reverter o aumento na imobilidade causado pela administração de reserpina, uma vez que, como pode ser observado, houve diferença estatística ( $P < 0.05$ ) entre os grupos RES+IMI e VEI+SAL, enquanto que o grupo RES+IMI não diferiu do grupo RES+SAL.

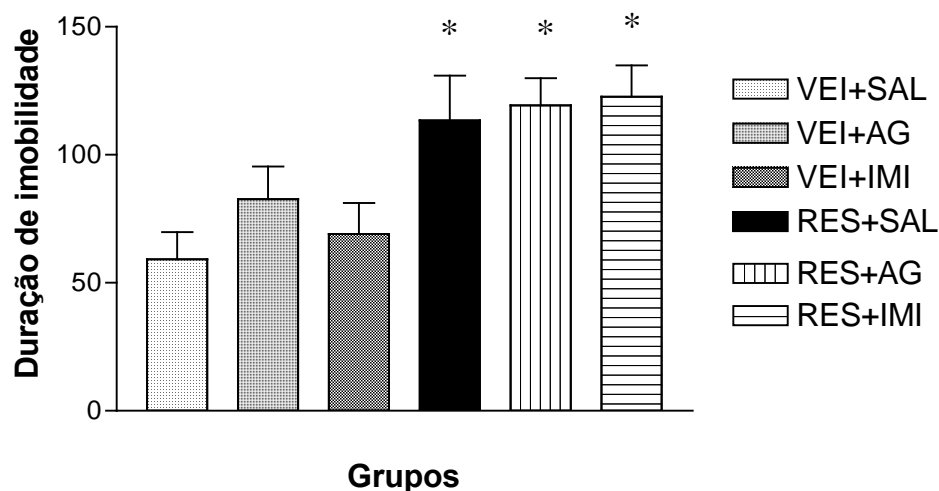


FIGURA 15. Efeitos da administração de aminoguanidina (50mg/kg) no tempo de imobilidade de camundongos C57BL/6 tratados com reserpina (1mg/Kg) e avaliados no teste da natação forçada 24 h após os tratamentos (n=10/grupo). \* $P < 0.05$  comparado ao grupo VEI+SAL.

#### 4.10 EFEITOS DO 7-NI NO TESTE DE PREFERÊNCIA POR SACAROSE EM CAMUNDONGOS SWISS TRATADOS COM RESERPINA (1mg/Kg).

A FIGURA 16 mostra o efeito da administração de 7-NI (25mg/Kg) em camundongos tratados com reserpina (1mg/Kg). Como pode ser observado, não houve diferença significativa na porcentagem de consumo de sacarose em nenhum grupo quando comparado aos grupos controles (VEI+OM e VEI+7-NI). Os dados demonstram que a reserpina, nesta dose, não foi capaz de causar redução na preferência por sacarose 24 h após sua administração. Além disso, não houve diferença entre os grupos em termos de consumo total, consumo de água ou consumo de sacarose.

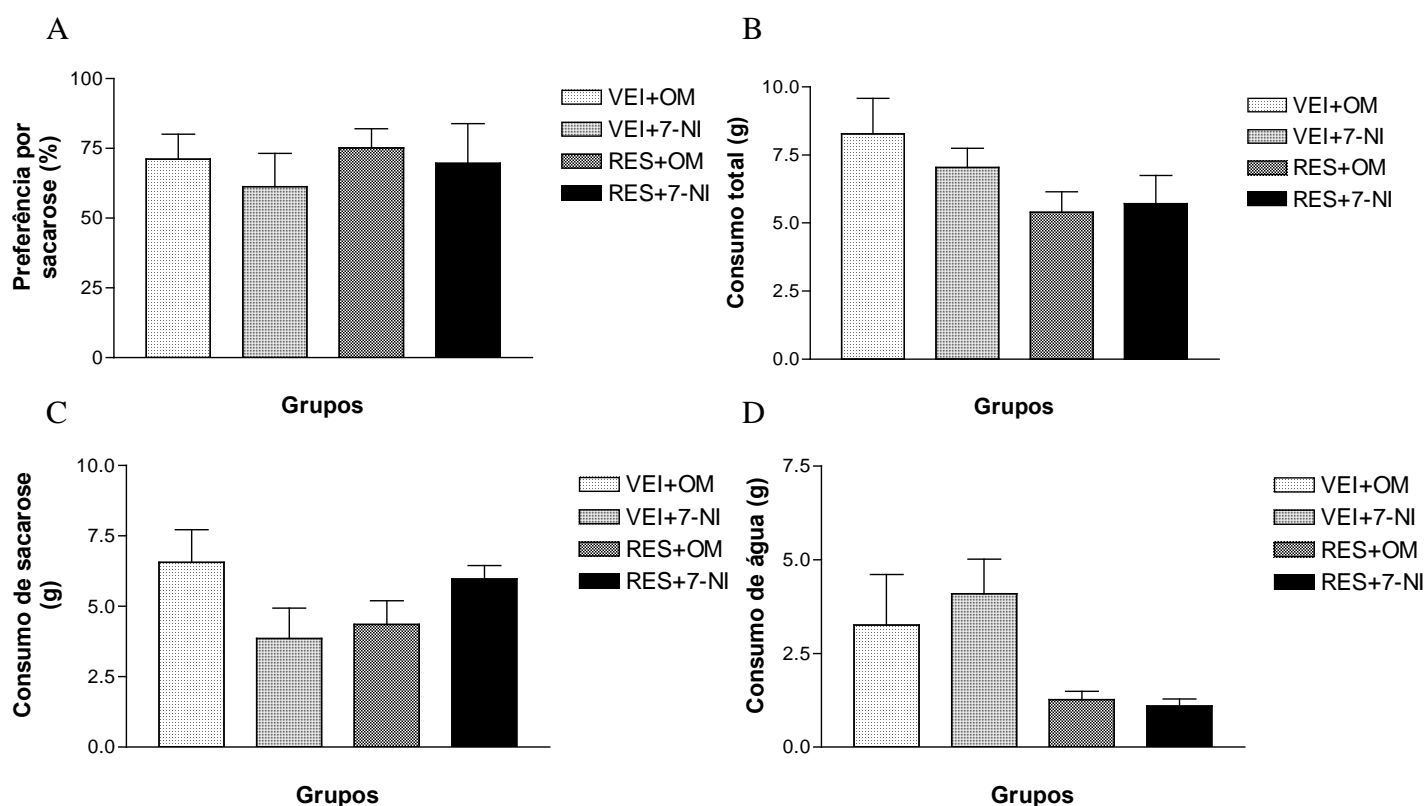


FIGURA 16. Efeitos da administração de 7-NI (25mg/Kg) em camundongos tratados com reserpina (1mg/Kg) e avaliados no teste de preferência por sacarose 24h após os tratamentos. (A) preferência por sacarose, (B) consumo total, (C) consumo de sacarose, (D) consumo de água. (n=10/grupo).

#### 4.11 EFEITOS DO 7-NI NO TESTE DE PREFERÊNCIA POR SACAROSE EM CAMUNDONGOS SWISS TRATADOS COM RESERPINA (2mg/Kg).

O efeito da administração de 7-NI (25mg/Kg) em camundongos tratados com reserpina (2mg/Kg) está indicado na FIGURA 17. Como pode ser observado, utilizando-se a dose de 2mg/Kg, também não houve diferença significativa na porcentagem de consumo de sacarose em nenhum grupo quando comparado aos grupos controles (VEI+OM e VEI+7-NI). Os dados demonstram que a reserpina, também na dose de 2mg/Kg, não causou diminuição na preferência por sacarose 24 h após sua administração. Finalmente, não houve diferença entre os grupos em termos de consumo total, consumo de água ou consumo de sacarose.

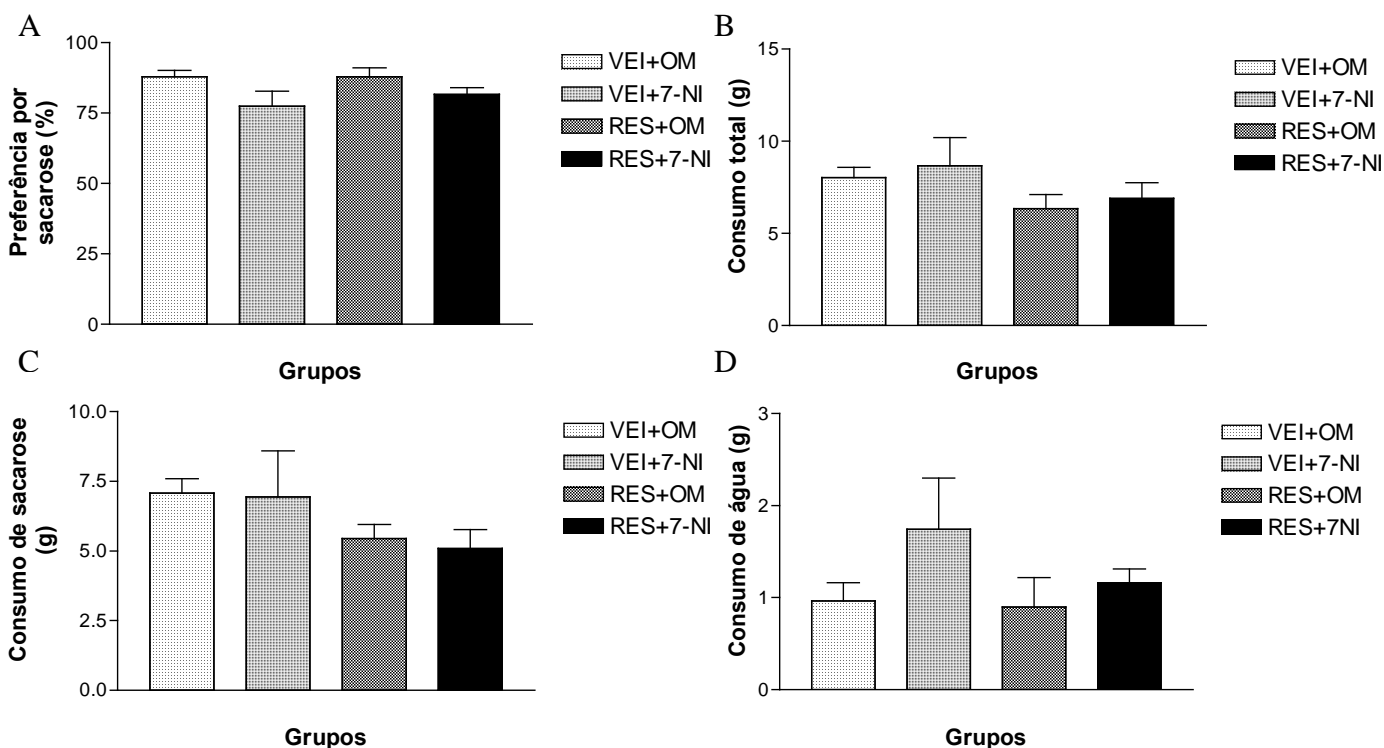


FIGURA 17. Efeitos da administração de 7-NI (25mg/Kg) em camundongos tratados com reserpina (2mg/Kg) e avaliados no teste de preferência por sacarose 24h após os tratamentos. (A) preferência por sacarose, (B) consumo total, (C) consumo de sacarose, (D) consumo de água. (n=10/grupo).

#### 4.12 EFEITOS DO 7-NI E AMINOGUANIDINA NOS NÍVEIS ESTRIATAIS DE GLUTATIONA DE RATOS TRATADOS COM RESERPINA.

A FIGURA 18 mostra o efeito da administração de 7-NI (25mg/Kg) e aminoguanidina (50mg/kg) nos níveis estriatais de glutaciona (GSH) em ratos tratados com reserpina 24h após a administração das drogas. Como pode ser observado, não houve diferença significativa nos níveis estriatais de glutaciona em nenhum dos grupos quando comparado aos grupos controles (VEI+OM e VEI+SAL). Os dados indicam que a administração de reserpina na dose de 1mg/Kg não foi capaz de alterar os níveis de GSH no estriado dos animais.

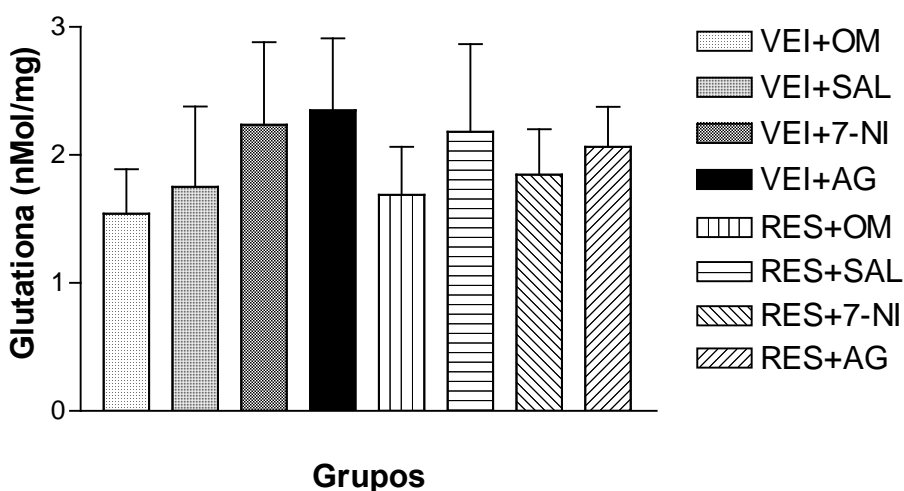


FIGURA 18. Efeitos da administração de 7-NI (25mg/Kg) e aminoguanidina (50mg/kg) em ratos tratados com reserpina (1mg/Kg) no nível estriatal de glutaciona 24h após os tratamentos (n=6/grupo).

## **5. DISCUSSÃO**

## 5 DISCUSSÃO

Nossos dados indicam que a inibição da NOS neuronal, produzida pelo 7-NI, reverteu os efeitos da reserpina em todos os parâmetros avaliados no teste do campo aberto em camundongos Swiss, porém, em camundongos C57BL/6, o 7-NI reverteu apenas a duração de imobilidade e a latência para início do movimento. Por outro lado, a inibição da isoforma induzida da NOS provocada pela aminoguanidina não alterou os efeitos da reserpina observados no campo aberto em nenhuma das linhagens de camundongos. No teste de natação forçada, o 7-NI reverteu o aumento do tempo de imobilidade provocado pela reserpina em animais Swiss, mas não nos camundongos C57BL/6. A aminoguanidina não alterou os efeitos da reserpina neste teste. No teste de preferência por sacarose, a reserpina (1 e 2 mg/Kg) não foi capaz de causar redução da preferência por sacarose 24 h após o tratamento. Em relação à quantificação dos níveis estriatais de GSH, os dados indicam que, 24 h após o tratamento com reserpina, os níveis de GSH no estriado não foram alterados.

Embora a causa da DP seja desconhecida, estudos experimentais, clínicos e epidemiológicos indicam um importante papel do estresse oxidativo com participação do NO na patogênese dessa desordem (JENNER e OLANOW, 1996; JENNER, 2003), uma vez que a lesão oxidativa em neurônios dopaminérgicos é considerada uma das principais causas de neurodegeneração na DP. Além disso, diversas evidências em relação à inibição da NOS (HANTRAYE *et al.*, 1996; KLIVENYI *et al.*, 2000) e estudos com *knockout* do gene da NOS (HANTRAYE *et al.*, 1996; PRZEDBORSKI *et al.*, 1996) indicam o envolvimento do óxido nítrico e da NOS na patogênese da DP.

Como diversas observações, principalmente em modelos animais de DP, têm demonstrado a participação do NO e da NOS no início e na progressão dessa desordem, no presente estudo, nós avaliamos os efeitos de dois inibidores da NOS, o 7-NI e a aminoguanidina, no teste de atividade geral em um campo aberto e no teste da natação forçada utilizando o modelo da reserpina.

O 7-NI inibe seletivamente a forma neuronal constitutiva da óxido nítrico sintase (MOORE *et al.*, 1993), que participa da transmissão sináptica no cérebro (GARTHWAITE *et al.*, 1988; BREDT e SNYDER, 1989), enquanto que a aminoguanidina possui como mecanismo de ação a inibição da isoforma induzida da NOS (iNOS), a qual é produzida pela micróglia ativada na ocorrência de processos inflamatórios (HENEKA *et al.*, 2000).

A primeira série de experimentos examinou os efeitos do 7-NI, administrado 30 min após a reserpina, na função motora e no teste de natação forçada em duas linhagens de camundongos, Swiss e C57BL/6.

Os resultados indicam que a reserpina (1mg/Kg) produziu alteração motora 24 e 48 h após sua administração nas duas linhagens de camundongos. Esses dados contrastam com os de PREDIGER *et al.* (2005). Neste estudo, a reserpina, à mesma dose, causou alteração na memória de reconhecimento social sem produzir alterações nos parâmetros motores de ratos em um campo aberto.

Nossos dados indicam que o 7-NI (25 mg/kg) reverteu a alteração motora induzida pela depleção de dopamina 24 h e 48 h após a injeção de reserpina em camundongos Swiss. Nesta linha, CONNOP *et al.*, (1994) mostraram que o 7-NI (20 mg/kg, i.p) produziu 90% de inibição da NOS presente na substância negra de ratos. Nossos resultados contrastam com os de STARR e STARR (1995). Neste estudo, administrou-se reserpina (5mg/Kg) ou veículo a camundongos e, após 24 h, injetou-se o 7-NI (10 a 50 mg/Kg). A atividade motora foi avaliada 30 min após a injeção do inibidor da NOS. No grupo pré-tratado com reserpina, o 7-NI não reverteu a hipocinesia nestes animais. Uma diferença entre este estudo e o presente é a dose de reserpina utilizada. No trabalho de STARR e STARR (1995), a reserpina foi administrada em uma dose 5 vezes maior que a utilizada em nosso protocolo, o que poderia explicar a ausência de efeito do 7-NI na reversão da acinesia induzida pela reserpina. Além disso, a administração de 7-NI (25 e 50 mg/Kg) a camundongos não reserpinizados produziu diminuição na locomoção, sendo que em nosso estudo, o 7-NI *per se* não alterou a locomoção dos animais.

Em camundongos C57BL/6, o tratamento com 7-NI reverteu apenas dois parâmetros de atividade (imobilidade e latência) no teste do campo aberto 24 h após a administração de reserpina. Quarenta e oito horas após o tratamento, a frequência de levantar e o tempo de latência foram revertidos pelo tratamento com 7-NI nessa linhagem de camundongos. No entanto, o 7-NI não foi capaz de abolir a hipolocomoção induzida pela reserpina 24 h e 48 h após o tratamento em camundongos C57BL/6. Sete dias após o tratamento, os parâmetros de atividade locomotora foram recuperados nas duas linhagens de camundongos.

A síndrome de hipocinesia em camundongos é utilizada para mimetizar a DP em modelos animais (COLPAERT, 1987; MENZAGHI *et al.*, 1997; DUTRA *et al.*, 2002). Portanto, nós

acreditamos que a inibição da nNOS, ao diminuir a produção de NO, pode ser responsável pela reversão dos sinais motores observados nos camundongos Swiss tratados com reserpina.

Foi demonstrado que a liberação de NO aumenta durante a progressão da DP como resultado de processos inflamatórios e causa depleção de dopamina. O “*turnover*” de dopamina está aumentado na substância negra de indivíduos com DP e em modelos animais de parkinsonismo. Os efeitos prejudiciais da dopamina à célula podem ser causados pela produção de ROS durante a deaminação oxidativa da dopamina catalisada pela MAO presente na membrana mitocondrial externa (ANTUNES *et al.*, 2005). Como resultado do aumento da deaminação de dopamina, os neurônios dopaminérgicos sobreviventes tornam-se expostos a um estresse oxidativo aumentado, o que leva a uma autooxidação ainda maior do neurotransmissor.

O aumento da oxidação de dopamina induzida pelo NO pode ser responsável pelos sinais motores observados no modelo da reserpina, uma vez que a reserpina causa parkinsonismo impedindo a entrada de dopamina nas vesículas de armazenamento. Dessa forma, uma possível explicação para entender os nossos resultados obtidos com o 7-NI em camundongos Swiss pode ser a diminuição da oxidação de dopamina induzida pelo NO, através da inibição da nNOS.

Outra razão que poderia justificar esses resultados é a participação do NO na sinalização celular nos circuitos motores nos gânglios basais (SNYDER e BREDT, 1991; VINCENT e HOPE, 1992). Existem inúmeras razões para se acreditar que a síntese de NO no estriado é particularmente influente neste local. O estriado é um componente chave do gânglio basal e recebe aferências glutamatérgicas massivas e topograficamente ordenadas de todas as principais regiões sensoriais e motoras do córtex cerebral. Possui grande quantidade de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (ALBIN *et al.*, 1992) e NO-sintase (VINCENT e HOPE, 1992).

De acordo com KAUR e STARR (1997) a dopamina e o glutamato apresentam efeitos opostos no comportamento motor, de forma que a dopamina seria excitatória e o glutamato inibitório. Desse modo, o aumento da transmissão glutamatérgica mediada pelo receptor NMDA representa um papel crucial na fisiopatologia de diversos distúrbios neurológicos associados com comportamento motor anormal, incluindo a DP e o parkinsonismo. De fato, após a depleção de dopamina pela reserpina, ocorreu aumento secundário da liberação de glutamato no estriado (STARR, 1995; LINDEFORS e UNGERSTEDT, 1990; ZHU e JUORIO, 1990).

Uma importante característica do bloqueio de receptores NMDA em animais com depleção de dopamina é a potenciação da atividade motora induzida pela estimulação de receptores D1. Além



disso, estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que o glutamato pode influenciar a liberação de dopamina, exercendo um controle inibitório (LEVIEL *et al.*, 1990, CHERAMY *et al.*, 1986), embora, em algumas situações, facilitatório (CLOW e JHAMANDIAS, 1989, DESCE *et al.*, 1992). A influência do glutamato sobre o sistema dopaminérgico explicaria a habilidade de antagonistas glutamatérgicos em atuarem como agentes antiparkinsonianos (STARR e STARR, 1994, GOODWIN *et al.*, 1992. MORELLI *et al.*, 1992).

O glutamato liberado de terminais axonais corticoestriatais atua em receptores NMDA, que estão ligados via  $Ca^{2+}$ /calmodulina à síntese de NO (GARTHWAITE *et al.*, 1989; MCCALL e VALLANCE, 1992). Deste modo, é possível que o NO participe da integração sensoriomotora no estriado através de sua influência nos sistemas de neurotransmissores locais, entre eles, o dopaminérgico (WEST *et al.*, 2002).

Foi demonstrado que, em algumas circunstâncias, o NO endógeno pode diminuir a liberação de dopamina. Assim, a utilização de doadores de NO (GUEVARA-GUZMAN *et al.*, 1994, ZHU e LUO, 1992) inibiu a liberação de dopamina em ratos. Além disso, o uso dos inibidores da NOS como o 7-NI (SILVA *et al.*, 1995), o L-NAME (BUGNON *et al.*, 1994) e o L-NMMA (SEILICOVICH *et al.*, 1995) aumentaram a liberação basal de dopamina no estriado, retina e hipotálamo, respectivamente.

Por outro lado, outros estudos indicam que o NO pode aumentar a liberação de dopamina (KISS *et al.*, 1999; IRAVANI *et al.*, 1998; LIANG e KAUFMAN, 1998; BLACK *et al.*, 1994; STRASSER *et al.*, 1995; WEST e GALLOWAY, 1998).

Neste estudo, nós focamos a inibição da atividade da nNOS pelo 7-NI para justificar a atenuação da hipocinesia induzida pela reserpina. No entanto, um estudo mostrou que o 7-NI produziu um efeito inibitório sobre a atividade da MAO-B (CASTAGNOLI *et al.*, 1997). Uma possibilidade alternativa e não excludente, portanto, seria que a inibição do metabolismo da dopamina causada pelo 7-NI poderia ser responsável pela reversão dos efeitos depletoria da reserpina na função motora de camundongos Swiss. No entanto, foi demonstrado que a redução de DOPAC causada pela administração de MPTP não foi revertida pelo 7-NI, sugerindo uma ausência de efeito desse inibidor da NOS sobre a função da MAO (CUTILLAS *et al.*, 1998). Além disso, em nosso experimento, o 7-NI *per se* não induziu aumento nos parâmetros locomotores no grupo controle VEI+7-NI, sugerindo que se de fato, o 7-NI inibiu a MAO, esta inibição não foi suficiente para causar aumento da locomoção.

Com relação aos efeitos do 7-NI em camundongos C57BL/6, verificamos que este inibidor da NOS atenuou somente a duração de imobilidade e a latência para iniciar o movimento 24 h após a administração de reserpina. 48 h após o tratamento, a frequência de levantar e o tempo de latência foram revertidos pelo tratamento com 7-NI nessa linhagem de camundongo. Deste modo, é possível sugerir duas possibilidades para entender a razão pela qual o 7-NI reverteu os efeitos da reserpina em camundongos Swiss, mas não nos C57BL/6: a primeira: que nos animais C57BL/6, a depleção de dopamina tenha sido maior que nos animais Swiss; a segunda, que nos C57BL/6 a dose de 7-NI tenha sido insuficiente para reverter todos os parâmetros avaliados no campo aberto.

Nossos dados indicam uma maior sensibilidade da linhagem C57BL/6 à reserpina em comparação aos camundongos Swiss. Como indica a Fig. 1, após tratamento com reserpina, os camundongos C57BL/6 apresentaram maior redução da função motora avaliada no campo aberto do que os animais Swiss. Nesta linha de raciocínio, existem estudos demonstrando uma maior sensibilidade de camundongos C57BL/6 em outro modelo de parkinsonismo. A linhagem de camundongos C57BL/6 é altamente suscetível aos efeitos neurotóxicos do MPTP e é conhecido como um excelente modelo animal de DP (HEIKKILA *et al.*, 1984; SUNDSTROM *et al.*, 1987). De fato, camundongos Swiss-Webster jovens (2-3 meses) demonstram um menor grau de lesão neuronal dopaminérgica quando comparados com camundongos C57BL/6 da mesma idade e sexo, enquanto camundongos C57BL/6 velhos (8-9 meses) exibem uma perda significativamente maior de neurônios dopaminérgicos. SMEYNE e colaboradores (2001) demonstraram que a maior susceptibilidade de camundongos C57BL/6 ao MPTP e MPP<sup>+</sup>, que leva a uma maior perda de neurônios dopaminérgicos é dependente da glia de camundongos C57BL/6, refletindo uma resposta anormal da glia mesencefálica ao estresse oxidativo nestes animais. Uma possível razão para a maior sensibilidade desta linhagem à administração de MPTP é a diferença no sistema dopaminérgico entre essa linhagem e outras menos suscetíveis a esta neurotoxina. Dessa forma, estudos demonstram que a linhagem C57BL/6 possui menor número de neurônios dopaminérgicos na SNc do que outras linhagens (TAKADA *et al.*, 1993; MUTHANE *et al.*, 1994). Isto poderia explicar os resultados obtidos em nossos experimentos, que mostram que os camundongos C57BL/6 possuem menor atividade motora quando comparados à linhagem Swiss (Fig. 1).

Nossos experimentos demonstraram que, enquanto o tratamento com reserpina causou aumento no tempo de imobilidade no teste da natação forçada nas duas linhagens de animais, este

feito foi revertido pela administração do 7-NI em camundongos Swiss, porém não em camundongos da linhagem C57BL/6.

Estudos clínicos e pré-clínicos sugerem que a alteração na função glutamatérgica está relacionada com a depressão (SKOLNICK, 1999; RADA *et al.*, 2003) e que o receptor NMDA pode ser um sítio para ação antidepressiva. Dessa forma, diversos estudos mostraram que antagonistas do receptor NMDA exibem atividade antidepressiva (TRULLAS e SKOLNICK, 1990; ROGÓ *et al.*, 2002; WATKINS e OLVERMAN, 1987; MARVIZON *et al.*, 1989; WATSON e LANTHORN, 1990; WONG *et al.*, 1986). Além disso, a administração crônica de antidepressivos a camundongos altera tanto os níveis de RNAm que codificam subunidades do receptor NMDA quanto a ligação a esse receptor em áreas circunscritas do SNC (SKOLNICK, 1999; PETRIE *et al.*, 2000).

A relação entre os receptores NMDA e a síntese de NO é bem conhecida (LEI *et al.*, 1992; MANZONI *et al.*, 1992) e já foi discutida neste trabalho. Neste contexto, diversos estudos demonstraram que inibidores da NOS como o L-NMMA, o L-NNA, o L-NAME e o 7-NI (HARKIN *et al.*, 1999, YILDIZ *et al.*, 2000, VOLKE *et al.*, 2002, HEIBERG *et al.*, 2002) reduziram o tempo de imobilidade no teste da natação forçada, e que a inibição da NOS causou *down-regulation* dos  $\beta$ -adrenoreceptores corticais, com magnitude comparável ao tratamento crônico com imipramina (KAROLEWICZ *et al.*, 1999). Mais ainda, ZOMKOWSKI *et al.* (2002) mostraram que a administração de agmatina, uma amina endógena que bloqueia o receptor NMDA e todas as isoformas de NOS, produziu redução do tempo de imobilidade no teste da natação forçada e no teste de suspensão da cauda em camundongos. Este efeito foi totalmente anulado pelo tratamento dos animais com L-arginina. Dessa forma, tomados em conjuntos, estes resultados sugerem que a ativação de receptores NMDA, resultando na formação de NO, possa estar envolvida no processo de depressão.

O teste de natação forçada é bastante utilizado no estudo pré-clínico para avaliar a atividade antidepressiva das drogas (BORSINI e MELI, 1988; CRYAN *et al.*, 2002). Neste teste, os camundongos são forçados a nadar em um espaço restrito de onde não podem escapar. Após períodos de agitação, as tentativas de escape cessam e os animais ficam imóveis. Acredita-se que a imobilidade reflita um estado de desespero ou incapacidade de adaptar-se ao estresse, o que reproduz uma característica ligada à depressão humana (STERU *et al.*, 1985; WILLNER, 1991). Este teste, no entanto, apresenta a possibilidade de obter efeitos falso-positivos. Desta forma, drogas

que aumentam a atividade motora podem apresentar este efeito no teste da natação forçada. Assim, antidepressivos tais como bupropiona, nomifensina e amineptina poderiam ser rejeitados por apresentarem aumento na atividade motora (BORSINI e MELI, 1998).

Neste contexto, é importante notar que o estado depressivo induzido pela reserpina em humanos foi considerado como uma das maiores evidências da hipótese monoaminérgica da depressão. Entretanto, de acordo com PORSOLT *et al.*, (1979), este alcalóide não apresentou aumento do tempo de imobilidade neste modelo de depressão. Em nossos experimentos, no entanto, a reserpina mostrou um aumento no tempo de imobilidade neste teste.

Nossos resultados mostram que a reserpina produziu alteração na função motora dos animais avaliados no teste do campo aberto. De acordo com BOURIN (1990) o efeito da reserpina seria maior no controle motor do que no humor. Dessa forma, não podemos excluir a possibilidade do efeito motor da reserpina ter sido a causa do aumento no tempo de imobilidade no teste da natação forçada.

De particular importância, o presente estudo verificou que o tratamento agudo com 7-NI (25 mg/kg) reverteu a hipocinesia causada pela reserpina no teste do campo aberto. Assim, não se pode afirmar que a diminuição do tempo de imobilidade causada pelo 7-NI no teste da natação forçada em camundongos Swiss tenha sido causada por um efeito antidepressivo dessa droga, e não por uma restauração da função motora desses animais.

Contrariamente ao esperado, o controle positivo empregado, imipramina (25 mg/kg), não reduziu o tempo de imobilidade em comparação ao grupo controle em ambas as linhagens neste teste. Um estudo (BAI *et al.*, 2001) mostrou que, em camundongos C57BL/6, a imipramina produziu uma curva dose-resposta bifásica e que doses abaixo de 5 e acima de 15 mg/Kg não apresentaram efeito na redução no tempo de imobilidade nestes animais. Este dado poderia explicar a ausência de efeitos da imipramina nesta linhagem, uma vez que a dose utilizada em nosso estudo foi de 25mg/Kg. Em relação aos camundongos Swiss, no entanto, nossos resultados contrariam dados anteriores do nosso laboratório (CASTILHO *et al.*, 2004), e não sabemos como explicar este dado. Por outro lado, verificou-se no corrente estudo, que a imipramina foi capaz de atenuar o aumento do tempo de imobilidade – causado pela reserpina- tanto em camundongos Swiss (Fig. 14) quanto nos animais C57BL/6 (Fig. 9).

Para confirmar o possível efeito antidepressivo do 7-NI, foi realizado o teste da preferência por sacarose. Trabalhos na literatura demonstraram que a administração de reserpina a

camundongos produziu redução na preferência pelo consumo de sacarose, a qual pode ser considerada como um indicativo de anedonia e um aumento no estado depressivo (MONLEON *et al.*, 1995; WILLNER, 1997). Uma vantagem na utilização deste teste é que ele não apresenta interferência da função motora uma vez que a administração de reserpina não causou efeito no consumo total, no consumo de água e no consumo de sacarose nos grupos tratados em comparação ao grupo controle, somente reduziu a preferência por sacarose, indicando um estado de anedonia (SKALISZ *et al.*, 2002).

Nossos dados, no entanto, diferindo deste estudo, indicam que a reserpina não foi capaz de causar diminuição na preferência por sacarose 24 h após sua administração. Não podemos explicar este resultado, uma vez que a dose de reserpina utilizada em nosso estudo (2 mg/Kg) foi semelhante à utilizada por SKALISZ *et al.* (2002). Desta forma, o efeito do 7-NI na reversão da anedonia não pôde ser confirmado.

Ainda em relação ao teste de preferência por sacarose, torna-se importante ressaltar que, neste modelo, o efeito de drogas antidepressivas é específico para animais que sofreram alguma forma de estresse. Dessa forma, o consumo de sacarose em animais controle não é alterado pela ação de antidepressivos (PAPP e WILLNER, 1996). Assim, não se pode afirmar que o 7-NI não possui efeito de reversão da anedonia neste teste, uma vez que a reserpina não causou diminuição na preferência pela sacarose.

Em relação à ausência de efeitos do 7-NI na redução do aumento do tempo de imobilidade induzido pela reserpina em camundongos da linhagem C57BL/6, uma revisão (PETIT-DEMOULIERE *et al.*, 2005) mostrou que linhagens *inbred* não constituem bons modelos de depressão no teste da natação forçada quando comparadas a linhagens *outbred* de camundongos. A literatura mostra que animais das linhagens C57BL/6 são pouco responsivos a drogas antidepressivas neste teste. De fato, apenas um tipo de antidepressivo, a bupropiona (um inibidor da recaptação de dopamina) foi significativamente efetivo no teste da natação forçada em camundongos C57BL/6Rj. Inibidores da recaptação de noradrenalina foram eficazes da redução do tempo de imobilidade em camundongos C57BL/6J. No entanto, nestes estudos, não foram realizados testes de atividade motora, de forma que os efeitos antidepressivos dessas drogas não puderam ser confirmados. Uma possível razão para explicar a ausência de resposta a drogas antidepressivas nesta linhagem é que, em nossos experimentos, os animais C57BL/6 do grupo controle apresentaram tempo de imobilidade baixo, em relação à linhagem Swiss (Figs. 8, 9, 14 e 15) no

teste da natação forçada. Deste modo, esta pode ser uma explicação plausível para a diferença de efeitos do 7-NI entre as duas linhagens de camundongos observada neste estudo.

A segunda série de experimentos examinou os efeitos da administração de aminoguanidina em relação às alterações motoras e comportamentais causadas pela administração de reserpina. Os animais foram tratados com aminoguanidina 30 min após a injeção de reserpina. Nossos dados mostram que este inibidor da NOS somente reverteu a frequência de levantar em camundongos C57BL/6 reserpinizados 24 h após a injeção do alcalóide. Considerando que tanto a locomoção como o levantar no campo aberto estão relacionados à ativação do núcleo accumbens e estriado (STARR e STARR, 1986), não podemos explicar a ausência de efeitos deste inibidor da NOS na locomoção dos animais. Os demais parâmetros investigados no campo aberto, não foram alterados após o tratamento com a aminoguanidina. Por outro lado, nos camundongos Swiss, a aminoguanidina não modificou os efeitos da reserpina. Os presentes dados corroboram aqueles de STARR e STARR (1995), que mostraram a inabilidade da aminoguanidina em reverter as alterações causadas pela administração de uma dose alta de reserpina (5 mg/kg) em camundongos.

Dessa forma, nossos dados indicam que a forma induzida de NOS não possui participação no parkinsonismo induzido pela reserpina. Essa isoforma de NOS é principalmente expressa em processos inflamatórios e provavelmente não deve estar envolvida com os efeitos da reserpina. A iNOS é induzida por citocinas de maneira  $Ca^{++}$ -independente. Esta isoforma não é normalmente expressa em macrófagos, todavia, na presença de citocinas ocorre transcrição do gene de iNOS e produção de NO em níveis mais altos que aqueles observados pela ativação das formas constitutivas (BELDER e MONCADA, 1995). Não encontramos na literatura dados que correlacionem a injeção de reserpina ao processo inflamatório. Por esta razão, a administração de reserpina provavelmente não causou ativação da isoforma iNOS, o que explicaria a ausência de efeitos da aminoguanidina no campo aberto e no teste de natação forçada em ambas linhagens de camundongos avaliados.

A quantificação dos níveis de GSH estriatais foi realizada com o intuito de se avaliar a habilidade da reserpina de causar diminuição no nível de glutathiona no estriado. Considerando que a redução do nível de glutathiona é utilizada como índice de estresse oxidativo, também foi objetivo desta etapa investigar a possibilidade dos inibidores da NOS reverterem esta alteração.

Em nosso estudo, entretanto, o tratamento com reserpina não foi capaz de causar redução nos níveis estriatais de GSH. Este resultado contrasta com o relato de ABÍLIO e colaboradores (2003), de que o tratamento com reserpina à dose de 1 mg/Kg induziu um aumento na taxa de

glutathiona oxidada/reduzida (GSSG/GSH) estriatal, além de aumentar a peroxidação lipídica (ABILIO *et al.*, 2002). Uma possível razão para a discrepância entre os resultados é a diferença no tempo de tratamento com a reserpina. No trabalho de ABILIO *et al.* (2003), os animais foram tratados com reserpina durante dois dias não-consecutivos previamente à análise da glutathiona, enquanto que, no nosso estudo, os animais receberam reserpina apenas uma vez, 24 h antes de serem sacrificados. É possível, portanto, que a quantidade de reserpina administrada aos animais em nosso estudo não tenha sido suficiente para a diminuição do nível de GSH estriatal.

A taxa de GSSG/GSH foi proposta como um índice sensível de estresse oxidativo (TOBOREK e HENNING, 1994; BAINS e SHAW, 1997). De fato, GSSG é formada em reações antioxidantes que envolvem GSH e pode se acumular com o aumento do estresse oxidativo na célula (TOBOREK e HENNING, 1994; BAINS e SHAW, 1997). Níveis diminuídos de GSH foram encontrados em diversas formas de morte celular e estão associados com a DP (PERRY *et al.*, 1982; RIEDERER *et al.*, 1989; SIAN *et al.*, 1994; WEBER, 1999). A depleção de GSH é a alteração bioquímica mais precoce demonstrada em cérebros de indivíduos parkinsonianos, embora a depleção de GSH por si só não seja suficiente para induzir degeneração nigral (TOFFA *et al.*, 1997).

Diante do exposto, nos parece possível sugerir que o modelo da reserpina mimetiza vários sinais da síndrome parkinsoniana, entre eles, a redução da função motora, as alterações cognitivas (ALVES *et al.*, 2001; PREDIGER *et al.*, 2005) e de humor (SKALISZ *et al.*, 2002). Entretanto, como em qualquer modelo animal, a reserpina é criticável em muitos aspectos, p.ex., a ausência de neurodegeneração, a rápida recuperação dos efeitos motores, a ausência de corpúsculos de Lewy e, na dose utilizada em nossos experimentos, a não ocorrência de estresse oxidativo.

## **6. CONCLUSÕES**



## 6 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados no presente estudo nos permitem chegar às seguintes conclusões:

- ◇ A reserpina, na dose de 1mg/Kg, reduziu as frequências de locomoção e levantar e os tempos de latência e imobilidade dos camundongos das duas linhagens avaliadas no campo aberto 24 e 48 h após sua administração. Estes dados sugerem que a reserpina constitui um bom modelo animal para se estudar a DP.
- ◇ O 7-NI, na dose de 25 mg/Kg, reverteu a hipolocomoção induzida pela reserpina 24 e 48 h após sua administração em camundongos da linhagem Swiss. Este resultado sugere a participação do NO nas alterações motoras induzidas pela reserpina.
- ◇ Em relação aos animais da linhagem C57BL/6, nossos dados indicam que o 7-NI não foi capaz de reverter a alteração na atividade geral induzida pela reserpina.
- ◇ O tratamento com reserpina (1mg/Kg) 24 h antes do teste da natação forçada, causou redução no tempo de imobilidade dos animais das duas linhagens. Estes dados sugerem que esta droga pode ser utilizada como modelo de depressão associada à DP.
- ◇ A administração de 7-NI (25mg/Kg) 30 min após o tratamento com reserpina, reduziu o tempo de imobilidade nos animais da linhagem Swiss avaliados no teste da natação forçada 24 h após a injeção de reserpina. Este resultado indica um possível efeito antidepressivo do 7-NI no modelo de depressão induzido pela reserpina. No entanto, como esta droga reverteu a alteração motora induzida pela reserpina, este efeito não pôde ser confirmado.
- ◇ O teste de preferência por sacarose foi realizado para confirmar o possível efeito antidepressivo do 7-NI no teste da natação forçada. A reserpina (1 e 2 mg/kg), no entanto, não reduziu a preferência por sacarose neste teste. Desta forma, o potencial antidepressivo do 7-NI não pôde ser determinado.
- ◇ A administração de 7-NI a camundongos da linhagem C57BL/6 não reduziu o tempo de imobilidade nos animais tratados com reserpina. Este resultado, em conjunto com experimentos prévios, indica que esta linhagem de camundongos é pouco sensível à ação de antidepressivos no teste da natação forçada, não constituindo, portanto, um bom modelo para se estudar a depressão.
- ◇ A aminoguaninida (50mg/Kg) não alterou os parâmetros motores estudados no teste do campo aberto após a administração de reserpina. Da mesma forma, o aumento do

tempo de imobilidade no teste da natação forçada induzido pela injeção de reserpina não foi revertido por essa droga. Estes resultados sugerem a ausência de participação da isoforma induzida na NOS no modelo da parkinsonismo induzido por reserpina.

- ◇ Embora a administração do controle positivo imipramina (25mg/Kg) tenha causado redução no tempo de imobilidade dos camundongos das duas linhagens tratados com reserpina, a imipramina não reduziu o tempo de imobilidade em camundongos Swiss e C57BL/6 em relação ao controle.
- ◇ O tratamento com reserpina (1mg/Kg) em ratos não alterou os níveis estriatais de GSH nesses animais. Dessa forma, no protocolo utilizado, não foi possível avaliar o possível efeito antioxidante dos inibidores da NOS utilizados neste estudo.

## **REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1 - ABÍLIO, VC; ARAUJO, CCS; BERGAMO, M; CALVENTE, PRV; ALMEIDA, VD; RIBEIRO, R. DE A; FRUSSA-FILHO, R. Vitamin E attenuates reserpine-induced oral dyskinesia and striatal oxidized glutathione/reduced glutathione ratio (GSSG/GSH) enhancement in rats. **Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry** v. 27, p. 109–114. 2003.

2 - ABREU, P; LLORENTE, E; SÁNCHEZ, JJ; GONZÁLEZ, MC. Nitric oxide inhibits tyrosine hydroxylase of rat median eminence. **Life Sci**, v. 67, n. 16, p. 1941-1946. 2000.

3 - ADAMS, JD JR; KALIVAS, PW; MILLER, CA. The acute histopathology of MPTP in the mouse CNS. **Brain Res Bull**, v. 23, p.1–17, 1989.

4 - AKIYAMA, H; ITAGAKI, S; MCGEER, PL. Major histocompatibility complex antigen expression on rat microglia following epidural kainic acid lesions. **J. Neurosci. Res.** v. 20, p. 147-157, 1988.

5 - ALBIN, R.L., MAKOWIEC, R.L., HOLLINGSWORTH, Z.R., DURE, L.S., PENNEY J.B., YOUNG, A.B. Excitatory amino acid binding sites in the basal ganglia of the rat: a quantitative autoradiographic study, **Neuroscience**, v. 46, p. 35, 1992.

6 - ALEXI, T; BORLONGAN, CV; FAULL, RLM; WILLIAMS, CE; CLARK, RG; GLUCKMAN PD; HUGHES, PE. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. **Prog. Neurobiol**, v. 60, n. 5, p. 409-470, 2000.

7 - ALMEIDA, RN; NAVARRO, DS; ASSIS, TS; MEDEIROS, IA; THOMAS, G. Antidepressant effect of an ethanolic extract of the leaves of *Cissampelos sympodialis* in rats and mice. **J. Ethnopharmacol**, v. 63, p. 247-252, 1998.

8 - ALVEZ, CSD; ANDREATINI, R; DA CUNHA, C; TUFIK, S; VITAL, MABF. Phosphatidylserine reverses reserpina-induced amnesia. **Eur. J. Pharmacol.**, v, 404,p. 161-167, 2001.

9 – ALVORD, JR EC; FORNO, LS; KUSSKE, JA; KAUFFMAN, RJ; RHODES, JS; GOETOWSKI, CR. The pathology of parkinsonism: a comparison of degenerations in cerebral cortex and brainstem. In: McDowell FH, editor. **Adv Neurol**, v. 5. p. 175-93, 1974.

10 – ANNUNZIATO. L; AMOROSO, S; PANNACCIONE, A; CATALDI, M; PIGNATARO, G; D’ALESSIO, A; SIRABELLA, R; SECONDO, A; SIBAUD, L; DI RENZO, GF. Apoptosis induced in neuronal cells by oxidative stress: role played by caspases and intracellular calcium ions. **Toxicol. Lett**, v. 139, p. 125–133, 2003.

11 - ANTUNES, F; NUNES, C; LARANJINHA, J; CADENAS, E. Redox interactions of nitric oxide with dopamine and its derivatives. **Toxicology** v. 208, p. 207-212, 2005.

12 - ARA, J; PRZEDBORSKI, S; NAINI, A.B; JACKSON-LEWIS, V; TRICILETTI, R.R; HORWITZ, J; ISCHIROPOULOS, H. Inactivation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxynitrite and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 7659-7663, 1998.

13 – ASBERG, M; BERTILSSON, L; MARTENSSON, B; SCALIA-TOMBA, GP; THOREN, P; TRANSKMAN-BENDZ, L. CSF monoamine metabolites in melancholia. **Acta Psychiatr Scand**, v. 69, p.201–19, 1984.

14 - BABBEDGE, RC; BLAND-WARD, PA; HART, SL; MOORE, PK. Inhibition of rat cerebellar nitric oxide synthase by 7-nitro indazole and related substituted indazoles. **Br. J. Pharmacol**, v. 110, p. 225–228, 1993.

15 – BAI, F; LI, X; CLAY, M; LINDSTROM, T; SKOLNICK, P. Intra- and interstrain differences in models of “behavioral despair”. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 70, p. 187-192, 2001.

16 - BAINS, JS; SHAW, CA. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. **Brain Res. Rev.** v. 25, p. 335–358. 1997.

17 – BARBER, J; TOMER, R; SROKA, H; MYSLOBODSKY, MS. Does unilateral dopamine deficit contribute to depression? **Psychiatry Res**, v. 15, p. 17–24, 1985.

18 – BARBOSA, ER; LIMONGI, JCP; CUMMINGS, JL. Parkinson’s disease. In: Miguel EC, Rauch SL, Leckman JF (Eds.). The psychiatric Clinics of North America. **Neuropsychiatric of the Basal Ganglia**, v. 20, n. 4, p. 769-790, 1997.

19 – BEAL, MF. Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson’s disease. **Ann. N.Y. Acad. Sci**, v. 991, p. 120– 131, 2003.

20 - BEAL, MF; FENNANTRE, RJ; BROWNE, SE, MATTHEWS, RT; KOWALL, NW; BROWN, JR. R.H. Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. **Ann. Neurol**, v. 42, p. 646–654, 1997.

21 - BECKMAN, JS; CHEN, J; CROW, JP; YE, YZ. Reactions of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite with superoxide dismutase in neurodegeneration. **Prog. Brain Res.** v. 103, p. 371–380, 1994.

22 - BECKMAN, JS; ISCHIROPOULOS, H; CHEN, J. Potential contribution of nitric oxide to superoxide-mediated tissue pathology. **Free Radic. Biol. Med**, v. 9, n. 1, p. 58, 1990.

23 – BELDER, A de; MONCADA, S. Cardiomyopathy: a role for nitric oxide? **Int J Cardiol**, v. 50, p. 263-268. 1995.

24 - BERDICHEVSKY, E; RIVEROS, N; SÁNCHEZ-ARMÁSS, S; ORREGO, F. Kainate, N-methylaspartate and other excitatory amino acids increase calcium influx into rat brain cortex cells in vitro. **Neurosci. Lett**, v. 36, n. 1, p. 75-80, 1983.

25 - BEZARD, E; DOVERO, S; PRUNIER, C; RAVENSCROFT, P; CHALON, S; GUILLOTEAU, D; CROSSMAN, AR; BIOULAC, B; BROTCHE, JM; GROSS, CE. Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. **J Neurosci**, v. 21, p. 6853– 6861, 2001.

26 - BLACK, MD; MATTHEWS, EK; HUMPHREY, PP. The effects of a photosensitive nitric oxide donor on basal and electrically-stimulated dopamine efflux from the rat striatum in vitro. **Neuropharmacology** v. 33, p. 1357–1365, 1994.

27 - BOCKELMANN, R; WOLF, G; RANSMAYR, G; RIEDERER, P. NADPHdiaphorase/nitric oxide synthase containing neurons in normal and Parkinson's disease putamen. **J. Neural Transm**, v 7, p. 115–121, 1994.

28 - BODIS-WOLLNER, I; MARX, M; MITRA, S; BOBAK, P; MYLIN, L; YAHR M. Visual dysfunction in Parkinson's disease. **Brain**, v 110, p. 1657–98, 1987.

29 - BOKA, G; ANGLADE, P; WALLACH, D; JAVOY-AGID, F; AGID, Y; HIRSCH, EC. Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. **Neurosci. Lett**, v 172, n. 1-2, p. 151-154, 1994.

30 - BOLANOS, JP; HEALES, SJR; LAND, JM; CLARK, JB. Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: Differential susceptibility of neurons and astrocytes in primary cultures. **J. Neurochem**, v. 64, p.1965–1972, 1995.

31 - BONDY, SC; LEE, DK. Oxidative stress induced by glutamate receptor agonists. **Brain Res**, v. 610, n. 2, p. 229-233, 1993.

32 – BORSINI, F; MELI, A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? **Psychopharmacology**, v. 94, p. 147-61.

33 - BOURIN, M. Is it possible to predict the activity of a new antidepressant in animals with simple psychopharmacological tests? **Fundam. Clin. Pharmacol**, v. 4; p. 49-64, 1990.

34 - BREDT, DS; HWANG, PM; GLATT, CE; LOWENSTEIN, C; REED, RR; SNYDER, SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. **Trends Cell Biol**, v. 1, n. 4, p. 86, 1991.

35 - BREDT, DS; SNYDER, SH. Nitric oxide mediates glutamate linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 9030-9033. 1989.

36 - BRONSTEIN, DM; PEREZ-OTANO, I; SUN, V; MULLIS SAWIN, S.B; CHAN, J; WU, GC; HUDSON, PM; KONG, LY; HONG, JS MCMILLIAN, MK. Glia-dependent neurotoxicity and neuroprotection in mesencephalic cultures. **Brain Res**, v. 704, p. 112-116, 1995.

37 – BROWN, RG; MAC CARTHY, B; GOTHAM, AM; DER, GJ; MARSDEN, CD. Depression and disability in Parkinson's disease: a follow up of 132 cases. **Psychol Med**, v. 18, p. 49–55, 1988.

38 - BROWN, RG; MARSDEN, CD. How Common Is Dementia In Parkinson's Disease? **The Lancet**, v. 324, n. 8414, p. 1262-1265, 1984.

39 - BUGNON, O; Schaad, NC; Schorderet, M. Nitric oxide modulates endogenous dopamine release in bovine retina. **Neuroreport** v. 5, p. 401–404, 1994.

40 - CALNE, D.B. The free radical hypothesis in idiopathic parkinsonism: evidence against it. **Ann. Neurol**, v. 32, p. 799– 803, 1992.



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

42 - CASTAGNOLI, K; PALMER, S; ANDERSON, A; BUETERS, T; CASTAGNOLI, N.JR. The Neuronal Nitric Oxide Synthase Inhibitor 7-Nitroindazole Also Inhibits the Monoamine Oxidase-B-Catalyzed Oxidation of 1-Methyl-4-phenyl-1, 2,3,6-tetrahydropyridine. **Chem. Res. Toxicol**, v. 10, p. 364-368, 1997.

43 – CASTILHO, JC; PERRY, JC; ANDREATINI, R; VITAL, MABF. Phosphatidylserine: an antidepressive or a cognitive enhancer? **Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry** , v. 28, p. 731-738. 2004.

44 – CELESIA, GG; WANAMAKER, WM. Psychiatric disturbances in Parkinson's disease. **Dis Nerv Syst**, v. 33, p.577-83, 1972.

45 - CHAN, P; LANGSTON, JW; IRWIN, I; DELANNEY, LE; DI MONTE, DA. 2-Deoxyglucose enhances 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine- induced ATP loss in the mouse brain. **J. Neurochem**, v. 61, p. 610–616, 1993.

46 - CHAN-PALAY, V; ASAN, E. Alterations in catecholamine neurons of the locus coeruleus in senile dementia of Alzheimer type and in Parkinson's disease with and without dementia and depression. **J Comp. Neurol**, v. 287, n. 3, p. 373-392, 1989.

47 - CHAO, CC; HU, S; PETERSON, PK. Glia: the not so innocent bystanders. **J. Neurovirol**, v. 2, p. 234-239, 1996.

48 - CHERAMY, A.; ROMO, R.; GODEHEU, G.; BARUCH, P.; GLOWINSKI, J. In vivo presynaptic control of dopamine release in the cat caudate nucleus-II. Facillitatory or inhibitory role of L-glutamate. **Neuroscience**, v. 19, p. 1081-1090, 1986.

49 – CHIA, LG; CHENG, LJ; CHUO, LJ; CHENG, FC; CU, JS. Studies of dementia, depression, electrophysiology and cerebrospinal fluid monoamine metabolites in patients with Parkinson's disease. **J Neurol Sci**, v. 133, p. 73–8, 1995.

50 – CHOMYN, A; ATTARDI, G. Mitochondrial mutations in aging and apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Comm**, v. 304, p. 519– 529, 2003.

51 – CHOW, TW; MASTERMAN, DL; CUMMINGS, JL. Depression (chap. 17). In: Weiner WJ, Factor SA, editors. Parkinson's disease: diagnosis and clinical management. New York: Demos Medical Publishing, Inc. 2000.

52 – CIARANELLO, RD; BOHEME, R. Genetic regulation of neurotransmitter enzyme and receptors: Relationship to the inheritance of psychiatric disorders. **Behav. Genet**, v. 12, p. 11-215, 1982.

53 - CLEETER, MWJ; COOPER, JM; DARLEY-USMAR, VM; MONCADA, S; SCHAPIRA, AHV. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide: Implications for neurodegenerative diseases. **FEBS Lett**, v. 345, n. 1, p. 50-54, 1994.

54 - CLOW, D.W.; JHAMANDIAS, K., Characterisation of L-glutamate action on the release of endogenous dopamine from the rat caudate-putamen. **J. Pharmacol. Exp. Ther**, v. 248, p. 722-727, 1989.

55 – COLE, SA; WOODARD, JL; JUNCOS, JL; KOGOS, JL; YOUNGSTROM, EA; WATTS, RL. Depression and disability in Parkinson's disease. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, v. 8, p. 20-5, 1996.

56 - COLPAERT, FC. Pharmacological characteristics of tremor, rigidity and hypokinesia induced by reserpine in rats. **Neuropharmacology**, v. 26; p. 1431-1440, 1987.

57 - CONNOP, BP; BOEGMAN, RJ; BENINGER, RJ; JHAMANDAS, K. Attenuation of Malonate-induced Degeneration of the Nigrostriatal Pathway by Inhibitors of Nitric Oxide Synthase. **Neuropharmacology**, v. 35, n. 4, p. 459-465, 1996 .

58 - CONNOP, BP; ROLFE, NG; BOEGMAN, RJ; JHAMANDAS, K; BENINGER, RJ. Potentiation of NMDA-mediated toxicity on nigrostriatal neurons by a low dose of 7-nitro indazole. **Neuropharmacology**, v. 33, p. 1439–1445, 1994.

59 – CRYAN, JF *et al.*. Noradrenergic lesions differentially alter the antidepressant-like effect of reboxetine in a modified forced swimming test. **Eur. J. Pharmacol.** v. 436, p. 197-205.

60 – CUBO, E; BERNARD, B; LEURGANS, S; RAMAN, R. Cognitive and motor function in patients with Parkinson's disease with and without depression. **Clin Neuropharmacol**, v. 23, p. 331–4, 2000.

61 – CUMMINGS, JL. Depression and Parkinson's disease: a review **Am J Psychiatry**, v. 49, p. 443-54, 1992.

62 – CUTILLAS, B; ESPEJO, M; AMBROSIO, S. 7-Nitroindazole prevents dopamine depletion caused by low concentrations of MPP<sup>+</sup> in rat striatal slices. **Neurochem. Int**, v. 33, p. 35-40.

63 – DAWSON, L; CHADHA, A; MEGALOU, M; DUTY, S. The group II metabotropic glutamate receptor agonist, DCG-IV, alleviates akinesia following intranigral or intraventricular administration in the reserpine-treated rat. **Br. J. Pharm**, v. 129, p. 541-546, 2000.

64 - DAWSON, TM; DAWSON, VL. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. **Science**, v. 302, p. 819– 822, 2003.

65 - DAWSON, TM; SNYDER, SH. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. **J. Neurosci**, v. 14, p. 5147–5159, 1994.

66 - DAWSON, VL; BRAHMBHATT, HP; MONG, JA; DAWSON, TM. Expression of inducible nitric oxide synthase causes delayed neurotoxicity in primary mixed neuronal-glia cortical cultures. **Neuropharmacology**, v. 33, p. 1425-1430, 1994.

67 - DAWSON, VL; DAWSON, TM; BARTLEY, DA; UHL, GR; SNYDER, SH. Mechanism of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. **J. Neurosci**, v. 13, p. 2651-2661, 1993.

68 - DAWSON, VL; DAWSON, TM; LONDON, ED; BREDT, DS; SNYDER, SH. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. **Proc. Natn. Acad. Sci**, v. 88, p. 6368-6371, 1991.

69 - DEHMER, T; LINDENAU, J; HAID, S; DICHGANS, J; SCHULZ, JB. Deficiency of inducible nitric oxide synthase protects against MPTP toxicity in vivo. **J. Neurochem**, v. 74, p. 2213-2216, 2000.

70 - DESCE, JM; GODEHEU, G; GALLI, T; ARTAUD, F; CHERAMY, A; GLOWINSKI, J. L-glutamate evoked release of dopamine from synaptosomes of the rat striatum: involvement of AMPA and N-methyl-D-aspartate receptors. **Neuroscience**, v. 47, p. 333-339, 1992.

71 - DESVIGNES, C; ROBERT, F; VACHETTE, C; CHOUVET, G; CESPUGLIO, R; RENAUD, B; LAMBA'S-SENÃS, L. Monitoring nitric oxide (NO) in rat locus coeruleus: differential effects of NO synthase inhibitors. **NeuroReport**, v. 8, p. 1321-1325, 1997.

72 - DI MONTE, DA; ROYLAND, JE; ANDERSON, A; CASTAGNOLI, K; CASTAGNOLI, N JR; LANGSTON, JW. Inhibition of monoamine oxidase contributes to the protective effect of 7-nitroindazole against MPTP neurotoxicity, **J. Neurochem**, v. 69, p. 1771-1773, 1997.

73 - DI MONTE, DA; WU, EY; DELANNEY, LE; IRWIN, I; LANGSTON, JW. Toxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in primary cultures of mouse astrocytes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 261, p. 44–49, 1992.

74 - DROGE, W. Oxidative stress and aging. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 543, p. 191–200, 2003.

75 - DUMAN, RS; HENINGER, GR; NESTLER, EJ. A molecular and cellular theory of depression. **Arch. Gen. Psychiatry**, v. 54, p. 597–606, 1997.

76 – DUTRA, RC; ANDREAZZA, AP; ANDREATINI, R; TUFIK, S; VITAL, MABF. Behavioral effects of MK801 on reserpine-treated mice. **Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 26, p. 487-495, 2002.

77 - DYKENS, JA. Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated Ca<sup>++</sup> and Na<sup>+</sup>: implications for neurodegeneration. **J. Neurochem**, v. 63, p. 584-591, 1994.

78 – EIDELBERG, D; EDWARDS, C. Functional brain imaging of movement disorders. **Neurol Res**, v. 22, p. 305–12, 2000.

79 – ERWIN, VG; WOMER, DE; CAMPBELL, AD; JONES, BC. Pharmacogenetics of cocaine: II Mesocorticolimbic and striatal dopamine and cocaine receptors in C57BL/6 and DBA/2 mice. **Pharmacogenetics**, v. 3, p. 189-196, 1993.

80 - EVE, DJ; NISBET, AP; KINGSBURY, AE; *et al.*, Basal ganglia neuronal nitric oxide synthase mRNA expression in Parkinson's disease.. **Brain Res. Mol. Brain Res**, v. 63, p. 62–71, 1998.

81 - FAHN, S; COHEN, G. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. **Ann. Neurol**, v. 32, p. 804–812, 1992.

82 - FERRANTE, RJ; BROWNE, SE; SHINOBU, LA; BOWLING, AC; BAIK, MJ; MACGARVEY, U; KOWALL, NW; BROWN, JR. RH; BEAL, MF. Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. **J. Neurochem**, v. 69, p. 2064–2074, 1997.

83 - FISKUM, G; STARKOV, A; POLSTER, BM; CHINOPOULOS, C; Mitochondrial mechanisms of neural cell death and neuroprotective interventions in Parkinson's disease. **Ann. N.Y. Acad. Sci**, v. 991, p. 111 – 119, 2003.

84 – FRIEDMAN, A; BARCIKOWSKA, M. Dementia in Parkinson's disease. **Dementia**, v. 5, p. 12-16, 1994.

85 – FRIEDMAN, J; FRIEDMAN, H. Fatigue in Parkinson's disease. **Neurology**, v. 43, p. 2016-8, 1993.

86 - GARTHWAITE, J; GARTHWAITE, G; PALMER, RM; MONCADA, S. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. **Eur. J. Pharmacol**, v. 172, p. 413. 1989.

87 - GEBICKE-HAERTER, PJ. Microglia in neurodegeneration: molecular aspects. **Microsc Res Technol**, v. 54, p.47-58, 2001.

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

89 – GERMAN, DC; NELSON, EL; LIANG, C; SPECIALE, SG; SINTON, CM; SONSALLA, PK. The neurotoxin MPTP causes degeneration of specific nucleus A8, A9 and A10 dopaminergic neurons in the mouse. **Neurodegeneration**, v. 5, p. 299-312, 1996.

90 - GIOVANNI, A; SIEBER, BA; HEIKKILA, RE; SONSALLA, PK. Correlation between the neostriatal content of the 1-methyl-4-phenylpyridinium species and dopaminergic neurotoxicity following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration to several strains of mice. **American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 257, p. 691-697, 1991.

91 - GONZALEZ, MC; LLORENTE, E; ABREU, P. Sodium nitroprusside inhibits the tyrosine hydroxylase activity of the median eminence in the rat. **Neurosci. Lett**, v. 254, p. 133–136, 1998.

92 - GOODWIN, P; BS, STARR; MS, STARR. Motor responses to dopamine D I and D 2 agonists in the reserpine-treated mouse are affected differentially by the NMDA receptor antagonist MK 801, **J. Neural Transm.** v. 4, p. 15, 1992.

93 - GORELL, JM; JOHNSON, CC; RYBICKI, BA. *et al.*. Occupational exposure to manganese, copper, lead, iron, mercury and zinc and the risk of Parkinson's disease. **Neurotoxicology**, v. 20, p. 239–248, 1999.

94 – GOTHAM, AM; BROWN, RG; MARSDEN, CD. Depression in Parkinson's disease: a quantitative and qualitative analysis. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 49, p.381-9, 1986.

95 – GREENAMYRE, JT; HASTINGS, TG. Biomedicine. Parkinson's-divergent causes, convergent mechanisms **Science**, v. 304, p. 1120–1122, 2004.

96 – GREENE, SM; GRIFFIN, WA. Symptom study in context: Effects of marital quality on signs of Parkinson's disease during patient–spouse interaction. **Psychiatry**, v. 61, p. 35–45, 1998.

97 - GROSS, SS; WOLIN, MS. Nitric oxide: Pathophysiological mechanisms. **Annu. Rev. Physiol**, v. 57, p. 737-769, 1995.

98 - GUEVARA-GUZMAN, R; EMSON, PC; KENDRICK, KM.. Modulation of in vivo striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic GMP. **Neurochem**, v. 62, p. 807–810, 1994.

99 - GUPTA, A; BHATIA, S. Psychological functioning in patients with Parkinson's disease, **Park Rel Dis**, v. 6, n. 3, p. 185-190, 2000.

100 - HAMBERGER, AC; CHIANG, GH; NYLÉN, ES; SCHEFF, SW; COTMAN, CW. Glutamate as a CNS transmitter. I. Evaluation of glucose and glutamine as precursors for the synthesis of preferentially released glutamate. **Brain Res**, v.168, n. 3, p. 513-530, 1979.

101 – HANTRAYE, P; BROUILLET, E; FERRANTE, R; PALÇ, S; DOLAN, R; MATTHEWS, RT; BEAL, MF. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents MPTP-induced parkinsonism in baboons. **Nat. Med**, v. 2, p. 1017-1021, 1996.

102 - HAOBAM, R; SINDHU, KM; CHANDRA, G; MOHANAKUMAR, KP. Swim-test as a function of motor impairment im MPTP model of Parkinson's disease: A comparative study in two mouse strains. **Behavioural Brain Res**, 2005.

103 - HARKIN, AJ; BRUCE, KH; CRAFT, B; PAUL, IA. Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice: 1. Acute treatments are active in the forced swim test. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 372, n. 3, p. 207-213, 1999.

104 - HARVEY, BE. Affective disorders and nitric oxide: a role in pathways to relapse and refractoriness?. **Human Psychopharmacology**, v. 11, p. 309–319, 1996.

105 - HASHIMOTO, M; ROCKENSTEIN, E; CREWS, L; MASLIAH, E. Role of protein aggregation in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Neuromol. Med**, v. 4, p. 21– 36, 2003.



106 - HEALES, SJR; BOLAÑOS, JP; STEWART, VC; BROOKES, PS; LAND, JM; CLARK, JB. Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1410, n. 2, p. 215-228, 1999.

107 – HEIBERG, IL; WENEGER, G; ROSENBERG, R. Reduction of cGMP and nitric oxide has antidepressant-like effects in the forced swimming test in rats. **Behavioural Brain Res**, v. 134, p. 479-494, 2002.

108 - HEIKKILA, KE; MANZINO, L; CABBAT, FS; DUVOISIN, RC. Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors. **Nature** v. 311, p. 467– 469, 1984.

109 - HENEKA, MT; DUMITRESCU, L; LOSCHMANN, PA; WULLNER, U; KLOCKGETHER, T. Temporal, regional, and cell-specific changes of iNOS expression after intrastriatal microinjection of interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. **J. Chem. Neuroanat**, v. 18, p. 167–179, 2000.

110 - HEWETT, SJ; CSERNANSKY, CA; CHOI, DW. Selective potentiation of NMDA-induced neuronal injury following induction of astrocytic iNOS. **Neuron**. v. 13, p. 487-494, 1994.

111 - HIRSCH, EC; HUNOT, S; DAMIER, P; FAUCHEUX, B. Glial cells and inflammation in Parkinson's disease: a role in neurodegeneration? **Ann. Neurol**, v.44, n. 1, p. S115-S120, 1998.

112 – HOSKINS, JA; DAVIS, LJ. The acute effect on levels of catecholamines and metabolites in brain, of a single dose of MPTP in 8 strains of mice. **Neuropharmacology**, v. 28, p. 1389-1397, 1989.

113 – HUBER, SJ; FREIDENBERG, DL; PAULSON, GW; SHUTLWORTH, JA. The pattern of depressive symptoms varies with progression of Parkinson's disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 53, n. 275, p. 278, 1990.

114 - HUNOT, S; BOISSIERE, F; FAUCHEUX, B; BRUGG, B; MOUATT-PRIGENT, A; AGID Y; HIRSCH , EC. Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 72, p. 355–363, 1996.

115- HUNOT, S; DUGAS, N; FAUCHEUX, B; HARTMANN, A; TARDIEU, M; DEBRE, P; AGID, Y; DUGAS, B; HIRSCH, EC. FcEpsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. **J. Neurosci**, v. 19, p. 3440-3447, 1999.

116 - IGNARRO, LJ; BARRY, BK; GRUETTER, DY; OHLSTEIN, EH; GRUETTER, CA; KADOWITZ, PJ; BARICOS, WH. Selective alterations in responsiveness of guanylate cyclase to activation by nitroso compounds during enzyme purification. **Biochem Biophys Acta**, v. 673, p. 394-407, 1981.

117 – INOUE, M; SATO, EF; NISHIKAWA, M; PARK, AM; KIRA, Y; IMADA, I; UTSUMI, K. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. **Curr. Med. Chem**, v. 10, p. 2495– 2505, 2003.

118 - IRAVANI, MM; MILLAR, J; KRUK, ZL. Differential release of dopamine by nitric oxide in subregions of rat caudate putamen slices. **J. Neurochem**, v. 71, p. 1969 –1977, 1998.

119 - ISCHIROPOULOS, H; DURAN, D; HORWITZ, J. Peroxynitrite-mediated inhibition of DOPA synthesis in PC12 cells. **J. Neurochem**, v. 65, p. 2366– 2372, 1995.

120 – JELLINGER, KA. General aspects of neurodegeneration. **J. Neural Transm**, v. 65, p. 101–144, 2003.

121 - JENNER, P; OLANOW, CW. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. **Neurology**, v. 47, n. 3, p. S161-S170, 1996.

122 - JENNER, P. Oxidative stress in Parkinson's disease. **Ann. Neurol**, v. 53, p. S26– S38, 2003.

123 – JENNINGS, D; SEIBYL, J; MAREK, K. Dopamine transporter imaging vs clinical examination in Parkinson's disease: unmasking an early diagnosis. **Neurology**, v. 60, n. 1, p. A292, 2003.

124 – JORDAN, J; CENA, V; PREHN, JH. Mitochondrial control of neuron death and its role in neurodegenerative disorders. **J Physiol. Biochem**, v.59, p. 129–141, 2003.

125 - KALIVAS, PW; BARNES, CD (Eds.). Limbic Motor Circuits a **Neuropsychiatry**, CRC Press, London. 1993.

126 – KANES, SJ; HITZEMAN, BA; HITZEMAN, RJ. On the relationship between D2 receptor density and neuroleptic-induced catalepsy among eight inbred strains of mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 267, p. 538-547, 1993.

127 - KAROLEWICZ, B; BRUCE, KH; LEE, B; PAUL, IA. Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice: 2. Chronic treatment results in downregulation of cortical  $\beta$ -adrenoceptors. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 372, n. 3, p. 215-220, 1999.

128 – KAUR, S; STARR, MS. Antiparkinsonian action of dexamethorphan in the reserpine-treated mouse. **Eur. J. Pharmacol**, v. 280, p.159-166, 1995.

129 - KAUR, S; STARR, MS. Differential effects of intrastriatal and intranigral injections of glutamate antagonists on motor behaviour in the reserpine-treated rat. **Neuroscience** v. 76, p. 345– 354, 1997.

130 - KITAMURA, Y; KAMOSHIMA, W; SHIMOHAMA, S; NOMURA, Y; TANIGUCHI, T. Nitric oxide donor-induced p53-sensitive cell death is enhanced by Bcl-2 reduction in human neuroblastoma cells. **Neurochem. Int**, v. 32, p. 93–102, 1998.

131 - KISS, JP; HENNINGS, EC; ZSILLA, G; VIZI, ES. A possible role of nitric oxide in the regulation of dopamine transporter function in the striatum. **Neurochem. Int.** v. 34. p. 345–350, 1999.

132 – KLAIDMAN, LK; YANG, J; CHANG, ML; ADAMS, JR. JD. Recent developments on the role of mitochondria in poly (ADP-ribose) polymerase inhibition. **Curr. Med. Chem**, v. 10, p. 2669– 2678, 2003.

133 – KLIVENYI, P; ANDREASSEN, OA; FERRANTE, RJ; LANCELOT, E; REIF, D; BEAL, MF. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase protects against MPTP toxicity. **Neuroreport**, v. 11, p. 1265–8, 2000.

134 - KNOWLES, RG; MONCADA, S. Nitric oxide synthase in mammals. **Biochem. J**, v. 298, p. 249–258, 1994.

135 – KOUTSILIERI, E; SCHELLER, C; TRIBL, F; RIEDERER, P. Degeneration of neuronal cells due to oxidative stress – microglial contribution. **Park Rel Dis**, v. 8, p. 401-406, 2002.

136 – KRAHL, SE; PEKARY, AE; SENANAYAKE, SS; SATTIN, A. Antidepressant efficacy of vagus nerve stimulation. **World Journal of Biological Psychiatry**, v. 2, n. 1, p. 336S, 2001.

137 – KRAHL, SE; PEKARY, AE; SENANAYAKE, SS; SATTIN, A. Vagus nerve stimulation is an effective antidepressant treatment in an animal model of depression. **Soc Neurosci Abstr**, p. 26, 2001.

138 – KRAHL, SE; SENANAYAKE, SS; PEKARY, AE; SATTIN, A. Vagus nerve stimulation (VNS) is effective in a rat model of antidepressant action. **Journal of Psychiatric Research**, v. 38, n. 3, p. 237-240, 2004.

139 - KUMER, SC; VRANA, KE. Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. **J. Neurochem**, v. 67, p. 443–462, 1996.

140 – KUZIS, G. SABE, L; TIBERTI, C; LEIGUARDA, R; STARKSTEIN, S; Cognitive functions in major depression and Parkinson's disease. **Arch. Neurol.** v. 54, p. 982-6, 1997.

141 - LANGSTON, JW; BALLARD, P; TETRUD, JW; IRWIN, I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. **Science**, v. 219, p. 979–980, 1983.

142 – LAWSON, LJ; PERRY, VH; DRI, P; GORDON, S. Heterogeneity in distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. **Neuroscience**, v. 39, p. 151–170, 1990.

143 – LE, W; ROWE, D; XIE, W; ORTIZ, I; HE, Y; APPEL, SH. Microglial activation and dopaminergic cell injury: an in vitro model relevant to Parkinson's disease. **J Neurosci**, v. 21, p. 8447-55, 2001.

144 – LEE, C; SAMII, A; SOSSI, V; RITH, T *et al.*, In vivo positron emission tomographic evidence for compensatory changes in presynaptic dopaminergic nerve terminals in Parkinson's disease. p. 493–503, 2000.

145 - LEE, SC; LIU, W; DICKSON, DW; BROSNAN, CF; BERMAN, JW. Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. **J. Immunol**, v. 150, p. 2659–2667, 1993.

146 - LEI, SZ; PAN, ZH; AGGARWAL, SK; CHEN, HS; HARTMAN, J; SUCHER, NJ; LIPTON, SA. Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor–channel complex. **Neuron**, v. 8, p. 1087–1099, 1992.

147 - LEVIEL, V; GOBERT, A; GUIBERT, B. The glutamate-mediated release of dopamine: further characterization of the dual excitatory-inhibitory function. **Neuroscience**, v. 39, p. 305-312, 1990.

148 – LEVIN, BE; LLABRE, MM; WEINER, MJ. Parkinson's disease and depression: psychometric property of the Beck Depression Inventory. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 51, p.1401, 1998.

149 - LIANG, LP; KAUFMAN, S. The regulation of dopamine release from striatum slices by tetrahydrobiopterin and L-arginine-derived nitric oxide. **Brain Res.** v. 800, p. 181–186, 1998.

150 - LIBERATORE, GT; JACKSON-LEWIS, V; VUKOSAVIC, S; MANDIR, AS; VILA, M; MCAULIE, WG; DAWSON, VL; DAWSON, TM; PRZEDBORSKI, S. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. **Nat. Med**, v. 5, p. 1403-1409, 1999.

151 - LINDEFORS, N; UNGERSTEDT, U. Bilateral regulation of glutamate tissue antagonists increase the release of dopamine in the substantia nigra extracellular levels in caudate-putamen by midbrain dopamine neurons, **Neurosci. Lett**, v. 115, p. 248–252. 1990.

152 – LIU, CY; WANG, SJ; FUH, JL; LIN, CH; YANG, YY; LIU, CH. The correlation of depression with functional activities in Parkinson's disease. **J Neurol**, v. 224, n. 8, p. 493-8, 1997.

153 - LOZANO, AM; LANG, AE; HUTCHISON, WD; DOSTROVSKY, JO. New developments in understanding the etiology of Parkinson's disease and in its treatment, **Curr Op Neurobiol**, v. 8, n. 6, p. 783-790, 1998.

154 - MAGUIRE-ZEISS, KA; FEDEROFF, HJ. Convergent pathobiologic model of Parkinson's disease. **Ann. N. Y. Acad. Sci**, v. 991, p. 152– 166, 2003.

155 - MAGUIRE-ZEISS, KA; SHORT, DW; FEDEROFF, HJ. Synuclein, dopamine and oxidative stress: co-conspirators in Parkinson's disease? **Molecular Brain Res**, 2005.

156 - MANZONI, O; BOCKAERT, J. Nitric oxide synthase activity endogenously modulates NMDA receptors. **J. Neurochem**, v. 61, p. 368–370. 1993.

157 - MARKAR, TK; NEDERGAARD, M; PREUSS, A; GELBARD, AS; PERUMAL, AS; COOPER, AJL. Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurones: Evidence that astrocytes play an important role in antioxidative stress in the brain. **J. Neurochem**, v. 62, p. 45–53, 1994.

158 - MARTINEZ-RUIZ, A; LAMAS, L. S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction. **Cardiovasc. Res**, v. 62, p. 43–52, 2004.

159 - MARVIZON, JC; LEWIN, AH; SKOLNICK, P. 1-Aminocyclopropane carboxylic acid: a potent and selective ligand for the glycine modulatory site of the N-methyl-D-aspartate receptor complex. **J. Neurochem**, v. 52, p. 992–994, 1989.

160 - MATTHEWS, RT; BEAL, MF; FALLON, J; FEDORCHAK, K; HUANG, PL; FISHMAN, MC; HYMAN, BT. MPP+ induced substantia nigra degeneration is attenuated in nNOS knockout mice. **Neurobiol. Disease**, v. 4, p. 114-121, 1997a.

161 - MATTHEWS, RT; YANG, L; BEAL, MF. S-Methylthiocitrulline, a neuronal nitric oxide synthase inhibitor, protects against malonate and MPTP neurotoxicity. **Exp. Neurol**, v. 143, p. 282-286, 1997b.

162 – MAYBERG, HS; SOLOMON, DH. Depression in Parkinson's disease: a biochemical and organic viewpoint. Weiner WJ, Lang AE, editors. Behavioral neurology of movement disorders. **Adv Neurol**, v. 65, p. 49-60, 1995.

163 – MAYER, B; HEMMENS, B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells, **Trends Biochem. Sci**, v. 22, p. 477-481, 1997.

164 – MAYEUX, R; STERN, Y; CTE, L; WILLIAMS, JBW. Altered serotonin metabolism in depressed patients with Parkinson's disease. **Neurology**, v. 39, p. 642-646, 1984.

165 - MCCALL, T; VALLANCE, P. Nitric oxide takes centre-stage with newly defined roles, **Trends Pharmacol. Sci**. v. 13, p. 1. 1992.

166 - MCGEER, PL; ITAGAKI, S; BOYES, BE; MCGEER, EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. **Neurology**, v. 38, p. 1285-1291, 1988a.

167 - MCGEER, PL; ITAGAKI, S; MCGEER, EG. Expression of the histocompatibility glycoprotein HLA-DR in neurological disease. **Acta Neuropathol**, v. 76, p. 550-557, 1988b.

168 – MENZA, M; SAGE, J; MARSHAL, E; CODY, R; DUVOISIN, R. Mood changes and on-off phenomena in Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 5, p. 148–51, 1990.

169 - MENZAGHI, F; WHELAN, KT; RISBROUGH, VB; RAO, TS; LLOYD, GK. Interactions between a novel cholinergic ion channel agonist, SIB-1765F and L-DOPA in the reserpine model of Parkinson's disease in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther**, v. 280, p. 393-401, 1997.

170 – MICHAELIS, EK. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. **Prog neurobiol**, v. 54, p. 369-415, 1997.

171 – MINDHAM, RHS. Psychiatry symptoms in Parkinsonism. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 33, p. 188-91, 1970.



172 - MINGHETTI, L; POLAZZI, E; NICOLINI, A; GRECO, A; LEVI, G. Possible role of microglial prostanoids and free radicals in neuroprotection and neurodegeneration. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 468, p. 109–119, 1999.

173 - MITCHELL, S; FINKEL, MS; LAGHRISSI-THODE, F; POLLOCK, BG; RONG, J. Paroxetine is a novel nitric oxide synthase inhibitor. **Psychopharmacol. Bull.**, v. 32, p. 653–658, 1996.

174 – MITRA, N; MOHANAKUMAR, KP; GANGULY, DK. Resistance of golden hamster to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: relationship with low levels of regional monoamine oxidase-B. **J Neurochem**, v. 62, p. 1906–12. 1994.

175 - MOCHIZUKI, H; GOTO, K; MORI, H; MIZUNO, Y. Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease. **J Neurol Sci**, v. 137, n. 2, p. 120-123, 1996.

176 - MOGI, M; HARADA, M; KOJIMA, K; KIUCHI, K; NAGATSU, T. Effects of systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine to mice on tyrosine hydroxylase, L-3,4-dihydroxyphenylalanine decarboxylase, dopamine beta-hydroxylase, and monoamine oxidase activities in the striatum and hypothalamus. **J. Neurochem**, v. 50, p. 1053-1056, 1988.

177 - MOGI, M; HARADA, M; KONDO, T; NARABAYASHI, H; RIEDERER, P; NAGATSU, T. Transforming growth factor- $\beta$ 1 levels are elevated in the striatum and in ventricular cerebrospinal fluid in Parkinson's disease. **Neurosci. Lett**, v. 193, n. 2, p. 129-132, 1995.

178 - MOGI, M; HARADA, M; KONDO, T; RIEDERER, P; INAGAKI, H; MINAMI, M; NAGATSU, T. Interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor are elevated in the brain from parkinsonian patients. **Neurosci. Lett**, v. 180, n. 2, p. 147-150, 1994a.

179 - MOGI, M; HARADA, M; RIEDERER, P; NARABAYASHI, H; FUJITA, K; NAGATSU, T. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. **Neurosci. Lett**, v. 165, n. 1-2, p. 208-210, 1994b.

180 – MONLEON, S; D'AQUILA, P; PARRA, A; SIMOM, VM; BRAIN, PF; WILLNER, P. Attenuation of sucrose consumption in mice by chronic mild stress and its restoration by imipramine. **Psychopharmacology**, v. 117; p. 435-457, 1995.

181 - MORELLI, M.; FENU, S; PINNA, A; DI CHIARA, G. Opposite effects of NMDA receptor blockade on dopaminergic D 1- and D<sub>2</sub>-mediated behaviour in the 6-hydroxydopamine model of turning: relationship with c-fos expression, **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 260, p. 402. 1992.

182 – MOSEWICH, RK; RAJPUT, AH; SHUAIB, A; ROZDILSKY, B; ANG, L. Pulmonary embolism: an under-recognized yet frequent cause of death in parkinsonism. **Mov Disord**, v. 9, n. 3, p. 350-2, 1994.

183 – MOORE, P.K; BABBEDGE, R C; WALLACE, P; GAFFEN, ZA; HART, SL. 7-Nitro indazole, an inhibitor of nitric oxide synthase, exhibits anti-nociceptive activity in the mouse without increasing blood pressure. **Br. J. Pharmacol**, v. 10s, p. 296-297, 1993a.

184 - MOORE, P.K; WALLACE, P; GAFFEN, Z; HART S.L; BABBEDGE, RC. Characterization of the novel nitric oxide synthase inhibitor 7-nitro indazole and related indazoles: antinociceptive and cardiovascular effects. **Br. J. Pharmacol**, v. 110, p. 219, 1993.

185 - MOORE, RY. Organization of midbrain dopamine systems and the pathophysiology of Parkinson's disease. **Park Rel Dis**, v. 9, n. 2, p. 65-71, 2003.

186 – MORRISH, P; RAKSHI, J; SAWLE, G; BROOKS, D. Measuring the rate of progression and estimating the preclinical period in Parkinson's disease. **J Neurol Neurosurg Psychiat**, v. 64, p. 314–9, 1998.

187 - MUFSON, EJ; BRANDABUR, MM. Sparing of NADPH-diaphorase striatal neurons in Parkinson's and Alzheimer's diseases. **Neuroreport**, v. 5, p. 705–708, 1994.

188 - MURPHY, S; SIMMONS, ML; AGULLO, L; GARCIA, A; FEINSTEIN, DL; GALEA, E; REIS, DJ; MINC-GOLOMB, D; SCHWARTZ, JP. Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. **Trends Neurosci**, v. 16, p. 323–328, 1993.

189 – MUTHANE, U; RAMSAY, KA; JIANG, H; JACKSON-LEWIS, V; DONALDSON, D; FERNALDO, S; FERREIRA, M; PREZDBORSKI, S. Differences in nigral neuron number and sensitivity to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57BL/6 and CD-1mice. **Exp Neurol**, v. 126, p. 195, 1994.

190 - NATHAN, C. Nitric oxide as a product of mammalian cells. **FASEB J**. v. 6, p. 3051-3064, 1992.

191 - NATHAN, C; XIE, QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. **J. Biol. Chem**, v. 269, p. 13725–13728, 1994.

192 – NG, GYK; O'DOWD, BF; GEORGE, SR. Genotype differences in brain dopamine receptor function in the DBA/2 and C57BL/6J inbred mouse strains. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 269, p. 349-364, 1994.

193 – NISSENBAUM, H; QUINN, N; BROWN, R; TOONE, B; GOTHAM, A; MARSDEN, D. Mood swings associated with the on-off phenomenon in Parkinson's disease. **Psychol Med**, v. 17, p. 899–904, 1987.

194 – OERTEL, WH; HOGLINGER, GU; CARACENI, T; *et al.*. Depression in Parkinson's disease. An update. **Adv Neurol**, v. 86, p. 373–83, 2001.

195 - ORRENIUS, S; MCCABE, MJ JR; NICOTERA, P. Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanisms of cytotoxicity and programmed cell death. **Toxicol. Lett**, v. 64-65, p. 357-364, 1992 .

196 - PAKKENBERG, B; MOLLER, A; GUNDERSEN, HJ; MOURITZEN DAM A; PAKKENBERG, H. The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, v. 54, p. 30–33, 1991.

197 – PAPP, M; WILLNER, P. Rapid onset of antidepressant action in an animal model of depression. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 6, p. S4. 1996.

198 – PARADIS, E; CLAVEL, S; JULIEN, P; MURTHY, MRV; DE BILBAO, F; ARSENIJEVIC, D; GIANNAKOPOULOS, P; VALLET, P; RICHARD, D. Lipoprotein lipase and endothelial lipase expression in mouse brain: regional distribution and selective induction following kainic acid-induced lesion and focal cerebral ischemia. **Neurobiol. Dis**, v. 15, p. 312– 325, 2004.

199 – PARTINEN, M. Sleep disorder related to Parkinson's disease. **J Neurol**; v. 224, n.1, p. S3-S6, 1997.

200 - PERRY, TL; GODIN, DV; HANSEN, S; Parkinson's disease: a disorder due to nigral glutathione deficiency. **Neurosci. Lett**. v. 33, p. 305–310. 1982.

201 – PETIT-DEMOULIERE, B; CHENU, F; BOURIN, M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. **Psychopharmacology**, v. 177; p. 245-255, 2005.

202 – PETRIE, RXA; REID, IC; STEWART, CA. The N-methyl-D-aspartate receptor, synaptic plasticity, and depressive disorder. **Pharmacol Ther**, v. 87, p. 11-25. 2000.

203 – PISANI, A; BONSI, P; CENTONZE, D; GUBELLINI, P; BERNARDI, G; CALABRESI, P. Targeting striatal cholinergic interneurons in Parkinson's disease: Focus on metabotropic glutamate receptors. **Neuropharmacology**, v. 45, p. 45-46, 2003.

204 – PORSOLT, RD; BERTIN, N; DENIEL, M; JALFRE, M. Immobility induced by forced swimming in rats: effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity. **Eur. J. Pharmacol.** v. 57; p. 201-210. 1979.

205 - POSSEL, H; NOACK, H; PUTZKE, J; WOLF, G; SIES, H. Selective upregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by lipopolysaccharide (LPS) and cytokines in microglia: in vitro and in vivo studies. **Glia**, v. 32, p. 51-59, 2000.

206 – PREDIGER, RDS; DA CUNHA, C; TAKAHASHI, RN. Antagonistic interaction between adenosine A<sub>2A</sub> and dopamine D<sub>2</sub> receptors modulates the social recognition memory in reserpina-treated rats. **Behav Pharmacol**, v. 0, n. 0, 2005.

207 - PRZEDBORSKI, S; JACKSON-LEWIS, V; YOKOYAMA, R; SHIBATA, T; DAWSON, VL; DAWSON, TM. Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl- 4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine MPTP -induced dopaminergic neurotoxicity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 93, p. 4565–4571, 1996.

208 - PRZEDBORSKI, S; LEVIVIER, M; JIANG, H; FERREIRA, M; JACKSON-LEWIS, V; DONALDSON, D; TOGASAKI, DM. Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. **Neuroscience**, v. 67, p. 631–647, 1995.

209 – PUGLISI-ALLEGRA, S; CABIB, S. Psychopharmacology of dopamine: The contribution of comparative studies in inbred strains of mice. **Prog neurobiol**, v. 51, p. 637-661, 1997.

210 – RABINSTEIN, AA; SHULMAN, LM. Management of behavioral and psychiatric problems in Parkinson's disease. **Park Rel Dis**, v 7, n 1, p. 41-50. 2001.

211 – RADA, P; MORENO SA; TUCCI, S; GONZALEZ, LE; HARRISON, T; CHAU. DT; HOEBEL, BG; HERNANDEZ, L. Glutamate release in the nucleus accumbens is involved in behavioral depression during the Porsolt swim test. **Neuropharmacology**, v. 119, p. 557-565. 2003.

212 – RADI, R; RODRIGUEZ, M; CASTRO, L; TELLERI, R. Inhibition of Mitochondrial Electron Transport by Peroxynitrite. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 308, n. 1, p. 89-95, 1994.

213 – RAKSHI, J; UEMA, T; ITO, K; *et al.*. Frontal, midbrain, and striatal dopamine function in early and advanced Parkinson's disease: a 3D [18F]dopa PET study. **Brain**, v. 122, p. 1637–50, 1999.

214 - RAUHALA, P; SZIRAKI, I; CHUANG, CC. Peroxidation of brain lipids in vitro: nitric oxide versus hydroxyl radicals. **Free Radic. Biol. Med**, v.21, n. 3, p. 391-394, 1996 .

215 – RIBEIRO, MJ; VIDAILHET, M; LOC'H, C; *et al.*. Dopaminergic function dopamine transporter binding assessed with positron emission tomography Parkinson disease. **Arch Neurol**, v. 59, p. 580–6, 2002.

216 – RICHARD, IH; SCHIFFER, RB; KURLAN, R. Anxiety in Parkinson`s disease. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, v. 8, n. 4, p. 383-92, 1996.

217 - RIEDERER, P; SOFIE, E; RAUSCH, WD; SCHMIDT, B; REYNOLDS, GP; JELLINGER, K; YODIM, MBH. Transition metals, ferritin, glutathione and ascorbic acid in parkinsonian brains. **J. Neurochem**, v. 52, p. 515–520, 1989.

218 – ROGÓ, Z; SKUZA, G; MAJ, J; DANYSZ, W. Synergistic effect of uncompetitive NMDA receptor antagonists and antidepressant drugs in the forced swimming test in rats. **Neuropharmacology**, v. 42, p. 1024-1030, 2002.

219 - ROYLAND, JE; DELFANI, K; LANGSTON, JW; JANSON, A; DI MONTE, DA. 7-Nitroindazole prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced ATP loss in the mouse striatum. **Brain Res**, v. 839, n. 1, p. 41-48, 1999 .

220 - RUBANYI, GM.; HO, EH; CANTOR, EH; LUMMA, WC; BOTELHO, LH. Cytoprotective function of nitric oxide: Inactivation of superoxide radicals produced by human leukocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 181, p. 1392–1397, 1991.

221 - SAGARA, J; MIURA, K; BANNAI, S. Maintenance of neuronal glutathione by glial cells. **J. Neurochem**, v. 61, p. 1672–1676, 1993.

222 – SADEK, HA; NULTON-PERSSON, AC; SZWEDA, PA; SZWEDA, LI. Cardiac ischemia/reperfusion, aging, and redox-dependent alterations in mitochondrial function. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 420, p. 201–208, 2003.

223 – SANTAMARIA, J. Parkinson's disease and depression: a possible subgroup of idiopathic parkinsonism. **Neurology**, v. 36, p. 1130–3, 1986.

224 – SASTRE, J; PALLARDO, FV; VINA, J. The role of mitochondrial oxidative stress in aging. **Free Radic. Biol. Med**, v. 35, p. 1–8, 2003.

225 – SATTIN, A; PEKARY, AE; LLOYD, RL. TRH gene products are implicated in the antidepressant mechanisms of seizures. **Ann NY Acad Sci**, v. 738, p. 135–153, 1994.

226 - SCHAPIRA, AHV; COOPER, JM; DEXTER, D; JENNER, P; CLARK, JB; MARSDEN, CD. Mitochondrial Complex I Deficiency In Parkinson's Disease. **The Lancet**, v. 333, n. 8649, p. 1269, 1989.

227 - SCHULZ, JB; MATTHEWS, RT; MUQIT, MM; BROWNE, SE; BEAL, MF. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice, **J. Neurochem**, v. 64, p. 936–939, 1995.

228 – SEDELIS, M; HOFELE, K; AUBURGER, GW; HUSTON, JP. MPTP susceptibility in the mouse: behavioral, neurochemical, and histological analyses of gender and strain differences. **Behav Genet**, v. 30, p. 171-82, 2000.

229 – SEDLAK, Y; LINDSAY, RH. Estimation of total protein bound and non-protein-bound SH groups in tissue with Ellman's reagent, **Anal Biochem** v. 25, p.192-205, 1968.

230 - SEILICOVICH, A; LASAGA, M; BEFUMO, M; DUVILANSKI, BH; DEL CARMEN DIAZ, M; RETTORI, V; MCCANN, SM. Nitric oxide inhibits the release of norepinephrine and dopamine from the medial basal hypothalamus of the rat. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 92, p. 11299 –11302, 1995.

231 - SENIUK, NA; TATTON, WG; GREENWOOD, CE. Dose-dependent destruction of the coeruleus-cortical and nigral-striatal projections by MPTP. **Brain Res**, v. 527, p. 7–20, 1990.

232 – SHULMAN, LM; SINGER, C; LEIFERT, R; *et al.*. The comorbidity of the non-motor symptoms in Parkinson's disease. **Ann Neurol**, v. 40, p. 536, 1996.

233 - SIAN, J., DEXTER, D.T., LEES, A.J., DANIEL, S.E., AGID, Y., JAVOY-AGID, F., JENNER, P., MARSDEN, C.D. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. **Ann. Neurol**, v. 36, p. 348–355, 1994.

234 - SILVA, MT.; ROSE, S; HINDMARSH, JG; AISLAITNER, G; GORROD, J W; MOORE, PK; JENNER, P; MARSDEN, CD. Increased striatal dopamine efflux in vivo following inhibition of cerebral nitric oxide synthase by the novel monosodium salt of 7-nitro indazole. **Br. J. Pharmacol**, v. 114, p. 257–258, 1995.

235 – SINGER, TP; CASTAGNOLI, N; RAMSAY, RR; TREVOR, AJ. Biochemical events in the development of parkinsonism induced by 1-methyl, 4-phenyl, 1,2,3,6- tetrahydropyridine. **J. Neurochem**, v. 49, p. 1-8, 1987.



236 - SKALISZ, LL; BEIJAMINI, V; JOCA, SL; VITAL, MABF; DA CUNHA, C; ANDREATINI, R. Evaluation of the face validity of reserpine administration as na animal model of depression-Parkinson's disease association. **Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry** , v. 26; p. 879-883, 2002.

237 – SKOLNICK, P. Antidepressants for the new millennium. **Eur. J. Pharmacol.** v. 375, p. 31-40. 1999.

238 - SMEYNE, M; GOLOUBEVA, O; SMEYNE, RJ. Strain-dependent susceptibility to MPTP and MPTP (+)-induced parkinsonism is determined by glia, **Glia**, v. 34, p. 73– 80, 2001.

239 - SNYDER, SH; BREDET, DS. Nitric oxide as a neuronal messenger. **Trends Pharmacol. Sci.** v. 12, p. 125. 1991

240 - SNYDER, SH; BREDET, DS. Biological roles of nitric oxide. **Sci Am**, v. 266, p. 18– 35, 1992.

241 – SOSSI, V; DE LA FUENTE-FERNANDEZ, R; HOLDEN, J; DOUDET, D; MCKENZIE, J; STOESSL, A; RUTH, T. Increase in dopamine turnover occurs early in Parkinson's disease: evidence from a new modeling approach to PET 18F-fluorodopa data. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 22, p. 232–9, 2002.

242 - SOUTHAN, GJ; SZABO, C; THIEMERMANN, C. Isothioureas: potent inhibitors of nitric oxide synthases with variable isoform selectivity. **Br. J. Pharmacol**, v. 114, p. 510-516, 1995.

243 – SPILLANTINI, MG; SCHMIDT, ML; LEE, VM; TROJANOWSKI, JQ; JAKES, R; GOEDERT, M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. **Nature**, v. 388, p. 839-840, 1997.

244 – STARKSTEIN, SE; PREZIOSI, TJ; BOLDUC, PL; ROBINSON, RG. Depression in Parkinson's disease. **J Nerv Mental Dis**, v. 178, p. 27-31, 1990.

245 - STARR, M.S. Glutamate/dopamine D /D balance in the basal ganglia modulation and Parkinson's disease, and its relevance to Parkinson's disease, **Synapse**, v. 19, 264–293, 1995.

246 - STARR, BS; STARR, MS. Differential effects of dopamine D 1 and D 2 agonists and antagonists on velocity of movement, rearing and grooming in the mouse, **Neuropharmacology** v. 25, p. 455. 1986.

247 - STARR, MS; STARR, BS. Comparison of the effects of NMDA and AMPA antagonists on the locomotor activity induced by selective D1 and D2 dopamine agonists in reserpine-treated mice, **Psychopharmacology** v. 114, p. 469, 1994.

248 – STARR, MS; STARR, BS. Do NMDA-receptor mediated changes in motor behaviour involve nitric oxide? **Eur. J. Pharmacol.**, v. 272, p. 211-217, 1995.

249 – STERU, L; CHERNAT, R; THIEERY, B *et al.*. **Psychopharmacology**, v. 85, p. 367-370. 1985.

250 - STOFFERS, D; BERENDSE, HW; DEIJEN, JB; WOLTERS, EC. Deficits on Corsi's block-tapping task in early stage Parkinson's disease. **Park Rel Dis**, v.10, n. 2, p. 107-111, 2003 .

251 - STRASSER, A; YASUMA, Y; MCCARRON, RM; ISHII, H; STANIMIROVIC, D; SPATZ, M. Effect of nitro-L-arginine on cerebral blood flow and monoamine metabolism during ischemia/reperfusion in the mongolian gerbil, **Brain Res**, v. 664, n. 1-2, p. 197-201, 1994 .

252 - STRASSER, A; MCCARRON, RM; ISHII, H; STANIMIROVIC, D; SPATZ, M. L-arginine induces dopamine release from the striatum in vivo. **Neuroreport** v. 5, p. 2298 –2300, 1995.

253 - SUNDSTROM, E; STROMBERG, I; TSUTSUMI, T; OLSON, L; JONSSON, G. Studies on the effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on central catecholamine neurons in C57BL/6 mice. Comparison with three other strains of mice. **Brain Res.** v. 405, p. 26– 38, 1987.

254 – SZIBOR, M; HOLTZ, J. Mitochondrial ageing. **Basic Res. Cardiol**, v. 98, p. 210–218, 2003.

255 – TABANO, R; JANNINGS, D; SEIBYL, J. b-CIT/SPECT in hemi-Parkinson's disease: evaluation of dopamine transporter loss at the threshold illness. **Neurology**, v. 60, n. 1, p.A292, 2003.

256 – TANDBERG, E; LARSEN, JP; AARSLAND, D; CUMMINGS, JL. The occurrence of depression in Parkinson's disease. A community- based study. **Arch Neurol**, v. 53, n. 2, p.175-9, 1996.

257 – TANDBERG, E; LARSEN, JP; AARSLAND, D; LAAKE, K; CUMMINGS, JL. Risk factors for depression in Parkinson's disease. **Arch Neurol**, v. 54, n. 5, p. 625-30, 1997.

258 - TANNER, C. M. Epidemiology of Parkinson's disease. **Neurol Clin**, v. 10, p. 317–329, 1992.

259 – TAKADA, M; SUGIMOTO, T; HATTORI, T. MPTP neurotoxicity to cerebellar Purkinje cells in mice. **Neurosci. Lett**, v. 150, p.49. 1993.

260 – TEDROFF, J; EKESBO, A; RYDIN, E; LANGSTROM, B; HAGBERG, G. Regulation of dopaminergic activity in early Parkinson's disease. **Ann**, v.46, p. 359–65, 1999.

261 - TER HORST, GJ; KNIGGE, MF; VAN DER WAL, A. Neurochemical lesioning in the rat brain with iontophoretic injection of the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>), **Neurosci. Lett**, v. 141, n. 2, p. 203-207, 1992 .

262 – THIRUCHELVAM, M; POWERS, JM; CORY-SLECHTA, DA; RICHFIELD EK. Risk factors for dopaminergic neuron loss in human alpha-synuclein transgenic mice, **Eur. J. Neurosci**, v. 19, p. 845– 854, 2004.

263 - TOBOREK, M; HENNING, B. Fatty acid-mediated effects on the glutathione redox cycle in cultured endothelial cells. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 59, p. 60– 65. 1994.

264 - TOFFA, S; KUNIKOWSKA, GM; JENNER, P; MARSDEN, CD. Glutathione depletion in rat brain does not cause nigrostriatal pathway degeneration. **J. Neural Transm**, v. 104, p. 67–75, 1997.

265 – TOM, T; CUMMINGS, JL. Depression in Parkinson's disease. Pharmacological characteristics and treatment. **Drugs Aging**, v. 12, p. 55–74, 1998.

266 – TORREILLES, F; TABCHEH, SS; GUÉRIN, MC; TORREILLES, J; Neurodegenerative disorders: the role of peroxynitrite. **Brain Res Reviews**, v. 30, p. 153-163, 1999.

267 – TRULLAS, R; SKOLNICK, P. Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 185; p. 1-10; 1990.

268 - TSAI, MJ; LEE, EHY. Differences in the disposition and toxicity of 1-methyl-4-phenyl pyridinium in cultured rat and mouse astrocytes. **Glia**, v. 12, p. 329–335, 1994.

269 – VALDERIOLA, F; NOBBE, FA; TOLOSA, E. Treatment of behavioral disturbances in Parkinson's disease. **J Neural Transm**, v.51, p.175-204, 1997.

270 - VERBEUREN, TJ; SIMONET, S; VALLEZ, MO; LAUBIE, M. 5-HT -receptor blockade restores vasodilations to 5-HT in atherosclerotic rabbit hearts. Role of the endothelium. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** v. 17, p. 222–228, 1991.

271 - VINCENT, JL; HOPE, BT. Neurons that say NO, **Trends Neurosci**, v. 15, p. 108, 1992.

272 – VOLKE, V; WENEGER, G; BOURIN, M; VASAR, E. Antidepressant- and anxiolytic-like effects of selective neuronal NOS inhibitor 1-(2-trifluoromethylphenyl)-imidazole in mice. **Behavioural Brain Res**, v. 140, p. 141-147. 2003.

273 – WALLACE, DC. Mouse models for mitochondrial disease. **Am. J. Med.Genet**, v. 106, p. 71– 93, 2001.

274 - WATKINS, JC; OLVERMAN, HJ. Agonists and antagonists for excitatory amino acid receptors. **Trends Neurosci**, v. 10, p. 265–272, 1987.

275 - WATSON, G; LANTHORN, TH. Pharmacological characteristics of cyclic homologues of glycine. **Neuropharmacology**, v. 29, p. 727–730, 1990.

276 - WEBER, G.F. Final common pathways in neurodegenerative diseases: regulatory role of the glutathione cycle. **Neurosci. Biobehav. Rev**, v. 23, p. 1079–1086, 1999.

277 - WEST, AR; GALLOWAY, MP. Nitric oxide and potassium chloride-facilitated striatal dopamine efflux in vivo: Role of calcium-dependent release mechanisms. **Neurochem. Int**, v. 33, p. 493–501, 1998.

278 - WEST, AR; GALLOWAY, MP; GRACE, AA. Regulation of striatal dopamine neurotransmission by nitric oxide: effector pathways and signaling mechanisms, **Synapse** v. 44, p. 227–245, 2002.

279 – WHONE, A; REMY, P; DAVIS, M; *et al.*. The REAL-PET study: slower progression in early Parkinson's disease treated with ropinirole compared with L-dopa. **Neurology**, v. 58, n. 3, p. A82–3, 2002.

- 280 – WILNER, P. **Trends. Pharmacol. Sci.** v. 12, p. 131-136, 1991.
- 281 - WILLNER, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology**, v. 134, p. 319-329, 1997.
- 282 - WILLNER, P; SCHEEL-KRÜGER, J; MARSHALL, JF. *et al.*. The mesolimbic dopamine system: From motivation to action. **Trends. Pharmacol. Sci.**, v. 12, p. 394-395, 1991.
- 283 - WILLNER, P; TOWELL, A; SAMPSON, D; SOPHOKLEOUS, S; MUSCAT, R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology**, v. 93, p. 358–364, 1987.
- 284 - WINK, DA; COOK, JÁ; PACELLI, R; DEGRAFF, W; GAMSON, J; LIEBMANN, J; KRISHNA, MC; MITCHELL, JB. The Effect of Various Nitric Oxide-Donor Agents on Hydrogen Peroxide-Mediated Toxicity: A Direct Correlation between Nitric Oxide Formation and Protection. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 331, n. 2, p. 241-248, 1996.
- 285 - WINK, DA; COOK, JA; PACELLI, R; LIEBMANN, J; KRISHNA, MC; MITCHELL, JB. Nitric oxide (NO) protects against cellular damage by reactive oxygen species. **Toxicol. Lett**, v. 82-83, p. 221-226, 1995.
- 286 - WITJAS T; KAPHAN E; AZULAY J; *et al.*. Nonmotor fluctuations in Parkinson's disease. **Neurology**, v. 59, p. 408–13, 2002.
- 287 - WONG, EHF; KEMP, JA; PRIESTLEY, T; KNIGHT, AR; WOODRUFF, GN; IVERSEN, LL. The anticonvulsant MK-801 is a potent Nmethyl-D-aspartate antagonist. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 83, p. 7104–7108, 1986.
- 288 - WU, EY; LANGSTON, JW; DI MONTE, DA. Toxicity of the MPTP and MPP1 species in primary cultures of mouse astrocytes. **J. Pharmacol. Exp. Ther**, v. 262, p. 225–230, 1992.

289 – YILDIZ, F; ERDEN, BF; ULAK, G; UTKAN, T; GACAR, N. Antidepressant like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. **Psychopharmacology**, v. 149, p. 41-4, 2000.

290 - YOUDIM, MB; RIEDERER, P. Understanding Parkinson's disease. **Sci. Am**, v. 276, p. 52–59, 1997.

291 – ZIGMOND, MJ; KEEFE, KA; STRICKER, EM, ABERCROMBIE, ED. Compensations in an animal model of Parkinsonism: implications for behavior under basal conditions and in response to stress. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 183, n. 2, p. 612-613, 1990.

292 - ZHU, M.Y, JUORIO, AV. Aromatic L-amino-acid decarboxylase: biological characterization and functional role, **Gen. Pharmacol**, v. 26, p. 681–696. 1995.

293 - ZHU, XZ; LUO, LG. Effect of nitroprusside (nitric oxide) on endogenous dopamine release from rat striatal slices. **J. Neurochem**. v. 59, p. 932–935, 1992.

294 – ZIMMER, J; GENESER, FA. Difference in monoamine oxidase B activity between C57 black and albino NMRI mouse strains may explain differential effects of the neurotoxin MPTP. **Neurosci. Lett**, v. 78, p. 253-258, 1987.

295 – ZOMKOWSKI, ADE; HAMMES, L; LIN, J; CALIXTO, JB; SANTOS, ARS; RODRIGUES, ALS. Agmatine produces antidepressant-like effects in two models of depression in mice. **Cognitive Neuroscience and Neuropsychology**, v. 13, n.4, 387-391.