

Aline Guimarães Pereira

**INVESTIGAÇÃO TEMPORAL DAS ALTERAÇÕES
COGNITIVAS E NEUROQUÍMICAS INDUZIDAS PELA
RESERPINA EM RATOS**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-graduação em Neurociências da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Rui Daniel S.
Prediger
Coorientadora: Prof^a Dr^a Alexandra S.
Latini

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pereira, Aline Guimarães

Investigação temporal das alterações cognitivas e neuroquímicas induzidas pela reserpina em ratos [dissertação] / Aline Guimarães Pereira ; orientador, Rui Daniel S. Prediger ; co-orientadora, Alexandra Susana Latini. - Florianópolis, SC, 2013.
80 p. ; 21cm

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

Inclui referências

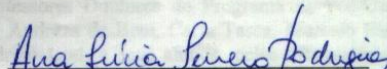
1. Neurociências. 2. Reserpina. 3. Doença de Parkinson. 4. Memória de curto prazo. 5. Neopterina. I. Prediger, Rui Daniel S. . II. Latini, Alexandra Susana. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. IV. Título.

ALINE GUIMARÃES PEREIRA

**“INVESTIGAÇÃO TEMPORAL DAS ALTERAÇÕES
COGNITIVAS E NEUROQUÍMICAS INDUZIDAS PELA
RESERPINA EM RATOS”**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

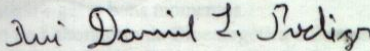
Florianópolis, 19 de fevereiro de 2013.



Profa. Ana Lúcia Severo Rodrigues

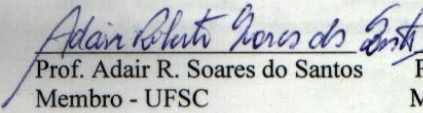
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:




Prof. Rui Daniel Schroder Prediger

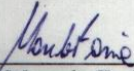
Orientadora – UFSC



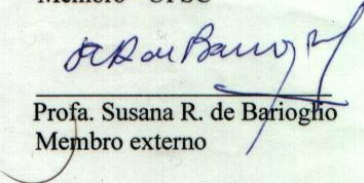
Prof. Adair R. Soares dos Santos
Membro - UFSC



Prof. Anicleto Poli
Membro - UFSC



Prof. Marcelo Farina
Membro – UFSC



Profa. Susana R. de Bariogho
Membro externo

AGRADECIMENTOS

Ao Guilherme, meu amor, por ter sido tão companheiro, paciente e amigo durante todo o período de realização deste trabalho, e à nossa Anita, linda filha amada, por iluminar minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rui Prediger pela oportunidade, confiança e dedicação na realização deste trabalho. Muito obrigada!

À minha coorientadora Prof^{sa} Dr^a Alexandra Latini por ter aberto as portas do seu laboratório, pela dedicação e atenção.

Ao Prof. Dr. Anicleto Poli pela grande ajuda profissional e material com o HPLC, pelos ensinamentos e agradáveis conversas.

Ao Dr. Aderbal Aguiar Jr. pelas sugestões e ajuda durante o curso deste trabalho.

Ao Doutorando Filipe Matheus pela grande ajuda com os gráficos e a estatística.

Aos Professores Doutores do Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Andreza de Bem, Carla Tasca, Marcelo Farina, Nelson Gabilan e Rodrigo Leal, e seus alunos, pelas discussões científicas e disponibilidade no empréstimo de centrífugas, pH gâmetros e nitrogênio líquido.

Ao Prof. Dr. João Calixto e a Doutoranda Mayra Bicca pelo uso do disruptor de células.

Aos amigos do Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas (LEXDON), Carol, Filipe, Ju, Paulo, Sandro e Vanessa pela amizade e pelos bons momentos.

Aos amigos do Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo (LABOX), Aline, Débora, Filipe, Karina, Lucila, Paulo, Roberta e Vivi pelo convívio e colaboração “bioquímica” fundamental na realização deste trabalho.

Ao técnico Sr. Nivaldo, sempre prestativo, por descomplicar os trâmites burocráticos.

À CAPES pela bolsa concedida durante o período de realização deste estudo.

RESUMO

A administração sistêmica da reserpina, um inibidor do transportador vesicular de monoaminas, em ratos pelas vias intraperitoneal (i.p.) ou subcutânea (s.c.), em doses consideradas baixas (0,1 – 1,0 mg/kg), tem sido proposto como um modelo válido para o estudo dos sintomas não-motores da doença de Parkinson (DP). O presente estudo teve como objetivo avaliar temporalmente (3, 24 e 72 h) os efeitos da administração de reserpina (1 mg/kg, s.c.) sobre as memórias de curto prazo de ratos avaliados nos testes de reconhecimento social e reconhecimento de objetos. Foram também investigadas possíveis alterações nas concentrações de dopamina, serotonina, e seus metabólitos no estriado, hipocampo e córtex pré-frontal, bem como no conteúdo de neopterina no plasma sanguíneo de ratos em diferentes intervalos após a administração da reserpina. Os resultados deste estudo demonstram que a administração da reserpina (1 mg/kg, s.c.) induziu prejuízos significativos nas memórias de curto prazo de ratos avaliadas após a sua administração nos testes de reconhecimento social e reconhecimento de objetos. Além disso, os nossos resultados confirmaram a depleção nas concentrações de dopamina e seu metabólito DOPAC no estriado de ratos tratados com reserpina, sendo este efeito mais pronunciado 72 h após o tratamento, quando foi evidenciado prejuízo locomotor no teste do campo aberto. Entretanto, não foram observadas alterações significativas nas concentrações de neopterina no plasma sanguíneo de ratos após a administração de reserpina nos diferentes intervalos de tempo (3 e 24 h) e doses (1 e 5 mg/kg, s.c.) testados. Em conjunto, os resultados do presente estudo reforçam o potencial da administração de baixas doses de reserpina e tempos breves após sua administração como um modelo útil para a investigação dos sintomas cognitivos associados à fase pré-motora da DP, sendo que estes prejuízos estão associados a depleção de dopamina no estriado, sem, todavia, modular as concentrações de neopterina no plasma sanguíneo de ratos.

Palavras-chave: Reserpina, doença de Parkinson, Memória de curto prazo, Monoaminas, Neopterina, Reconhecimento social, Reconhecimento de objetos, ratos.

ABSTRACT

The systemic administration of reserpine, an inhibitor of vesicular monoamine transporter, by intraperitoneal (i.p.) or subcutaneous (s.c.) in rats at low doses (0,1 – 1,0 mg/kg) has been proposed as a valuable model for the study of non-motor symptoms of Parkinson's disease (PD). The present study aimed to investigate temporally (3, 24 and 72 h) the effects of reserpine (1 mg/kg, s.c.) on short-term memory of rats evaluated in the social recognition and object recognition tasks. We also investigated putative alterations in the levels of dopamine, serotonin and its metabolites in striatum, hippocampus and prefrontal cortex as well as in the neopterin content in the blood plasma at different intervals after reserpine administration. The present findings demonstrated that reserpine administration (1 mg/kg, s.c.) disrupted the short-term memory of rats evaluated after treatment in the social recognition and object recognition tasks. Furthermore, our results confirm the depletion of the concentrations of dopamine and its metabolite DOPAC in the striatum of rats after reserpine administration. The highest level of dopamine depletion, and also DOPAC, was found in the group of 72 h after reserpine, which was associated with reduced locomotor activity evaluated in the open field test. However, there were no significant changes in the concentrations of neopterin in blood plasma of rats after administration of reserpine, at different time intervals (3 and 24 h) and doses (1 and 5 mg/kg, s.c.) used. Altogether, the present findings reinforce the single administration of low reserpine dose and short time as valuable model for the study of the cognitive symptoms associated with an early pre-motor phase of PD. Moreover, the observed short-term memory impairments induced by reserpine were associated with the striatal dopamine depletion, while no significant changes on blood plasma neopterin levels were observed.

Keywords: Reserpine, Parkinson's disease, Short-term memory, Monoamines, Neopterin, Social recognition, Object recognition, rat.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Metabolismo da tetrahydrobiopterina (BH4).....25
- FIGURA 2.** Fotografias ilustrando comportamentos sociais de ratos usualmente observados no teste do reconhecimento social.....33
- FIGURA 3.** Ilustração das fases de habituação, treino e teste do teste de reconhecimento do objeto.....35
- FIGURA 4.** Efeitos do tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.) e solução controle (s.c.) (3 horas antes do experimento) sobre o tempo de investigação de ratos avaliados no teste de reconhecimento social.....39
- FIGURA 5.** Efeitos do tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.) e solução controle (s.c.) (24 horas antes do experimento) sobre o tempo de investigação de ratos avaliados no teste de reconhecimento social.....40
- FIGURA 6.** Efeitos do tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.) e solução controle (s.c.) (72 horas antes do experimento) sobre o tempo de investigação de ratos avaliados no teste de reconhecimento social.....41
- FIGURA 7.** Efeitos do tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.) e solução controle (s.c.) (3 horas antes do experimento) sobre o desempenho de ratos avaliados no teste de reconhecimento do objeto..43
- FIGURA 8.** Efeitos do tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.) e solução controle (s.c.) (24 horas antes do experimento) sobre o desempenho de ratos avaliados no teste de reconhecimento do objeto..45
- FIGURA 9.** Efeitos do tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.) e solução controle (s.c.) (72 horas antes do experimento) sobre o desempenho de ratos avaliados no teste de reconhecimento do objeto..47
- FIGURA 10.** Efeitos do tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.) e solução controle (s.c.) (3 horas antes do experimento) sobre a atividade locomotora de ratos avaliados por 5 minutos no teste do campo aberto.....49
- FIGURA 11.** Efeitos do tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.) e solução controle (s.c.) (24 horas antes do experimento) sobre a atividade

locomotora de ratos avaliados por 5 minutos no teste do campo aberto.....50

FIGURA 12. Efeitos do tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.) e solução controle (s.c.) (72 horas antes do experimento) sobre a atividade locomotora de ratos avaliados por 5 minutos no teste do campo aberto.....51

FIGURA 13. Efeitos do tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.) e solução controle (s.c.) (3 horas após a administração) sobre as concentrações de dopamina e DOPAC no estriado de ratos.....53

FIGURA 14. Efeitos do tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.) e solução controle (s.c.) (24 horas após a administração) sobre os níveis de dopamina e DOPAC no estriado de ratos.....54

FIGURA 15. Efeitos do tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.) e solução controle (s.c.) (72 horas após a administração) sobre os níveis de dopamina e DOPAC no estriado de ratos.....55

FIGURA 16. Efeitos dos tratamentos com reserpina (1 ou 5 mg/kg, s.c.) e solução controle (s.c.) sobre os níveis plasmáticos de neopterinina em ratos mensurados 3 horas ou 24 horas após os tratamentos.....57

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Efeitos do tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.) e solução controle (s.c.) sobre as concentrações de 5-HT e 5-HIAA no estriado, hipocampo e córtex pré-frontal de ratos.....	56
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BH4 – 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina
COMT – Catechol-O-metiltransferase
DOPAC – Ácido 3,4-dihidroxiifenilacético
DP – Doença de Parkinson
E.P.M. – Erro padrão da média
GTPCH I – GTP-ciclohidroxilase I
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência
i.c.v. – Intracerebroventricular
LPS – Lipopolissacarídeo bacteriano
IFN- γ – Interferon- γ
MAO-B – Monoamina oxidase B
MPTP – 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
PTPS – 6-piruvil-tetrahidropterina sintase
s.c. – Subcutânea
SNpc – Substância negra parte compacta
SR – Sepiapterina redutase
TH – Tirosina hidroxilase
TNF- α – Fator de necrose tumoral- α
VMAT – Transportador vesicular das monoaminas
5-HIAA – Ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT – Serotonina
6-OHDA – 6-hidroxidopamina
 λ (lambda) – Comprimento de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVO GERAL.....	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 ANIMAIS.....	31
3.2 DROGAS E TRATAMENTO.....	31
3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	31
3.3.1 Teste de reconhecimento social	32
3.3.2 Teste de reconhecimento do objeto	33
3.3.3 Avaliação da atividade locomotora espontânea	35
3.4 AVALIAÇÕES NEUROQUÍMICAS.....	35
3.4.1 Determinação do conteúdo cerebral de monoaminas através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	35
3.4.2 Determinação das concentrações plasmáticas de neopterina através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	37
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
4 RESULTADOS	39
4.1 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	39
4.1.1 O efeito do tratamento com reserpina sobre a memória social de ratos	39
4.1.2 O efeito do tratamento com reserpina sobre a memória de reconhecimento do objeto de ratos	41

4.1.3 O efeito do tratamento com reserpina sobre a atividade locomotora espontânea de ratos.....	48
4.2 AVALIAÇÕES NEUROQUÍMICAS.....	52
4.2.1 Conteúdo cerebral de monoaminas (HPLC).....	52
4.2.1.1 O efeito do tratamento com reserpina sobre as concentrações de dopamina e DOPAC no estriado de ratos.....	52
4.2.1.2 O efeito do tratamento com reserpina sobre as concentrações de serotonina e 5-HIAA no estriado, hipocampo e córtex pré-frontal de ratos.....	55
4.2.2 O efeito do tratamento com reserpina sobre as concentrações plasmáticas de neopterinina.....	56
5 DISCUSSÃO.....	59
6 CONCLUSÕES.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum após a doença de Alzheimer, apresentando distribuição universal e atingindo todos os grupos étnicos. O início da doença ocorre tipicamente em torno dos 60 anos e as taxas de prevalência e incidência aumentam com a progressão da idade. No Brasil, há carência de pesquisas que expressem uma estimativa geral sobre a ocorrência da DP. Na Europa, a prevalência é estimada em torno de 0,6% da população com idade entre 65 - 69 anos, aumentando para 2,5 - 3,5% entre indivíduos com idade acima de 75 anos (De Rijk et al., 2000). Nos Estados Unidos, a prevalência estimada da DP é de 1% da população acima de 60 anos. Em relação à prevalência de acordo com o gênero, embora alguns estudos epidemiológicos não tenham encontrado diferenças, uma meta-análise de 7 estudos sugeriu que os homens apresentam um risco 1,5 vezes maior de desenvolver a DP do que as mulheres (De Rijk et al., 2000).

Apesar de ser uma doença de etiologia primária desconhecida, a DP é considerada multifatorial, resultando da associação entre exposição ambiental a toxicantes e susceptibilidade genética (Van Den Eeden et al., 2003). Dentre os fatores associados ao aumento do risco de desenvolvimento da DP estão a exposição a herbicidas e pesticidas (paraquat, rotenona, organofosfatos) (Elbaz e Tranchant, 2007), exposição a neurotoxinas ambientais (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine – MPTP, tolueno, cianeto, dissulfeto de carbono), exposições ocupacionais (manganês) e fatores dietéticos como a ingestão sistemática de alguns metais (cobre e ferro) (Tanner e Aston, 2000; Van Den Eeden et al., 2003).

Sua fisiopatologia é caracterizada pela degeneração crônica e progressiva dos neurônios dopaminérgicos da substância negra, parte compacta (SNpc) (Hirsch e Hunot, 2009), localizada no mesencéfalo. Os neurônios dopaminérgicos desta região projetam-se em direção aos núcleos da base no prosencéfalo, mais especificamente ao estriado (formado pelos núcleos caudado e putâmen), dando origem à via dopaminérgica nigroestriatal. Em adição à perda neuronal, a DP é caracterizada pela presença de inclusões proteicas denominadas de corpos de Lewy, formadas a partir do acúmulo das proteínas α -sinucleína e ubiquitina. Estas inclusões parecem emergir seguindo um gradiente ascendente, originando-se no tronco cerebral, expandindo-se até os núcleos da base, e chegando ao córtex cerebral (Braak et al., 2003).

Os núcleos da base estão associados a diversas funções como o controle motor, a cognição, as emoções e o aprendizado. A degeneração dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal causa diminuição do conteúdo de dopamina no estriado e conseqüente acinesia (definida como perda ou diminuição – hipocinesia- da amplitude e frequência dos movimentos), bradicinesia (lentidão na realização dos movimentos), rigidez muscular (aumento do tônus muscular), tremor (atividade muscular de repouso com frequência de 4 – 6 Hz nos membros com predominância distal) e instabilidade postural (dificuldade em manter a postura ereta), representando estes os sinais motores clássicos da DP (Rodríguez-Oroz et al., 2009). No entanto, as alterações não são restritas à SNpc e podem estar presentes tanto em outras vias dopaminérgicas (vias mesocortical e mesolímbica) como também em vias não dopaminérgicas.

Neurônios noradrenérgicos do lócus coeruleus, colinérgicos do prosencéfalo basal e do tronco encefálico, serotoninérgicos dos núcleos da rafe, e neurônios do bulbo olfatório (Hirsch e Hunot, 2009), bem como neurônios periféricos, como os do sistema mesentérico (Braak et al., 2003), são também afetados pelo processo patológico na DP. A presença de processo degenerativo além do sistema nigroestriatal pode explicar uma série de sinais e sintomas não motores da DP, tais como alterações do olfato, prejuízos cognitivos, alterações emocionais como depressão e ansiedade, sintomas psicóticos, distúrbios do sono, hipotensão postural, constipação e demência (Lees, Hardy e Revesz, 2009; Rodríguez-Oroz et al., 2009).

A DP é geralmente diagnosticada quando os sinais motores clássicos se apresentam e estima-se que, neste estágio, em torno de 60% dos neurônios da SNc já se encontram degenerados e em torno de 60 - 70% do conteúdo de dopamina no estriado esteja reduzido (Tissingh et al., 1998; Rodríguez-Oroz et al., 2009). Entretanto, um número crescente de estudos tem evidenciado que alguns sintomas não motores podem preceder o aparecimento do comprometimento motor. Este período tem sido referido como uma fase pré-motora da DP (Tolosa, Compta e Gaig, 2007; Lelos e Dunnett, 2011).

Os sintomas pré-motores da DP, incluindo prejuízos cognitivos como a disfunção executiva e alteração da memória de trabalho, ansiedade e depressão, apresentam grande impacto na qualidade de vida dos pacientes e familiares cuidadores (Ziemssen e Reichmann, 2007). A disfunção executiva refere-se aos prejuízos nos processos envolvidos no controle do comportamento tais como a habilidade para iniciar, executar, inibir e monitorar a seqüência de ações (Rodríguez-Oroz et al.,

2009). A memória de trabalho tem sido descrita como um sistema cerebral que provê armazenamento e manipulação temporários (de segundos a poucos minutos) da informação necessária para tarefas complexas como a compreensão da linguagem, aprendizagem e razão (Baddeley, 1992). Os prejuízos cognitivos relacionados à memória de trabalho e ao planejamento (função executiva) presentes em estágios iniciais da DP, de acordo com vários autores, são o resultado da disfunção do processamento na região do córtex pré-frontal decorrente da depleção dopaminérgica nigroestriatal e sua influência sobre o funcionamento do circuito frontoestriatal (Postle et al., 1997; Owen et al., 1998; Lewis et al., 2003; Lelos e Dunnett, 2011).

Em paralelo à memória de trabalho, formam-se as memórias de curta duração, que duram minutos ou horas e servem para proporcionar a continuidade do nosso sentido do presente, adquirido pela memória de trabalho. As memórias de curta duração utilizam circuitos neurais que envolvem, entre outras estruturas cerebrais, o hipocampo e o córtex entorrinal. A principal importância da memória de curta duração é manter as informações “vivas” no cérebro, permitindo que elas sejam requisitadas (evocadas), durante o período (poucas horas) em que estas informações ainda não foram armazenadas na sua forma definitiva (Izquierdo et al., 1998, 1999).

A fase pré-motora da DP tem sido investigada em alguns estudos clínicos como também em estudos experimentais utilizando modelos animais da doença. Os sintomas parkinsonianos pré-motores podem ser mimetizados em ratos e camundongos pela indução da depleção parcial de dopamina estriatal e/ou pela degeneração parcial das células dopaminérgicas nigroestriatais semelhantes à fase inicial da DP (Da Cunha et al., 2002; Prediger et al., 2006, 2010, 2011; Tadaiesky et al., 2008; Moreira et al., 2010).

Alguns testes comportamentais, como os testes de reconhecimento social e reconhecimento do objeto, têm sido utilizados para avaliar o efeito de drogas e tratamentos sobre os diferentes tipos de memórias em modelos animais da DP. De acordo com Dantzer e colaboradores (1987), a memória social, ou paradigma de reconhecimento, é principalmente gerada pela capacidade discriminativa olfatória dos animais e pode ser facilitada por drogas que aumentem a memória, bem como interrompida em modelos farmacológicos e patofisiológicos conhecidos por causarem prejuízo da memória em roedores (Prediger e Takahashi, 2003; Prediger, Batista e Takahashi, 2005; Prediger, Da Cunha e Takahashi, 2005).

Em adição, o teste de reconhecimento do objeto, validado e descrito por Ennaceur e Delacour (1988), é similar aos testes de reconhecimento visual utilizados em primatas não humanos. Baseado no comportamento espontâneo dos ratos, este teste não envolve mecanismos estressores como descargas elétricas ou privação do alimento, sendo que estas características fazem com que possa ser comparável a testes de memória correntemente utilizados em humanos.

Em relação aos modelos animais da DP, a descoberta de que a administração da reserpina (que inibe o transportador vesicular das monoaminas – VMAT) ou o haloperidol (antagonista não seletivo dos receptores para dopamina) a roedores e coelhos leva a um estado do tipo parkinsonismo transitório foi rapidamente seguido pela descoberta de que estes sintomas eram revertidos pela administração de L-DOPA (Carlsson, Lindqvist e Magnusson, 1957), o precursor da dopamina, que permanece ainda nos dias atuais como o principal fármaco usado no tratamento da DP. A descoberta de Carlsson, Lindqvist e Magnusson (1957) deu início a uma era em que os modelos animais desta doença foram utilizados para investigar a base do tratamento sintomático. Como consequência, desde então, os modelos animais da DP têm tido um papel fundamental na elaboração de novos tratamentos farmacológicos e não-farmacológicos e na compreensão da natureza dos processos patogênicos envolvidos na perda neuronal desta doença (Duty e Jenner, 2011).

Existe uma variedade de modelos em roedores, dentre os quais os modelos transgênicos, farmacológicos agudos, como a administração sistêmica de reserpina ou haloperidol, e também modelos que induzem a degeneração da via dopaminérgica nigroestriatal, como, por exemplo, a administração de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) e 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 -tetrahidropiridina (MPTP) (Duty e Jenner, 2011).

O modelo de roedores tratados com a reserpina foi um dos primeiros utilizados na pesquisa da PD. A reserpina é um alcalóide extraído das raízes da planta *Rauwolfia serpentina*. A sua ação farmacológica foi descrita em detalhes pela primeira vez por Bein em 1953 (Gillis, 1974). Tem ação depressora do sistema nervoso central e efeito hipotensor, tendo sido utilizada clinicamente como um agente antipsicótico (Bear et al., 2008) e no tratamento da hipertensão arterial. A reserpina interfere no armazenamento vesicular de monoaminas (dopamina, noradrenalina, adrenalina e serotonina), causando depleção destes neurotransmissores nos terminais nervosos, com consequente hipolocomoção e rigidez muscular transitórias, sendo estas respostas

dependentes da dose utilizada (Colpaert, 1987; Gerlach e Riederer, 1996; Dawson, 2000).

Recentemente, o uso de reserpina em doses consideradas baixas (0,1 – 1,0 mg/kg) tem sido proposto como um modelo válido para o estudo dos prejuízos cognitivos (Alves et al., 2000; Prediger et al., 2005; Carvalho et al., 2006) e sintomas depressivos (Skalisz et al., 2002) associados à DP. A alta afinidade da reserpina pelo VMAT faz com que ela interaja com este transportador impedindo a vesicularização das monoaminas. Isso impossibilita a liberação destas pelo processo de exocitose, prejudicando assim as atividades dependentes desses neurotransmissores (Gillis, 1974).

O VMAT, um membro da família dos transportadores vesiculares de neurotransmissores, é responsável pelo deslocamento das monoaminas do citoplasma para dentro das vesículas sinápticas via um gradiente eletroquímico de prótons gerado por uma bomba de prótons dependente de ATP vacuolar (V-ATPase). Assim, o VMAT age como um “trocador eletrogênico” de prótons e monoaminas (Henry et al., 1994; Zheng, Dwoskin e Crooks, 2006). Neurônios monoaminérgicos do sistema nervoso central e pós-ganglionares do sistema nervoso simpático expressam somente o VMAT2, enquanto o VMAT1 é predominantemente expresso por células neuroendócrinas, tais como as células cromafins da medula adrenal, tanto em humanos como em roedores (Henry et al., 1994; Zheng, Dwoskin e Crooks, 2006; Adam, Edwards e Schuldiner, 2008).

Nos últimos anos, um número crescente de trabalhos tem procurado investigar as razões pelas quais os neurônios dopaminérgicos são particularmente vulneráveis na DP, ou seja, quais fatores intrínsecos celulares contribuem para a vulnerabilidade à neurodegeneração nesta doença. A própria dopamina, a tirosina hidroxilase (TH), monoamina oxidase, ferro e/ou neuromelanina tem sido sugeridos como possíveis fatores envolvidos neste processo (Choi et al., 2006).

A captação de dopamina pelo VMAT2 parece ser um mecanismo muito importante para prevenir a oxidação deste neurotransmissor (Sulzer et al., 2000). A utilização da reserpina, que possui alta afinidade pelo VMAT2, promove a oxidação da dopamina citoplasmática e o aumento subsequente de espécies reativas de oxigênio levando à toxicidade celular (Fuentes et al., 2007).

Outra molécula presente endogenamente nos neurônios dopaminérgicos que pode gerar substâncias pró-oxidantes e induzir morte celular é a 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH4) (Choi et al., 2006). A BH4 é um cofator enzimático obrigatório para a atividade biológica

da enzima TH, que catalisa a síntese do neurotransmissor dopamina, assim como da enzima triptofano hidroxilase, que catalisa a síntese de serotonina (5-HT), a partir dos aminoácidos tirosina e triptofano, respectivamente. Nos últimos anos, este cofator vem sendo relacionado com processos neurodegenerativos observados em algumas doenças crônicas e agudas (Foxton, Land e Heales, 2007), e tem sido sugerido como uma molécula endógena candidata ao envolvimento na patogênese da DP (Kim et al., 2003; Kim et al., 2004; Choi et al., 2006).

De acordo com Choi e colaboradores (2006), a BH4 induz neurodegeneração dopaminérgica seletiva, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, pelo processo de apoptose mediada por disfunção mitocondrial. Em outro estudo, Kim e colaboradores (2003) demonstraram que a administração intraestriatal de BH4 em ratos produziu degeneração seletiva dos terminais dopaminérgicos estriatais, diminuição do conteúdo de dopamina e morte celular apoptótica acompanhada por déficits motores, alterações estas semelhantes àquelas observadas na DP. Enquanto os neurônios dopaminérgicos precisam produzir BH4 para a síntese de dopamina, ironicamente, a inevitável presença de ambos, BH4 e dopamina dentro da mesma célula, parece contribuir para a citotoxicidade, sendo que em condições normais, a quantidade de BH4 no sistema nigroestriatal é o fator limitante para a produção de dopamina (Choi et al., 2006).

Estudos prévios que avaliaram o conteúdo de BH4 (Abou-Donia e Viveros, 1981), a atividade da TH (Black, 1975), a atividade da GTP-ciclohidroxilase I (GTPCH I - enzima limitante do passo de síntese de BH4) (Viveros et al., 1981) e os níveis de mRNA para GTPCH I em neurônios centrais e periféricos (Thöny, Auerbach e Blau, 2000) após a administração de reserpina, mostraram que tanto o conteúdo do cofator BH4 como a atividade da GTPCH I e da TH, assim como os níveis de mRNA para GTPCH I, estão aumentados após a depleção das monoaminas pela reserpina.

Estes resultados indicam que o tratamento com reserpina induz o aumento do conteúdo do cofator BH4 (Olgiaiti, Algeri e Stramentinoli, 1987), como também da atividade da enzima limitante para a síntese de dopamina e outros neurotransmissores, a TH, como um mecanismo compensatório secundário à depleção das monoaminas.

A via de biossíntese *de novo* de BH4 a partir da GTP envolve, além da enzima GTPCH I, também as enzimas 6-piruvil-tetrahydropterina sintase (PTPS) e sepiapterina redutase (SR) (Figura 1). No primeiro passo de síntese, a GTPCH I cataliza a formação do dihidroneopterina-trifosfato, o primeiro metabólito da via de síntese de

BH4 a partir de GTP. Este metabólito é convertido pela PTPS para formar 6-piruvil-tetrahydropterina, o qual é por sua vez convertido pela SR a BH4 nos neurônios. Diferente dos neurônios, células da linhagem monocítica possuem baixa atividade constitutiva de PTPS. Assim, dihidropterina-trifosfato não é convertido a BH4, ao contrário, ele é defosforilado e oxidado a neopterina, um metabólito secundário da via de síntese de BH4, em uma reação não enzimática (Hagberg et al., 2010).

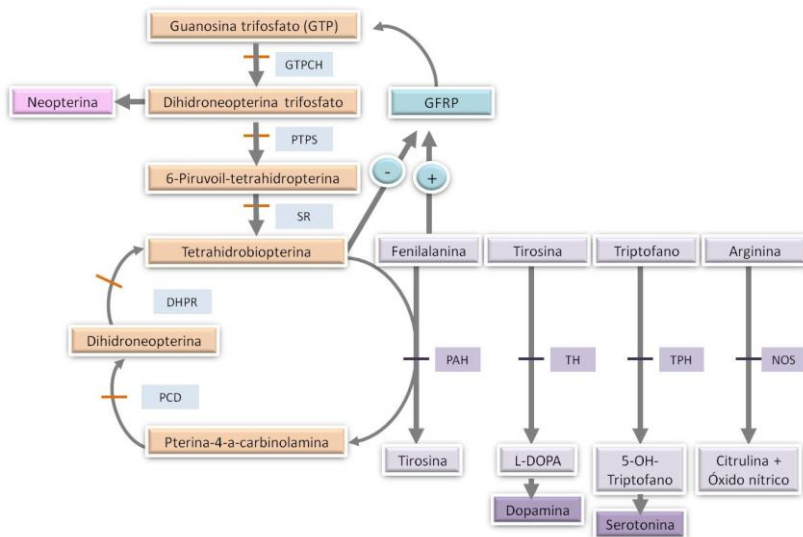


Figura 1. Metabolismo da tetrahydrobiopterina (BH4). GTPCH: GTP ciclohidroxilase; PTPS: 6-piruvil tetrahydropterina sintase; SR: seapterina redutase; GFRP: proteína reguladora da ativação da GTPCH; DHPR: dihidropterina redutase; PCD: pterina carbinolamina-4-desidratase; PAH: fenilalanina hidroxilase; TH: tirosina hidroxilase; TPH: triptofano hidroxilase; NOS: óxido nítrico sintase. Adaptada de Blau, Bonafe e Thöny (2001).

Em relação à regulação da biossíntese do cofator, o principal ponto de controle é a GTPCH I e a expressão desta enzima parece ser modulada pela indução de citocinas pró-inflamatórias. As citocinas, tais como o interferon- γ (IFN- γ) e a interleucina-1 β , ou uma combinação destas com o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), induzem a expressão do gene que codifica para GTPCH I *in vitro* e *in vivo* em várias células incluindo monócitos, macrófagos e células dendríticas da linhagem monocítica (microglia), produzindo desta forma neopterina (Thöny,

Auerbach e Blau, 2000; Hoffmann, Wirleitner e Fuchs, 2003; Dale et al., 2009; Hagberg et al., 2010).

A neoptերina não é somente um marcador da ativação do sistema imune, ela também tem funções fisiológicas e bioquímicas na defesa contra organismos patógenos invasores (Dale et al., 2009). Hoffmann, Wirleitner e Fuchs (2003) sugeriram a hipótese de que a neoptերina promove o aumento do potencial citotóxico, ou estresse pró-oxidativo, em macrófagos ativados e células dendríticas, amplificando os efeitos citotóxicos via interações com intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio.

A neoptերina ganhou recentemente grande importância nas alterações psiquiátricas e neurodegenerativas, tais como a DP, a doença de Alzheimer e a doença de Huntington, quando foi verificado que os pacientes acometidos por essas doenças apresentavam elevadas concentrações de neoptերina (Dale et al., 2009), e baixas concentrações de BH4 (Lovenberg et al., 1979), no líquido, no plasma sanguíneo e na urina. O aumento das concentrações de neoptերina no plasma sanguíneo e líquido de pacientes com DP avançada, quando comparados a indivíduos controle de mesma faixa etária, sugere a atividade de resposta neuroinflamatória nestes pacientes (Widner, Leblhuber e Fuchs, 2002).

De acordo com o estudo de Dale e colaboradores (2009), a neoptերina no líquido é um marcador de um processo ativo ou degenerativo, mas não de um processo estático, sendo que estes mecanismos são importantes por que apresentam um potencial modificável com terapia imunomodulatória. Além disso, a neoptերina pode ser mensurada na urina, plasma sanguíneo e líquido por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e por radioimunoensaio, podendo ser avaliada tanto em estudos clínicos em humanos como em estudos utilizando modelos animais. Sendo assim, caso confirmado o seu envolvimento na fisiopatologia da DP, esta pode representar um bom biomarcador para o acompanhamento da progressão desta doença.

A neuroinflamação, mediada principalmente pela ativação microglial, mas também por recrutamento de células do sistema imune, é uma característica comum das doenças neurodegenerativas. Estudos epidemiológicos reforçam o papel do processo neuroinflamatório na progressão da DP, sendo que ainda não é bem estabelecido se a neuroinflamação é meramente a consequência da degeneração neural ou se está envolvida na patogênese da doença por produzir moléculas pró-inflamatórias que cronicamente podem induzir a morte neuronal (Hirsch

e Hunot, 2009; Polazzi e Monti, 2010), como pode ser o caso da neopterina.

Por outro lado, em um estudo prévio realizado pelo grupo da Dra. Alexandra Latini (Departamento de Bioquímica, UFSC) em colaboração com o nosso laboratório (resultados ainda não publicados) foi investigado o efeito da administração intracerebroventricular (i.c.v.) de neopterina (0,4 e 4 pmol) sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos em camundongos. A administração aguda (i.c.v.) de neopterina facilitou as memórias de curto e de longo prazo avaliadas no teste da esQUIVA inibitória do tipo *step-down*, sem modificar a atividade locomotora espontânea dos animais avaliada no teste do campo aberto. Adicionalmente, a neopterina aumentou a resistência ao estresse oxidativo tecidual verificada através do aumento das concentrações de glutatona, tióis livres e diminuição da peroxidação lipídica. Neste mesmo estudo, em contrapartida, a administração prolongada de neopterina, através do uso de bombas de infusão osmóticas, teve um efeito pró-oxidante verificado através do aumento do estresse oxidativo no estriado dos animais.

Diante do exposto acima, é sabido que após a administração da reserpina, e consequente depleção das monoaminas, ocorre a elevação das concentrações de BH4 como um processo adaptativo pelo maior requerimento deste cofator para a síntese de monoaminas. Contudo, em relação à neopterina, um metabólito secundário da via de síntese de BH4, não foram encontrados relatos na literatura sobre possíveis alterações no seu conteúdo após a administração da reserpina. Supondo que um aumento no passo de síntese de BH4 poderia ser acompanhado por alguma alteração no conteúdo de neopterina, que por sua vez poderia se traduzir em alterações nos processos de memória, conforme os achados de Oliveira e Latini (2011), realizamos no presente estudo a investigação temporal dos efeitos da administração de reserpina (1 mg/kg, s.c.) sobre a memória de curto prazo de ratos avaliados nos testes de reconhecimento do objeto e social, associado à quantificação de dopamina, serotonina e seus metabólitos em diferentes estruturas encefálicas, bem como dos níveis da neopterina no plasma sanguíneo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os possíveis prejuízos cognitivos e alterações nas concentrações de dopamina, serotonina, e seus metabólitos no estriado, hipocampo e córtex pré-frontal e o conteúdo de neopterina no plasma sanguíneo de ratos em diferentes intervalos de tempo após a administração de reserpina, utilizado como um modelo experimental da fase pré-motora da DP.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar os prejuízos da memória de curto prazo de ratos em diferentes intervalos de tempo (3, 24 e 72 horas) após a administração de reserpina (1 mg/kg, s.c.) utilizando os testes de reconhecimento social e reconhecimento do objeto;

- Verificar possíveis prejuízos locomotores induzidos pela administração de reserpina (1 mg/kg, s.c.) após diferentes intervalos de tempo (3, 24 e 72 horas) através da quantificação da distância total percorrida e dos atos de levantar no teste do campo aberto em ratos;

- Avaliar as concentrações de dopamina, serotonina, e seus metabólitos no estriado, hipocampo e córtex pré-frontal, de ratos após diferentes intervalos de tempo (3, 24 e 72 horas) da administração de reserpina (1 mg/kg, s.c.) através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);

- Mensurar o conteúdo de neopterina no plasma sanguíneo de ratos 3 e 24 horas após a administração de reserpina (1 ou 5 mg/kg, s.c) através da técnica de HPLC.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos, com idade aproximada de 3 meses, pesando entre 250 e 350 gramas. Para o teste de reconhecimento social, foram também utilizados ratos Wistar machos jovens com aproximadamente 30 dias de vida que foram usados como estímulo olfatório. Os animais foram fornecidos pelo biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e mantidos em grupos de 5 animais por caixa (42 x 34 x 17 cm), em condições controladas de temperatura (22 ± 1 °C) e umidade, em ciclo de claro-escuro de 12 horas e livre acesso à água e comida. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA/UFSC), registrados no processo de número 2012.0219.

3.2 DROGAS E TRATAMENTO

Para a realização dos testes comportamentais e neuroquímicos, os animais foram tratados com reserpina (methyl reserpate 3,4,5-trimethoxybenzoic acid Ester; Sigma-Adrich, EUA, R0875) na dose de 1 mg/kg sendo que este modelo foi previamente padronizado em nosso laboratório (Prediger, Da Cunha e Takahashi, 2005; Aguiar Jr. et al., 2009). Em uma segunda etapa experimental de testes neuroquímicos, também foi utilizada a dose de 5 mg/kg. A reserpina foi dissolvida em ácido acético e então diluída em solução salina de cloreto de sódio (NaCl) 0,9% a uma concentração final de 0,5% de ácido acético. A solução controle foi preparada com solução salina também contendo uma concentração final de 0,5% de ácido acético. Os animais foram divididos aleatoriamente entre os grupos e as soluções foram administradas pela via subcutânea (s.c.) em um volume de 1,0 ml/kg de peso corporal.

3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

Os testes de reconhecimento do objeto e de reconhecimento social foram realizados em diferentes intervalos de tempo (3, 24 e 72 horas) após a administração de reserpina (1 mg/kg, s.c.) em grupos independentes de animais. A avaliação da atividade locomotora (distância percorrida e atos de levantar), nos mesmos intervalos de tempo após a administração de reserpina, foi realizada durante a fase de

treino do teste de reconhecimento do objeto, sendo assim, com os mesmos animais utilizados nesse experimento.

3.3.1 Teste de reconhecimento social

O experimento foi realizado de acordo com o procedimento descrito por Dantzer e colaboradores (1987) e padronizado em nosso laboratório (Prediger e Takahashi, 2003; Prediger et al., 2004). O teste de reconhecimento social vem sendo utilizado como um modelo válido para o estudo da memória de curta duração, utilizado para demonstrar possíveis efeitos “amnésicos” de diferentes drogas e procedimentos, bem como para testar tratamentos ou manipulações que aumentam ou facilitam esta memória social (Dantzer et al., 1987; Prediger e Takahashi, 2003; Prediger et al., 2004).

O teste consiste em duas apresentações sucessivas de 5 minutos cada, sendo que a segunda apresentação é feita após um intervalo de tempo de 30 minutos. Inicialmente todos os animais que participaram do experimento, adultos e jovens, foram separados em caixas individuais (42 x 34 x 17 cm) por no mínimo um período de 1 hora e 30 minutos antes do teste para que fossem habituados somente com seus próprios odores, sem a interferência dos odores de seus co-específicos. Na primeira apresentação, o animal jovem foi introduzido na caixa de um animal adulto, e observou-se o tempo que o animal adulto gastou investigando o rato jovem, durante 5 minutos. Por investigação social entendem-se os atos de cheirar, lambe, se aproximar etc., ilustrados na Figura 2, que são medidos em segundos. Após o final da primeira apresentação, o animal jovem foi retirado da caixa, e então o rato adulto ficou isolado por 30 minutos. Após este intervalo de tempo, o mesmo rato jovem foi reapresentado ao rato adulto por mais 5 minutos, e então, o tempo de investigação foi novamente registrado. A diminuição do tempo de investigação na segunda apresentação demonstra o reconhecimento social, já que reconhecendo o animal jovem, o rato adulto perde o interesse em investigá-lo novamente.

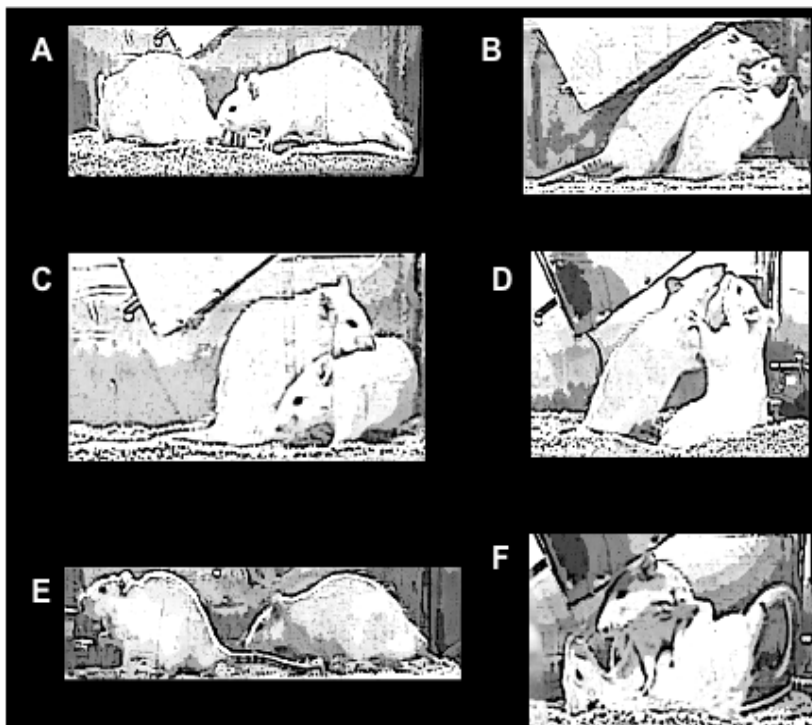


Figura 2. Fotografias ilustrando comportamentos sociais usualmente observados em estudos sobre memória de reconhecimento social. (A) Investigação anogenital. (B) Investigação da cabeça. (C) Investigação do corpo. (D) Comportamentos agressivos. (E) Perseguição. (F) Comportamento de dominância (Moura e Xavier, 2010).

3.3.2 Teste de reconhecimento do objeto

O teste de reconhecimento do objeto baseia-se no princípio de que, em um ambiente familiar, os roedores de laboratório mostram uma atração instintiva para a novidade, ou preferência por um novo objeto, não familiar (Hughes, 2007). Esta preferência é utilizada como um indicativo de memória em relação ao objeto familiar. O procedimento foi realizado de acordo com Pires e colaboradores (2010) e adaptado em nosso laboratório. Consiste de 3 fases: uma fase de habituação, uma fase de treino e uma fase de teste. A fase de habituação foi realizada em 2 dias consecutivos antes do dia do teste, sendo que cada animal foi colocado no centro de um campo aberto sem objetos, onde pode explorar livremente o aparato por 10 minutos em cada dia. A fase de

habituação tem como objetivo diminuir o estresse, a ansiedade e a exploração do ambiente (campo aberto) dos animais no dia do teste. As fases de treino e de teste ocorreram 24 horas após o segundo dia de habituação, durante 5 minutos cada, separadas por um intervalo de tempo de 30 minutos, com objetivo de avaliar a memória de curto prazo. O tempo que o animal despendeu investigando cada objeto, em ambas as fases de treino e teste, foi cronometrado em segundos. Previamente a fase de treino, foram fixados dois objetos idênticos (A e B, cilíndricos) em cantos opostos do campo aberto, a 10 cm distantes das paredes e aproximadamente 70 cm afastados um do outro (Figura 3). Cada animal foi então colocado no centro do aparato e depois de transcorridos 5 minutos da fase de treino, os animais foram retirados do campo aberto e devolvidos as suas caixas de moradia. Após um período de 30 minutos, um dos objetos familiares (B) foi trocado por um objeto novo (C) (cilíndrico com tampa inclinada) que também foi fixado no mesmo local anteriormente ocupado pelo objeto B. Novamente o mesmo animal foi reintroduzido no centro do campo aberto e o tempo de exploração despendido em cada objeto, novo e familiar, foi registrado por 5 minutos, finalizando assim, a fase de teste. Todo o procedimento foi registrado por uma câmera fixada sobre o campo aberto e o sistema de vídeo colocado na sala adjacente à sala experimental. A exploração de um objeto foi definida como a aproximação a uma distância igual ou inferior a 2 cm e/ou o contato com o objeto. O índice de reconhecimento foi calculado por $(T_{\text{novo}} \times 100)/(T_{\text{novo}} + T_{\text{familiar}})$ onde T_{novo} é o tempo despendido pelo animal explorando o novo objeto (C) e T_{familiar} é o tempo despendido pelo animal explorando o objeto familiar (A) na fase de teste. O aparato utilizado no teste consistiu de um campo aberto feito em madeira, pintado uniformemente, com um chão de dimensões de 100 x 100 cm e paredes de 40 cm de altura. No final de cada procedimento comportamental, o campo aberto foi limpo com papel toalha e álcool 10%.

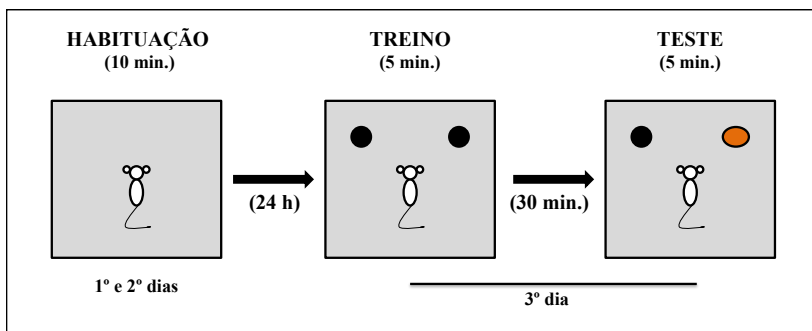


Figura 3. Ilustração das fases de habituação, treino e teste do teste de reconhecimento do objeto. A fase de habituação foi realizada durante 2 dias consecutivos, por um período de 10 minutos, no campo aberto vazio. No 3º dia foram realizadas as fases de treino e teste com intervalo de 30 minutos entre elas. Na fase de treino o animal explora livremente 2 objetos idênticos por 5 minutos; na fase de teste um dos objetos é trocado por um novo objeto e o animal é reintroduzido no aparato por mais 5 minutos.

3.3.3 Avaliação da atividade locomotora espontânea

A atividade locomotora espontânea foi avaliada de acordo com dois parâmetros diferentes: a distância total percorrida (em metros) pelos animais, durante 5 minutos, e analisada pela plataforma ANY-maze sobre as imagens geradas na fase de treino do teste de reconhecimento do objeto; o número total de atos de levantar, registrado com o uso de um contador manual, durante o mesmo período de 5 minutos. Um ato de levantar foi considerado quando o animal apoiava-se nas 2 patas traseiras mantendo as 2 patas dianteiras levantadas. Estes procedimentos foram realizados para avaliar possíveis prejuízos locomotores causados pela reserpina, nos diferentes tempos (3, 24 e 72 horas) estudados após a sua administração.

3.4 AVALIAÇÕES NEUROQUÍMICAS

3.4.1 Determinação do conteúdo cerebral de monoaminas através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Para verificar o efeito da administração de reserpina (1 mg/kg, s.c.) sobre as concentrações de monoaminas, nos tempos de 3, 24 e 72 horas após a administração, analisamos o conteúdo de dopamina, serotonina (5-HT) e seus metabólitos, o ácido 3,4-dihidroxifenilacético

(DOPAC) e o ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) através da HPLC no estriado, hipocampo e córtex pré-frontal de ratos de acordo com o método descrito por Linder e colaboradores (2008) e adaptado por Silva (2012).

O equipamento utilizado para quantificação foi um sistema modular de HPLC da marca Waters, modelo Alliance e2695. O programa computacional utilizado para controle, aquisição e processamento dos dados foi o Empower 2 (Waters Co.).

Os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação nos tempos de 3, 24 e 72 horas após a administração da reserpina. Seus encéfalos foram rapidamente removidos, as estruturas foram separadas e congeladas em nitrogênio líquido, em solução de 0,1 M de ácido perclórico contendo 0,02 % de metabissulfito de sódio, e mantidas a -80 °C para posterior análise das monoaminas.

As amostras de tecido foram homogeneizadas em um desruptor de células ultra-sônico (Unique Group), sonicadas e centrifugadas a 16.000 g durante 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante de cada amostra foi retirado e mantido em microtubos do autoinjeter a uma temperatura de 4 °C, sendo que uma alíquota de 20 µL de cada amostra foi injetada no cromatógrafo a cada 7 minutos e 30 segundos.

A fase móvel foi composta por 90 mM de fosfato de sódio monobásico, 50 mM de ácido cítrico, 1,7 mM de 1-heptanossulfonato de sódio, 50 µM de EDTA dissódico, 10 % de acetonitrila (CH₃CN) e H₂O ultrapura (Milli-Q, Millipore). A fase móvel teve o pH ajustado para 3,0 com hidróxido de sódio e, em seguida, foi filtrada através de uma membrana de acetato de celulose com porosidade de 0,45 µM (Millipore) e desgaseificada a vácuo em banho de ultrassom de 40 kHz por 10 minutos.

O fluxo foi bombeado a 0,4 ml por minuto, através de uma coluna modelo ACE 3 (Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, Scotland, UK), com 150 mm de comprimento e 3 mm de diâmetro interno. A coluna foi protegida por uma guarda coluna (C18) com 10 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro interno (Alltech, Deerfield, USA), ambas utilizadas na temperatura de 35 °C. Para equilíbrio completo da coluna cromatográfica a fase móvel foi bombeada a um fluxo de 0,1 ml/min durante 12 horas (“overnight”) antes de iniciar as análises.

As amostras foram quantificadas através das curvas de calibração construídas como os padrões dos analitos dissolvidos em 0,1 M de ácido perclórico contendo 0,02% de metabissulfito de sódio. As concentrações das curvas foram de 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000 e 2.500 ng/mL de

cada analito. A partir da análise das amostras de calibração, a equação da curva de calibração foi determinada por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A curva de calibração foi construída a partir das diferentes concentrações das soluções padrão (eixo “x”) versus a área dos picos de cada analito (eixo “y”). Para o cálculo das concentrações dos analitos nas amostras experimentais, foi empregada à equação $y = ax + b$, em que ‘x’ é a concentração do analito na amostra (ng/ml) e ‘y’ é a área extraída dos picos do analito nos cromatogramas, ‘a’ é a inclinação da reta e ‘b’ é o valor do intercepto. Os valores obtidos foram expressos em nanogramas por miligrama de tecido úmido.

3.4.2 Determinação das concentrações plasmáticas de neopterina através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Para verificar o efeito da administração de reserpina sobre os níveis plasmáticos da neopterina (3 e 24 horas após a administração), foram realizadas as coletas das amostras de sangue no momento da eutanásia dos animais.

A análise cromatográfica foi realizada com o mesmo equipamento descrito no item 3.4.1. acoplado ao detector de fluorescência (modelo 2475) com comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) = 345 nm e comprimento de onda de emissão (λ_{em}) = 435 nm.

O sangue foi coletado em microtubos contendo heparina e centrifugado a 7.000 g, por 10 minutos, para obtenção do plasma. As amostras de plasma permaneceram a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o dia das análises, quando as proteínas plasmáticas foram precipitadas pela adição de um volume igual ao da amostra de ácido tricloroacético (TCA) a 5%, de acordo com Oliveira e Latini (2011). O preparado foi sonificado e centrifugado a 16.000 g por 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante de cada amostra foi retirado e mantido em microtubos do autoinjeter a uma temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo que uma alíquota de 20 μL de cada amostra foi injetada no cromatógrafo a cada 11 minutos.

A fase móvel utilizada foi composta por 50 mM de acetato de sódio, 5 mM de ácido cítrico, 48 μM de EDTA, 160 μM de ditioeritritol (DTE) e H₂O ultrapura (Milli-Q, Millipore). A fase móvel foi filtrada através de uma membrana de acetato de celulose com porosidade de 0,45 μM (Millipore) e desgaseificada a vácuo em banho de ultrassom de 40 kHz por 10 minutos.

O fluxo foi bombeado a 0,5 ml por minuto através da coluna Supelcosil LC 18T (Supelco – Sigma-Aldrich, Bellefonte, Pennsylvania, USA), com 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno,

utilizada na temperatura de 25 °C. Para equilíbrio completo da coluna fluorescente a fase móvel foi bombeada a um fluxo de 0,1 ml/minuto durante 3 horas antes de iniciar as análises.

As amostras foram quantificadas através das curvas de calibração construídas como o padrão do analito dissolvido em 50 % de fase móvel, 50 % de TCA a 5 % e H₂O ultrapura (Milli-Q, Millipore). As diferentes concentrações de neopterinina para construção da curva de calibração foram de 0,25; 0,5; 1; 2; 5; 10; 25 e 50 nM. A partir da análise das amostras de calibração, a equação da curva de calibração foi determinada por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A curva de calibração foi construída a partir das diferentes concentrações da solução padrão (eixo “x”) versus a área do pico de cada diferente concentração de neopterinina (eixo “y”). Para o cálculo da concentração do analito nas amostras experimentais, foi empregada à equação $y = ax + b$, em que ‘x’ é a concentração do analito na amostra (ng/ml) e ‘y’ é a área extraída dos picos do analito nos cromatogramas, ‘a’ é a inclinação da reta e ‘b’ é o valor do intercepto. Os valores obtidos foram expressos em nmol.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os resultados do efeito do tratamento com reserpina no teste comportamental de reconhecimento social foram analisados através da análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas, seguido pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

Para análise dos resultados obtidos no teste de reconhecimento de objeto foram utilizados, no treino, o teste t de Student para comparar as médias dos tempos totais de investigação em ambos os objetos A1 e A2 nos grupos controle e reserpina e ANOVA de uma via para comparar os tempos gastos em cada objeto em ambos os grupos. O índice de reconhecimento obtido durante o teste foi analisado pelo teste t de Student.

Os resultados dos demais experimentos comportamentais (atividade locomotora espontânea) e testes neuroquímicos foram analisados pelo teste t de Student.

A probabilidade aceita como indicativo da existência de diferença estatisticamente significativa foi $P < 0,05$. Todas as comparações estatísticas foram efetuadas utilizando-se o pacote estatístico GraphPadPrism 5.

4 RESULTADOS

4.1 TESTES COMPORTAMENTAIS

4.1.1 O efeito do tratamento com reserpina sobre a memória social de ratos

Os efeitos do tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.) e solução controle sobre a memória social de curto prazo de ratos foram investigados nos tempos de 3, 24 e 72 horas após o tratamento, em grupos independentes de animais, através do teste de reconhecimento social.

A administração de reserpina (1 mg/kg, s.c.), 3 horas antes do experimento, prejudicou a capacidade de reconhecimento social de curto prazo dos ratos adultos, indicada por um aumento no tempo de investigação quando o mesmo rato jovem foi reapresentado após um intervalo de 30 min (Fig. 4). A análise estatística efetuada através da ANOVA com medidas repetidas indicou um efeito significativo dos fatores repetição [$F(1,18) = 26,18$; $P \leq 0,0001$] e interação [$F(1,18) = 12,65$; $P \leq 0,01$], já no fator tratamento, não indicou efeito significativo [$F(1,18) = 0,48$; $P = 0,50$]. O teste post-hoc de Newman-Keuls revelou uma diferença significativa entre os tempos de investigação da 1ª em relação à 2ª exposição no grupo controle ($P < 0,05$) o que indica a capacidade de reconhecimento dos ratos adultos deste grupo quando o rato jovem foi reapresentado após um curto intervalo de tempo.

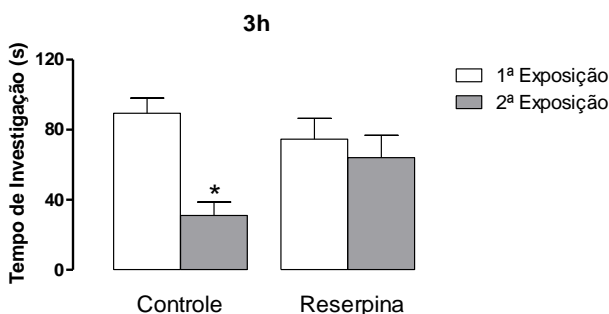


Figura 4. Efeitos do tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.) e solução controle (s.c.) (3 horas antes do experimento) sobre o tempo de investigação de ratos avaliados no teste de reconhecimento social. O intervalo de tempo entre a 1ª e a 2ª exposição do mesmo rato jovem foi de 30 minutos. As barras representam o tempo de investigação (média \pm E.P.M.) de 10 animais por grupo. * $P < 0,05$ comparado a 1ª exposição do mesmo grupo (Teste de Newman-Keuls).

Os resultados do efeito da administração de reserpina (1 mg/kg, s.c.) e solução controle (s.c.), 24 horas antes do experimento, sobre a memória social de curto prazo de ratos estão ilustrados na Fig. 5. A análise estatística efetuada através da ANOVA com medidas repetidas revelou efeitos significantes para os fatores de repetição [$F(1,32) = 18,45$; $P \leq 0,001$] e interação [$F(1,32) = 3,84$; $P \leq 0,05$], e não significativa para o fator tratamento [$F(1,32) = 0,93$; $P = 0,34$]. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou diferenças significativas ($P \leq 0,05$) no tempo de investigação da 1ª em relação à 2ª exposição ao mesmo rato jovem no grupo controle, o que indica a capacidade de reconhecimento dos ratos adultos quando o rato jovem foi reexposto. Já o grupo tratado com reserpina apresentou prejuízo da capacidade de reconhecimento social de curto prazo, indicada por um aumento no tempo de investigação quando o mesmo rato jovem foi rerepresentado após um intervalo de 30 min.

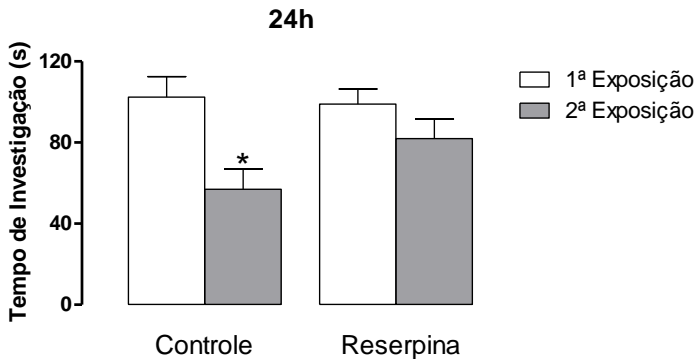


Figura 5. Efeitos do tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.) e solução controle (s.c.) (24 horas antes do experimento) sobre o tempo de investigação de ratos avaliados no teste de reconhecimento social. O intervalo de tempo entre a 1ª e a 2ª exposição do mesmo rato jovem foi de 30 minutos. As barras representam o tempo de investigação (média \pm E.P.M.) de 14 e 20 animais (grupos controle e reserpina, respectivamente). * $P < 0,05$ comparado a 1ª exposição do mesmo grupo (Teste de Newman-Keuls).

Quando o mesmo teste comportamental foi realizado 72 h após a administração de reserpina (1 mg/kg, s.c.) ou solução controle, os animais tratados com reserpina apresentaram prejuízo da capacidade de reconhecimento social de curto prazo, indicada por um aumento no

tempo de investigação quando o mesmo rato jovem foi reapresentado após um intervalo de 30 min (Fig. 6). A análise estatística efetuada através da ANOVA com medidas repetidas indicou um efeito significativo no fator repetição [$F(1,16) = 24,99$; $P \leq 0,001$]. Para os fatores tratamento [$F(1,16) = 0,00005$; $P = 0,99$] e interação [$F(1,16) = 1,81$; $P = 0,20$] a análise não indicou efeitos significativos. O teste post-hoc de Newman-Keuls revelou um efeito significativo quando comparado o tempo de investigação da 1ª em relação à 2ª exposição no grupo controle ($P < 0,05$) o que indica a capacidade de reconhecimento dos ratos adultos deste grupo quando o rato jovem foi reapresentado.

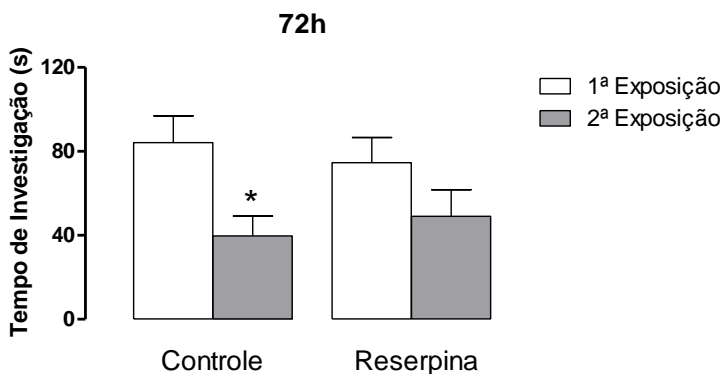


Figura 6. Efeito do tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.) e solução controle (s.c.) (72 horas antes do experimento) sobre o tempo de investigação de ratos avaliados no teste de reconhecimento social. O intervalo de tempo entre a 1ª e a 2ª exposição do mesmo rato jovem foi de 30 minutos. As barras representam o tempo de investigação (média \pm E.P.M.) de 9 animais por grupo. * $P < 0,05$ comparado a 1ª exposição do mesmo grupo (Teste de Newman-Keuls).

4.1.2 O efeito do tratamento com reserpina sobre a memória de reconhecimento do objeto de ratos

O efeito do tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.) e solução controle sobre a memória de reconhecimento de objeto de ratos foi avaliado nos tempos de 3, 24 e 72 horas após o tratamento, em grupos independentes de animais, através do teste de reconhecimento do objeto.

A Fig. 7A apresenta a média \pm E.P.M. da soma do tempo total de investigação dos objetos iguais (A e B) durante o treino, assim como o tempo de investigação despendido em cada objeto pelos grupos controle e reserpina 3 horas após a administração. Quando comparadas as médias

do tempo total de investigação (tempo de investigação despendido no objeto A mais o tempo de investigação despendido no objeto B), o teste t de Student não revelou diferença significativa entre os grupos controle e reserpina [$t = -0,65$; $P = 0,52$] indicando que não houve diferença no tempo total de investigação dos objetos entre os grupos.

A ANOVA de uma via realizada para comparar os tempos de investigação despendidos em cada um dos objetos durante a sessão de treino também não revelou um efeito significativo do tratamento [$F(3,17) = 0,22$; $P = 0,88$], indicando que os animais não apresentaram preferência por nenhum dos objetos ou preferência de lugar durante a sessão de treino.

A Fig. 7B apresenta a porcentagem do índice de reconhecimento do novo objeto durante o teste, 3 horas após a administração de reserpina ou solução controle. O teste t de Student revelou diferença significativa quando o índice de reconhecimento do grupo controle foi comparado à média teórica de 50% [$t = 7,04$; $P \leq 0,0001$] indicando que os animais deste grupo despenderam mais tempo investigando o objeto novo. Quando o índice de reconhecimento do grupo reserpina foi comparado à média teórica de 50% pelo teste t de Student, não foi evidenciada diferença significativa [$t = -0,55$; $P = 0,59$], o que indica tempos semelhantes de investigação em ambos os objetos novo e familiar.

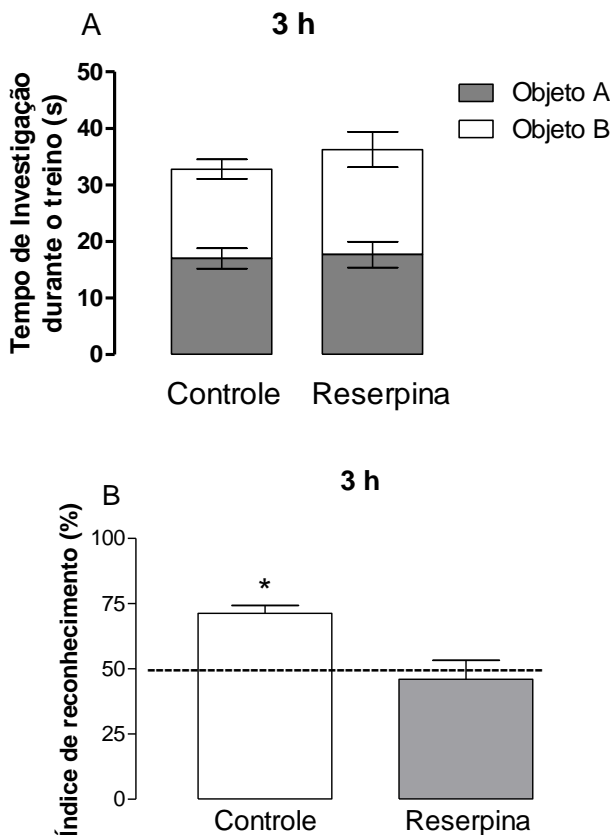


Figura 7. Efeitos do tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.) e solução controle (s.c.) (3 horas antes do experimento) sobre o desempenho de ratos avaliados no teste de reconhecimento do objeto. (A) As barras representam o tempo total de investigação do objeto A mais o objeto B, assim como o tempo despendido em cada objeto. (B) O índice de reconhecimento foi calculado pelo tempo que os animais despenderam investigando os objetos novo e familiar $[(T_{\text{novo}} \times 100)/(T_{\text{novo}} + T_{\text{familiar}})]$ durante o teste realizado 30 minutos após o treino. O teste t de Student indicou diferença significativa quando comparado o índice de reconhecimento do grupo controle (n=9) a média teórica de 50%, e diferença não significativa ($P > 0,05$), quando a mesma média foi comparada ao índice de reconhecimento do grupo reserpina (n=12). Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M..

A Fig. 8A apresenta a média \pm E.P.M. da soma do tempo total de investigação dos objetos iguais A e B durante o treino, assim como o tempo de investigação despendido em cada objeto pelos grupos controle (n=9) e reserpina (n=10), 24 horas após a administração. Quando comparadas as médias do tempo total de investigação (tempo de investigação despendido no objeto A mais o tempo de investigação despendido no objeto B), o teste t de Student não revelou diferença significativa entre os grupos controle e reserpina [$t = -0,33$; $P = 0,74$].

A ANOVA de uma via realizada para comparar os tempos de investigação despendidos em cada um dos objetos também não revelou um efeito significativo dos tratamentos com reserpina e solução controle sobre o tempo de investigação durante o treino [$F(3,15) = 0,46$; $P = 0,71$], indicando que os animais não apresentaram preferência por algum dos objetos ou preferência de lugar.

A Fig. 8B apresenta a porcentagem do índice de reconhecimento do objeto novo durante o teste, realizado 24 horas após a administração de reserpina e solução controle. O teste t de Student revelou diferença significativa quando os índices de reconhecimento dos grupos controle [$t = 7,08$; $P \leq 0,0001$] e reserpina [$t = 4,45$; $P \leq 0,001$], foram comparados à média teórica de 50% indicando que os animais de ambos os grupos despenderam mais tempo investigando o objeto novo.

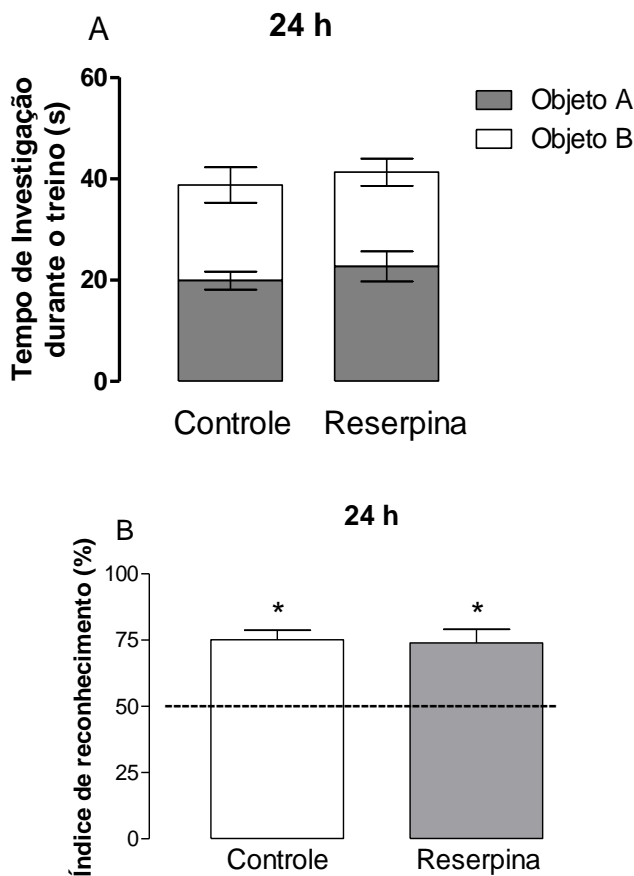


Figura 8. Efeitos do tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.) e solução controle (s.c.) (24 horas antes do experimento) sobre o desempenho de ratos avaliados no teste de reconhecimento do objeto. (A) As barras representam o tempo total de investigação do objeto A mais o objeto B, assim como o tempo despendido em cada objeto (legenda). (B) O índice de reconhecimento foi calculado pelo tempo que os animais despenderam investigando os objetos novo e familiar [$(T_{\text{novo}} \times 100) / (T_{\text{novo}} + T_{\text{familiar}})$] durante o teste realizado 30 minutos após o treino. O teste t de Student indicou diferença significativa quando comparado o índice de reconhecimento para ambos os grupos controle e reserpina, a média teórica de 50%. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. de 9 e 10 animais por grupo (controle e reserpina, respectivamente).

A Fig. 9A apresenta a média \pm E.P.M. da soma do tempo total de investigação dos objetos iguais A e B durante o treino, assim como o tempo de investigação despendido em cada objeto pelos grupos controle (n=16) e reserpina (n=14), 72 horas após a administração. Quando comparadas as médias do tempo total de investigação, o teste t de Student não revelou diferença significativa entre os grupos controle e reserpina [t = 0,72; P = 0,48].

A ANOVA de uma via realizada para comparar os tempos de investigação despendidos em cada um dos objetos em ambos os grupos controle e reserpina, também não revelou um efeito significativo dos tratamentos com reserpina e solução controle sobre o tempo de investigação durante o treino [F(3,26) = 1,38; P = 0,26], indicando que os animais não apresentaram preferência por algum dos objetos ou preferência de lugar durante a sessão de treino.

A Fig. 9B apresenta a porcentagem do índice de reconhecimento do novo objeto durante o teste realizado 72 horas após a administração de reserpina ou solução controle. O teste t de Student revelou diferença significativa quando o índice de reconhecimento do grupo controle foi comparado à média teórica de 50% [t = 8,45; P \leq 0,0001] indicando que os animais deste grupo despenderam mais tempo investigando o novo objeto. Quando o índice de reconhecimento do grupo reserpina foi comparado à média teórica de 50% pelo teste t de Student, não foi encontrada diferença significativa [t = 1,11; P = 0,28], evidenciado pelo índice de reconhecimento em torno de 50% neste grupo, o que indica tempos semelhantes de investigação em ambos os objetos novo e familiar.

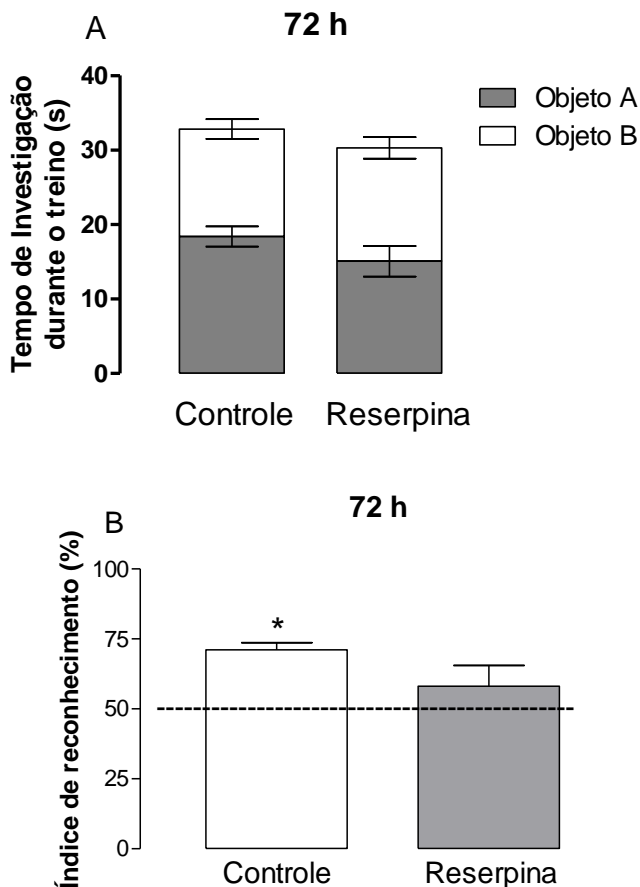


Figura 9. Efeitos do tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.) e solução controle (s.c.) (72 horas antes do experimento) sobre o desempenho de ratos avaliados no teste de reconhecimento do objeto. (A) As barras representam o tempo total de investigação do objeto A mais o objeto B, assim como o tempo despendido em cada objeto (legenda). (B) O índice de reconhecimento foi calculado pelo tempo que os animais despenderam investigando os objetos novo e familiar $[(T_{\text{novo}} \times 100)/(T_{\text{novo}} + T_{\text{familiar}})]$ durante o teste realizado 30 minutos após o treino. O teste t de Student indicou diferença significativa quando comparado o índice de reconhecimento do grupo controle a média teórica de 50%. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. de 16 e 14 animais por grupo (controle e reserpina, respectivamente).

4.1.3 O efeito do tratamento com reserpina sobre a atividade locomotora espontânea de ratos

O efeito do tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.) e solução controle sobre a atividade locomotora de ratos foi testado nos tempos de 3, 24 e 72 horas após o tratamento. Os ratos foram avaliados durante a fase de treino no teste de reconhecimento do objeto por 5 minutos no campo aberto. Tanto a distância percorrida em metros (exploração horizontal) quanto os atos de levantar (exploração vertical) são apresentados nas Figuras 10, 11 e 12.

Os grupos controle (n=9) e reserpina (n=12), avaliados 3 horas após os tratamentos, não apresentaram diferença estatística nas distâncias percorridas em metros (Fig. 10A) quando avaliadas pelo teste t de Student [$t = 0,58$; $P = 0,58$]. Com relação aos atos de levantar (Fig. 10B), o teste t de Student [$t = 0,26$; $P = 0,80$] também não indicou diferença estatística entre os grupos, sugerindo que o grupo tratado com reserpina (1 mg/kg, s.c.) não apresentou comprometimento motor quando comparado ao grupo controle.

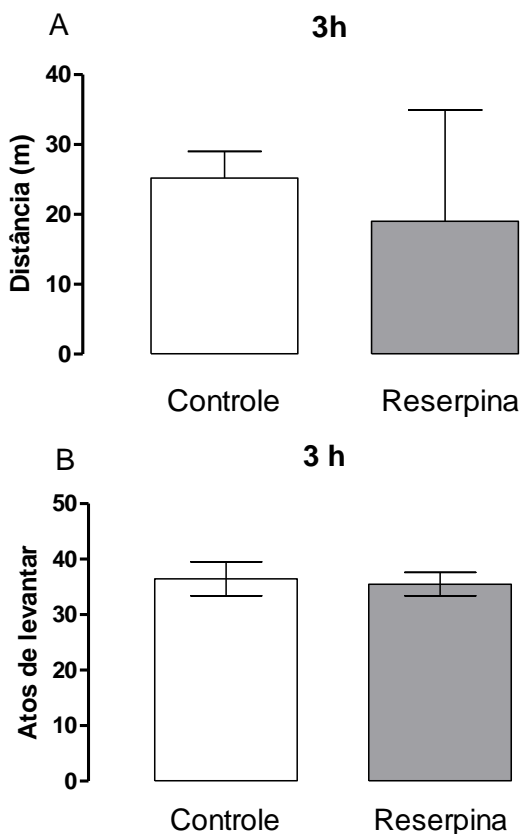


Figura 10. Efeitos do tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.) e solução controle (s.c.) (3 horas antes do experimento) sobre a atividade locomotora de ratos avaliados por 5 minutos no teste do campo aberto. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. da distância percorrida em metros (A) e dos atos de levantar (B) de 9 e 12 animais por grupo (controle e reserpina, respectivamente).

Os grupos controle (n=9) e reserpina (n=10), avaliados 24 horas após a administração de solução controle e reserpina (1 mg/kg, s.c.), não apresentaram diferença estatística (Fig. 11A) no teste t de Student [$t = 0,27$; $P = 0,79$] quando comparadas as distâncias percorridas em metros. O teste t de Student [$t = 0,30$; $P = 0,76$] também não apresentou diferença estatística entre os grupos quando quantificados os atos de levantar (Fig. 11B), indicando que o grupo tratado com reserpina (1

mg/kg, s.c.) não apresentou comprometimento motor quando comparado ao grupo controle.

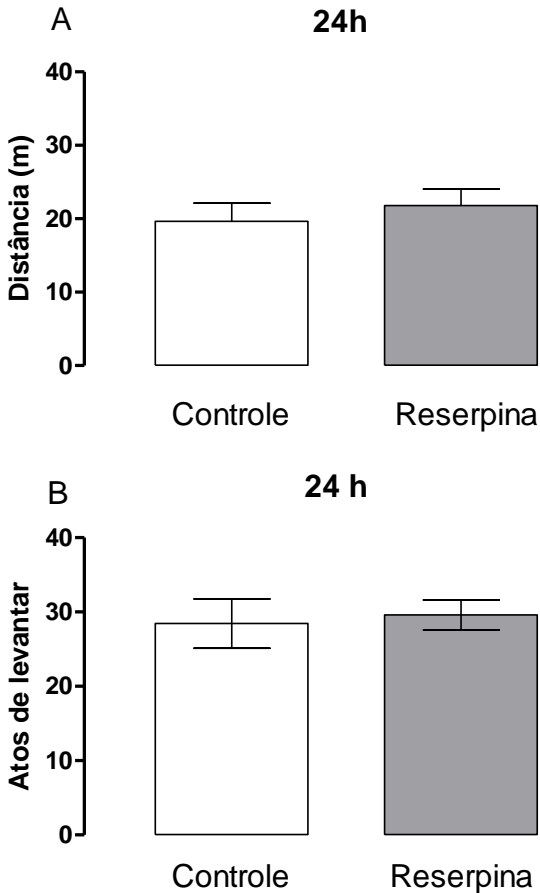


Figura 11. Efeitos do tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.) e solução controle (s.c.) (24 horas antes do experimento) sobre a atividade locomotora de ratos avaliados por 5 minutos no teste do campo aberto. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. da distância percorrida em metros (A) e dos atos de levantar (B) de 9 e 10 animais por grupo (controle e reserpina, respectivamente).

Os grupos controle (n=16) e reserpina (n=14), avaliados 72 horas após o tratamento, apresentaram diferença estatística (Fig. 12A) no teste t de Student [$t = 2,34$; $P \leq 0,05$] quando comparadas as distâncias

percorridas em metros. Quando quantificados os atos de levantar (Fig. 12B), o teste t de Student [$t = 1,45$; $P = 0,16$] não indicou diferença estatística entre os grupos, sugerindo que o grupo tratado com reserpina apresentou comprometimento motor em relação à distância percorrida, mas não em relação aos atos de levantar, quando comparado ao grupo controle.

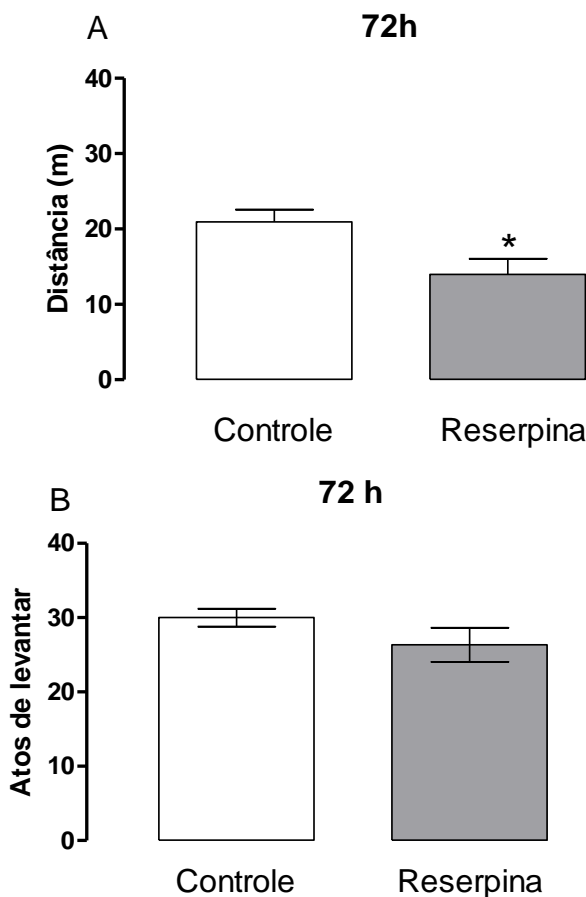


Figura 12. Efeitos do tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.) e solução controle (s.c.) (72 horas antes do experimento) sobre a atividade locomotora de ratos avaliados por 5 minutos no teste do campo aberto. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. da distância percorrida em metros (A) e dos atos de levantar (B) de 16 e 14 animais por grupo (controle e reserpina, respectivamente). * $P \leq 0,05$ comparado ao grupo controle (teste t de Student).

4.2 AVALIAÇÕES NEUROQUÍMICAS

4.2.1 Conteúdo cerebral de monoaminas (HPLC)

4.2.1.1 O efeito do tratamento com reserpina sobre as concentrações de dopamina e DOPAC no estriado de ratos

Para verificar possíveis alterações no conteúdo de dopamina e o seu metabólito não-conjugado, o DOPAC, após diferentes intervalos de tempo (3, 24 e 72 h) da administração de reserpina (1 mg/kg, s.c.) no estriado, foi realizada a dosagem destes compostos por HPLC.

A Fig. 13 ilustra as concentrações de dopamina (A) e DOPAC (B) no estriado dos animais dos grupos controle e reserpina 3 horas. O teste t de Student [$t = 0,40$; $P = 0,70$] não indicou diferenças significativas no conteúdo estriatal de dopamina entre os grupos controle ($n=4$) e reserpina ($n=4$). Em relação aos níveis de DOPAC, o teste t de Student revelou diferença significativa [$t = 2,82$; $P \leq 0,05$] nestes mesmos grupos, indicando que o grupo tratado com reserpina apresentou um aumento dos níveis de DOPAC em relação ao grupo controle (Fig. 13B).

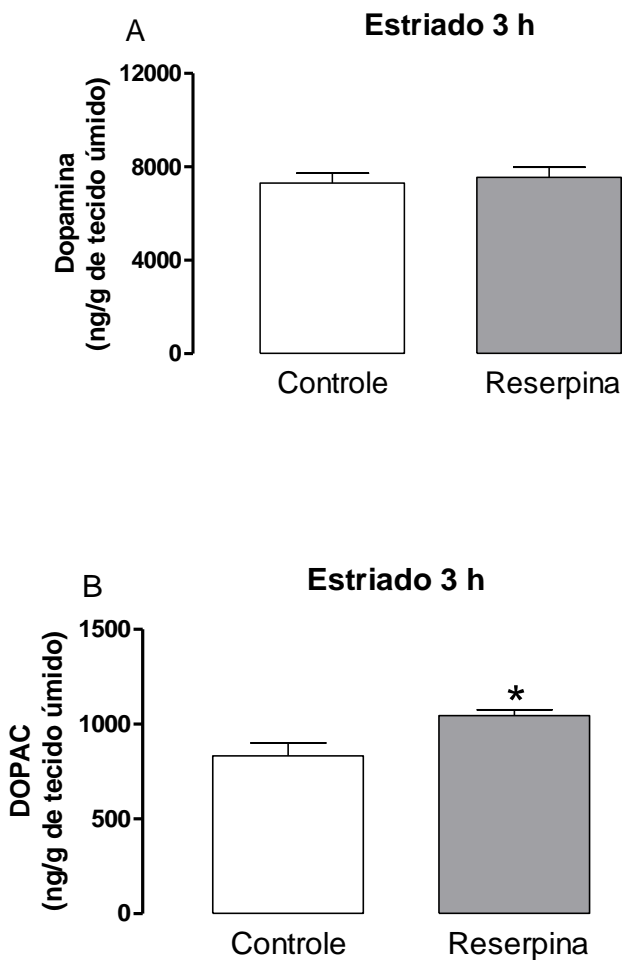


Figura 13. Efeito do tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.) e solução controle (s.c.) (3 horas após a administração) sobre as concentrações de dopamina (A) e DOPAC (B) no estriado de ratos. Os dados estão apresentados como média ± E.P.M. de 4 animais por grupo. *P ≤ 0,05 comparado ao grupo controle (teste t de Student).

As concentrações de dopamina e DOPAC no estriado dos animais dos grupos controle e reserpina cujas estruturas foram coletadas 24 horas após o tratamento estão ilustrados na Fig. 14. O teste t de Student não revelou diferenças significativas entre os grupos controle (n=4) e reserpina (n=4) nos níveis de dopamina [$t = 1,28$; $P = 0,25$] (Fig. 14A) e DOPAC [$t = 0,56$; $P = 0,60$] (Fig. 14B).

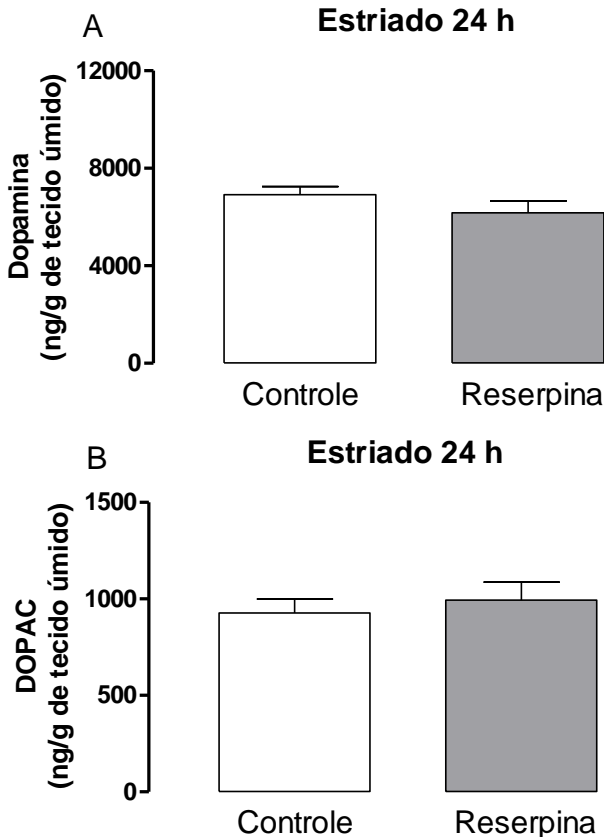


Figura 14. Efeitos do tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.) e solução controle (s.c.) (24 horas após a administração) sobre os níveis de dopamina (A) e DOPAC (B) no estriado de ratos. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. de 4 animais por grupo.

As concentrações de dopamina e DOPAC no estriado dos animais dos grupos controle e reserpina em que as estruturas foram coletadas 72 horas após o tratamento estão ilustrados na Fig. 15. O teste t de Student

revelou uma redução significativa nos níveis estriatais de dopamina [$t = 2,80$; $P \leq 0,05$] (Fig. 15A) e DOPAC [$t = 3,28$; $P \leq 0,05$] (Fig. 15B) nos animais que receberam a administração de reserpina ($n=4$) em relação ao grupo controle ($n=4$).

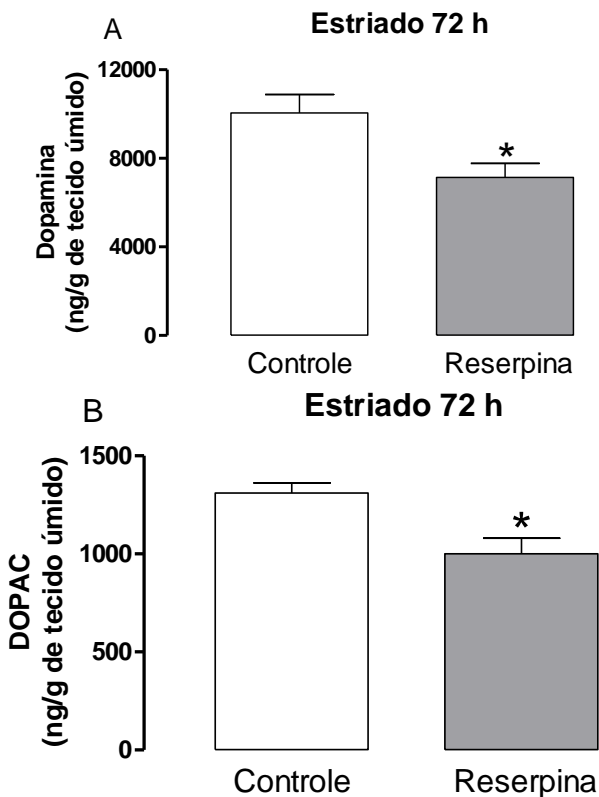


Figura 15. Efeitos do tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.) e solução controle (s.c.) (72 horas após a administração) sobre os níveis de dopamina (A) e DOPAC (B) no estriado de ratos. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. de 4 animais por grupo. * $P \leq 0,05$ comparado ao grupo controle (teste t de Student).

4.2.1.2 O efeito do tratamento com reserpina sobre as concentrações de serotonina e 5-HIAA no estriado, hipocampo e córtex pré-frontal de ratos

Para verificar possíveis alterações nas concentrações de serotonina (5-HT) e o seu metabólito, o 5-HIAA, após diferentes

intervalos de tempo (3, 24 e 72 h) da administração de reserpina (1 mg/kg, s.c.), no estriado, hipocampo e córtex, foram realizadas as dosagens destes compostos por HPLC.

A Tabela 1 ilustra o conteúdo de 5-HT e 5-HIAA no estriado, hipocampo e córtex cerebral dos animais dos grupos controle e reserpina cujas estruturas foram retiradas nos diferentes tempos (3, 24 e 72 horas) após o tratamento. O teste t de Student não revelou diferença significativa entre os grupos controle e reserpina em nenhum dos diferentes tempos, tanto em relação aos níveis de 5-HT como de seu metabólito, o 5-HIAA, em todas as estruturas estudadas. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. das concentrações de 5-HT e 5-HIAA, em ng/g de tecido úmido, de 4 animais por grupo.

Tabela 1. Efeitos do tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.) e solução controle (s.c.) sobre as concentrações de 5-HT e 5-HIAA no estriado, hipocampo e córtex pré-frontal de ratos.

Tecido	Concentração (média \pm E.P.M.; n=4) (ng/g de tecido úmido)						
	5-HT			5-HIAA			
	3 h	24 h	72 h	3 h	24 h	72 h	
Estriado	CTL*	349,5 \pm 64,5	438,3 \pm 34,5	530,3 \pm 70,9	401,2 \pm 37,8	404,9 \pm 28,3	503,0 \pm 42,8
	RES**	304,7 \pm 33,1	374,4 \pm 27,0	456,4 \pm 23,2	368,0 \pm 34,8	409,7 \pm 14,9	487,9 \pm 29,0
Hipocampo	CTL	248,9 \pm 20,5	338,0 \pm 20,2	375,8 \pm 20,0	316,2 \pm 12,2	370,2 \pm 38,3	505,1 \pm 22,2
	RES	217,8 \pm 15,5	285,7 \pm 32,9	374,3 \pm 10,7	318,1 \pm 17,7	389,0 \pm 18,1	452,4 \pm 18,9
Córtex	CTL	223,7 \pm 34,1	336,9 \pm 51,8	457,0 \pm 47,5	206,4 \pm 17,7	303,1 \pm 20,4	431,3 \pm 61,4
	RES	251,0 \pm 39,1	320,8 \pm 29,2	359,7 \pm 39,3	216,6 \pm 16,3	268,9 \pm 10,1	336,4 \pm 20,0

* CTL = grupo controle; ** RES = grupo reserpina.

4.2.2 O efeito do tratamento com reserpina sobre as concentrações plasmáticas de neopterinina

Possíveis alterações nas concentrações plasmáticas de neopterinina foram avaliadas por HPLC 3 horas após a administração de reserpina (1 ou 5 mg/kg, s.c.) e 24 horas após administração de reserpina na dose de 1 mg/kg (s.c.) em ratos.

A Fig. 16A ilustra os níveis de neopterinina plasmática nos grupos reserpina (1 ou 5 mg/kg, s.c.) e controle (s.c.) (n=5 por grupo), 3 horas após o tratamento. A análise estatística efetuada através da ANOVA de uma via não apresentou diferença significativa entre os grupos [F(2,14) = 0,23; P>0,05]. Na Fig. 16B, o teste t de Student [t = 1,02; P>0,05] não

apresentou diferença significativa entre os grupos (n=7 por grupo). Estes resultados indicam que 3 horas após a administração de diferentes doses de reserpina (1 e 5 mg/kg), bem como 24 horas após a administração de reserpina (1 mg/kg), o conteúdo de neopterina plasmática não foi alterado.

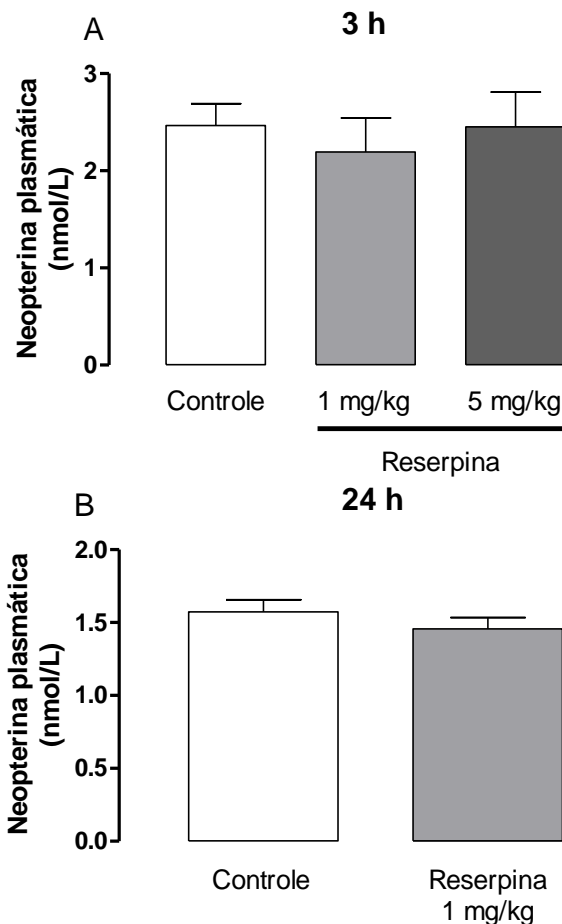


Figura 16. Efeitos dos tratamentos com reserpina (1 ou 5 mg/kg, s.c.) e solução controle (s.c.) sobre os níveis plasmáticos de neopterina em ratos mensurados 3 horas (A) ou 24 horas (B) após os tratamentos. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo.

5 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo confirmam e estendem resultados da literatura em que a administração aguda de reserpina (1 mg/kg, s.c.) provoca alterações comportamentais e neuroquímicas que mimetizam a fase pré-motora da DP, como os prejuízos nas memórias de curto prazo e redução nos níveis estriatais de dopamina. De maneira importante, o presente estudo é pioneiro na investigação temporal dos prejuízos cognitivos induzidos pela reserpina em roedores, demonstrando prejuízo da memória social em todos os tempos avaliados (3, 24 e 72 horas) e prejuízo da memória de reconhecimento de objeto nos tempos de 3 e 72 horas após a sua administração em ratos. É importante destacar que não foram observadas alterações na atividade locomotora espontânea dos animais nos tempos de 3 e 24 horas após o tratamento com reserpina, em ambos os parâmetros de distância total percorrida e atos de levantar. Entretanto, no tempo de 72 horas após a administração da droga foi evidenciado prejuízo locomotor significativo indicado pela redução na distância total percorrida no teste do campo aberto. Estes dados sugerem que os efeitos da reserpina sobre as memórias de curto prazo dos testes de reconhecimento social e do objeto, nos tempos de 3 e 24 horas após o tratamento, mimetizam a fase pré-motora da DP. Em relação às concentrações de neopterina no plasma dos animais pré-tratados com reserpina (1 mg/kg, s.c.), não foram encontradas alterações nos grupos de 3 e 24 horas quando comparados aos seus controles. Quando investigamos os níveis de neopterina em animais tratados com uma dose maior de reserpina (5 mg/kg, s.c.), 3 horas após a administração, também não encontramos diferença significativa em relação aos controles.

As memórias podem ser classificadas de acordo com a sua duração em memória de trabalho (memória imediata com duração de segundos ou poucos minutos), memória de curto prazo (que se desenvolve em alguns segundos ou minutos e dura por algumas horas) e memória de longo prazo (que se consolida lentamente e é relativamente permanente) (para uma revisão ver Izquierdo et al., 1999), e que as memórias de curto e longo prazo são identificadas como entidades separadas (Izquierdo et al., 1999).

Dentre os sistemas de memória que apresentam prejuízo na DP estão os sistemas de memória hipocampal e dos núcleos da base. Estes sistemas processam e armazenam informação independentemente e de diferentes formas. De acordo com esta visão, o sistema hipocampal processa as memórias espaciais e temporais elaborando relações entre

pistas ambientais (por exemplo, memória episódica em humanos), enquanto o sistema dos núcleos da base está envolvido no aprendizado de hábitos nos quais um determinado estímulo é repetidamente associado com determinada resposta (Packard and McGaugh, 1992; Da Cunha et al., 2003).

As conexões recíprocas entre os núcleos da base e o córtex pré-frontal estão intimamente relacionadas com os déficits cognitivos de pacientes com DP (Postle et al., 1997). De acordo com Petrides (1994), o córtex pré-frontal ventrolateral é o local do processamento inicial e armazenamento da memória de curto prazo da informação sensorial, e as regiões dorsolaterais são os locais envolvidos no processamento executivo e monitoramento de respostas, ambas as funções relacionadas com a memória de trabalho (Postle et al., 1997). Adicionalmente, segundo Owen e colaboradores (1998), os déficits cognitivos frontais no planejamento (função executiva) e na memória de trabalho presentes em estágios iniciais da DP são o resultado não da disfunção pré-frontal *per se*, mas do processamento anormal no córtex pré-frontal através da disfunção do circuito dos núcleos da base.

Estes tipos distintos de memória podem ser avaliados em estudos com modelos animais utilizando diferentes testes comportamentais. Conforme Terranova e colaboradores (1994), que induziram dano na camada hipocampal CA1 após isquemia cerebral em ratos, o teste de reconhecimento social em ratos e camundongos é altamente dependente da integridade do hipocampo. Já o teste de reconhecimento do objeto, apesar de seu amplo uso, ainda não há um consenso definido sobre as principais estruturas cerebrais envolvidas na realização desta tarefa. De acordo com Chao, Pum e Huston (2013) o desempenho neste teste é dependente da interação entre os núcleos da base e o córtex pré-frontal, por outro lado, conforme Broadbent et al. (2010) lesões produzidas no hipocampo de ratos causaram perda da memória de reconhecimento do objeto sugerindo que esta estrutura também é importante para este tipo de memória.

Os resultados obtidos no teste de reconhecimento social estão de acordo com trabalhos prévios do nosso laboratório (Prediger, Da Cunha e Takahashi, 2005; Aguiar Jr. et al., 2009), bem como de outros grupos de pesquisa (Bortolatto et al., 2013), que utilizaram o modelo da reserpina (1 mg/kg, s.c.). Entretanto, em todos os trabalhos, o intervalo de tempo entre a administração da droga e o teste foi de 24 horas.

A memória social representa uma forma de memória olfatória de curto prazo (Lemaire, 2003 in Bortolatto et al., 2013). No teste de reconhecimento social, se o período entre a primeira e a segunda

apresentação é menor do que 40 minutos, o rato adulto macho usualmente reconhece o rato juvenil por reduzir significativamente o tempo de investigação social durante a segunda apresentação comparada à primeira (Dantzer et al., 1987; Prediger e Takahashi, 2003).

De acordo com Dantzer e colaboradores (1987), a memória social em roedores é principalmente formada pela capacidade discriminativa olfatória dos animais e pode ser facilitada por drogas que aumentam a memória e interrompida em modelos farmacológicos e patofisiológicos conhecidos por causar prejuízo de memória em roedores (Prediger e Takahashi, 2003; Prediger, Batista e Takahashi, 2005; Prediger, Da Cunha e Takahashi, 2005).

Os resultados apresentados aqui demonstram que uma única administração de reserpina (1 mg/kg, s.c.) aumenta o tempo de investigação do mesmo rato jovem durante a segunda apresentação ao rato adulto, indicando o prejuízo da memória social de curto prazo neste modelo nos três tempos avaliados após a administração da droga. Estes dados sugerem que a ação da reserpina sobre parâmetros comportamentais tem início antes do tempo usual de 24 horas após sua administração, sendo que após 3 horas os animais já demonstravam prejuízo da memória social. Este dado pode indicar que neste período a droga já estava causando efeitos amnésicos secundários à depleção dos neurotransmissores no terminal sináptico sendo evidenciado pelo aumento significativo de DOPAC em relação ao grupo controle na região do estriado.

Em adição, o teste de reconhecimento do objeto é um teste de memória não espacial e não aversiva que tem sido utilizado como uma boa ferramenta experimental para avaliação de efeitos de drogas sobre a memória e investigação dos mecanismos neurais envolvidos na aprendizagem e memória (Ennaceur e Delacour, 1988). Este teste baseia-se no princípio de que, em um ambiente familiar, os roedores de laboratório mostram uma atração instintiva para a novidade, ou preferência por um novo objeto, não familiar (Hughes, 2007).

Nossos resultados indicaram prejuízo na memória de reconhecimento do objeto de curto prazo nos tempos de 3 e 72 horas após a administração da reserpina, enquanto o grupo avaliado 24 horas após a injeção de reserpina não apresentou prejuízo desta memória. Este último resultado está de acordo com o estudo prévio de Fernandes e colaboradores (2008) que não encontraram diferença entre os grupos controle e grupos reserpina (0.1; 0.25 e 0.5 mg/kg de reserpina 24 h após administração), embora tenham utilizado doses menores do que a dose utilizada em nosso estudo, a preferência para exploração dos

objetos novos foi demonstrada por todos os grupos, indicando que a reserpina não afetou este tipo de memória (Fernandes et al., 2008).

A perda de alteração nesta tarefa está de acordo com alguns estudos clínicos que mostram a memória de reconhecimento intacta em pacientes com a DP (Gabrieli, 1996 in Fernandes et al., 2008; Postle et al., 1997). Por outro lado, de acordo com Whittington, Podd e Kan (2000), a teoria de que os pacientes com DP têm pouca ou nenhuma dificuldade de reconhecimento de novas informações, mas apresentam problemas de recuperação da informação (“recall”), precisa ser modificada. Os autores sugerem uma teoria geral da disfunção cognitiva na PD que deva levar em conta não só a ocorrência de déficit de reconhecimento como também que este déficit pode aumentar com a progressão da doença (Whittington, Podd e Kan, 2000). Em um estudo recente realizado por Bortolatto e colaboradores (2013), os autores descrevem o prejuízo das memórias de curta e longa duração no teste de reconhecimento do objeto em ratos tratados com reserpina (1 mg/kg, 24 h após administração), em intervalos de 1 e 24 horas entre treino e teste, respectivamente, o que discorda dos nossos achados.

Resultados recentes obtidos com o modelo da 6-OHDA no teste de reconhecimento do objeto indicam que a interação entre o córtex pré-frontal e projeções prosencefálicas dopaminérgicas, particularmente da via nigroestriatal, são essenciais para a integridade da memória de reconhecimento do objeto (Chao, Pum e Huston, 2013). Levando em consideração estes dados, podemos sugerir que os resultados obtidos neste teste comportamental são, ao menos em parte, explicados pela ausência de redução nos níveis estriatais de dopamina e DOPAC no intervalo de 24 horas após a administração de reserpina, uma vez que de acordo com os autores supracitados, a via nigroestriatal está diretamente envolvida neste teste. Estes resultados bioquímicos estão de acordo com os resultados obtidos por Verheij e Cools (2007) em que foi investigada a redução da concentração extracelular de dopamina no núcleo accumbens (pertencente ao sistema dopaminérgico mesolímbico e anatomicamente ao corpo estriado), por microdialise seguida por análise em um sistema de HPLC, após a administração de reserpina (1 mg/kg, i.p.) em ratos. Os autores deste estudo descreveram uma depleção máxima de dopamina 1 hora após a injeção de reserpina, sendo que 24 horas após o tratamento os níveis de monoaminas no núcleo accumbens retornou aos níveis basais (Verheij e Cools, 2007).

O fato da administração de reserpina ter prejudicado a memória social de ratos, mas não o reconhecimento de objetos 24 após a sua administração, pode ser justificado pelos diferentes processos de

memória envolvidos em ambos os testes. De acordo com Terranova e colaboradores (1994), o sistema hipocampal está diretamente envolvido na memória de reconhecimento social. Entretanto, os níveis de dopamina e DOPAC nesta estrutura, que poderiam corroborar o envolvimento do hipocampo nos prejuízos de memória social em nosso estudo, infelizmente não foram detectados pela técnica do HPLC, e o conteúdo de serotonina e seu metabólito 5-HIAA não apresentaram diferença significativa em relação aos grupos controle, em todos os tempos investigados.

Já nos grupos de 72 horas pós-reserpina, os prejuízos das memórias verificados em ambos os testes comportamentais podem ter sido causados pela diminuição significativa do conteúdo de dopamina e DOPAC nas estruturas pertencentes aos sistemas de memória envolvidos, e/ou podem ser secundários ao prejuízo locomotor observado na avaliação da distância total percorrida no teste do campo aberto. Quando avaliados os atos de levantar, ou seja, a exploração vertical, os animais não apresentaram prejuízo significativo em relação aos controles. Nossos resultados indicam uma diminuição significativa do conteúdo de dopamina e de DOPAC no estriado dos animais 72 horas após o tratamento com reserpina. Estes dados estão de acordo com resultados prévios em que ocorreu diminuição significativa de dopamina e de DOPAC em ratos tratados com reserpina (1 mg/kg, s.c.) neste mesmo intervalo de tempo (Sussman, Tran-Nguyen e Neisewander, 1997).

Os resultados dos testes comportamentais nos grupos avaliados 3 horas após a administração de reserpina apresentaram prejuízo destas memórias, sendo que em nossos resultados bioquímicos não foi evidenciada diminuição significativa do conteúdo de dopamina nos sobrenadantes dos homogenatos estriatais, mas, em relação ao conteúdo de DOPAC, houve aumento significativo em comparação aos controles. O rápido aumento no conteúdo de DOPAC, secundário à administração de reserpina, de acordo com Agid, Javoy e Youdim (1976), pode refletir a liberação da dopamina dos locais de armazenamento vesicular para o compartimento citoplasmático onde este neurotransmissor é imediatamente metabolizado por enzimas como a MAO-B e COMT (Agid, Javoy e Youdim, 1976 In: Kannari et al., 2000). Estes dados sugerem que a ligação da reserpina ao transportador (VMAT2) impediu o seu armazenamento e liberação no terminal sináptico, o que causou um consequente aumento do metabolismo da dopamina no meio citoplasmático, evidenciado em nossos resultados pelo aumento significativo de DOPAC. Outro estudo que corrobora com nossa

suposição foi realizado em ratos tratados com reserpina na dose de 5 mg/kg (i.p.), sendo que os níveis extracelulares de dopamina e DOPAC foram avaliados por microdialise seguida por análise de HPLC (Kannari et al., 2000). Neste estudo, os autores relataram uma diminuição gradual dos níveis extracelulares de dopamina de até 4% dos valores basais em 3 horas, concomitante a um aumento dos níveis de DOPAC até aproximadamente 250% dos valores basais em 80 minutos (Kannari et al., 2000). Tomados estes dados em conjunto, podemos sugerir que os prejuízos das memórias nos testes comportamentais nos grupos 3 horas pós-reserpina são induzidos pela falta de dopamina e/ou outros neurotransmissores no terminal sináptico e que esta depleção não se traduziu em diferença significativa do conteúdo total de dopamina e serotonina no sobrenadante dos homogenatos dos estriados, hipocampus e córtices pré-frontais analisados por HPLC.

Em relação às avaliações neuroquímicas de monoaminas por HPLC, infelizmente não conseguimos detectar o conteúdo de dopamina e DOPAC no córtex pré-frontal e, assim como já mencionado anteriormente, no hipocampo.

A reserpina inibe o VMAT2 levando a uma perda da capacidade de armazenamento e consequente depleção central e periférica de monoaminas, incluindo dopamina, noradrenalina e 5-HT. Embora esta perda de seletividade para a dopamina já tenha sido considerada uma falha do modelo da reserpina em mimetizar a DP, a descoberta subsequente de que os sistemas noradrenérgicos e serotoninérgicos também estão afetados na DP (Jellinger, 1991), argumenta em favor do modelo da reserpina como sendo um bom modelo em mimetizar a bioquímica da doença (Duty e Jenner, 2011). O modelo da reserpina tem sido usado no desenvolvimento de importantes contribuições para o entendimento da ligação entre a depleção de monoaminas e os sintomas parkinsonianos, estabelecendo potencial eficácia sintomática de novas drogas na DP (Duty e Jenner, 2011).

Vários trabalhos demonstram o envolvimento das monoaminas nos processos de aprendizagem e memória. Estudos usando reserpina (Prediger, Da Cunha e Takahashi, 2005), 6-OHDA (Tadaiesky et al., 2010) e MPTP (Prediger et al., 2006) para mimetizar a DP em roedores, têm mostrado prejuízos das memórias de trabalho e de procedimento análogos àqueles observados em estágios precoces da DP. Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com estudos prévios que descrevem a importância das monoaminas para a capacidade de reconhecimento social e de reconhecimento do objeto em ratos.

Em relação às análises do plasma sanguíneo dos grupos 3 e 24 horas pós-reserpina (1 mg/kg, s.c.) e 3 horas (5 mg/kg, s.c.), as concentrações de neopterina foram detectadas por HPLC e não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos 3 horas que receberam diferentes doses de reserpina, assim como diferenças significativas em relação aos seus controles. Nossos dados estão de acordo com os dados obtidos por Oliveira e Latini (2011) em um estudo prévio realizado em colaboração com o nosso laboratório em que foram quantificados os níveis de neopterina no plasma sanguíneo de camundongos.

De acordo com Kannari e colaboradores (2000), o nível máximo de depleção de dopamina culmina em torno de 3 horas pós-reserpina (5 mg/kg, i.p.), permanecendo até em torno de 6 horas, e, a partir de então, os níveis começam a elevar. A partir do mencionado, quantificamos a neopterina no plasma sanguíneo de ratos pré-tratados com a dose de 5 mg/kg no tempo de 3 horas para investigar uma possível modulação do conteúdo de neopterina no plasma sanguíneo com uma dose 5 vezes maior neste intervalo. Como não houve diferença significativa nos conteúdos de neopterina nos diferentes grupos analisados (3 e 24 horas), optamos por não realizar a quantificação do grupo 72 horas, por acreditarmos que estes dados não eram necessários para a conclusão deste trabalho.

Conforme Dale e colaboradores (2009), a neopterina está aumentada em processos inflamatórios do sistema nervoso central, sendo que este metabólito não é somente um marcador da ativação do sistema imune. A neopterina também tem funções bioquímicas e fisiológicas na defesa contra organismos patógenos invasores, pois segundo Hoffmann, Wirleitner and Fuchs (2003), promove estresse pró-oxidativo, o qual pode amplificar os efeitos citotóxicos de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

A comunicação entre os sistemas neuroendócrino e imune envolve a interação da liberação de mediadores a partir de ambos os sistemas, incluindo neurotransmissores e citocinas. Conforme Szélenyi, Kiss and Vizi (2000), a noradrenalina de origem vesicular, liberada por terminações simpáticas, controla tonicamente diminuindo a produção de citocinas. Neste estudo, a depleção da noradrenalina vesicular por reserpina (10 mg/kg), dramaticamente aumentou a produção de TNF- α induzida por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), uma endotoxina que provoca uma forte resposta imune, em camundongos. O aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias induz o aumento da produção de neopterina *in vitro* e/ou *in vivo* em várias células incluindo

monócitos, macrófagos e células dendríticas da linhagem monocítica (micróglia) (Thöny et al., 2000; Hoffmann, Wirleitner e Fuchs, 2003; Dale et al., 2009; Hagberg et al., 2010).

A partir de nossos resultados, concluímos que a utilização da reserpina, um tratamento conhecido por aumentar os níveis de BH4 nos tecidos de roedores (Abou-Donia and Viveros, 1981; Hirayama and Kapatos, 1995), administrada de forma isolada como em nosso estudo, não modula as concentrações de neopterinina, um metabólito secundário da via de síntese de BH4, no plasma sanguíneo de ratos tratados com a dose de 1 mg/kg (s.c. 3 e 24 horas após a administração) e com a dose de 5 mg/kg (s.c. 3 horas após a administração).

Sugerimos, de acordo com o exposto, que o tratamento com a reserpina associada à administração de LPS, como indutor da ativação do sistema imune, possa ser um bom modelo para o estudo da modulação da neopterinina. A reserpina, que potencializou a produção de citocinas induzida pelo LPS, devido a sua ação sobre o sistema neuroendócrino (Szelényi, Kiss and Vizi, 2000), também está associada ao aumento da concentração de BH4 (Abou-Donia e Viveros, 1981), de GTPCH I (Viveros et al., 1981; Thöny, Auerbach e Blau, 2000) e PTPS (Hirayama and Kapatos, 1995), mas utilizada de forma isolada, parece não modificar a via de síntese de neopterinina.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo confirmam a utilização da reserpina (1 mg/kg, s.c.) como um modelo da fase inicial da DP, sendo capaz de induzir prejuízos de memória de curto prazo relatados nesta doença. Estes resultados foram demonstrados pelos prejuízos da memória social e de reconhecimento do objeto de curto prazo.

O intervalo de tempo de 3 horas após a administração da reserpina apresentou o melhor perfil para o estudo dos efeitos pré-motores da DP no teste de reconhecimento do objeto de curto prazo. Neste intervalo as avaliações neuroquímicas indicaram um aumento significativo das concentrações de DOPAC em relação aos controles, o que sugere um aumento do metabolismo de dopamina, sem ocorrência de alterações na atividade locomotora espontânea dos animais.

O tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.) causou alterações nas concentrações de dopamina e DOPAC nos estriados, principalmente no grupo 72 horas. Neste intervalo de tempo, foi verificado comprometimento locomotor quando avaliada a distância total percorrida, o que compromete os resultados de prejuízo das memórias de curta duração nos testes comportamentais realizados 72 horas após a administração da reserpina.

Não foram evidenciadas alterações significativas nas concentrações de neopterina no plasma sanguíneo de ratos após a administração de reserpina nos diferentes intervalos de tempo e doses utilizados. A partir destes resultados sugerimos que a administração s.c. da reserpina nas presentes doses (1 e 5 mg/kg) não modula as concentrações de neopterina no plasma sanguíneo de ratos. Sugerimos que a utilização da reserpina, que modula a via de síntese de BH₄, associada a alguma toxina, como o LPS, que induz ativação do sistema imune e de processo inflamatório, possa ser um bom modelo para a investigação do metabolismo da neopterina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-DONIA M. M. and VIVEROS H. Tetrahydrobiopterin increases in adrenal medulla and cortex: A factor in the regulation of tyrosine hydroxylase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 5, p. 2703-2706, 1981.
- ADAM Y., EDWARDS R. H. and SCHULDINER S. Expression and function of the rat vesicular monoamine transporter 2. **Cell Physiology**, v. 294, p. C1004–C1011, 2008.
- AGID Y., JAVOY F., and YOUDIM M. Monoamine oxidase and aldehyde dehydrogenase activity in the striatum of rats after 6-hydroxydopamine lesion of the nigrostriatal pathway. *Br. J. Pharmacol.* v. 48, p. 175–177, 1976. In: KANNARI K., TANAKA H., MAEDA T., TOMIYAMA M., SUDA T. and MATSUNAGA M. Reserpine Pretreatment Prevents Increases in Extracellular Striatal Dopamine Following L-DOPA Administration in Rats with Nigrostriatal Denervation. **Journal of Neurochemistry**, v. 74, n. 1, p. 263-269, 2000.
- AGUIAR JR. A. S., ARAÚJO A. L., DA CUNHA T. R., SPECK A. E., IGNÁCIO Z. M., DE MELLO N. and PREDIGER R. D. S. Physical exercise improves motor and short-term social memory deficits in reserpinized rats. **Brain Research Bulletin**, v. 79, p. 452–457, 2009.
- ALVES C. S. D., ANDREATINI R., DA CUNHA C., TUFIK S. and VITAL M. A. B. F. Phosphatidylserine reverses reserpine-induced amnesia. **European Journal Pharmacology**, v. 404, p. 161–167, 2000.
- BADDELEY A. Working Memory. **Science**, v. 255, p. 556-559, 1992.
- BEAR M. F., CONNORS B. W. e PARADISO M. A. **Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso**. 3ª Edição, Artmed Editora, Porto Alegre, 2008.
- BLACK I. B. Increased tyrosine hydroxylase activity frontal cortex and cerebellum after reserpine. **Brain Research**, v. 95, p. 170-176, 1975.
- BLAU N., BONAFE L. and THÖNY B. Tetrahydrobiopterin Deficiencies without Hyperphenylalaninemia: Diagnosis and Genetics of DOPA-Responsive Dystonia and

Septapterin Reductase Deficiency. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 74, p. 172–185, 2001.

BORTOLATTO C. F., SOUZA A. C. G., WILHELM E. A. and NOGUEIRA C. W. Acute Treatment with Bis Selenide, an Organic Compound Containing the Trace Element Selenium, Prevents Memory Deficits Induced by Reserpine in Rats. **Biological Trace Element Research**, v. 151, p. 92–99, 2013.

BRAAK H., DEL TREDICI K., RÜB U., DE VOS R. A., JANSEN STEUR E.N. and BRAAK E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 24, n. 2, p. 197-211, 2003.

BROADBENT N. J., GASKIN S., SQUIRE L. R. and CLARK R. E. Object recognition memory and the rodent hippocampus. **Learning and Memory**, v. 17, p. 5-11, 2010.

CARLSSON A., LINDQVIST M. and MAGNUSSON T. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. **Nature**, 30 Nov, 180 (4596):1200, 1957.

CARVALHO R. C., PATTI C. C., TAKATSU-COLEMAN A. L., KAMEDA S. R., SOUZA C. F., GARCEZ-DO-CARMO L., ABÍLIO V. C., FRUSSA-FILHO R. and SILVA R. H. Effects of reserpina on the plus-maze discriminative avoidance task: dissociation between memory and motor impairments. **Brain Research**, v. 1122, p. 176–83, 2006.

CHAO, O. Y., PUM M. E. and HUSTON J. P. The interaction between the dopaminergic forebrain projections and the medial prefrontal cortex is critical for memory of objects: Implications for Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.01.003>, 2013.

CHO S., VOLPE B. T., BAE Y., HWANG O., CHOI H. J., GAL J., PARK L. C. H., CHU C. K., DU J. and JOH T. H. Blockade of Tetrahydrobiopterin Synthesis Protects Neurons after Transient Forebrain Ischemia in Rat: A Novel Role for the Cofactor. **Journal Neuroscience**, v. 19, p. 878-889, 1999.

CHOI H. J., LEE S. Y., CHO Y., NO H., KIM S. W. and WANG O. Tetrahydrobiopterin causes mitochondrial dysfunction in dopaminergic cells: implications for Parkinson's disease. **Neurochemistry International**, v. 48, p. 255–262, 2006.

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

DA CUNHA C., ANGELUCCI M. E., CANTERAS N. S., WONNACOTT S. and TAKAHASHI R. N. The lesion of the rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons as a model for Parkinson's disease memory disabilities. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 22, n. 3, Jun. p. 227-237, 2002.

DA CUNHA C., WIETZIKOSKI S., WIETZIKOSKI E. C., MIYOSHI E., FERRO M. M., ANSELMO-FRANCI J. A. and CANTERAS N. S. Evidence for the substantia nigra pars compacta as an essential component of a memory system independent of the hippocampal memory system. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 79, p. 236–242, 2003.

DALE R. C., BRILOT F., FAGAN E. and EARL J. Cerebrospinal fluid neopterin in paediatric neurology: a marker of active central nervous system inflammation. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 51, p. 317–323, 2009.

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

DAWSON T. M. New animal models for Parkinson's disease. **Cell**, v. 101, p. 115-118, 2000.

DE RIJK M. C., LAUNER L. J., BRETELER M. M., DARTIGUES J. F., BALDERESCHI M., FRATIGLIONI L., LOBO A., MARTINEZ-LAGE J., TRENKWALDER C. and HOFMAN A. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. **Neurology**, v. 54, p. 21-23, 2000.

DUTY S. and JENNER P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, p. 1357–1391, 2011.

ELBAZ A and TRANCHANT C. Epidemiologic studies of environmental exposures in Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 262, p. 37–44, 2007.

ENNACEUR A. and DELACOUR J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioural Brain Research**, v. 31, p. 47-59, 1988.

FERNANDES V. S., RIBEIRO A. M., MELO T. G., GODINHO M., BARBOSA F. F., MEDEIROS D. S., MUNGUBA H. and SILVA R. H. Memory impairment induced by low doses of reserpine in rats: Possible relationship with emotional processing deficits in Parkinson disease. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 32, p. 1479-1483, 2008.

FOXTON R. H., LAND J. M. and HEALES S. J. Tetrahydrobiopterin availability in Parkinson's and Alzheimer's disease; potential pathogenic mechanisms. **Neurochemistry Research**, v. 32, p. 751-756, 2007.

FUENTES P., PARIS I., NASSIF M., CAVIEDES P. and SEGURA-AGUILAR S. Inhibition of VMAT-2 and DT-diaphorase induced cell death in a substantia nigra-derived cell line – an experimental cell model for dopamine toxicity studies. **Chemical Research in Toxicology**, v. 20, p. 776-783, 2007.

GABRIELI J. D. E. Memory systems analyses of mnemonic disorders in aging and age-related diseases. *Proc Natl Acad Sci.*, v. 93, 1996. In: FERNANDES V. S., RIBEIRO A. M., MELO T. G., GODINHO M., BARBOSA F. F., MEDEIROS D. S., MUNGUBA H. and SILVA R. H. Memory impairment induced by low doses of reserpine in rats: Possible relationship with emotional processing deficits in Parkinson disease. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 32, p. 1479-1483, 2008.

GERLACH M. and RIEDERER P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the

disease in man. **Journal of Neural Transmission**, v. 103, p. 987–1041, 1996.

GILLIS M. K. **Subcellular localization of 3h-reserpine in rat brain**. Ph.D., Pharmacology, F. University of Illinois at the Medical Center, 1974.

HAGBERG L., CINQUE P., GISSLEN M., BREW B. J., SPUDICH S., BESTETTI A., PRICE R. W. and FUCHS D. Cerebrospinal fluid neopterin: an informative biomarker of central nervous system immune activation in HIV-1 infection. **AIDS Research and Therapy**, v. 7, p. 1-15, 2010.

HENRY J. P., BOTTON D., SAGNE C., ISAMBERT M.-F., DESNOS C., BLANCHARD V., RAISMAN-VOZARI R., KREJCI E., MASSOULIE J. and B. GASNIER. Biochemistry and molecular biology of the vesicular monoamine transporters from chromaffin granules. **Journal Experimental Biology**, v. 196, p. 251-262, 1994.

HIRAYAMA K. and KAPATOS G. Expression and regulation of rat 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase mRNA. **Neurochemistry International**, v. 26, n. 6, p. 601-606, 1995

HIRSCH E. C. and HUNOT S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? **Lancet Neurology**, v. 8, p. 382-397, 2009.

HOFFMANN G., WIRLEITNER B. and FUCHS D. Potential role of immune system activation-associated production of neopterin derivatives in humans. **Inflammation Research**, v. 52, p. 313–21, 2003.

HUGHES R. N. Neotic preferences in laboratory rodents: issues, assessment and substrates. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 31, p. 441–464, 2007.

IZQUIERDO I., BARROS D. M., MELLO e SOUZA T., DE SOUZA M. M., IZQUIERDO L. A. and MEDINA J. H. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, v. 393, p. 635-636, 1998.

IZQUIERDO I., MEDINA J. H., VIANNA M. R. M., IZQUIERDO, L. A. and BARROS D. M. Separate mechanisms of short- and long-term memory. **Behavioural Brain Research**, v. 103, p. 1-11, 1999.

JELLINGER, K. A. Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. **Molecular and Chemical Neuropathology**, v. 14, p. 153 – 197, 1991.

KANNARI K., TANAKA H., MAEDA T., TOMIYAMA M., SUDA T. and MATSUNAGA M. Reserpine Pretreatment Prevents Increases in Extracellular Striatal Dopamine Following L-DOPA Administration in Rats with Nigrostriatal Denervation. **Journal Neurochemistry**, v. 74, n. 1, p. 263-269, 2000.

KIM S. W., JANG Y. J., CHANG J. W. and HWANG O. Degeneration of the nigrostriatal pathway and induction of motor deficit by tetrahydrobiopterin: an in vivo model relevant to Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 13, p. 167–176, 2003.

KIM S. T., CHANG J. W., HONG H. N. and HWANG O. Loss of striatal dopaminergic fibers after intraventricular injection of tetrahydrobiopterin in rat brain. **Neuroscience Letters**, v. 359, p. 69-72, 2004.

LEES A. J., HARDY J. and REVESZ T. Parkinson's disease. **Lancet.**, v. 373 (9680), p. 2055-2066, 2009.

LELOS M. J. and DUNNETT S. B. Aberrant dopamine transmission and cognitive dysfunction in animal models of Parkinson's disease. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 1, p. 151-165, 2011.

LEMAIRE M. Social recognition task in the rat. *Curr. Protoc. Pharmacol.*, v. 5, 2003 in BORTOLATTO C. F., SOUZA A. C. G., WILHELM E. A. and NOGUEIRA C. W. Acute Treatment with Bis Selenide, an Organic Compound Containing the Trace Element Selenium, Prevents Memory Deficits Induced by Reserpine in Rats. **Biological Trace Element Research**, v. 151, p. 92–99, 2013.

LEWIS S., DOVE A., ROBBINS T. W., BARKER R. A. and OWEN A. M. Cognitive impairments in early Parkinson's disease are accompanied

by reductions in activity in frontostriatal neural circuitry. **Journal Neuroscience**, v. 23, p. 6351–6356, 2003.

LINDER A. E., DIAZ J., NI W., SZASZ T., BURNETT R. and WATTS S. W. Vascular reactivity, 5-HT uptake, and blood pressure in the serotonin transporter knockout rat. **American Journal Physiology – Heart and Ciculatory Physiology**, v. 294, n. 4, Apr, p. 745-752, 2008.

LOVENBERG W., LEVINE R. A., ROBINSON D. S., EBERT M., WILLIAMS A. C. and CALNE D. B. Hydroxylase Cofactor Activity in Cerebrospinal Fluid of Normal Subjects and Patients with Parkinson's Disease. **Science**, v. 204, may, 1979.

MOREIRA E. L. G., RIAL D., AGUIAR JR A. S., FIGUEIREDO C. P., SIQUEIRA J. M., DALBO´ S., HORST H., OLIVEIRA J., MANCINI G., SANTOS T S ., VILLARINHO J. G., PINHEIRO F. V., MARINONETO J., FERREIRA J., DE BEM A. F., LATINI A., PIZZOLATTI M. G. RIBEIRO-DO-VALLE R. M. and PREDIGER R. D. S. Proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* Baill confers neuroprotection in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine rat model of Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 117, p. 1337–1351, 2010.

MOURA P. J. e XAVIER G. F. Memória de reconhecimento social em ratos. **Psicologia UsP**, v. 21, n. 2, abril/junho, p. 355-389, 2010.

NAGATSU T., SAWADA M., AKINO M., MASADA M., SUGIMOTO T. and MATSUURA S. Distribuição de GTP cyclohydrolase I, neopterin, and biopterin in the human brain. In: KUZUYA h., SAKAMOTO H., HIBIYA M., SHIMPO K., BEPPU H. and NAGATSU, P. 673-721. In: **Neurochemical markers of degenerative nervous disease and drig addiction. Progress in HPLC-HPCE**, v. 7, G. ALI QURESHI et al. (Eds.), 1998.

OLGIATI V. R., ALGERI S. and STRAMENTINOLI G. Biochemical and behavioural indices of striatal dopaminergic activity after 6-methyltetrahydropterin. **Pharmacological Research Communications**, v. 19, n. 3, p. 231-240, 1987.

OLIVEIRA K. G. **Caracterização do efeito da neopterina no sistema nervoso central** [dissertação]; orientadora, Alexandra S. Latini.

Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. Florianópolis, SC, 2011.

OWEN A. M., DOYON J., DAGHER A., SADIKOT A. and EVANS A. C. Abnormal basal ganglia outflow in Parkinson's disease identified with PET: Implications for higher cortical functions. **Brain**, v. 121, p. 949–965, 1998.

PACKARD M. G. and McGAUGH J. L. Double dissociation of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: further evidence for multiple memory systems. **Behavioral Neuroscience**, v. 106, n. 3, p. 439-446, 1992.

PETRIDES M. Frontal lobes and behaviour. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 4, n. 2, p. 207-211, 1994.

PIRES V. A., PAMPLONA F. A., PANDOLFO P., PREDIGER R. D. S. and TAKAHASHI R. N. Chronic caffeine treatment during prepubertal period confers long-term cognitive benefits in adult spontaneously hypertensive rats (SHR), an animal model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). **Behavioural Brain Research**, v. 215, p. 39–44, 2010.

POLAZZI E. and MONTI B. Microglia and neuroprotection: From in vitro studies to therapeutic applications. **Progress in Neurobiology**, v. 92, p. 293–315, 2010.

POSTLE B. R., LOCASCIO J. J., CORKIN S., and GROWDON J. H. The time course of spatial and object learning in Parkinson's disease. **Neuropsychologia**, v. 35, p. 1413–1422, 1997.

PREDIGER R. D. S. and TAKAHASHI R. N. Ethanol improves short-term social memory in rats. Involvement of opioid and muscarinic receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 462, p. 115 – 123, 2003.

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

PREDIGER R. D. S., DA CUNHA C. and TAKAHASHI R. N. Antagonistic interaction between adenosine A2A and dopamine D2 receptors modulates the social recognition memory in reserpine-treated rats. **Behavioral Pharmacology**, v. 16, n. 4, p. 209-218, 2005.

PREDIGER R. D. S., BATISTA L. C., MEDEIROS R., PANDOLFO P., FLORIO J. C. and TAKAHASHI R. N. The risk is in the air: intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 202, p. 391-403, 2006.

PREDIGER R. D. S., AGUIAR JR. A. S., ROJAS-MAYORQUIN A. E., FIGUEIREDO C. P., MATHEUS F. C., GINESTET L., CHEVARIN C., BEL E. D., MONGEAU R., HAMON M., LANFUMEY L. and RAISMAN-VOZARI R. Single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine in C57BL/6 mice models early preclinical phase of Parkinson's disease. **Neurotoxicity Research**, v. 17, p. 115-129, 2010.

PREDIGER R. D. S., ROJAS-MAYORQUIN A. E., AGUIAR JR. A. S., CHEVARIN C., MONGEAU R., HAMON M., LANFUMEY L., DEL BEL E., MURAMATSU H., COURTY J. and RAISMAN-VOZARI R. Mice with genetic deletion of the heparin-binding growth factor midkine exhibit early preclinical features of Parkinson's disease. **Journal Neural Transmission**, v. 118, p. 1215-1225, 2011.

RODRIGUEZ-OROZ M. C., JAHANSHAHI M., KRACK P., LITVAN I., MACIAS R., BEZARD E. and OBESO J. A. Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. **Lancet Neurology**, v. 8, p. 1128-1139, 2009.

SILVA T. P. **Alterações comportamentais, neuroquímicas e neuroimunológicas induzidas por lesão estriatal com 6-OHDA** [dissertação]; orientador, Reinaldo Naoto Takahashi. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Florianópolis, SC, 2012.

SKALISZ L. L., BEIJAMINI V., JOCA S. L., VITAL M. A. B. F., DA CUNHA C. and ANDREATINI R. Evaluation of the face validity of reserpine administration as an animal model of depression-Parkinson's

disease association. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 26, p. 879 – 883, 2002.

SULZER D., BOGULAVSKY J., LARSEN K. E., BEHR G., KARATEKIN E., KLEINMAN M. H., TURRO N., KRANTZ D., EDWARDS R. H., GREENE L. A. and ZECCAET L. Neuromelanin biosynthesis is driven by excess cytosolic catecholamines not accumulated by synaptic vesicles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 22, p. 11869–11874, 2000.

SUSSMAN A. N., TRAN-NGUYEN L. T. L. and NEISEWANDER J. L. Acute reserpine administration elicits long-term spontaneous oral dyskinesia. **European Journal of Pharmacology**, v. 337, p. 157–160. 1997.

SZELÉNYI J., KISS J. P. and VIZI E. S. Differential involvement of sympathetic nervous system and immune system in the modulation of TNF- α production by α 2 and β -adrenoceptores in mice. **Journal of Neuroimmunology**, v. 103, p. 34–40, 2000.

TADAIESKY M. T., DOMBROWSKI P. A., FIGUEIREDO C. P., CARGNIN-FERREIRA E., DA CUNHA C. and TAKAHASHI R. N. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 156, p. 830–840. 2008.

TADAIESKY M. T., DOMBROWSKI P. A., DA CUNHA C. and TAKAHASHI R. N. Effects of SR141716A on Cognitive and Depression-Related Behavior in an Animal Model of Premotor Parkinson's Disease. **Parkinson's Disease**, v. 2010, ID 238491. 2010.

TANI Y. and OHNO T. Analysis of 6R- and 6S-tetrahydrobiopterin and other pterins by reversed-phase ion-pair liquid-chromatography with fluorimetric detection by post-column sodium nitrite oxidation. **Journal of Chromatography**, v. 617, p. 249-255, 1993.

TANNER C. M. and ASTON D. A. Epidemiology of Parkinson's disease and akinetic syndromes. **Current Opinion in Neurology**, v. 200, n. 13, p. 427–30. 2000.

TERRANOVA J. P., PÉRIO A., WORMS P., LE FUR G. and SOUBRIÉ P. Social olfactory recognition rodents: deterioration with

age, cerebral ischaemia and septal lesion. **Behavioural Pharmacology**, v. 5, p. 90-98, 1994.

TISSINGH G., BERGMANS P., BOOIJ J., WINOGRODZKA A., VAN ROYEN E. A., STOOFF J. C. and WOLTERSET E. C. Drug-naïve patients with Parkinson's disease in Hoehn and Yahr stages I and II show a bilateral decrease in striatal dopamine transporters as revealed by [¹²³I]beta-CIT SPECT. **Journal of Neurology**, v. 245, p. 14–20, 1998.

THÖNY B., AUERBACH G. and BLAU N. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. **Biochemical Journal**, v. 347, p. 1-16, 2000.

TOLOSA E., COMPTA Y. and GAIG C. The premotor phase of Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 13, p. 2-7, 2007.

VAN DEN EEDEN S. K., TANNER C. M., BERNSTEIN A. L., FROSS R. D., LEIMPETER A., BLOCH D. A. and NELSON L. M. Incidence of Parkinson's Disease: Variation by Age, Gender, and Race/Ethnicity. **American Journal of Epidemiology**, v. 157, p. 1015–1022, 2003.

VERHEIJ M. M. M. and COOLS A. R. Differential contribution of storage pools to the extracellular amount of accumbal dopamine in high and low responders to novelty: effects of reserpine. **Journal of Neurochemistry**, v. 100, p. 810-821, 2007.

VIVEROS O. H., LEE C-L., ABOU-DONIA M. M., NIXON J. C. and NICHOL C. A. Biopterin cofactor biosynthesis: independent regulation of GTP cyclohydrolase in adrenal medulla and cortex. **Science**, v. 213, 1981.

ZHENG G., DWOSKIN L. P. and CROOKS P. A. Vesicular monoamine transporter 2: role as a novel target for drug development. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 10, n. 8 (4), p. 682-692, 2006.

ZIEMSEN T. and REICHMANN H. Non-motor dysfunction in Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 13, p. 323-332, 2007.

WHITTINGTON C. J., PODD J. and KAN M. M. Recognition Memory Impairment in Parkinson's Disease: Power and Meta-Analyses. **Neuropsychology.**, v. 14, n. 2, p. 233-246, 2000.

WIDNER B., LEBLHUBER F. and FUCHS D. Increased neopterin production and tryptophan degradation in advanced Parkinson's disease. **Journal Neural Transmission**, v. 109, n. 2, p. 181-189, 2002.