

NEUROBIOLOGIA DO PARKINSONISMO

II. MODELOS EXPERIMENTAIS

SILVIA PONZONI*, NOBERTO GARCIA-CAIRASCO**

RESUMO - O emprego de modelos experimentais de parkinsonismo tem contribuído não só para explicar o conhecimento das funções dos gânglios basais como também tem permitido o surgimento de várias hipóteses para explicar os processos neurodegenerativos do sistema nervoso central. Nesta revisão são apresentados e discutidos os modelos de parkinsonismo que utilizam neurotoxinas como a 6-hidroxi dopamina, MPTP e o manganês.

PALAVRAS-CHAVE: parkinsonismo, 6-hidroxi dopamina, MPTP, manganês, modelos experimentais.

Neurobiology of parkinsonism: II. Experimental models

SUMMARY - The study of experimental models of parkinsonism has contributed to the knowledge of basal ganglia functions, as well as to the establishment of several hypothesis for the explanation of the cause and expression of central neurodegenerative disorders. In this review we present and discuss several models such as 6-hydroxydopamine, MPTP and manganese, all of them widely used to characterize the behavioral, cellular and molecular mechanisms of parkinsonism.

KEY WORDS: parkinsonism, 6-hydroxydopamine, MPTP, manganese, experimental models.

É crescente o número de investigações científicas objetivando o conhecimento da causa do processo degenerativo que ocorre nos neurônios da via nigroestriatal. No parkinsonismo idiopático, tem permitido não só o conhecimento da organização neuroanatômica e neuroquímica dos gânglios da base (objeto do artigo precedente) como também tem contribuído para o aparecimento de novos tratamentos e possibilitado o estudo dos mecanismos envolvidos na morte neuronal presentes tanto no processo natural do envelhecimento cerebral quanto nas doenças degenerativas do sistema nervoso central (SNC). De etiologia desconhecida, várias hipóteses têm sido aventadas para explicar a causa do mal de Parkinson (PK). Apresentamos algumas correntes que vêm merecendo atenção nos dias de hoje, destacando:

1. a que propõe como gatilho para o processo degenerativo um agente ambiental. Esta corrente tem a seu favor a existência de comprometimento do sistema extrapiramidal com sinais característicos do parkinsonismo em decorrência de: a. ingestão de semente de uma palmeira, *Cycus circinalis*, pelos nativos nas ilhas da baía de Guam e Rota, no Pacífico. A ação tóxica poderia ser decorrente da

*Doutor em Ciências, Disciplina de Biofísica do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina (UEL); **Doutor em Ciências, Laboratório de Neurofisiologia e Neuroetologia Experimental da Disciplina de Neurofisiologia do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP). Aceite: 3-maio-1995.

presença da toxina cicasina, que constitui 2% da composição da semente e, através de seu metabólito metilazoximetanol (MAM), danificaria o DNA celular²⁷; b. inalação de pó de manganês pelos mineradores do Chile e de Taiwan³³ e por floricultores de Ibiuna, São Paulo, que utilizam um fungicida com manganês em sua composição⁷; c. N-metil-1,4 fenil 1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), um derivado da meperidina que quando injetada no homem produz quadro irreversível de PK. Alguns autores descartam a hipótese de um fator ambiental para o PK tomando por base a ausência de variações em sua incidência ao longo dos anos³², enquanto outros estudos revelam elevada frequência de PK em países industrializados e áreas rurais²⁸.

2. a que considera a existência de fatores genéticos que poderiam resultar na incapacidade do organismo em desintoxicar-se quando agredido por toxinas² ou na deficiência nos mecanismos reparadores de DNA, causando acúmulo de DNA defeituoso nos neurônios nigrais acarretando sua morte¹⁰. Atualmente tem sido observada uma variação inata nos gens da monoaminoxidase tipo B (MAOB) em pacientes com mal de Parkinson, o que poderia revelar a existência de uma predisposição genética para esta doença²¹.

3. a que considera o parkinsonismo como consequência natural do processo de envelhecimento cerebral, podendo este ser acelerado pela ação cumulativa de repetidos insultos durante a vida, tais como viroses, toxinas e traumatismos cranianos, entre outros.

4. a que considera o acúmulo gradual de neuromelanina durante décadas uma contribuição considerável para o processo patológico quer pela geração de radicais livres, quer pela sua ligação a agentes tóxicos como o MPTP e metais pesados como o manganês¹⁹. Esta hipótese baseia-se no grande poder autoxidativo da dopamina (DA) que além de gerar neuromelanina produz intermediários tóxicos, como radicais livres. Um dado interessante é a observação da atividade autoxidativa da DA no estriado do cobaio aumentar com a idade⁸.

5. a que considera que a degeneração do sistema nigroestriatal seja resultante de aumento na formação de radicais livres ou de inadequado funcionamento dos sistemas neutralizadores. Esta corrente tem a seu favor a existência de substâncias como o MPTP cuja toxicidade é produzida pelo seu radical MPP+ e o achado histoquímico de redução da principal enzima neutralizadora do peróxido, a catalase, observada na substância negra, caudado e putâmen de pacientes com parkinsonismo³⁰.

6. a que considera como fator de degeneração do sistema nigroestriatal a redução dos estoques de ATP, causada por bloqueio do sistema mitocondrial de transferência de elétrons. A consequência da redução das concentrações de ATP seria um desequilíbrio nas concentrações de cálcio intracelular que levaria à morte neuronal⁹.

MODELOS EXPERIMENTAIS DE PARKINSONISMO

Um modelo ideal de PK deve incorporar todas as características clínicas, neuropatológicas e neuroquímicas da doença. Como características clínicas, o modelo de PK deve apresentar: bradicinesia, rigidez muscular, instabilidade postural e tremores. Neuropatologicamente a distribuição das lesões neuronais deve ser específica havendo comprometimento principal da substância negra e locus coeruleus e neuroquimicamente deve ocorrer perda de dopamina no núcleo caudado e putâmen, sendo o segundo mais afetado. Satisfeitas estas exigências pelo modelo experimental, o mecanismo etiológico por este proposto pode assemelhar-se em muito ou mesmo ser idêntico ao do PK. Será completo o modelo que como o PK apresentar evolução progressiva²⁹.

Duas neurotoxinas seletivas têm sido de grande importância para o estudo do parkinsonismo experimental em animais de laboratório, a 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) e o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), além do emprego de metais como o manganês. Apresentamos a seguir algumas características dos três modelos experimentais de PK utilizados.

2,4,5- Trihidroxifeniletilamina (6-hidroxi-dopamina, 6-OHDA)

O emprego de injeções unilaterais de 6-OHDA na substância negra, tectum ventral e feixe prosencefálico medial em ratos tem sido efetiva em causar degeneração da via nigroestriatal³¹. O mesmo efeito foi demonstrado

em camundongos³⁶. Considerando que a lesão do sistema dopaminérgico nigroestriatal acarreta redução da dopamina estriatal e que esta é uma das características do PK, este modelo tem sido um dos mais utilizados.

O efeito seletivo da 6-OHDA sobre os neurônios catecolaminérgicos é resultante de sua analogia estrutural às catecolaminas e desta forma é captada por estes neurônios através do sistema de transporte de alta afinidade presente em seus terminais³⁴. A ação tóxica da 6-OHDA sobre o sistema catecolaminérgico, especificamente o dopaminérgico, poderia ser mediada por: a) sua capacidade em potencializar o mecanismo autoxidativo da DA com a concomitante produção de radicais livres; b) produção de quinonas durante a sua oxidação, as quais poderiam ligar-se covalentemente aos grupos sulfidrilas das células. Em cultura de neuroblastoma a 6-OHDA parece exercer seu efeito citotóxico primário pela gênese de radicais livres, sendo a reatividade sulfidrilas das quinonas resultante de um fator secundário. A importância em determinar o mecanismo neurotóxico da 6-OHDA deriva de ser este um produto da autooxidação da DA, podendo estar envolvido na patogênese de doenças como PK, psicose maníaco depressiva e esquizofrenia¹².

Animais submetidos a injeções unilaterais de 6-OHDA na substância negra apresentam assimetria motora, tais como dobramento corporal para o lado lesado. A administração de agonistas DA nestes animais produz acentuado comportamento rotatório, sendo o sentido da rotação dependente da natureza da droga utilizada. Considera-se que os receptores DA no estriado desnervado desenvolvam supersensibilidade a agentes com atividade direta sobre estes, como a apomorfina, causando rotação no sentido contrário ao lado desnervado pela ativação preferencial destes receptores supersensíveis³³.

Um quadro semelhante ao PK, com hipocinesia, rigidez muscular e tremores das extremidades anteriores, é obtido com injeções bilaterais de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial em ratos. As alterações motoras são acompanhadas pela redução da DA do estriado e núcleo accumbens; estes animais apresentam também perda do comportamento alimentar¹⁸. Déficits no comportamento alimentar não são observados quando o tratamento com 6-OHDA é efetuado em fases neonatais³². As lesões induzidas pela 6-OHDA em ratos neonatos são efetivas em causar hiperatividade, observada durante o desenvolvimento que persiste durante a vida adulta não havendo modificação no comportamento alimentar destes animais.

A diferença de efeitos comportamentais, observada no emprego de 6-OHDA em diferentes idades, sugere que seus efeitos dependam da fase de desenvolvimento do animal em estudo. Sua utilização em fases precoces do desenvolvimento parece acarretar alterações funcionais nos terminais pré e pós sinápticos do circuito dopaminérgico como resposta à perda dos terminais DA estriatais. A aplicação local de DA no estriado destes animais lesados com 6-OHDA promove excitação das células estriatais, ao contrário da resposta inibitória observada nos animais controles³¹.

A lesão do sistema nigroestriatal produzida pela 6-OHDA em ratos adultos é efetiva em aumentar a expressão de RNAm para a enzima ácido glutâmico descarboxilase (GAD), assim como a sua atividade no estriado ipsilateral à lesão. Estes dados sugerem uma ação inibitória dos neurônios DA sobre os neurônios gabaérgicos e sua expressão gênica³⁶. Neurônios dopaminérgicos do sistema nigroestriatal sobreviventes à injeção de 6-OHDA apresentam perda de RNAm para a enzima tirosina hidroxilase (TH) e retração do nucléolo²⁵. Os mesmos efeitos são também observados nos neurônios sobreviventes da SNc de pacientes parkinsonianos³³. A administração de 6-OHDA na via dopaminérgica estriatal resulta em substancial elevação nas concentrações de c-jun mRNA, porém não do c-fos mRNA nos neurônios da substância negra pars compacta¹⁷.

Embora o modelo de PK produzido pela injeção de 6-OHDA seja um dos mais utilizados, mimetizando alguns dados neuroquímicos da doença, ele ainda não permite a identificação das causas que levam à degeneração dos neurônios da SN. Um fator limitante neste modelo é o surgimento de um quadro agudo, 24 horas após a injeção intranárgica de 6-OHDA, quando o processo degenerativo que tem lugar no PK é de evolução lenta e progressiva.

1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP)

Descoberto na década de 80 como um contaminante presente em heroína sintética, com capacidade de destruir as células dopaminérgicas da substância negra compacta, produzindo quadro muito semelhante ao PK, o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) vem sendo utilizado em modelos experimentais de PK e tem sido proposto como agente etiológico para esta síndrome neurodegenerativa.

O MPTP tem demonstrado possuir efeito tóxico seletivo sobre os neurônios dopaminérgicos nigrais em primatas e roedores. Sabe-se que o MPTP não possui efeito tóxico sendo na verdade uma prototoxina que,

convertida em 1-metil-4-fenilpiridina (MPP+) pela enzima monoaminoxidase tipo B (MAO-B), apresenta ação neurotóxica. Em linhas gerais as etapas envolvidas no processo de transformação do MPTP em agente tóxico podem ser divididas em - 1) Entrada do composto no tecido cerebral: tem sido demonstrado que apenas o MPTP atravessa a barreira hematoencefálica. 2) Oxidação do MPTP em MPDP+ e este em MPP+, mediada pela MAO-B. Acredita-se que esta etapa do processo tenha lugar nas células gliais. A utilização de bloqueadores da enzima MAO-B, como o deprenil, tem sido efetiva em reduzir os efeitos neurotóxicos do MPTP em macacos, demonstrando a necessidade de sua oxidação em MPP+ para a expressão da neurotoxicidade. 3) Captação do MPP+ pelos terminais dopaminérgicos devido às semelhanças estruturais existentes entre este composto e a DA. O emprego de N-1-(2-benzo(b)-tiofenilciclohexil piperidina), BTCP, bloqueador seletivo da recaptação de DA, protege cultura de neurônios dopaminérgicos dos efeitos tóxicos do MPTP e 6-OHDA⁴. 4) Deposição e acúmulo do MPP+ no neurônio dopaminérgico causando danos no complexo I do sistema de transferência de elétrons na mitocôndria⁹. 5) Depleção de ATP celular em consequência do bloqueio da oxidação mitocondrial, acarretando alterações na homeostase do íon cálcio causando a morte neuronal³⁰.

O MPTP tem demonstrado causar destruição dos neurônios nigrais em primatas, camundongos e ratos. A sensibilidade dos camundongos ao MPTP é menor que a dos primatas¹⁵, sendo porém maior que a apresentada pelos ratos. Tal diferença de sensibilidade pode ser decorrente do metabolismo do MPTP no SNC. A baixa toxicidade do MPTP em ratos pode ser explicada pela presença exclusiva de MAO-A nestes roedores, demonstrada em preparados de sinaptossomas dopaminérgicos estriatais²⁶. A administração sistêmica de MPTP em ratos não induz lesão nos neurônios dopaminérgicos da substância negra: injeções unilaterais na substância negra de MPTP ou MPP+ em ratos jovens e velhos demonstram que a toxicidade do primeiro é dependente da idade do animal, sendo maior no segundo grupo²².

A lesão produzida pelo MPTP no sistema dopaminérgico nigroestriatal caracteriza-se por redução nas concentrações de DA e de seus metabólitos bem como em redução na recaptação de DA. Estas alterações bioquímicas são associadas à perda de atividade da enzima tirosina hidroxilase (TH), demonstrada por redução da resposta imunocitoquímica nos terminais nervosos do estriado, soma e dendritos na substância negra compacta (SNC)¹⁶.

Macacos submetidos a injeção de MPTP exibem todos os comprometimentos motores observados no PK³. Uma observação comum obtida nos macacos que recebem MPTP é o aparecimento inicial de PK, seguido por recuperação parcial ou completa. Alguns fatores podem contribuir para esta recuperação como dose empregada, idade do animal utilizado e tempo de tratamento com MPTP. Animais mais velhos são menos propensos à recuperação após exposição ao MPTP. Não foram observadas lesões no núcleo caudado ou putâmen em macacos tratados com MPTP, a despeito da depleção dopaminérgica nestas áreas, assim como no PK humano.

Embora o modelo de PK induzido por MPTP seja importante na determinação de um agente etiológico, algumas diferenças significativas entre a síndrome induzida por MPTP e PK devem ser consideradas. Primeiramente, o PK é doença degenerativa de progressão lenta e o MPTP produz um PK severo e agudo. Alguns toxicômanos expostos ao MPTP não desenvolveram parkinsonismo agudo, apresentando sinais de PK precoce quando examinados 4 anos após a exposição. A captação de [18F] dopamina estriatal nestes pacientes assintomáticos é menor que a observada nos controles. A localização da lesão neuronal na substância negra no modelo induzido por MPTP é maior nas porções mediais enquanto no PK a distribuição é mais mediolateral. As alterações patológicas produzidas pelo MPTP não reproduzem exatamente a patologia típica do PK, tais como formação dos corpos de Lewys e degeneração de outros núcleos pigmentados.

Manganês

Uma síndrome extrapiramidal semelhante ao parkinsonismo é observada em pacientes intoxicados por manganês. A administração de manganês em animais de laboratório produz redução nas concentrações de DA estriatal. O quadro clínico observado em pacientes com intoxicação mangânica apresenta-se inicialmente como distúrbio psiquiátrico muito semelhante à esquizofrenia, caracterizando uma fase inicial de aumento das concentrações de DA nas estruturas basais. Esta fase psiquiátrica, conhecida como "loucura mangânica", tem a duração de um mês aproximadamente, quando então dá lugar à fase neurológica permanente cujo quadro clínico assemelha-se ao PK, apresentando boa resposta ao tratamento com L-dopa. A necrópsia de pacientes com intoxicação mangânica revela degeneração e perda do pigmento neuromelanina na substância negra e deficiência de DA no caudado e putâmen e de noradrenalina no hipotálamo. Camundongos submetidos cronicamente a dietas com alto teor de manganês apresentam aumento nas concentrações de DA cerebral durante a primeira

fase do tratamento. Um aumento na atividade da enzima TH estriatal de ratos é observado durante o primeiro mês de regime alimentar contendo altos teores de manganês e a manutenção desta dieta por período de 8 meses revela depressão da atividade enzimática. O tratamento crônico com $MnCl_2$ é efetivo em aumentar as concentrações de DA, noradrenalina (NA) e ácido homovanílico (HVA) no estriado de ratos. Este aumento contudo tem lugar nas fases iniciais do tratamento, sendo seguido por fase na qual observam-se reduções significantes da DA, NA e HVA. Estes resultados indicam que o manganês possui ação bifásica sobre o metabolismo dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais, atuando como estimulante numa primeira fase e uma ação depressora num segundo momento. O aumento da atividade da enzima TH com a consequente elevação das concentrações de DA, NA e HVA estriatais, presente na fase inicial da intoxicação manganíca, poderia explicar a sua fase psiquiátrica; a subsequente fase neurológica poderia ser resultante da elevada produção de radicais livres devido ao aumento do metabolismo dopaminérgico⁵.

O efeito tóxico do manganês poderia ser expresso pela sua capacidade em acelerar a autooxidação da DA na fase psiquiátrica, produzindo maiores concentrações de radicais livres^{13,20}, superando desta forma a capacidade redutora da neuromelanina e de outros sistemas protetores nos neurônios DA e causando a morte celular. Uma das hipóteses para explicar os processos neurodegenerativos propõe a existência de um desequilíbrio nos sistemas de oxidação-redução. A oxidação das catecolaminas, DA inclusive, tem lugar na mitocôndria e gera radicais livres⁶. A redução do número de terminais dopaminérgicos decorrente do efeito tóxico do manganês poderia acarretar aumento na demanda das células sobreviventes, favorecendo a progressão da doença. O tratamento crônico com $MnCl_2$ em macacos Rhesus produz distúrbios no sistema extrapiramidal associados às alterações patológicas dos gânglios basais semelhantes àquelas observadas no homem. São observadas baixas concentrações de DA no estriado de macacos sacrificados durante a fase neurológica do manganismo crônico, assim como os cérebros necropsiados de pacientes parkinsonianos. À necrópsia, cérebros de pacientes intoxicados com manganês, assim como aqueles portadores de parkinsonismo, revelam perda do pigmento neuromelanina na substância negra decorrente da degeneração desta região. Os grânulos de neuromelanina são ricos em metais, incluindo o manganês, e em radicais semiquinonas. Em ambos os casos observa-se deficiência de dopamina no complexo estriatal e de noradrenalina no hipotálamo. A ingestão de $MnCl_2$ produz efeitos tóxicos nos gânglios da base resultando em redução de DA e norepinefrina teciduais em ratos²⁰.

Injeções unilaterais de $MnCl_2$ na substância negra de ratos são efetivas em reduzir as concentrações de DA no estriado ipsilateral à injeção. O efeito é dose-dependente, observando-se também redução nas concentrações de DOPAC o que sugere a existência de inibição na síntese do neurotransmissor ou degeneração dos neurônios dopaminérgicos²⁴. A aplicação unilaterial de $MnCl_2$ na substância negra de ratos tem demonstrado resposta imunocitoquímica à enzima tirosina hidroxilase (TH) e à apomorfina, dose-dependentes. Observa-se redução de 99% na resposta TH no estriado ipsilateral dos animais que receberam injeções com concentrações de 50 $\mu g/\mu l$ de $MnCl_2$ quando comparados aos controles ou àqueles cuja dose de $MnCl_2$ aplicada foi de 25 $\mu g/\mu l$. A resposta à apomorfina é mais intensa no grupo de 50 $\mu g/\mu l$, havendo expressão significativa do comportamento rotatório com baixas doses de apomorfina; o mesmo comportamento não é observado nos animais controles ou naqueles pertencentes ao grupo de 25 $\mu g/\mu l$. O mecanismo de degeneração neuronal manganês induzido pode ser mediado pelos receptores glutamatérgicos, N-metil-D-aspartato (NMDA), pois o emprego de seu antagonista não competitivo MK-801 ou a remoção das aferências glutamatérgicas corticais bloqueiam as lesões².

O modelo de PK induzido pelo manganês, assim como os demais, apresenta a limitação do tempo de instalação da síndrome que é muito curto, quando no PK este tempo é mais longo. Um outro dado interessante é o quadro psiquiátrico observado nos pacientes intoxicados com manganês anteriormente à síndrome extrapiramidal, fato que não acompanha o PK idiopático.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O emprego de modelos animais no estudo do PK tem permitido o avanço do nosso conhecimento sobre a neurobiologia dos gânglios da base. Não se pode pretender que um modelo animal mimetize perfeitamente uma entidade clínica e os modelos de PK obtidos com as neurotoxinas não são exceção a esta regra. Algumas discrepâncias entre os modelos e o PK merecem destaque:

1. Em quase todos os casos envolvendo as neurotoxinas, a lesão cerebral é obtida em um curto intervalo de tempo, não reproduzindo o processo neurodegenerativo gradual observado no PK.

2. Apesar da lesão induzida pela neurotoxina destruir a principal via envolvida na síndrome clínica, ela não produz toda a neuropatologia associada à doença.

3. Os modelos animais permitem somente uma aproximação da síndrome neurológica observada nos pacientes e nunca poderá ser utilizado para estudar as manifestações cognitivas e emocionais da doença.

4. Apesar dos grandes avanços e o surgimento de varias hipóteses para explicar o início do processo degenerativo no PK, pouco ainda se conhece sobre qual gatilho é disparado na degeneração da via envolvida, causa da morte neuronal. Talvez a chave para este mistério possa abrir a porta para a compreensão dos processos neurodegenerativos e do envelhecimento cerebral.

REFERÊNCIAS

1. Biagini, G, Ferraguti F, Ponzoni S, Zoli M, Alboni L, Toffano G, Fuxe K, Agnati LF. Neurochemical and behavioural studies on L-DOPA toxicity in the model of manganese lesioned nigrostriatal pathway in the rat: evidence for a protective effect of the GM1 lactone siagoside. In Fuxe K, Agnati LF, Bjelke B, Ohoson D (eds). Wenner-Gren Symposium on Trophic regulation of the basal ganglia: focus on dopamine neurons. 1994, p 381-407.
2. Brouillet EP, Shinobu L, McGarvey U, Hochberg F, Beal MF. Manganese injection into the rat striatum produces excitotoxic lesions by impairing energy metabolism. *Exp Neurol* 1993, 120:89-94.
3. Burns RS. Subclinical damage to the nigrostriatal dopamine system by MPTP as a model of preclinical Parkinson's disease: a review. *Acta Neurol Scand* 1991, 84 (Suppl 136):29-36.
4. Cerruti C, Drian MJ, Kamenka JM Privat A. Protection by BTCP of cultured dopaminergic neurons exposed to neurotoxins. *Brain Res* 1993, 617:138-142.
5. Donaldson J, McGregor D, LaBella F. Manganese neurotoxicity: a model for free radical mediated neurodegeneration? *Can J Physiol Pharmacol* 1982, 60:1398-1405.
6. Fahn S, Cohen G. The oxidative stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol* 1994, 32:804-812.
7. Ferraz HB, Bertolucci PHF, Pereira JS, Lima JGC, Andrade LAF. Chronic exposure to the fungicide maneb may produce symptoms and signs of CNS manganese intoxication. *Neurology* 1988, 38:550-553.
8. Fornstedt B, Pileblad E, Carlsson A. In vivo autoxidation of dopamine in guinea pig striatum increases with age. *J Neurochem* 1990, 55:655-659.
9. Flint Beal M, Hyman BT, Koroshetz W. Do effects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathophysiology of neurodegenerative diseases? *TINS* 1993, 16:125-131.
10. Floyd RA, Carney JM. Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann Neurol* 1992, 32:S22-S27.
11. Glover V, Sandler M. Monoamine oxidase and the brain. *Rev Neurosci* 1987, 1:145-156.
12. Graham DG, Tiffany SM, Bell WR Jr, Gutknecht WF. Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine, and related compounds toward C 1300 neuroblastoma cells in vitro. *Molec Pharmacol* 1978, 14:644-653.
13. Graham DG. Catecholamine toxicity: a proposal for the molecular pathogenesis of manganese neurotoxicity and Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 1984, 5:83-96.
14. Heikkila R, Cohen G. Inhibition of biogenic amine uptake by hydrogen peroxide: a mechanism for toxic effects of 6-hydroxydopamine. *Science* 1972, 172:1257-1258.
15. Heikkila RE, Hess A, Duvoisin RC. Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. *Science* 1984, 224:1451-1453.
16. Javoy-Agid F, Hirsch EC, Dumas S, Duyckaerts C, Mallet J, Agid Y. Decreased tyrosine hydroxylase messenger RNA in the surviving dopamine neurons of the substantia nigra in Parkinson's disease: an in situ hybridization study. *Neuroscience* 1990, 38:248-253.
17. Jenkins R, O'Shea R, Thomas KL, Hunt SP. c-jun expression in substantia nigra neurons following striatal 6-hydroxydopamine lesions in the rat. *Neuroscience* 1993, 53:447-455.
18. Jilicoeur FB, Rivest R. Rodent models of Parkinson's disease In: Boulton AA, Baker GA, Butterworth RF (eds). Animal models of neurological disease: I. Neurodegenerative diseases. Humana Press, 1992, p 135-158.
19. Kastner A, Hirsch EC, Lejeune O, Javoy-Agid F, Rascol O, Agid Y. Is the vulnerability of neurons in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease related to their neuromelanin content? *J Neurochem* 1992, 59:1080-1089.

20. Kumar MVS, Desiraju T. Effects of chronic manganese exposure on rat brain regional biogenic amines and GABA/glutamate system. *Biog Amines* 1992, 8:79-83.
21. Kurth JH, Kurth MC, Poduslo SE, Schwankhaus JD. Association of a monoamine oxidase B allele with Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1993, 33:368-372.
22. Lange KW. Behavioural effects and supersensitivity in the rat following intranigral MPTP and MPPP+ administration. *Eur J Pharmacol* 1990, 175:57-61.
23. Luthman J, Friedemann M, Bickford P, Olson L, Hoffer BJ, Gerhardt GA. In vivo electrochemical measurements and electrophysiological studies of rat striatum following neonatal 6-hydroxydopamine treatment. *Neuroscience* 1993, 52:677-687.
24. Parenti M, Flauto C, Parati E, Vescovi A, Groppetti A. Manganese neurotoxicity: effects of L-dopa and pargyline treatments. *Brain Res* 1986, 367:8-13.
25. Pasinetti GM, Osterburg HH, Kelly AB, Kohama S, Morgan DG, Reinhard JF Jr., Stellwagen RH, Finch CE. Slow changes of tyrosine hydroxylase gene expression in dopaminergic brain neurons after neurotoxin lesioning: a model for aging. *Molec Brain Res* 1992, 13:63-73.
26. Segovia J, Tillakaratne NJK, Whelan K, Tobin AJ, Gale K. Parallel increase in striatal glutamic acid decarboxylase activity and mRNA levels in rats with lesions of the nigrostriatal pathway. *Brain Res* 1990, 529:345-348.
27. Stone R. Guam: deadly disease dying out. *Science* 1993, 261:424-426.
28. Tanner CM. The role of environmental toxins in the etiology of the Parkinson's disease. *TINS* 1989, 12:49-54.
29. Tetrad JW, Langston JW. MPTP-induced parkinsonism a model for Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 1989, 126:35-40.
30. Tripton KF, Singer TP. Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds. *J Neurochem* 1993, 61:1191-1206.
31. Ungerstedt U. Post-synaptic supersensitivity after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigrostriatal dopamine system. *Acta Physiol Scand* 1971 Suppl, 367:69-93.
32. Zigmond MJ, Stricker EM. Animals models of parkinsonism using selective neurotoxins: clinical and basic implications. *Internat Rev Neurobiol* 1989, 31:1-79.
33. Wang JD, Huang CC, Wang YHH, Chiang JR, Lin JM, Chen JS. Manganese induced parkinsonism: an outbreak due to an unrepaired ventilation control system in a ferromanganese smelter. *Brit J Industr Med* 1989, 46:856-859.