

MICHELE LIMA GREGÓRIO

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO ROTATÓRIO INDUZIDO POR DIFERENTES
SUBSTÂNCIAS EM RATOS COM LESÃO INDUZIDA POR 6-OHDA NO FEIXE
PROSENCEFÁLICO MEDIAL (FPM)**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio da Cunha

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Ap. B. F. Vital

**CURITIBA
Abril, 2007**

**Esta dissertação de Mestrado foi realizada no Departamento de
Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do
Paraná, com apoio financeiro do CNPq**

“Se as coisas são inatingíveis...
ora!
Não é motivo para não querê-las
Que tristes os caminhos, se não
fora
A mágica presença das estrelas!”

(Mário Quintana)

Esta dissertação é dedicada
ao meu irmão Leonardo V. L. Gregório,
aos meus pais Devanir Gregório e Maria Ap. V. L. Gregório.
a todos os meus amigos de Mirassol que sempre me apoiaram,
especialmente Débora, Ana Longhi, João Vítor e Nilton
e a todos os amigos que fiz durante o mestrado.

O meu muito obrigada à vocês
que sempre me deram força para continuar,
com muito amor e confiança.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Cláudio da Cunha, agradeço por sua dedicação, atenção e respeito durante os anos de orientação, desde a graduação até o mestrado. Seus conselhos e ensinamentos sempre dados com interesse em ensinar contribuíram ao meu desejo de aprender cada vez mais. Muito obrigada por ser orientador e amigo.

À Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida B. F. Vital pela atenção, amizade e ensinamentos, profissionais e pessoais, durante todo o mestrado. Atenciosa e dedicada, como quem ama o trabalho, sempre estava pronta a ajudar. Caminhar ao seu lado foi imprescindível. Adoro você! Obrigada.

Ao meu amado irmão Leonardo que, mesmo distante, sempre se mostrou interessado pelo meu trabalho. Seu apoio tornou minha caminhada mais fácil e meus estudos mais prazerosos. Léo, amo você! Obrigada.

Aos meus pais por estarem sempre ao meu lado, com amor, dedicação e respeito. O carinho e confiança que me deram foram fundamentais na construção de mais uma parte importante de minha vida. Muito obrigada pelo respeito de vocês.

Aos demais professores do departamento de Farmacologia, muito obrigada pelo apoio diário durante o mestrado, auxiliando nas dúvidas e colaborando na elaboração do trabalho.

Aos queridos amigos do laboratório Scheila, Marcelinho, Léa, Mariza, Lucélia, Edmar, Evellyn, Patrícia, Jeff, Vinícius, Suelen, Nádia, Ângela, Marcelo, Inara, André, agradeço pelo carinho, ajuda durante os experimentos e amizade de sempre. Serão sempre lembrados. Obrigada.

Aos amigos do mestrado que nunca serão esquecidos Jaqueline, Mariângela, Luciana, Fernanda, Amanda, Camila, Yara, Pamela, Plínio, Juliane, Evelise, Renata, Shirley, Eduardo, Stéfani e a todos os demais alunos da pós-graduação, agradeço pela amizade e companheirismo de sempre. Seria muito mais difícil esta vitória sem vocês. Obrigada!

À amiga e farmacêutica Sílvia, que sempre nos socorreu com alegria durante as dúvidas e necessidades. Obrigada pela dedicação ao seu trabalho e pela amizade.

À amiga e professora Suzana, sempre auxiliando nas correções dos trabalhos em inglês. Obrigada pelas dicas, conselhos e pela eterna amizade.

Aos amigos e funcionários do departamento de Farmacologia, S. Jorge, Lindacir e Nair pelo apoio de sempre. Obrigada mais uma vez.

À Alessandra e Cristiane, secretárias do departamento de Farmacologia, por toda a ajuda, alegria e conselhos durante o mestrado. Serão sempre lembradas com carinho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À todos, muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	i
LISTA DE FIGURAS	iii
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Doença de Parkinson	1
1.2. Modelos Animais da Doença de Parkinson	7
1.3. Comportamento de Rotação	11
1.4. Cafeína	13
1.5. Nicotina	17
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo Geral	19
2.2. Objetivos Específicos	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. Animais	20
3.2. Cirurgia	20
3.3. Desenho Experimental – Testes Comportamentais	22
3.3.1. Teste de rotação	22
3.3.2. Experimento 1 - rotação espontânea	23
3.3.3. Experimento 2 - rotação induzida por apomorfina	24
3.3.4. Experimento 3 - rotação induzida por cafeína	25
3.3.5. Experimento 4 - rotação induzida por nicotina aguda	25
3.3.6. Experimento 5 - rotação induzida por nicotina prolongada	26
3.3.7. Experimento 6 – análise neuroquímica	27
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
5. RESULTADOS	28
5.1. Experimento 1 - rotação espontânea	28
5.2. Experimento 2 - rotação induzida por apomorfina	30
5.3. Experimento 3 - rotação induzida por cafeína	33
5.4. Experimento 4 - rotação induzida por nicotina aguda	36

5.5. Experimento 5 - rotação induzida por nicotina prolongada.....	39
5.6. Experimento 6 – análise neuroquímica.....	45
6. DISCUSSÃO.....	46
7. CONCLUSÕES.....	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

3-OM-DOPA:	3-O-metildopa
3,4- DHBA:	ácido 3,4-dihidróxibenzóico
6 – OHDA:	6 – hidroxidopamina
AMPc:	ácido monofosfato cíclico
AP:	anteroposterior
APO:	apomorfina
ATV:	área tegmental ventral
A ₁ :	receptor adenosinérgico do subtipo A ₁
A _{2A} :	receptor adenosinérgico do subtipo A _{2A}
A _{2B} :	receptor adenosinérgico do subtipo A _{2B}
A ₃ :	receptor adenosinérgico do subtipo A ₃
Ca ²⁺ :	íon cálcio (cátion)
COMT:	catecol-O-metiltransferase
DA:	dopamina
D ₁ :	receptor dopaminérgico do subtipo D ₁
D ₂ :	receptor dopaminérgico do subtipo D ₂
D ₃ :	receptor dopaminérgico do subtipo D ₃
D ₄ :	receptor dopaminérgico do subtipo D ₄
D ₅ :	receptor dopaminérgico do subtipo D ₅
dopa:	L-di-hidroxifenilalanina
DP:	doença de Parkinson
DV:	dorsoventral
D ₁ :	receptor dopaminérgico do subtipo D ₁
D ₂ :	receptor dopaminérgico do subtipo D ₂
DOPAC:	ácido dihidróxifenilacético
EC:	detecção eletroquímica
FPM:	feixe prosencefálico medial
GABA:	ácido γ-aminobutírico
GP:	globo pálido

GPe:	globo pálido externo
GPi:	globo pálido interno
HPLC:	cromatografia líquida de alta resolução
HVA:	ácido homovanílico
i.m.:	intramuscular
i.p.:	intraperitoneal
L-DOPA:	levodopa ou 3,4-dihidroxifenilalanina
L:	lateral
MAO-B:	monoamino oxidase B
MPP ⁺ :	1-metil-4-fenilpiridínio
MPTP:	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NB:	núcleos da base
NST:	núcleo subtalâmico
RNA _m :	ácido ribonucléico mensageiro
s.c.:	subcutâneo
SN:	substância negra
SNc:	substância negra parte compacta
SNr:	substância negra parte reticulata
TH:	tirosina hidroxilase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Lesão da substância negra pars compacta com a neurotoxina 6-OHDA (UNGERSTEDT, 1968, 1971c; UNGERSTEDT e ARBUTHNOTT, 1970).

Figura 2: Diagrama simplificado ilustrando as conexões anatômicas dentro do circuito dos núcleos da base, e as mudanças na atividade dos núcleos dos núcleos da base associadas com o desenvolvimento de parkinsonismo. GPe, globo pálido externo; STN, núcleo subtalâmico; GPi, globo pálido interno; SNr, substância negra parte reticulada; SNc, substância negra parte compacta; PPN, núcleo pedúnculo pontino; CM, núcleo centro-mediano do tálamo; VA, núcleo ventro-anterior do tálamo; VL, núcleo ventrolateral do tálamo. Setas vermelhas representam as conexões excitatórias, setas pretas identificam as conexões inibitórias (GABAérgicas). Mudanças na largura das setas indicam mudanças de atividade (WICHMANN e DELONG, 2006).

Figura 3: Representação esquemática do comportamento rotatório de ratos unilateralmente lesados com 6-OHDA após desafio com agonista indireto (A) ou direto (B) dos receptores dopaminérgicos (UNGERSTEDT, 1968, 1971c; UNGERSTEDT e ARBUTHNOTT, 1970).

Figura 4: Representação esquemática de secção coronal do cérebro de rato demonstrando a região de infusão de 6-OHDA (PAXINOS e WATSON, 2005).

Figura 5: Recipiente utilizado para estudo do comportamento rotatório.

Figura 6: Observação do número de rotações espontâneas (administração de salina) sobre número de rotações ipsilaterais e contralaterais de ratos controle, sham e unilateralmente lesados com 6-OHDA um dia após a cirurgia. Os valores representam a média $\pm$ EPM do número de rotações ipsilaterais (valores positivos) e contralaterais (valores negativos) observados durante 30 min após o desafio com salina (0,0). $\neq p < 0,05$ comparado aos grupos controle e sham. ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls.

Figura 7: Observação do número de rotações espontâneas (administração de salina) sobre número de rotações ipsilaterais e contralaterais de ratos controle, sham e unilateralmente lesados com 6-OHDA sete dias após a cirurgia. Os valores representam a média $\pm$ EPM do número de rotações ipsilaterais (valores positivos) e contralaterais (valores negativos) observados durante 30 min após o desafio

com salina (0,0). $\neq p < 0,05$ comparado aos grupos controle e sham. ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls.

Figura 8: Efeito da administração de apomorfina sobre número de rotações ipsilaterais e contralaterais de ratos unilateralmente lesados com 6-OHDA. Os valores representam a média $\pm$ EPM do número de rotações ipsilaterais (valores positivos) e contralaterais (valores negativos) observados durante 30 min após o desafio com salina (0,0) ou apomorfina (s.c.). $\square p < 0,05$ comparado aos grupos que não foram lesados com 6-OHDA; $\neq p < 0,05$ comparado ao grupo 6-OHDA desafiado com salina. ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls.

Figura 9: Efeito da administração da mesma dose de apomorfina (0,1 mg/kg) (segundo dia) sobre número de rotações ipsilaterais e contralaterais de ratos unilateralmente lesados com 6-OHDA. Os valores sob o eixo das abcissas correspondem às doses de apomorfina (mg/kg) administradas aos animais no dia anterior ao teste. No dia do teste todos os animais receberam o mesmo desafio de apomorfina (0,1 mg/kg). Os valores das barras representam a média $\pm$ EPM do número de rotações ipsilaterais (valores positivos) e contralaterais (valores negativos) observados durante 30 min após o desafio com apomorfina. $\square p < 0,05$ comparado aos grupos que não foram lesados com 6-OHDA; $\neq p < 0,05$ comparado ao grupo 6-OHDA que no dia anterior foi desafiado com salina. ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls.

Figura 10: Efeito da administração de cafeína sobre número de rotações ipsilaterais e contralaterais de ratos unilateralmente lesados com 6-OHDA. Os valores representam a média $\pm$ EPM do número de rotações ipsilaterais (valores positivos) e contralaterais (valores negativos) observados durante 30 min após o desafio com salina (0,0) ou cafeína (s.c.). $\square p < 0,05$ comparado aos grupos que não foram lesados com 6-OHDA; $\neq p < 0,05$ comparado ao grupo 6-OHDA desafiado com salina. ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls.

Figura 11: Efeito da administração da mesma dose de apomorfina (0,1 mg/kg) (segundo dia) sobre número de rotações ipsilaterais e contralaterais de ratos unilateralmente lesados com 6-OHDA. Os valores sob o eixo das abcissas correspondem às doses de cafeína administradas aos animais no dia anterior ao teste. No dia do teste todos os animais receberam o mesmo desafio de apomorfina (0,1 mg/kg). Os valores das barras representam a média $\pm$ EPM do número de rotações ipsilaterais (valores positivos) e contralaterais (valores negativos) observados durante 30 min após o desafio com apomorfina. $\square p < 0,05$ comparado aos grupos que não foram lesados com 6-OHDA; $\neq p < 0,05$ comparado ao grupo 6-OHDA que no dia anterior foi desafiado com salina. ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls.

Figura 12: Efeito da administração de nicotina sobre número de rotações ipsilaterais e contralaterais de ratos unilateralmente lesados com 6-OHDA. Os valores representam a média $\pm$ EPM do número de rotações ipsilaterais (valores positivos) e contralaterais (valores negativos) observados durante 30 min após o desafio com salina (0,0) ou nicotina (s.c.). $\square$ $p < 0,05$ comparado aos grupos controle, sham e 6-OHDA desafiado com salina no dia do teste. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman Keuls.

Figura 13: Efeito da administração da mesma dose de apomorfina (0,1 mg/kg) (segundo dia) sobre número de rotações ipsilaterais e contralaterais de ratos unilateralmente lesados com 6-OHDA. Os valores sob o eixo das abscissas correspondem às doses de nicotina administradas aos animais no dia anterior ao teste. No segundo dia de teste todos os animais receberam o mesmo desafio de apomorfina (0,1 mg/kg). Os valores das barras representam a média $\pm$ EPM do número de rotações ipsilaterais (valores positivos) e contralaterais (valores negativos) observados durante 30 min após o desafio com apomorfina. $\square$ $p < 0,05$ comparado aos grupos que não foram lesados com 6-OHDA; $\neq$ $p < 0,05$ comparado ao grupo 6-OHDA que no dia anterior foi desafiado com salina. ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls.

Figura 14: Efeito da administração prolongada de nicotina (0,5 mg/kg) sobre número de rotações ipsilaterais e contralaterais de ratos unilateralmente lesados com 6-OHDA. Os valores representam a média $\pm$ EPM do número de rotações ipsilaterais (valores positivos) e contralaterais (valores negativos) observados durante 30 min após o desafio com salina (0,0) ou apomorfina (s.c.). $\square$ $p < 0,05$ comparado ao grupo salina (controle, sham e aos animais lesados com 6-OHDA desafiados com salina). ANOVA de uma via seguido do teste de Newman Keuls.

Figura 15: Efeito da administração da mesma dose de apomorfina (0,1 mg/kg) (segundo dia) sobre número de rotações ipsilaterais e contralaterais de ratos unilateralmente lesados com 6-OHDA tratados com nicotina (0,5 mg/kg) prolongada durante cinco dias. Os valores sob o eixo das abscissas correspondem às doses de nicotina administrada aos animais no dia anterior ao teste. No dia do teste todos os animais receberam o mesmo desafio de apomorfina (0,1 mg/kg). Os valores das barras representam a média $\pm$ EPM do número de rotações ipsilaterais (valores positivos) e contralaterais (valores negativos) observados durante 30 min após o desafio com apomorfina. $\neq$ $p < 0,05$ comparado aos grupos controle e sham que no dia anterior foram desafiados com salina. ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls.

Figura 16: Efeito da administração aguda e prolongada de nicotina (0,5 mg/kg) sobre o comportamento rotatório de ratos unilateralmente lesados com 6-OHDA. Os tratamentos agudos ocorreram 7 ou 14 dias após a lesão com 6-OHDA. O tratamento crônico foi aplicado 1 vez ao dia entre os dias 14-18. Os valores das barras representam a média $\pm$ EPM do número de rotações ipsilaterais (valores positivos) e contralaterais (valores negativos) observados durante 30 min após o último desafio com apomorfina. $\square$ $p < 0,05$ comparado aos grupos que não foram lesados com 6-OHDA; $\neq$ $p < 0,05$ comparado ao grupo 6-OHDA que no dia anterior foi desafiado com salina. ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls.

Figura 17: Efeito da administração da mesma dose de apomorfina (0,1 mg/kg) (segundo dia) sobre número de rotações ipsilaterais e contralaterais de ratos unilateralmente lesados com 6-OHDA, após tratamento agudo ou prolongado com nicotina (0,5 mg/kg). Os tratamentos agudos ocorreram sempre 1 dia antes do teste aplicado 7 ou 14 dias após a lesão com 6-OHDA. O tratamento prolongado foi aplicado nos 5 dias anteriores ao teste aplicado 18 dias após a lesão com 6-OHDA. Os valores sob o eixo das abscissas correspondem às doses de nicotina administradas aos animais no dia anterior ao teste. No dia do teste todos os animais receberam o mesmo desafio de apomorfina (0,1 mg/kg). Os valores das barras representam a média $\pm$ EPM do número de rotações ipsilaterais (valores positivos) e contralaterais (valores negativos) observados durante 30 min após o desafio com apomorfina. $\square$ $p < 0,05$ comparado aos grupos que não foram lesados com 6-OHDA; $\neq$ $p < 0,05$ comparado ao grupo 6-OHDA que no dia anterior foi desafiado com salina; ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls.

Figura 18: Dosagem de catecolaminas dopamina (DA), ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) e de ácido homovanílico (HVA) no estriado ipsilateral e contralateral a lesão com 6-OHDA no FPM. Os valores são dados em ng/g de tecido. $\square$ $p < 0,05$ em relação ao lado contralateral a lesão. ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls.

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é a mais comum desordem neurodegenerativa relacionada ao movimento e a sua incidência aumenta com o passar dos anos (GIASSON e LEE, 2003). Pacientes com a doença de Parkinson exibem sintomas clínicos clássicos como bradicinesia – movimentos lentos, tremor de repouso, rigidez muscular e instabilidade postural (GIASSON e LEE, 2003). Os principais distúrbios motores da doença de Parkinson devem-se a uma extensa perda de neurônios dopaminérgicos da substância negra parte compacta (SNc). O presente estudo foi desenvolvido com um modelo animal desta doença onde ratos Wistar machos adultos foram unilateralmente lesados no feixe prosencefálico medial (FPM) com a neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA). O modelo animal da DP com uso de 6-OHDA é muito usado para estudo de possíveis drogas antiparkinsonianas. Após uma semana, estes animais foram testados para observação do comportamento rotatório após administração subcutânea de apomorfina (APO), um agonista direto dos receptores dopaminérgicos, cafeína e nicotina, substâncias com potencial terapêutico para tratar os sintomas motores da doença de Parkinson. Em seguida ao teste de rotação, os animais tiveram seus cérebros retirados e processados para análise neuroquímica.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the most common neurodegenerative disease related to movement, and its prevalence increases along the years. PD patients exhibit classical clinical symptoms including bradykinesia (slowed movement), resting tremor, rigidity, and postural instability (GIASSON e LEE, 2003). The major motor disturbances of PD are due to a significant loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNc). The present study was developed with an animal model of PD using adult male Wistar rats with 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced lesions on the medial forebrain bundle (MFB). Such model is broadly used in the study of feasible antiparkinsonian drugs. One week after surgery, the animals were tested and their turning behavior was observed after subcutaneous (s.c.) administration of apomorphine, a direct agonist of dopaminergic receptors, caffeine or nicotine, drugs with therapeutic potential to treat the motor symptoms of PD. After the turning behavior test, the animals had their brains removed and processed for neurochemistry analysis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Parkinson

A doença de Parkinson é a mais comum desordem do movimento e a segunda, depois da doença de Alzheimer, onde há uma neurodegeneração relacionada à idade (FAHN e PRZEDBORSKI, 2000; MAYEUX, 2003; FAHN e SULZER, 2004). Esta doença afeta aproximadamente 1% da população com mais de 55 anos (BARNEOUD *et al.*, 1995). James Parkinson (1817) descreveu esta doença pela primeira vez como “paralisia agitante”, a qual hoje leva seu nome.

Apesar da etiologia desconhecida, a doença de Parkinson é caracterizada pela depleção maciça da dopamina (DA) estriatal como resultado da degeneração dos neurônios dopaminérgicos da substância negra (SN) (RADAD *et al.*, 2005).



Figura 1: Lesão da substância negra pars compacta com a neurotoxina 6-OHDA (UNGERSTEDT, 1968, 1971c; UNGERSTEDT e ARBUTHNOTT, 1970).

Os tipos e a severidade dos sinais da doença de Parkinson dependem tanto da duração quanto do início da doença (DEUMENS *et al.*, 2002). Os sinais motores incluem: bradicinesia, acinesia, tremor de repouso, rigidez muscular, distúrbios do equilíbrio e da marcha, anormalidades posturais (DELFINO *et al.*, 2004) além da existência de déficits cognitivos da doença (DA CUNHA *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2005; FERRO *et al.*, 2005; DA CUNHA *et al.*, 2003; MIYOSHI *et al.*, 2002) e outros como depressão, alterações do sono e distúrbios no sistema nervoso autônomo (FLINT, 2001).

As alterações do movimento podem ser divididas em sinais positivos e em sinais negativos. Os sinais positivos podem ser definidos como comportamentos geralmente não observados em pessoas normais, saudáveis: tremor de repouso, rigidez muscular e movimentos involuntários devido ao tratamento com 3,4-dihidroxifenilalanina (levodopa ou L-DOPA). Os sinais negativos geralmente são déficits na perda da função motora normal, como a bradicinesia (movimentos lentos) e as alterações posturais (KOLB e WHISHAW, 1990).

Os primeiros sinais motores da doença só aparecerem após a perda de cerca de 50-60% dos neurônios dopaminérgicos da SN e de quase 80 % dos aferentes dopaminérgicos ao estriado (KIRIK *et al.*, 1998). Isto demonstra a existência de mecanismos compensatórios, que fornecem um nível razoável de DA ao estriado mesmo após uma grande perda de neurônios dopaminérgicos. Assim, o diagnóstico da doença de Parkinson só pode ser feito após algum tempo do início da doença (HORNYKIEWICZ, 1986).

A DA possui um papel fundamental na manutenção da estabilidade da rede dos núcleos da base (NB) e é essencial para a seleção e processamento da atividade neuronal associada com o movimento normal (OLANOW *et al.*, 2006). A situação muda em um estado sem inervação dopaminérgica. A perda dos neurônios dopaminérgicos nigrais prejudica a modulação dopaminérgica da atividade corticoestriatal (CALABRESI, 1993). O déficit de DA estriatal pode ser inicialmente compensado por uma dessensibilização do transportador de DA, maior sensibilidade do receptor pós-sináptico e mudanças no disparo no núcleo subtalâmico (NST) e no globo pálido interno (Gpi). Estas compensações podem explicar o intervalo entre o

início da neurodegeneração e dos sinais da doença (ZIGMOND, 1997; BEZARD *et al.*, 2001).

Os NB são um termo coletivo utilizado para descrever um grupo de núcleos subcorticais interconectados que fornece um alça de feedback a muitas áreas diferentes no córtex e influências descendentes a regiões motoras do tronco cerebral (ROUSE *et al.*, 2000) e este seu papel é evidenciado na doença de Parkinson. O principal aferente excitatório aos NB é o córtex motor. O córtex envia projeções excitatórias ao estriado, o principal núcleo de entrada dos NB. Fibras corticoestriatais fazem sinapse com neurônios GABAérgicos (contendo o neurotransmissor ácido γ -aminobutírico - GABA) de projeção estriatal chamados neurônios médios espinhosos estriatais devido a presença de muitos espinhos dendríticos na sua morfologia. Estes neurônios de projeção podem ser divididos em duas classes funcionais. Uma parte destes neurônios projetam-se aos núcleos de saída dos NB, o GPi e a substância negra parte reticulata (SNr) (SMITH and BOLAM, 1990). Esta é a via direta e fornece um controle inibitório direto sobre os núcleos de saída dos NB. O controle inibitório sobre as células GABAérgicas de saída do GPi/SNr fornecido pela via direta leva a uma desinibição das células talamocorticais (ROUSE *et al.*, 2000).

A outra parte dos neurônios médios espinhosos estriatais participa de uma projeção multisináptica conhecida como via indireta. Estes neurônios que originam a via indireta projetam-se para o globo pálido externo (GPe) e inibem as células GABAérgicas deste núcleo. Estas células normalmente exercem um controle inibitório tônico sobre as células glutamatérgicas do núcleo subtalâmico (NST), mas a ativação da via GABAérgica estriatopalidal leva a uma desinibição do NST. Isso permite uma transmissão excitatória entre o NST e os núcleos de saída dos NB, o GPi/SNr, desta maneira inibindo as células talamocorticais (BERGMAN *et al.*, 1990; DELONG, 1990).

As vias direta e indireta dos NB atuam como um mecanismo de fino ajuste no controle do movimento. O balanço da transmissão através destas vias é fortemente regulado por uma projeção modulatória principal a partir dos neurônios dopaminérgicos da substância negra parte compacta (SNc). Esta entrada dopaminérgica ao estriado regula diferentemente as vias direta e indireta devido à

presença de diferentes receptores dopaminérgicos pós-sinápticos (ROUSE *et al.*, 2000).

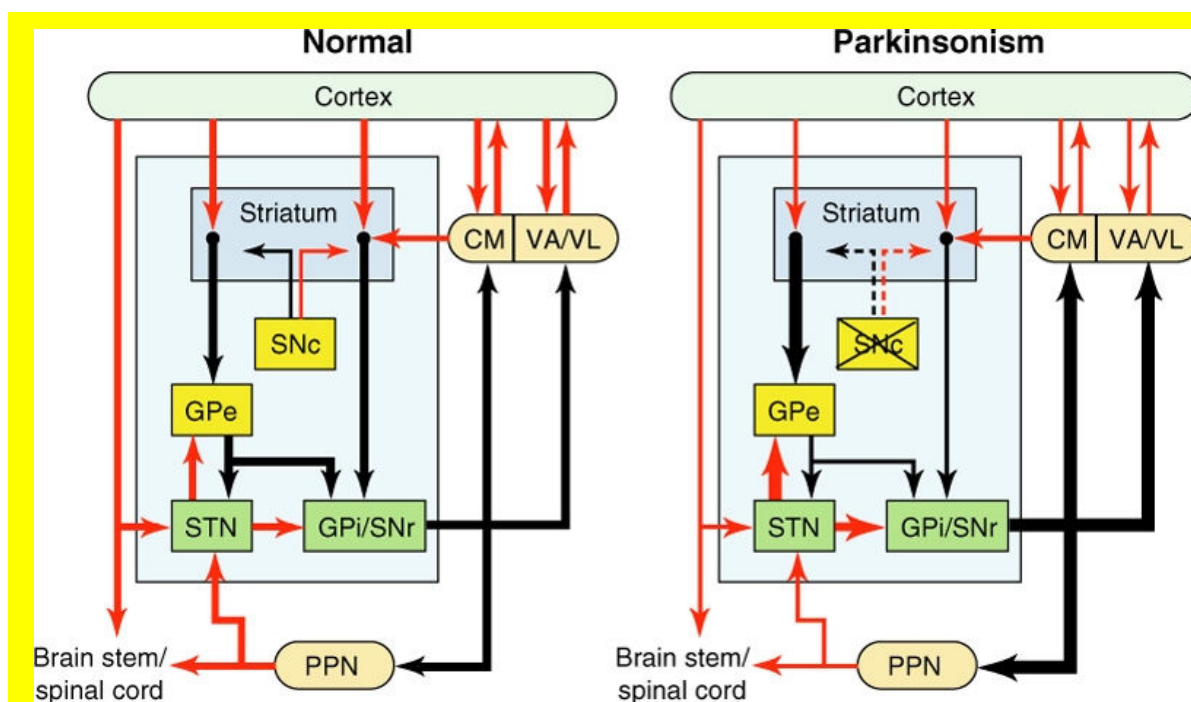


Figura 2: Diagrama simplificado ilustrando as conexões anatômicas dentro do circuito dos núcleos da base, e as mudanças na atividade dos núcleos dos núcleos da base associadas com o desenvolvimento de parkinsonismo. GPe, globo pálido externo; STN, núcleo subtalâmico; GPi, globo pálido interno; SNr, substância negra parte reticulada; SNc, substância negra parte compacta; PPN, núcleo pedúnculo pontino; CM, núcleo centro-mediano do tálamo; VA, núcleo ventro-anterior do tálamo; VL, núcleo ventrolateral do tálamo. Setas vermelhas representam as conexões excitatórias, setas pretas identificam as conexões inibitórias (GABAérgicas). Mudanças na largura das setas indicam mudanças de atividade (WICHMANN e DELONG, 2006).

Existem cinco tipos de receptores de DA, que podem ser subdivididos em receptores D₁ (subtipos D₁ e D₅) e em D₂ (subtipos D₂, D₃ e D₄) de acordo com suas propriedades funcionais, farmacológicas e homologia de sequência (SOKOLOFF e SCHWARTZ, 1995; HURLEY e JENNER, 2006). Os receptores dopaminérgicos estão espalhados no cérebro, onde cada subtipo apresenta uma distribuição particular.

A subfamília dos receptores D₁ está positivamente acoplada a adenilato ciclase enquanto que a subfamília D₂ está negativamente acoplada a adenilato ciclase (NEVE *et al.*, 2004; JOYCE e MILLAN, 2005).

Os receptores dopaminérgicos D₁ apresentam uma ampla distribuição e uma grande densidade no cérebro em relação aos demais receptores dopaminérgicos. Sua proteína tem sido identificada por métodos de radioligantes, autoradiografia (AUGOOD *et al.*, 2000; HURLEY *et al.*, 2001) e imunohistoquímica (LEVEY *et al.*, 1993) em cérebro humano *post-mortem*. São principalmente encontrados nos neurônios médios espinhosos estriatais GABAérgicos no estriado dorsal, os quais se projetam ao GPi e SNr (via direta) (AUBERT *et al.*, 2000).

Poucos estudos têm examinado a distribuição dos receptores D₅ no cérebro humano e os estudos existentes se limitam a algumas regiões cerebrais (HURLEY e JENNER, 2006). Estes receptores apresentam uma distribuição mais restrita do que os receptores D₁. Através de estudos imunohistológicos, observou-se no estriado dorsal baixos níveis de imunorreatividade do RNAm do receptor D₅, enquanto que grandes níveis foram constatados no estriado ventral e área septal (KHAN *et al.*, 2000).

A distribuição dos receptores dopaminérgicos D₂ no cérebro é semelhante aquela dos receptores D₁ (HURLEY e JENNER, 2006). A proteína deste receptor tem sido identificada por radioligantes, autoradiografia (GUREVICH e JOYCE, 1999) e por imunohistoquímica (LEVEY *et al.*, 1993) em cérebros *post-mortem*. As maiores densidades são encontradas nos dendritos dos neurônios GABAérgicos estriadopalidais no estriado dorsal. Pequenas quantidades foram observadas no estriado ventral.

O receptor dopaminérgico D₃ tem uma distribuição mais restrita que o D₂. Os maiores níveis de proteína deste receptor foram encontrados no estriado ventral (GUREVICH e JOYCE, 1999; HURLEY e JENNER, 2006).

A distribuição dos receptores D₄ é diferente daquela dos receptores da família D₂ e se assemelha à distribuição dos receptores da família D₁, onde grandes quantidades são encontradas em regiões corticais e extraestriatais, com pequena expressão em regiões estriatais (HURLEY e JENNER, 2006).

No estriado, os receptores dopaminérgico D₁ e D₂ localizam-se principalmente nos dendritos dos neurônios GABAérgicos estriatopálidais, os quais recebem aferências de neurônios dopaminérgicos da SNc. Os receptores D₁ também são encontrados nos terminais de projeção glutamatérgicos do córtex ao tálamo e também em neurônios GABAérgicos que inervam o GPi e SNr (via direta). Os receptores apresentam altos níveis de expressão nos neurônios GABAérgicos que inervam o GPe (via indireta) (AUBERT *et al.*, 2000).

A DA atua pós-sinapticamente para estabilizar a taxa de disparo e excitabilidade dos neurônios estriatais. A DA inibe (via receptores dopaminérgicos do subtipo D₂) e facilita (via receptores dopaminérgicos do subtipo D₁) a atividade dos neurônios estriatopálidais (GUZMAN *et al.*, 2003). Neurônios espinhosos médios usualmente expressam tanto receptores D₁ quanto D₂, os quais dão origem a projeções que formam as vias estriatopálidais direta e indireta, respectivamente, embora haja um cross-talk considerável entre estes sistemas os quais provavelmente não são totalmente segregados (KITA, 1993; LEVESQUE e PARENT, 2005). A facilitação do movimento está associada com uma atividade aumentada na via direta e uma atividade reduzida na via indireta (ALBIN *et al.*, 1989; DELONG, 1990; OBESO *et al.*, 2000a,b). A DA facilita a atividade em neurônios contendo receptores D₁ os quais possuem efeito inibitório no globo pálido (GP) e inibe a atividade em neurônios contendo receptores D₂ os quais levam a uma excitação do GP (WEST e GRACE, 2002).

A reposição de DA é a principal abordagem médica para se tratar os sintomas motores da doença de Parkinson (CHEN *et al.*, 2005). A apomorfina é um agonista dos receptores dopaminérgicos, que apresente curta-duração de ação e é não seletiva

aos subtipos dos receptores D₁ e D₂ e foi o primeiro agonista dopaminérgico usado no tratamento da DP (DELEU *et al.*, 2004), mas hoje foi substituído clinicamente por agonistas D₂ mais seletivos como o pramiprexol, entre outros.

O tratamento padrão para a doença de Parkinson se baseia no uso de agonistas do receptor dopaminérgico e/ou L-DOPA juntamente com um inibidor da descarboxilase periférica (MATSUBARA *et al.*, 2006). A maioria dos pacientes com doença de Parkinson se beneficia do tratamento com o precursor da dopamina, L-DOPA (PINNA *et al.*, 2005). Não existem dúvidas acerca da sua efetividade em tratar os sinais e sintomas da doença de Parkinson. Contudo, a resposta a longo-prazo deste tratamento L-DOPA torna-se repleta de complicações, como discinesias (movimentos involuntários anormais) e flutuações motoras (oscilações no desempenho de movimentos), as quais contribuem às alterações motoras dos pacientes nos estágios avançados da doença de Parkinson (METMAN, 2002; KOPIN *et al.*, 2003). Estas mudanças na resposta a L-DOPA são denominadas complicações motoras (METMAN, 2002).

Para melhorar este quadro, diversas drogas com ação dopaminérgica foram então desenvolvidas e estudadas para manterem a eficácia da terapia a longo-prazo da L-DOPA. No entanto, os déficits motores observados são devidos a um desbalanço na atividade das vias direta e indireta dos núcleos da base (NB) (ALBIN *et al.*, 1989; BERGMAN *et al.*, 1990; DELONG *et al.*, 1990).

Uma alternativa seria uma terapia não-dopaminérgica, cujo alvo seria um receptor não-dopaminérgico, para a modulação das vias eferentes dos núcleos da base (SHIOZAKI *et al.*, 1999).

1.2. Modelos Animais da Doença de Parkinson

A manipulação experimental dos sistemas neuronais permite o estudo das relações existentes entre o cérebro e o comportamento (SCHWARTING e HUSTON, 1996). Portanto, foram desenvolvidas diversas técnicas para que fosse possível este tipo de estudo.

Os modelos animais da doença de Parkinson são necessários para estudar os possíveis mecanismos patológicos da doença e são essenciais ao desenvolvimento e testes de novas estratégias terapêuticas (DEUMENS *et al.*, 2002). Para mimetizar a doença de Parkinson, o modelo animal deve mimetizar tanto a perda dos neurônios dopaminérgicos quanto os déficits comportamentais da mesma (DEUMENS *et al.*, 2002).

Os modelos animais de parkinsonismo induzidos por toxinas são importantes meios de se estudar a fisiopatologia desta doença (HODAIE *et al.*, 2007). As toxinas mais freqüentemente utilizadas para produção de tais modelos animais são o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) e a 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (IANCU *et al.*, 2005; DAUER e PRZEDBORSKI, 2003).

Embora a neurotoxina MPTP seja um modelo já validado da doença de Parkinson em camundongos e primatas não humanos, ela apresenta algumas limitações (IANCU *et al.*, 2005). A administração de MPTP provoca uma síndrome parkinsoniana bilateral enquanto todos os testes comportamentais se baseiam em lesões unilaterais. Além disso, uma recuperação espontânea dos sintomas parkinsonianos ocorre tanto em macacos (EIDELBERG *et al.*, 1986; TAYLOR *et al.*, 1997), como em camundongos (SEDELIS *et al.*, 2000, 2001) após lesão com MPTP, o que impede a avaliação dos efeitos terapêuticos de uma droga (IANCU *et al.*, 2005).

Em contrapartida, a 6-OHDA permitiu a produção de um ótimo modelo da doença de Parkinson (HEIKKILA *et al.*, 1989) já que ratos unilateralmente lesados com esta neurotoxina são úteis como modelo de hemiparkinsonismo, permitindo o estudo das funções relacionadas à DA e também avaliar o tratamento da doença de Parkinson (INAJI *et al.*, 2005). A 6-OHDA destrói seletivamente os neurônios catecolaminérgicos e é geralmente administrada unilateralmente, uma vez que injeções bilaterais ocasionam uma elevada mortalidade dos animais (IANCU *et al.*, 2005).

A 6-OHDA foi a primeira neurotoxina descoberta a ter efeitos específicos nas vias catecolaminérgicas, sendo usada para obtenção de modelos animais da doença de Parkinson (UNGERSTEDT, 1968, 1971a,b). Administrada sistemicamente, é incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica e, para atingir a via dopaminérgica nigroestriatal, deve ser injetada intracerebralmente na SN, no trato nigroestriatal ou no

estriado (PERESE *et al.*, 1989; KAAKKOLA e TERÄVÄINEN, 1990; PRZEDBORSKI *et al.*, 1995; SCHWARTING e HUSTON, 1996).

A 6-OHDA é uma neurotoxina específica para neurônios catecolaminérgicos, tanto no sistema nervoso central quanto periférico (MA *et al.*, 2006) e sua neurotoxicidade ocorre através do desacoplamento da fosforilação oxidativa da mitocôndria, o que resulta na privação de energia para as células neuronais que, incapazes de realizarem suas funções fisiológicas normais, morrem (GLINKA *et al.*, 1996, 1997; BLUM *et al.*, 2001). Além disso, sua neurotoxicidade tem sido associada à sua auto-oxidação em pH neutro com produção de peróxido de hidrogênio, hidroxil e radicais superóxido (KUMAR *et al.*, 1995; TIFFANY-CASTIGLIONI *et al.*, 1982) os quais formam ligações covalentes com grupos nucleofílicos de macromoléculas que, conseqüentemente, aumentam sua toxicidade (IZUMI *et al.*, 2005).

A administração de 6-OHDA na SN ou no trato nigroestriatal promove uma destruição imediata e quase completa dos neurônios dopaminérgicos da SNc e uma lesão menos extensa dos neurônios presentes na área tegmental ventral (ATV), resultando na depleção do conteúdo de DA estriatal (MARIN *et al.*, 2006). Cerca de 80-90% de perda de DA estriatal é obtida após administração de 6-OHDA na SN ou no feixe prosencefálico medial (FPM), produzindo um modelo do estágio severo e avançado da doença de Parkinson e que é usado para investigar novas estratégias terapêuticas, como o implante de células e terapia gênica (BJÖRKLUND, 1991, 2002; JIANG *et al.*; 1993; BEAL, 2001; DEUMENS *et al.*, 2002).

A administração intracerebral de 6-OHDA permitiu o estudo da fisiologia dos neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo, possibilitando a análise e o entendimento de suas relações com os NB, seu papel no comportamento além de estudar os possíveis tratamentos para a doença de Parkinson como citado anteriormente (SCHWARTING e HUSTON, 1996), pois tem a vantagem de permitir, de uma maneira mais fácil, uma avaliação dos prejuízos motores em testes como rotação induzida por drogas (UNGERSTEDT e ARBUTHNOTT, 1970) e em testes motores espontâneos.

Lesões unilaterais com 6-OHDA no FPM destroem células dos grupos A9 (SNc) e A10 (VTA) (PERESE *et al.*, 1989) e resultam na perda quase total de DA no caudado-putâmen, supersensibilidade dos receptores dopaminérgicos pós-sinápticos no

caudado-putâmen ipsilateral e também no comportamento de rotação em resposta ao desafio com drogas dopaminérgicas (assimetria no comportamento motor) (SCHWARTING e HUSTON, 1996). Geralmente, os animais apresentam um comportamento de rotação em direção ao lado lesado (ipsilateral) após desafio com agonistas indiretos de DA (que causam liberação de DA) e em direção oposta a lesão (contralateral) após desafio com agonistas da DA ou com L-DOPA (UNGERSTEDT, 1976).

Estas lesões com 6-OHDA são geralmente unilaterais, permitindo a comparação das mudanças entre o hemisfério cerebral lesado (ipsilateral) e o intacto (contralateral), fornecendo desta maneira um controle interno da lesão. Também promovem a perda localizada da inervação dopaminérgica ao estriado e, portanto, uma lateralização do déficit do comportamento, o qual se relaciona a mudanças cerebrais (SCHWARTING e HUSTON, 1996).

Isso ocorre porque os agonistas indiretos criam um desbalanço na estimulação de receptores dopaminérgicos entre o estriado do lado lesado e não-lesado. As rotações ipsilaterais podem mesmo ser observadas em ratos com apenas 50% dos neurônios dopaminérgicos da SN (HEFTI *et al.*, 1980). Já as rotações contralaterais induzidas por agonistas dopaminérgicos diretos ou por L-DOPA ocorrem pela estimulação dos receptores dopaminérgicos supersensibilizados no estriado desnervado. Esta supersensibilidade ocorre apenas quando a maioria dos neurônios da SN contendo DA tiverem sido degenerados (HEFTI *et al.*, 1980; DEUMENS *et al.*, 2002).

Esta supersensibilidade é uma reação dopaminérgica característica mediada pelo receptor dopaminérgico nos neurônios pós-sinápticos no estriado desnervado devido à perda de DA (SCHWARTING e HUSTON, 1996), como o possível aumento do número do subtipo de receptor dopaminérgico D₂ estriatais. De acordo com estudos da literatura, esta supersensibilidade geralmente ocorre uma semana após a lesão com a neurotoxina 6-OHDA (SCHWARTING e HUSTON, 1996).

Desta maneira, o modelo animal da doença de Parkinson através do uso da 6-OHDA parece ser útil para avaliar as novas estratégias farmacológicas nesta desordem neurodegenerativa (ISHIDA *et al.*, 2005).

1.3. Comportamento de Rotação

Os primeiros experimentos de rotação foram feitos por UNGERSTEDT (1968) e UNGERSTEDT e ARBUTHNOTT (1970), os quais observaram que ratos com lesão unilateral com 6-OHDA apresentavam rotação em direção ao lado lesado (ipsilateral) assim como uma postura assimetricamente direcionada ao lado ipsilateral (MARSHALL *et al.*, 1974).

O comportamento de rotação tem sido bastante utilizado para avaliar a assimetria funcional de ratos com lesão unilateral com 6-OHDA (BALUCHNEJADMOJARAD e ROGHANI, 2004). Este modelo de lesão parcial da doença de Parkinson permite o estudo de tratamentos neuroprotetores e recuperação comportamental após intervenção terapêutica (OLSSON *et al.*, 1995).

A medida do comportamento de rotação é usada para descrever e determinar os efeitos das lesões unilaterais com 6-OHDA no comportamento. O comportamento de rotação é usado porque os dados da rotação são obtidos de maneira simples, barata, não exigem treinamento do animal e nem interação deste com o pesquisador. Além disso, a rotação pode ser analisada de maneira qualitativa e quantitativamente (SCHWARTING e HUSTON, 1996).

Quando estes animais são desafiados com agonistas diretos dos receptores dopaminérgicos como apomorfina, que estimula tanto o subtipo de receptor D₁ quanto D₂, eles apresentam um comportamento de rotação contralateral ao lado de grande atividade, ou seja, são observadas rotações contralaterais a lesão. Isso ocorre devido a uma estimulação induzida por desnervação dos receptores dopaminérgicos D₂ supersensibilizados no estriado lesado, sendo este comportamento de rotação usado como indicador quantitativo da função da DA pós-sináptica (SCHWARTING e HUSTON, 1996). A rotação contralateral induzida por apomorfina relaciona-se com alterações funcionais no receptor de dopamina, principalmente com o aumento de receptores D₂ no estriado desnervado (WADDINGTON *et al.*, 1979a,b).

Lesão do lado esquerdo

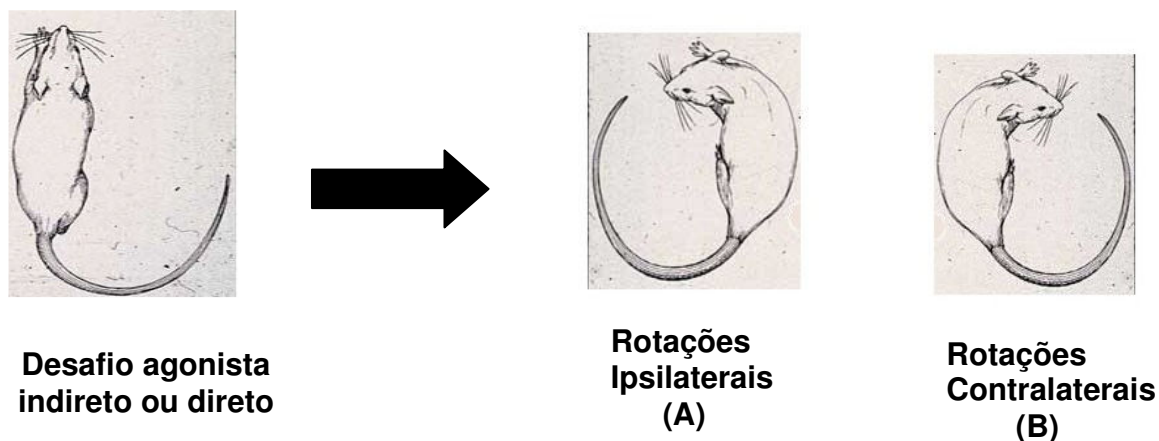


Figura 3: Representação esquemática do comportamento rotatório de ratos unilateralmente lesados com 6-OHDA após desafio com agonista indireto (A) ou direto (B) dos receptores dopaminérgicos (UNGERSTEDT, 1968, 1971c; UNGERSTEDT e ARBUTHNOTT, 1970).

De acordo com LANE *et al.* (2006) o comportamento de rotação no modelo unilateral da 6-OHDA apresenta um significado pato-fisiológico. As rotações contralaterais podem estar representando não apenas uma atividade antiparkinsoniana, mas indicam a habilidade em induzir discinesias além de serem usadas na avaliação do potencial farmacológico de candidatos a drogas antiparkinsonianas (HEIKKILA *et al.*, 1981; SCHNEIDER *et al.*, 1984; SCHWARTING e HUSTON, 1996). Todas as drogas atualmente utilizadas no tratamento sintomático da doença de Parkinson foram primeiramente estudadas na sua capacidade de induzir rotações (DUVOISIN *et al.*, 1982; TRAUB *et al.*, 1985; FUKUZAKI *et al.*, 2000; PRIKHOJAN, 2000).

1.4. Cafeína

As metilxantinas, como a cafeína, teofilina e teobromina mostram propriedades psicoestimulantes em humanos e em animais (CASAS *et al.*, 2000), como aumento na atividade motora (NEHLIG *et al.*, 1992), produção de efeitos de reforço (DWORKIN *et al.*, 1993; GRIFFITHS e MUMFORD, 1995) além da potencialização das propriedades de reforço e de estímulo locomotor dos agonistas dos receptores dopaminérgicos (SCHENK *et al.*, 1994; MISRA *et al.*, 1986).

Em 2000, ROSS *et al.* fizeram um estudo prospectivo mostrando uma relação inversa entre o consumo de cafeína e o risco de desenvolvimento da doença de Parkinson. Este resultado aumentou a possibilidade de que a cafeína assim como antagonistas dos receptores A_1 e A_{2A} pudessem reduzir o risco de desenvolver a doença de Parkinson por atenuar a degeneração dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais (KALDA *et al.*, 2006).

A cafeína é um antagonista dos receptores adenosinérgicos A_{2A} que, assim como os antagonistas específicos destes receptores, produz um aumento da atividade motora em roedores com depleção de DA (RICHARDSON *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2001a,b; PINNA *et al.*, 2001; KALDA *et al.*, 2006).

O gene dos receptores adenosinérgicos foi clonado na década de 1990 e pertence à classe dos receptores acoplados a proteína G. Quatro subtipos destes receptores foram caracterizados (A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3), embora acredite-se que apenas os receptores A_1 e A_{2A} apresentem afinidade suficiente para serem ativados pela concentrações fisiológicas da adenosina extracelular, sendo os responsáveis pela função neurobiológica da adenosina no cérebro (FREDHOLM *et al.*, 1994).

Os receptores A_1 estão distribuídos em diversas áreas cerebrais e em órgãos periféricos (FREDHOLM *et al.*, 1994) enquanto que os receptores A_{2A} concentram-se no estriado dorsal e ventral (SVENNINGSSON *et al.*, 1999). A localização celular dos receptores A_{2A} fornece uma base anatômica para a interação adenosina-DA que relaciona os benefícios dos sintomas motores dos antagonistas dos receptores A_{2A} na doença de Parkinson. Na última década muitos antagonistas A_{2A} foram desenvolvidos

e mostraram ter propriedades antiparkinsonianas por aumentar a atividade motora em modelos animais da doença de Parkinson (KALDA *et al.*, 2006).

Os receptores A_{2A} são acoplados a proteína G-estimulatória que estimula a atividade da AC e aumenta a produção de APMc (OLAH, 1997; KULL *et al.*, 2000; CORVOL *et al.*, 2001; HERVE *et al.*, 2001). São quase que exclusivamente encontrados no estriado (SCHIFFMANN *et al.*, 1991a,b), onde estão co-localizados com receptores D_2 nos neurônios médios espinhosos estriatais GABAérgicos da via estriadopalidal indireta (SCHIFFMANN *et al.*, 1991a,b; FINK *et al.*, 1992; SVENNINGSSON *et al.*, 1998a,b; HILLION *et al.*, 2002; AGUIAR *et al.*, 2006). Tal como exposto acima, estas células são de grande importância no funcionamento dos NB que são núcleos envolvidos no controle dos movimentos voluntários assim como em outros aspectos do comportamento motor (FISONE *et al.*, 2004). De acordo com diversos estudos, esta interação é antagonista, onde a estimulação dos receptores A_{2A} reduz a ligação da dopamina nos receptores D_2 enquanto que o bloqueio dos receptores A_{2A} facilita a estimulação do receptor D_2 , e indiretamente potencializa as respostas mediadas através do receptor dopaminérgico do subtipo D_1 (FERRÉ *et al.*, 1997).

Os receptores A_{2A} estriatais modulam a neurotransmissão dopaminérgica (FUXE *et al.*, 1998, 2005) e muitos fenômenos neuronais, como o controle motor (EL YACOUBI *et al.*, 2000). Por isso, os antagonistas destes receptores são promissores como tratamentos terapêuticos para a doença de Parkinson (FREDHOLM e SVENNINGSSON, 2003).

As terapias atuais com drogas antiparkinsonianas diminuem apenas parcialmente os sintomas da doença, mas não são capazes de impedir a degeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos (AGUIAR *et al.*, 2006) além de muitas vezes apresentarem efeitos colaterais, como as discinesias, principais efeitos adversos irreversíveis após tratamento dopaminérgico crônico. Estes efeitos colaterais geralmente são os responsáveis pela limitação ao tratamento sintomático da doença de Parkinson, o que permitiu uma crescente busca por novas terapias não dopaminérgicas alternativas.

Estudos de FREDHOLM e SVENNINGSSON (2003) sugerem que o bloqueio de receptores adenosinérgicos do subtipo A_{2A} produz efeitos diretos nos receptores D_2 , já que ambos estão co-localizados em neurônios estriatais onde se dimerizam. Além disso, diversas evidências mostram o potencial terapêutico dos antagonistas dos receptores A_{2A} no tratamento da doença de Parkinson, onde exercem efeitos antiparkinsonianos (MORELLI, 2003).

Lesões unilaterais nigroestriatais com 6-OHDA têm sido usadas como modelo animal da doença de Parkinson. A toxicidade da 6-OHDA deve-se aos radicais reativos de oxigênio e altos níveis destes radicais livres são observados com o envelhecimento e podem ser um fator contribuinte para a doença de Parkinson (ALFAVARO *et al.*, 2004). A cafeína e seus metabólitos parecem inibir o dano oxidativo causado por certas substâncias reativas (LEE, 2000).

O controle oposto das vias direta e indireta pela DA na atividade dos neurônios tálamo-corticais (desinibição e aumento, respectivamente) resulta, no final, em estimulação motora (FISONE *et al.*, 2004). Diversos estudos mostram uma expressão maciça dos receptores A_{2A} da adenosina nos neurônios da via indireta e desta maneira, a maior parte dos efeitos estimulantes motores da cafeína são mediados pela regulação da atividade destes neurônios (FISONE *et al.*, 2004).

SVENNINGSSON *et al.* (1997a) sugerem que bloqueio dos receptores A_{2A} é capaz de induzir ativação motora independente da neurotransmissão dopaminérgica e que os antagonistas destes receptores podem ser benéficos no tratamento da doença de Parkinson sem o uso combinado de agonistas dos receptores dopaminérgicos. Entretanto, alguns estudos mostram que ratos com lesão unilateral da via dopaminérgica nigroestriatal não apresentam nenhuma alteração motora quando antagonistas A_{2A} são administrados sozinhos (FERRÉ *et al.*, 2001).

FUXE e UNGERSTEDT, em 1974 e JIANG *et al.* (1993) observaram que a cafeína também era capaz de induzir rotações contralaterais sozinha além de potencializar este comportamento quando administrada concomitantemente a agonistas dopaminérgicos seletivos e não seletivos.

Apesar disso, estudos mais recentes têm mostrado que antagonistas A_{2A} não induzem comportamento rotacional quando administrados sozinhos, mas

potencializam a rotação quando administrados junto com agonistas dos receptores dopaminérgicos, especialmente D_2 (PINNA *et al.*, 1996; FERRÉ *et al.*, 1997) Isso porque em animais com lesão unilateral com 6-OHDA, o bloqueio da neurotransmissão dopaminérgica após uso de antagonistas dopaminérgicos se opõe a indução da atividade motora dos antagonistas adenosinérgicos (GARRET e HOLTZMAN, 1995), afirmando que um certo grau de atividade dopaminérgica é necessária para a observação da atividade motora induzida por antagonistas adenosinérgicos.

As lesões dos neurônios dopaminérgicos da substância negra por 6-OHDA e o comportamento observado após estimulação dopaminérgica podem ser diminuídos pela administração de cafeína. Estes efeitos protetores em modelos animais sugerem uma relação inversa existente entre o consumo humano de café e o risco de desenvolvimento da doença de Parkinson (XU *et al.*, 2005).

Assim, os antagonistas dos receptores A_{2A} facilitam o comportamento motor e justificam os efeitos benéficos observados em modelos animais da doença de Parkinson após o uso destas substâncias (BIBBIANI *et al.*, 2003; MORELLI, 2003; XU *et al.*, 2005).

Todos estes dados sugerem que as metilxantinas, como a cafeína, podem ser benéficas no tratamento de pacientes com doença de Parkinson, apesar de terem um rápido desenvolvimento de tolerância em suas propriedades psicoestimulantes (EVANS e GRIFFITHS, 1992).

Este trabalho teve com um dos objetivos verificar se a cafeína, através de seus efeitos nos receptores A_{2A} , apresenta atividade antiparkinsoniana através da observação do comportamento de rotação quando administrada sozinha em ratos com lesão unilateral da via dopaminérgica nigroestriatal induzida por 6-OHDA.

1.5. Nicotina

Os receptores nicotínicos da acetilcolina são canais iônicos regulados por ligantes que estão amplamente distribuídos no cérebro humano onde parecem ter uma função modulatória associada com diversos outros sistemas neurotransmissores (PIMLOTT *et al.*, 2003). Uma diminuição do número destes receptores parece ocorrer em diversas desordens neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, demência com corpúsculos de Lewy e a doença de Parkinson (RINNE *et al.*, 1991; PERRY *et al.*, 1995; COURT *et al.*, 2000; STEINLEIN, 2004; SINGH *et al.*, 2004; SACCO *et al.*, 2004; FORGACS e BODIS-WOLLNER, 2004). Na doença de Parkinson, muitos estudos mostram déficits de receptores nicotínicos no caudado-putâmen (PERRY *et al.*, 1990; RINNE *et al.*, 1991; AUBERT *et al.*, 1992; COURT *et al.*, 2000), na SNc e ATV (PERRY *et al.*, 1995).

Diversas evidências mostram o envolvimento dos receptores nicotínicos centrais em vários sistemas cognitivos, motores e comportamentais. A modulação destes receptores para a produção de agentes terapêuticos tem sido o objetivo de muitos estudos (NEWHOUSE e KELTON, 2000).

Embora o envolvimento dos receptores nicotínicos em algumas doenças do sistema nervoso central seja incompleto, os efeitos benéficos de drogas que atuam nestes receptores os implicam em tais doenças (HOGG e BERTRAND, 2007). Autoradiografia de tecido cerebral *post-mortem* de indivíduos portadores de doenças neurodegenerativas revela que os níveis de ligação dos ligantes seletivos destes receptores estão reduzidos em algumas áreas cerebrais (PERRY *et al.*, 1995). Esta redução está histopatologicamente associada a mudanças na doença de Parkinson, sugerindo que a redução dos receptores nicotínicos precede a neurodegeneração na doença de Parkinson (HOGG e BERTRAND, 2007).

Os receptores nicotínicos podem ser encontrados em localizações diversas no sistema nervoso central: dendritos, corpo celular, axônio, pré e pós-sinápticos, o que contribui aos diversos papéis destes receptores no sistema nervoso central. Os pré-sinápticos aumentam a liberação de neurotransmissor enquanto que aqueles pós-sinápticos excitam e modulam processos intracelulares (DANI e BERTRAND, 2007).

A modulação da liberação de neurotransmissor pelos receptores nicotínicos pré-sinápticos é o seu principal e mais bem estudado papel no cérebro, sendo que a sua ativação aumenta a liberação de diferentes neurotransmissores (RADCLIFFE e DANI, 1998; LUETJE, 2004; SHER *et al.*, 2004).

Diversas evidências sugerem que fumantes têm menor risco de desenvolverem a doença de Parkinson (MORENS *et al.*, 1995; TZOURIO *et al.*, 1997), o que é consistente com recentes estudos animais onde a nicotina se opõe aos efeitos da lesão da via nigroestriatal em termos da perda nos neurônios dopaminérgicos, níveis de DA estriatal ou mudanças nos receptores dopaminérgicos D₂ (CLARK e PERT, 1985; JANSON *et al.*, 1988; JANSON e MOLLER, 1994; PARINE *et al.*, 2001).

Exposição aguda a fumaça do cigarro e a nicotina aumenta a expressão do RNAm do transportador de DA na ATV e na SN (LI *et al.*, 2004). A liberação de DA estriatal em resposta ao desafio com nicotina tem sido demonstrada em humanos e em primatas (BRODY *et al.*, 2004; MARENCO *et al.*, 2004).

A nicotina parece melhorar de maneira significativa os sintomas de pacientes com doença de Parkinson (KELTON *et al.*, 2000) pelo aumento nos níveis de DA sináptica na SN (KITA *et al.*, 1992). Ainda, o estriado humano apresenta sítios de ligação para nicotina e expressa RNAm para diferentes subunidades do receptor nicotínico (RUBBOLI *et al.*, 1994; COURT e PERRY, 1995; COURT *et al.*, 1998; TOHGI *et al.*, 1998). Em roedores, os receptores nicotínicos se localizam nos terminais dopaminérgicos cerebrais (WONNACOTT, 1997). Como mudanças nestes receptores estão envolvidas em doenças do movimento como a doença de Parkinson, alguns estudos consideram os receptores nicotínicos do estriado como alvo para terapia sintomática e neuroprotetora desta doença (COURT e PERRY, 1994) já que são capazes de estimular a liberação de DA e desta maneira melhorar os sintomas pela administração aguda de nicotina (ISHIKAWA e MIYATAKE, 1993; FAGERSTRÖM *et al.*, 1994).

Alguns estudos mostram que a nicotina apresenta efeitos protetores em neurônios ou em linhagem de células neuronais *in vitro* contra diversas substâncias tóxicas como exposição ao glutamato (SHIMOHAMA *et al.*, 1996), etanol (TIZABI *et al.*, 2003) e hipóxia (HEJMADI *et al.*, 2003). A nicotina também protege culturas de neurônios

dopaminérgicos mesencefálicos contra os efeitos tóxicos do 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP⁺) (JEYARASASINGAM e QUIK, 1999 a,b) e por isso o receptor nicotínico tem sido proposto como um alvo terapêutico em potencial para o tratamento neuroprotetor da doença de Parkinson (VISANJI *et al.*, 2006).

Este trabalho também teve como objetivo verificar se a nicotina apresenta atividade antiparkinsoniana através da observação do comportamento de rotação quando administrada em ratos com lesão unilateral da via dopaminérgica nigroestriatal induzida por 6-OHDA.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Estudar o efeito da nicotina e da cafeína em um modelo animal de alterações motoras da doença de Parkinson.

2.2. Objetivos Específicos

- Observar se ocorrem rotações espontâneas em animais com lesão unilateral da SNc induzida por administração lenta de 6-OHDA no FPM.
- Testar se as rotações destes animais com lesão unilateral da SNc respondem de forma dose-dependente ao tratamento com apomorfina, um agonista competitivo de receptores dopaminérgicos.
- Estudar os efeitos de diferentes doses de cafeína e nicotina sobre o comportamento de rotação destes animais com lesão unilateral da SNc
- Observar os efeitos crônico e agudo da nicotina 0,5 mg/kg (s.c.) sobre o comportamento de rotação destes animais com lesão da SNc.
- Comparar os níveis estriatais de DA e seus metabólitos no estriado ipsilateral e contralateral à administração lenta de 6-OHDA.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados neste trabalho ratos Wistar machos adultos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná, pesando entre 280 a 330 g no início dos experimentos. Estes animais foram mantidos em um número máximo de 5 animais por gaiola, a uma temperatura constante de $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ e a um ciclo de claro e escuro de 12 h (7h00-19h00) no Biotério do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná. Todos os experimentos foram realizados no período da manhã.

Todos os experimentos deste projeto foram aprovados pelo comitê de ética em experimental animal desta universidade (certificado nº 190).

3.2. Cirurgia

Antes do início da cirurgia, os animais a serem operados receberam:

- Sulfato de atropina (0,4 mg/kg, i.p.) para inibir a salivação
- Anestésico Equitesin (3 ml/kg, i.p.) (1 g de Tiopental; 4,25 g de Hidrato de Cloral; 42,8 ml de Propileno Glicol; 11,5 ml de álcool 90%; 45,7 ml de água destilada e 2,13 g de Sulfato de Magnésio)
- Antibiótico: penicilina G-procaína 200.000 U/ml (0,1 ml de despacilina, i.m.)
- Assepsia com álcool iodado

Após a anestesia dos animais, estes foram tricotomizados na porção superior da cabeça. Em seguida, houve assepsia com álcool iodado e, subseqüentemente os animais foram colocados no aparelho estereotático para início da cirurgia (DAVID KOFP, EUA). Com auxílio de um bisturi, foi feita uma incisão na porção superior da cabeça do animal para que fosse exposto o crânio deste. Após a identificação destas localizações no crânio do animal, este foi perfurado com uma broca dentária. No local da perfuração foi introduzida uma agulha 30 gauge no FPM, nas seguintes

coordenadas estereotáticas, adaptadas do Atlas de de PAXINOS e WATSON (2005) anteroposterior (AP): - 0,19 mm, lateral (L): + 0,19 mm, dorsoventral (DV): -0,79 mm.

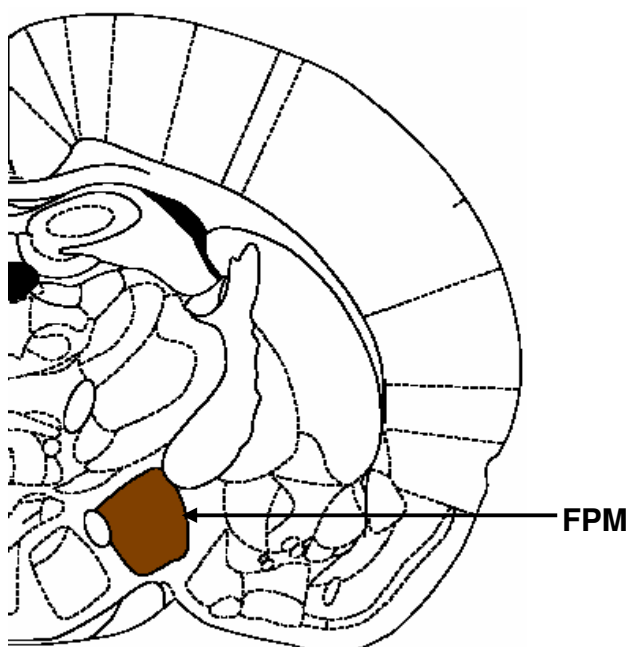


Figura 4: Representação esquemática de secção coronal do cérebro de rato demonstrando a região de administração lenta de 6-OHDA (PAXINOS e WATSON, 2005).

A agulha ficava ligada a um tubo de polietileno, o qual faz conexão com uma seringa Hamilton de 10 μ l cujo êmbolo era impulsionado por uma bomba de microinfusão (Harvard Instruments, EUA).

A solução de 6-OHDA (6 μ g/ μ l) foi administrada com o fluxo de 0,2 μ l/min durante 8 minutos. Após a administração, foram aguardados 4 minutos para retirada da agulha, o que foi feito lentamente a fim de se evitar refluxo. Em seguida, a pele da porção superior da cabeça do animal foi suturada com auxílio de agulha e fio de sutura. Antes da sutura, foi colocado cloranfenicol em pó no local da sutura.

Após este procedimento, o animal foi retirado do estereotáxico e colocado isolado em uma gaiola e levado para o biotério do Departamento de Farmacologia da UFPR.

Neste experimento, animais pertencentes ao grupo SHAM foram submetidos a uma cirurgia, mas receberam administração de salina ao invés de 6-OHDA. Os animais controle não foram submetidos a nenhum procedimento cirúrgico.

Nos cinco dias subseqüentes a cirurgia, os animais receberam ração líquida no lugar da ração sólida normalmente ingerida por eles e foram mantidos isolados em gaiolas individuais. Ao término dos cinco dias, os animais foram novamente reagrupados, a dieta sólida foi restabelecida e foram iniciados os testes com as diferentes drogas.

3.3. Desenho Experimental – Testes Comportamentais

3.3.1. Teste de rotação

O teste de rotação foi realizado em um recipiente plástico circular transparente com 28 cm de diâmetro e 35 cm de altura. Em volta deste recipiente há um anteparo de cartolina de formato circular, envolvendo o recipiente, para evitar que o animal escape durante o período de teste. Este sistema foi filmado por uma câmara localizada no teto de uma sala com temperatura controlada de 22 ± 1 °C. Antes do início do teste, os animais a serem observados receberam como desafio uma injeção de salina, apomorfina, cafeína ou nicotina, tal como descrito acima e, em seguida, foram colocados no centro do recipiente plástico, voltados para a parede. Posteriormente, foi analisado o número de rotações ipsilaterais e contralaterais dos animais de 15 em 15 minutos, num total de 30 minutos após a administração de apomorfina (s.c.) ou salina (i.p.).



Figura 5: Recipiente utilizado para estudo do comportamento rotatório.

3.3.2. Experimento 1 - rotação espontânea

A rotação espontânea (sem droga) de animais foi observada durante 30 min no primeiro e sétimo dia após a lesão. FORNAGUERA e SCHWARTING (1999) relatam que animais lesados com 6-OHDA apresentam rotação ipsilateral à lesão sem administração de drogas nos primeiros dias após a cirurgia. Portanto este dado ajudou a confirmar que o procedimento usado foi adequado para produzir uma lesão da SNc dos ratos.

Grupo	Número (N) de animais
Controle (sem lesão)	10
Sham operados	7
Lesão 6-OHDA	12

3.3.3. Experimento 2 - rotação induzida por apomorfina

No dia primeiro dia do teste de rotação, realizado 7 dias após a cirurgia, os animais lesados com 6-OHDA foram desafiados com doses crescentes de apomorfina ou salina segundo o esquema abaixo.

Grupo	Número (N) de animais	Droga
Controle (sem lesão)	10	Salina
Controle (sem lesão)	8	Apomorfina 0,1 mg/kg
Sham operados	11	Salina
Sham operados	6	Apomorfina 0,1 mg/kg
Lesão 6-OHDA	8	Apomorfina 0,01 mg/kg
Lesão 6-OHDA	11	Apomorfina 0,05 mg/kg
Lesão 6-OHDA	8	Apomorfina 0,075 mg/kg
Lesão 6-OHDA	11	Apomorfina 0,1 mg/kg
Lesão 6-OHDA	7	Apomorfina 0,2 mg/kg
Lesão 6-OHDA	11	Apomorfina 1,0 mg/kg

No dia seguinte (segundo dia), os animais de todos os grupos receberam apomorfina na dose de 0,1 mg/Kg (s.c.). Esta dose foi escolhida porque foi a que induziu o maior número de rotações. Este procedimento foi usado como controle da lesão, pois está descrito na literatura que apenas animais lesados apresentam este comportamento de rotação contralateral quando desafiados com apomorfina. Apenas os animais que apresentaram mais de 50 rotações contralaterais à lesão em 30 minutos neste segundo dia de teste foram incluídos na análise estatística. Este procedimento também teve como objetivo testar se o desafio do dia anterior potenciou o efeito da droga aplicada como desafio no segundo dia de teste (DELFINO *et al.*, 2004).

3.3.4. Experimento 3 - rotação induzida por cafeína

Nos testes de rotação induzida por cafeína, os animais receberam os seguintes desafios no primeiro dia de teste realizado 7 dias após a cirurgia:

Grupo	Número (N) de animais	Droga
Controle (sem lesão)	10	Salina
Sham operados	10	Salina
Lesão 6-OHDA	8	Salina
Lesão 6-OHDA	10	Cafeína 1,0 mg/kg
Lesão 6-OHDA	10	Cafeína 5,0 mg/kg
Lesão 6-OHDA	7	Cafeína 10,0 mg/kg

No dia seguinte, os animais de todos os grupos receberam apomorfina na dose de 0,1 mg/Kg (s.c.) como controle da lesão com 6-OHDA. Apenas os dados dos animais que apresentaram mais de 50 rotações em 30 minutos neste dia seguinte de rotação foram incluídos na análise estatística.

3.3.5. Experimento 4 - rotação induzida por nicotina aguda

Nos testes de rotação induzida por nicotina, os animais receberam os seguintes desafios no primeiro dia de teste realizado 7 dias após a cirurgia:

Grupo	Número (N) de animais	Droga
Controle (sem lesão)	10	Salina
Sham operados	10	Salina
Lesão 6-OHDA	8	Salina
Lesão 6-OHDA	8	Nicotina 0,1 mg/kg
Lesão 6-OHDA	10	Nicotina 0,5 mg/kg
Lesão 6-OHDA	8	Nicotina 1,0 mg/kg
Lesão 6-OHDA	10	Nicotina 5,0 mg/kg

No dia seguinte, os animais de todos os grupos receberam apomorfina na dose de 0,1 mg/Kg (s.c.). O resultado deste teste serviu como critério de exclusão, tal como nos itens anteriores.

3.3.6. Experimento 5 - rotação induzida por nicotina prolongada

Além destes grupos animais, também foi realizado um procedimento onde, quinze dias após a lesão unilateral no FPM com a neurotoxina 6-OHDA, um grupo de ratos recebeu desafio de nicotina 0,5 mg/kg (s.c.) e um outro grupo de animais foi tratado cronicamente com nicotina 0,5 mg/kg (s.c.) durante cinco dias. Em ambos os grupos, foram observados o número de rotações ipsilaterais e contralaterais a lesão durante 30 min após a administração da droga. Também existiram animais controle e sham neste experimento.

Após cinco dias de tratamento crônico com nicotina, os animais deste grupo não receberam nenhum tratamento nos dois dias subsequentes. No oitavo dia receberam uma dose desafio de nicotina 0,5 mg/kg (s.c.) e observou-se o número de rotações contralaterais ou ipsilaterais a lesão durante 30 minutos.

No dia seguinte ao tratamento agudo e após o oitavo dia no grupo de animais tratados cronicamente com nicotina, os animais receberam apomorfina na dose de 0,1 mg/kg (s.c.) como controle da lesão com 6-OHDA, sendo os dados tratados como nos itens anteriores.

Grupo	Droga	Tratamento	Número (N) de animais
Controle (sem lesão)	Salina	Agudo	10
Sham operados	Salina	Agudo	10
Lesão 6-OHDA	Salina	Agudo	8
Lesão 6-OHDA	Nicotina 0,5 mg/kg	Agudo	6
Lesão 6-OHDA	Nicotina 0,5 mg/kg	Crônico	10

3.3.7. Experimento 6 – análise neuroquímica

Em seguida, os animais (N=4) foram eutanasiados por decapitação, tendo a parte anterior destinada a análise neuroquímica para dosagem dos níveis de DA e seus metabólitos através do uso do HPLC.

A parte anterior dos cérebros dos animais foi utilizada para análise neuroquímica, onde seus estriados foram dissecados para dosagem de catecolaminas. Após a dissecação do estriado de cada animal, estes foram armazenados em freezer -70°C até a realização da análise neuroquímica. O tecido foi pesado previamente antes de ser congelado. As amostras foram suspensas com ácido perclórico 0,1M com 0,02% de metabissulfito de sódio como antioxidante, em concentração de 15 µl/mg de material cerebral. Este material foi fragmentado com caneta sonicadora e centrifugado a 10 000 G por 40 minutos.

O sobrenadante (20 µl) foi injetado em uma estação de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) composta por bomba Shimadzu LC10AD, uma coluna de fase reversa C-18, 75 x 4,6 mm, partículas de 4µm, em temperatura de 30º C. A DA e seus metabólitos (DOPAC e HVA) foram identificados e quantificados por um detector eletroquímico L-ECD-6A, com potencial de oxidação ajustado para + 80 mV. A fase móvel se constituiu de Na₂HPO₄.12H₂O 7,16g; ácido cítrico 4,2g; EDTA 40mg; ácido octanossulfônico 550mg; metanol 100mL; H₂O 800mL; pH 3,0. As áreas dos picos foram comparadas às áreas dos padrões externos (SIGMA) para identificação e quantificação de DA e seus metabólitos DOPAC e HVA. Os resultados foram expressos como ng/g de peso úmido do tecido.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls e p<0,05.

5. RESULTADOS

5.1. Experimento 1 - rotação espontânea

Na Figura 7 observa-se um aumento no número de rotações espontâneas (sem droga) ipsilaterais ($F(2,26) = 31,37$, $p < 0,05$) e contralaterais ($F(2,26) = 10,47$, $p < 0,05$) à lesão no primeiro dia após a lesão unilateral de ratos com 6-OHDA, o qual foi significativo em relação aos animais dos grupos controle e sham. Do mesmo modo, na Figura 8 observa-se um aumento significativo no número de rotações ipsilaterais ($F(2,26) = 6,50$, $p < 0,05$) de ratos lesados com 6-OHDA sete dias após a lesão em relação aos animais do grupo controle e sham.

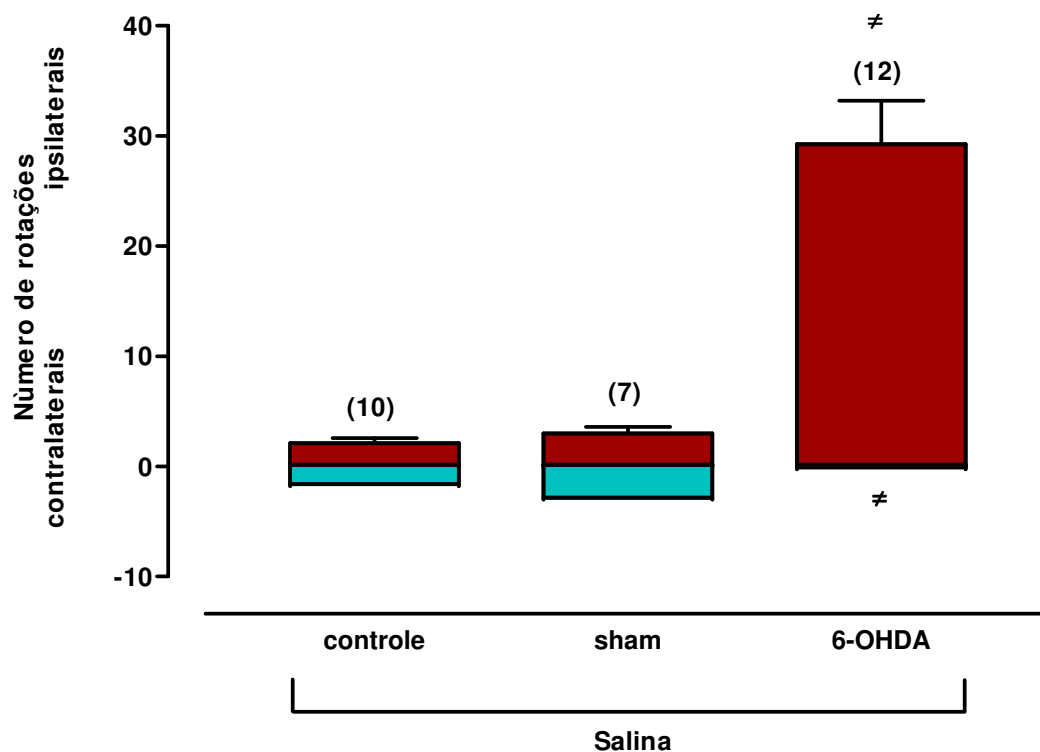


Figura 6: Observação do número de rotações espontâneas (administração de salina) sobre número de rotações ipsilaterais e contralaterais de ratos controle, sham e unilateralmente lesados com 6-OHDA um dia após a cirurgia. Os valores representam a média $\pm$ EPM do número de rotações ipsilaterais (valores positivos) e contralaterais (valores negativos) observados durante 30 min após o desafio com salina (0,0). $\neq p < 0,05$ comparado aos grupos controle e sham. ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls.

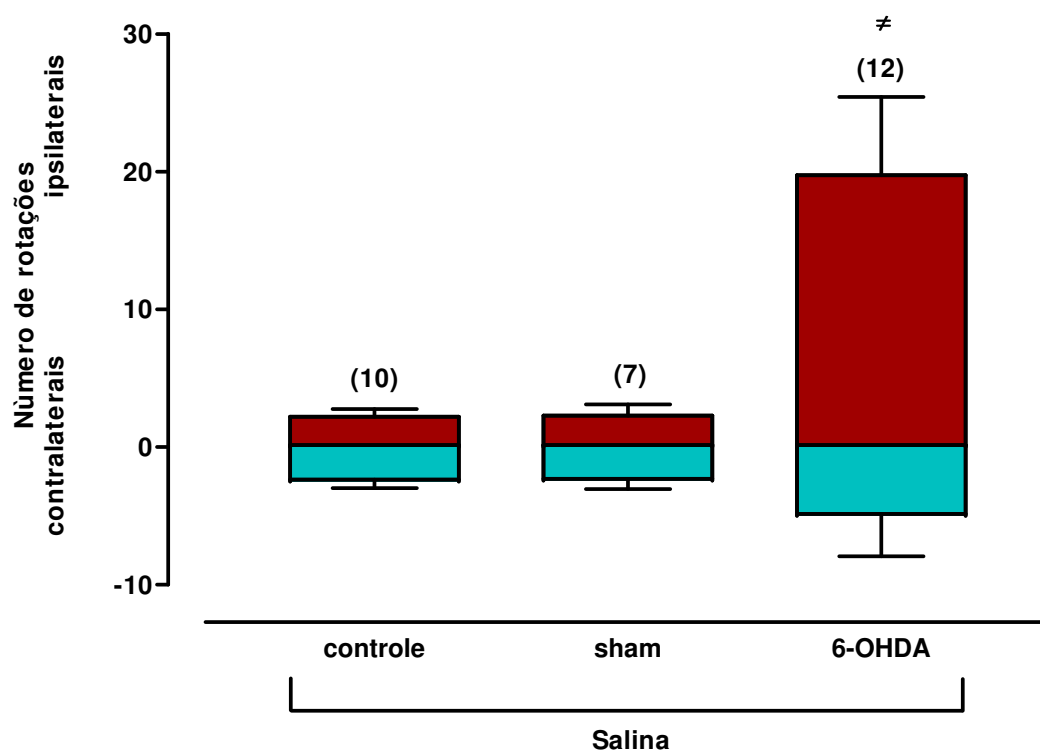


Figura 7: Observação do número de rotações espontâneas (administração de salina) sobre número de rotações ipsilaterais e contralaterais de ratos controle, sham e unilateralmente lesados com 6-OHDA sete dias após a cirurgia. Os valores representam a média $\pm$ EPM do número de rotações ipsilaterais (valores positivos) e contralaterais (valores negativos) observados durante 30 min após o desafio com salina (0,0). $\#p < 0,05$ comparado aos grupos controle e sham. ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls.

5.2. Experimento 2 - rotação induzida por apomorfina

O desafio com diferentes doses de apomorfina (0,01; 0,05; 0,075; 0,1; 0,2 e 1,0 mg/kg, s.c.) uma semana após a lesão unilateral dos animais com 6-OHDA provocou um aumento dose-dependente das rotações contralaterais ($F(10,88) = 12,32$, $p < 0,05$), tal como pode ser observado na Figura 9. Nos grupos que receberam apomorfina nas doses de 0,01 – 1,0 mg/kg, este aumento foi estatisticamente significativo em relação aos animais dos grupos que receberam salina (controle, sham e 6-OHDA) e apomorfina 0,1 mg/kg (controle e sham) no dia do teste. Por outro lado, a apomorfina nas diferentes doses administradas neste estudo não causou alteração significativa no número de rotações ipsilaterais ($F(10,88)=1,30$, $p=0,24$) nos mesmos animais no dia do teste (Figura 8).

No dia seguinte estes mesmo animais foram desafiados com uma única dose de apomorfina (0,1 mg/kg, s.c.). Observou-se que todos os animais lesados apresentaram um aumento no número de rotações contralaterais à lesão durante 30 min ($F(10,88) = 22,2$, $p < 0,05$), conforme observado na Figura 9, o qual foi dose-dependente com relação as diferentes doses de apomorfina administradas no dia anterior. Em todos os grupos de animais lesados, este aumento no número de rotações contralaterais foi estatisticamente significativo em relação aos animais dos grupos salina (controle e sham) e apomorfina 0,1 mg/kg (controle e sham). O grupo de animais lesados que recebeu salina no dia anterior e que no dia seguinte foi desafiado com apomorfina 0,1 mg/kg apresentou um aumento significativo das rotações contralaterais à lesão em relação ao grupo salina (controle e sham) e apomorfina 0,1 mg/kg (controle e sham). Não houve diferenças significantes entre os grupos no número de rotações ipsilaterais à lesão ($F(10,88)=6,12$ e $p=0,08$) (Figura 9).

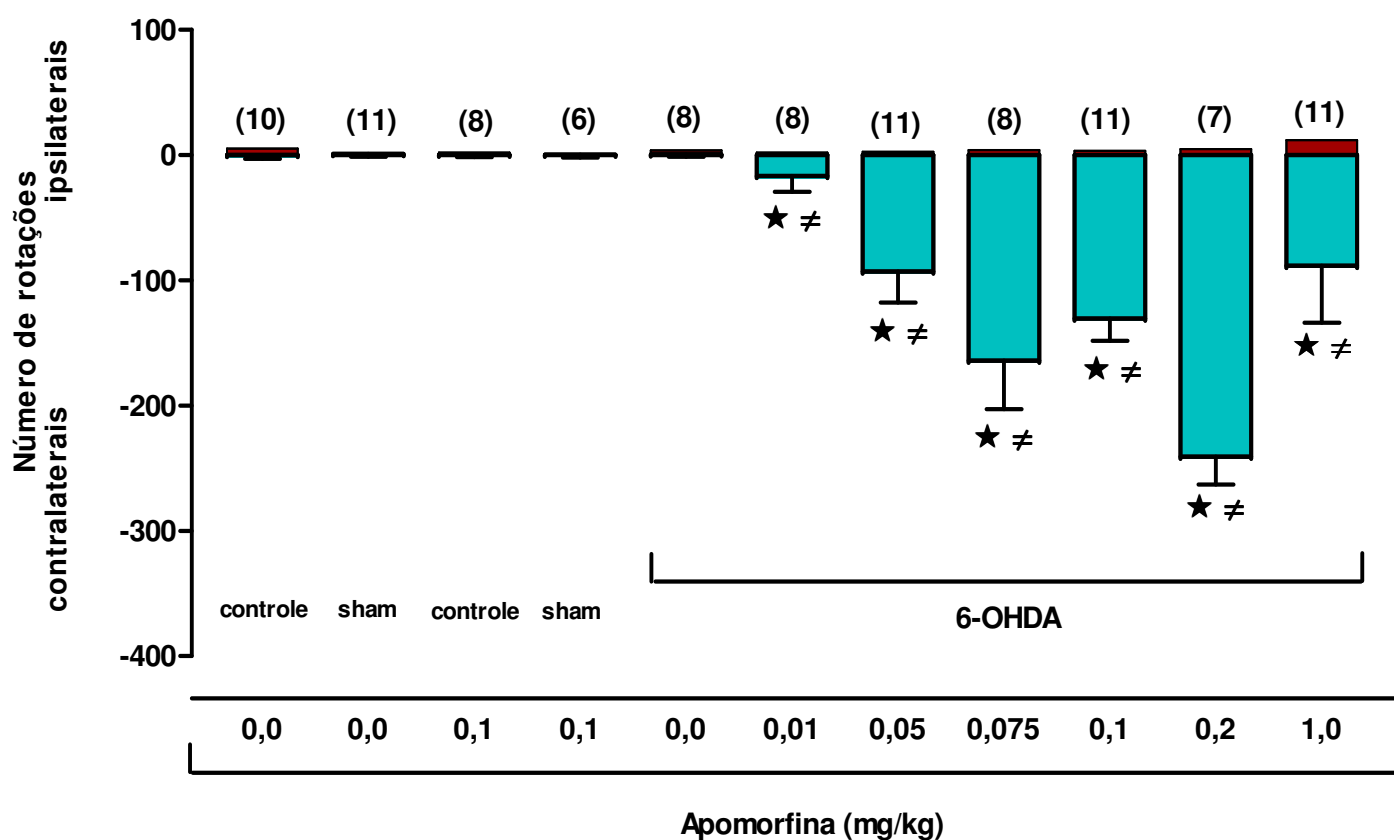


Figura 8: Efeito da administração de apomorfina sobre número de rotações ipsilaterais e contralaterais de ratos unilateralmente lesados com 6-OHDA sete dias após a cirurgia. Os valores representam a média $\pm$ EPM do número de rotações ipsilaterais (valores positivos) e contralaterais (valores negativos) observados durante 30 min após o desafio com salina (0,0) ou apomorfina (s.c.). □ $p < 0,05$ comparado aos grupos que não foram lesados com 6-OHDA; ≠ $p < 0,05$ comparado ao grupo 6-OHDA desafiado com salina. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman Keuls.

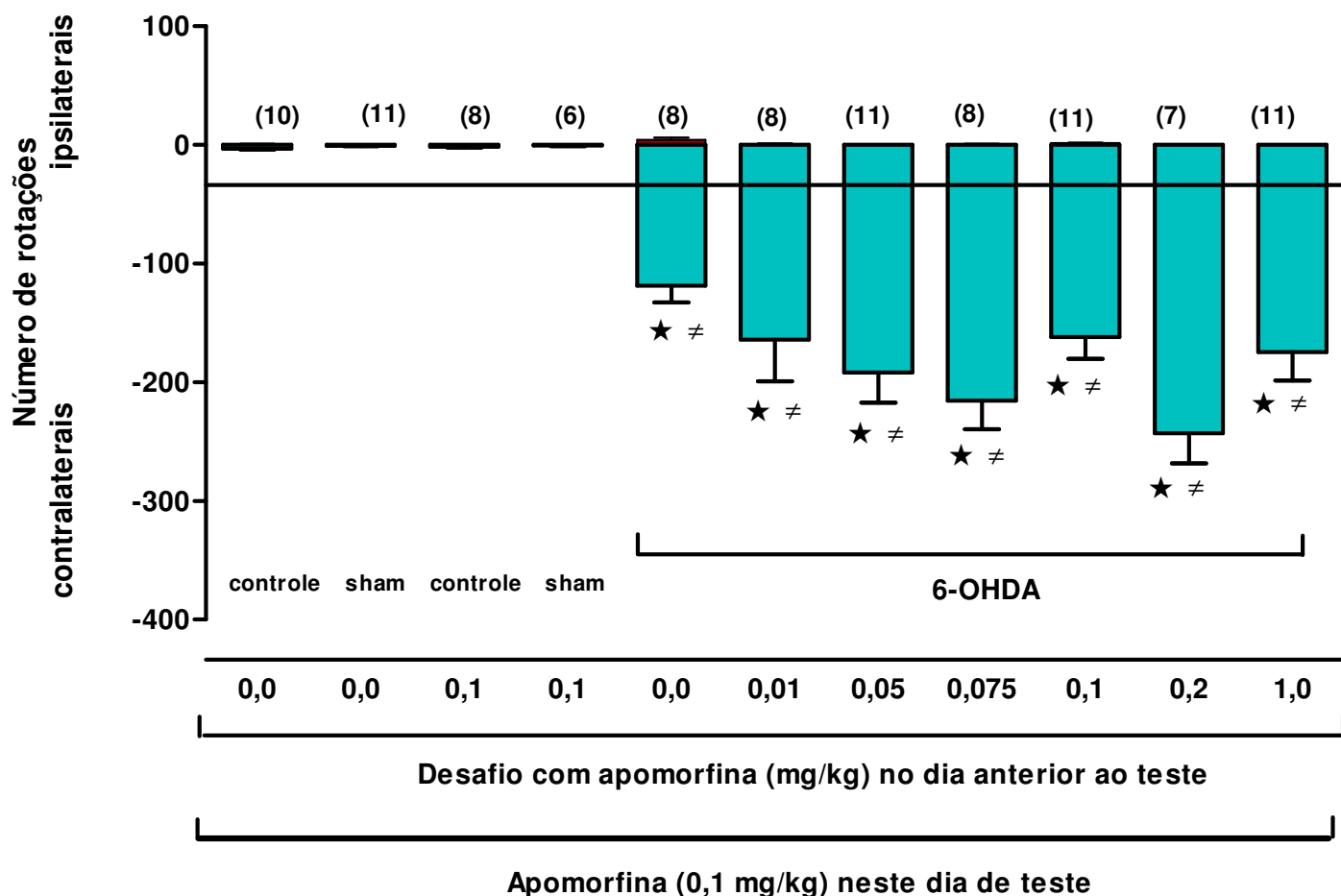


Figura 9: Efeito da administração da mesma dose de apomorfina (0,1 mg/kg) (segundo dia) sobre número de rotações ipsilaterais e contralaterais de ratos unilateralmente lesados com 6-OHDA oito dias após a cirurgia. Os valores sob o eixo das abcissas correspondem às doses de apomorfina (mg/kg) administradas aos animais no dia anterior ao teste. No dia do teste todos os animais receberam o mesmo desafio de apomorfina (0,1 mg/kg). Os valores das barras representam a média $\pm$ EPM do número de rotações ipsilaterais (valores positivos) e contralaterais (valores negativos) observados durante 30 min após o desafio com apomorfina. □ p<0,05 comparado aos grupos que não foram lesados com 6-OHDA; # p<0,05 comparado ao grupo 6-OHDA que no dia anterior foi desafiado com salina. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman Keuls.

5.3. Experimento 3 - rotação induzida por cafeína

O desafio com diferentes doses de cafeína (1,0; 5,0 e 10,0 mg/kg, s.c.) uma semana após a lesão unilateral dos animais com 6-OHDA produziu um aumento dose-dependente das rotações ipsilaterais à lesão ($F(5,49)=28,84$ e $p<0,05$), tal como pode ser observado na Figura 10. Nos grupos que receberam cafeína nas doses de 5,0 e 10,0 mg/kg, este aumento foi estatisticamente significativo em relação aos animais do grupo controle e sham que receberam salina no dia do teste. Os animais que receberam cafeína no dia do teste (1,0; 5,0 e 10,0 mg/kg) apresentaram um aumento do número de rotações ipsilaterais estatisticamente significante em relação aos animais lesados com 6-OHDA que receberam salina no dia do teste. Por outro lado, a cafeína não causou alterações significantes no número de rotações contralaterais ($F(5,49) = 0,48$ e $p=0,79$) nos mesmos animais (Figura 10).

Quando estes mesmos animais foram desafiados no dia seguinte com uma mesma dose de apomorfina (0,1 mg/kg, s.c.), todos os grupos de animais lesados apresentaram um aumento dose-resposta no número de rotações contralaterais à lesão durante 30 min ($F(5,49) = 33,11$ e $p<0,05$), de acordo com a Figura 11. Em todos os grupos de animais lesados que receberam cafeína nas doses 1,0, 5,0 e 10,0 mg/kg, este aumento no número de rotações contralaterais após o desafio com apomorfina 0,1 mg/kg foi estatisticamente significativo em relação aos animais do grupo que receberam salina no dia anterior (controle, sham e 6-OHDA). Não houve alteração significativa no número de rotações ipsilaterais neste dia de teste ($F(5,49)$ e $p=0,43$) (Figura 11).

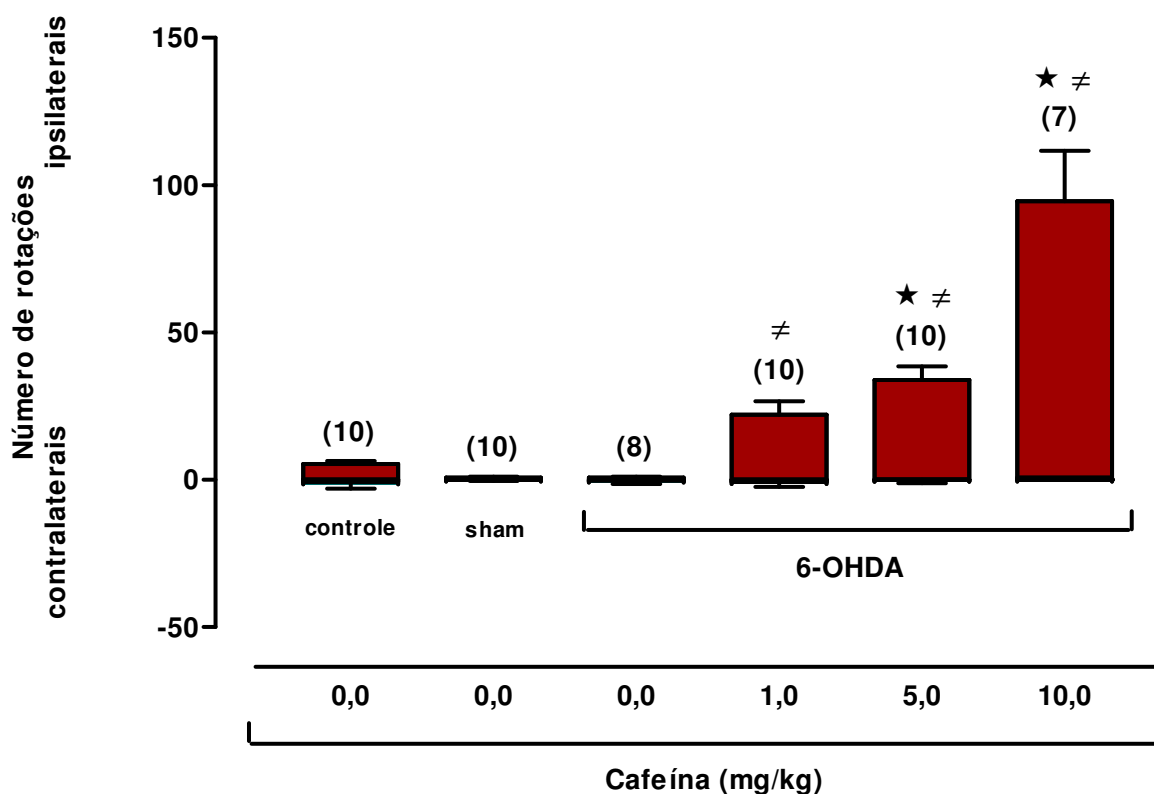


Figura 10: Efeito da administração de cafeína sobre número de rotações ipsilaterais e contralaterais de ratos unilateralmente lesados com 6-OHDA sete dias após a cirurgia. Os valores representam a média $\pm$ EPM do número de rotações ipsilaterais (valores positivos) e contralaterais (valores negativos) observados durante 30 min após o desafio com salina (0,0) ou cafeína (s.c.). $\square$ $p < 0,05$ comparado aos grupos que não foram lesados com 6-OHDA; $\neq$ $p < 0,05$ comparado ao grupo 6-OHDA desafiado com salina. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman Keuls.

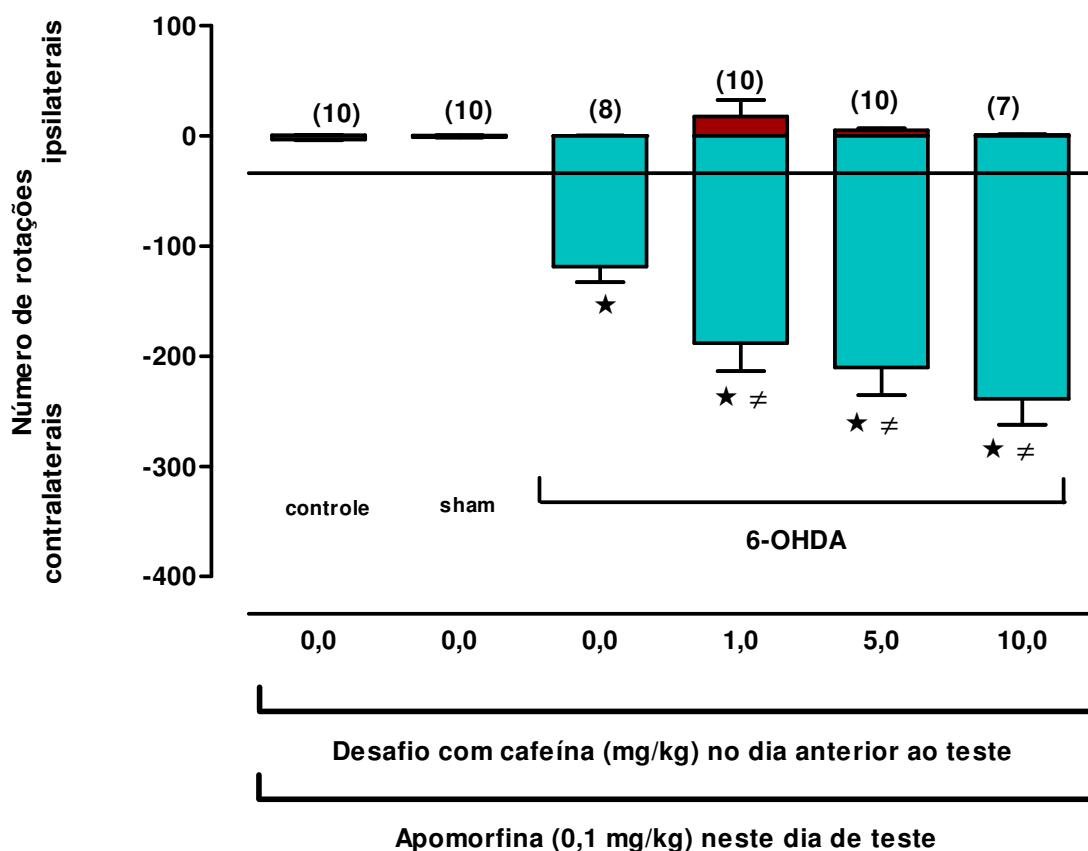


Figura 11: Efeito da administração da mesma dose de apomorfina (0,1 mg/kg) (segundo dia) sobre número de rotações ipsilaterais e contralaterais de ratos unilateralmente lesados com 6-OHDA oito dias após a cirurgia. Os valores sob o eixo das abscissas correspondem às doses de cafeína administradas aos animais no dia anterior ao teste. No dia do teste todos os animais receberam o mesmo desafio de apomorfina (0,1 mg/kg). Os valores das barras representam a média $\pm$ EPM do número de rotações ipsilaterais (valores positivos) e contralaterais (valores negativos) observados durante 30 min após o desafio com apomorfina. □ $p < 0,05$ comparado aos grupos que não foram lesados com 6-OHDA; ≠ $p < 0,05$ comparado ao grupo 6-OHDA que no dia anterior foi desafiado com salina. ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls.

5.4. Experimento 4 - rotação induzida por nicotina aguda

O desafio com diferentes doses de nicotina (0,1; 0,5; 1,0 e 5,0 mg/kg, s.c.) uma semana após a lesão unilateral dos animais com 6-OHDA produziu um aumento dose-dependente das rotações ipsilaterais à lesão ($F(6,57) = 16,11$ e $p < 0,05$) exceto na dose de 5,0 mg/kg, tal como pode ser observado na Figura 13. Este aumento no número de rotações ipsilaterais nas doses de 0,5 e 1,0 mg/kg de nicotina foi estatisticamente significativo com relação ao grupo salina (controle, sham e 6-OHDA). Por outro lado, a nicotina, nestas diferentes doses usadas no dia do teste, não causou alterações significantes no número de rotações contralaterais ($F(6,57) = 1,11$ e $p = 0,37$) nos mesmos animais.

No dia seguinte (segundo dia de teste), quando estes animais foram desafiados com uma única dose de apomorfina (0,1 mg/kg, s.c.), todos os grupos de animais lesados apresentaram um aumento dose-resposta no número de rotações contralaterais à lesão durante 30 min ($F(6,57) = 44,08$ e $p < 0,05$), de acordo com a Figura 13. Em todos os grupos de animais lesados, este aumento no número de rotações contralaterais foi estatisticamente significativo em relação aos animais que no dia anterior receberam salina (controle e sham). Além disso, os animais que receberam nicotina nas doses 0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg no dia anterior apresentaram um aumento estatisticamente significativo nas rotações contralaterais após desafio com apomorfina 0,1 mg/kg com relação aos animais do grupo lesado com 6-OHDA que recebeu salina no dia anterior. Não houve alteração significativa no número de rotações ipsilaterais neste dia de teste ($F(6,57) = 1,69$ e $p = 0,14$) (Figura 13).

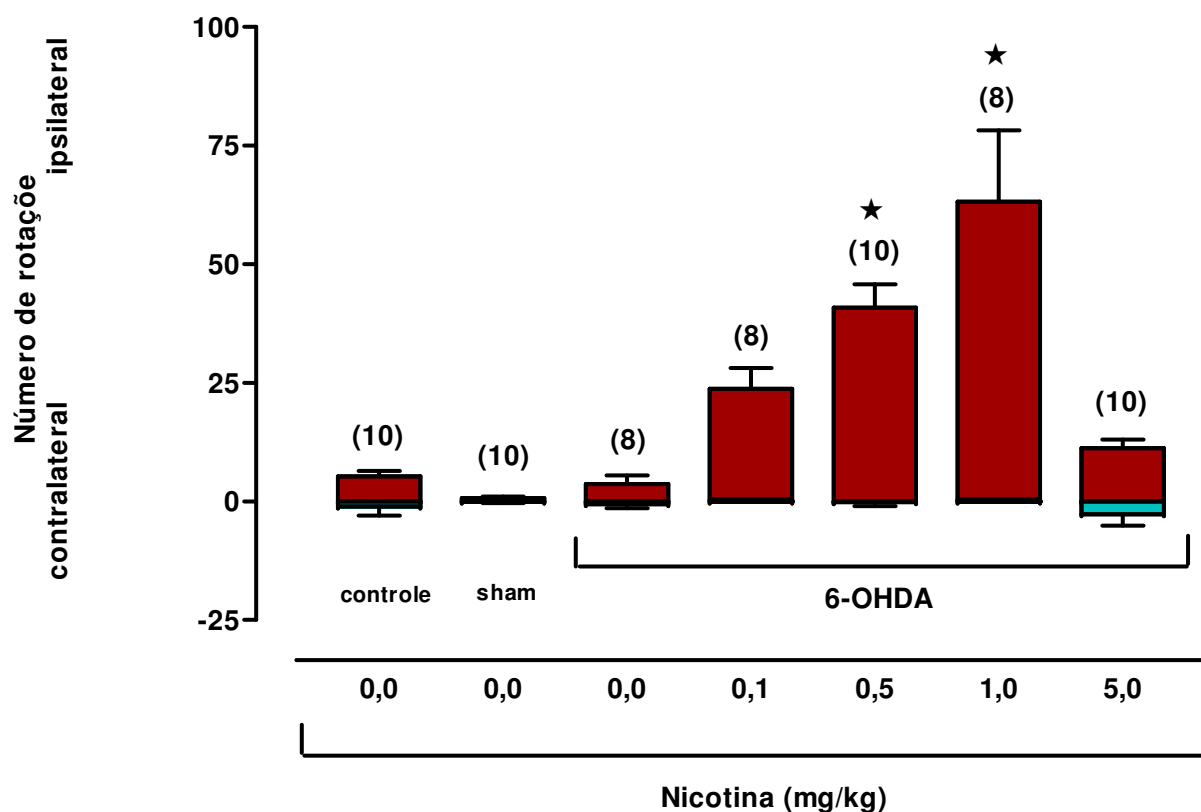


Figura 12: Efeito da administração de nicotina sobre número de rotações ipsilaterais e contralaterais de ratos unilateralmente lesados com 6-OHDA sete dias após a cirurgia. Os valores representam a média $\pm$ EPM do número de rotações ipsilaterais (valores positivos) e contralaterais (valores negativos) observados durante 30 min após o desafio com salina (0,0) ou nicotina (s.c.). □ $p < 0,05$ comparado aos grupos controle, sham e 6-OHDA desafiado com salina no dia do teste. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman Keuls.

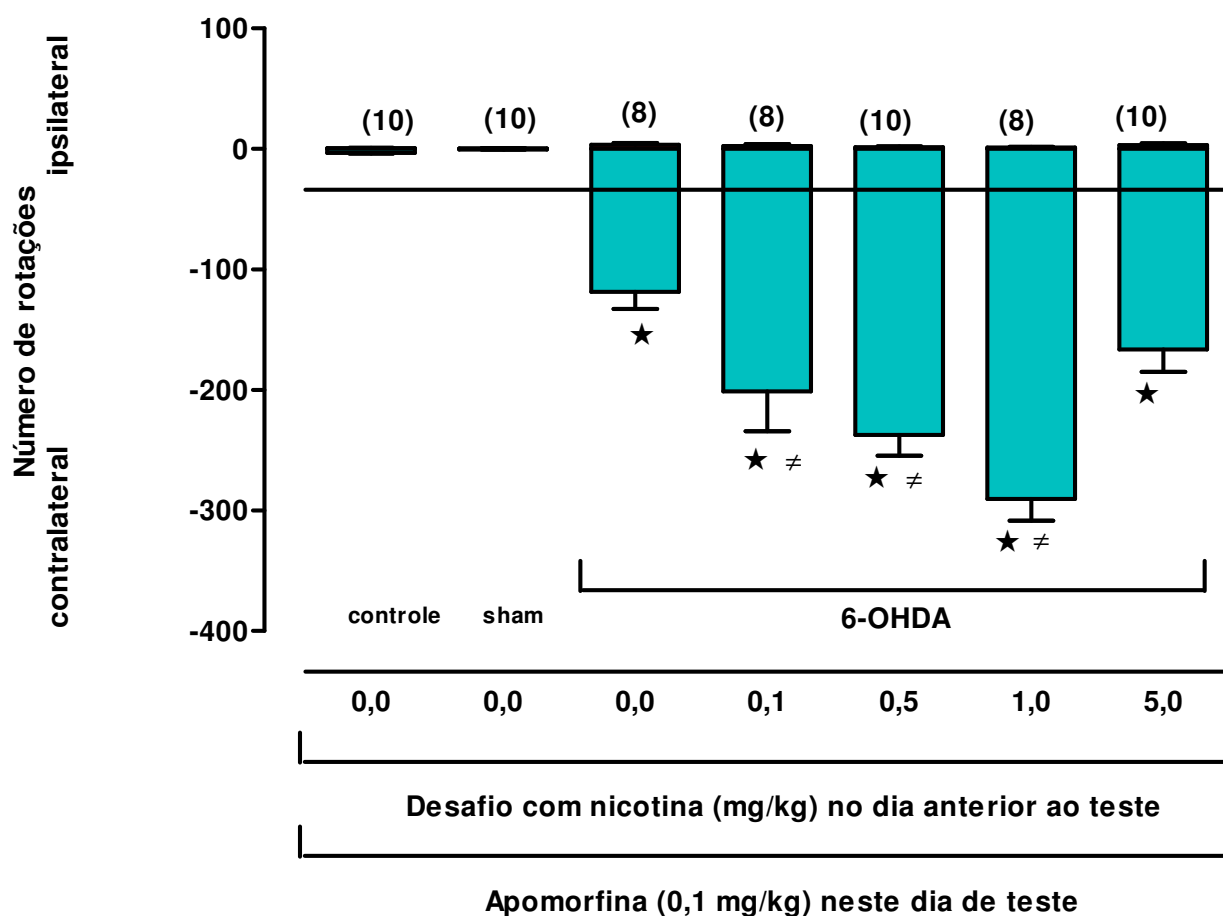


Figura 13: Efeito da administração da mesma dose de apomorfina (0,1 mg/kg) (segundo dia) sobre número de rotações ipsilaterais e contralaterais de ratos unilateralmente lesados com 6-OHDA oito dias após a cirurgia. Os valores sob o eixo das abscissas correspondem às doses de nicotina administradas aos animais no dia anterior ao teste. No segundo dia de teste todos os animais receberam o mesmo desafio de apomorfina (0,1 mg/kg). Os valores das barras representam a média $\pm$ EPM do número de rotações ipsilaterais (valores positivos) e contralaterais (valores negativos) observados durante 30 min após o desafio com apomorfina. ★ $p < 0,05$ comparado aos grupos que não foram lesados com 6-OHDA; ≠ $p < 0,05$ comparado ao grupo 6-OHDA que no dia anterior foi desafiado com salina. ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls.

5.5. Experimento 5 - rotação induzida por nicotina prolongada

A Figura 14 mostra que a administração de nicotina 0,5 mg/kg durante cinco dias (quatorze dias após a lesão dos animais com 6-OHDA) promoveu um aumento significativo das rotações ipsilaterais em relação aos animais do grupo salina (controle e sham) e aos animais lesados que receberam salina no dia do teste ($F(3,31) = 29,17$, $p < 0,05$). Este aumento não foi estatisticamente significativo entre os cinco dias de administração de nicotina em relação ao número de rotações contralaterais ($F(3,31) = 2,05$, $p < 0,05$). Além disso, na Figura 15 observa-se que a média das rotações durante os cinco dias de administração de nicotina não foi diferente nos cinco dias, o que indica que a nicotina sozinha não foi capaz de potencializar o comportamento de rotação. Não houve alteração significativa no número de rotações contralaterais neste dia de teste ($F(6,57) = 1,69$ e $p = 0,14$) (Figura 14).

No dia seguinte ao último dia de administração de nicotina ou de salina (Figura 15), todos os animais receberam a mesma dose de apomorfina 0,1 mg/kg. Observou-se um aumento significativo no número de rotações contralaterais à lesão nos animais que receberam nicotina 0,5 mg/kg durante cinco dias e naqueles animais lesados que receberam salina no dia anterior ($F(3,31) = 78,33$, $p < 0,05$) em relação aos animais controle e sham. Não houve diferença no número de rotações ipsilaterais neste dia de teste ($F(3,31) = 3,08$, $p < 0,05$).

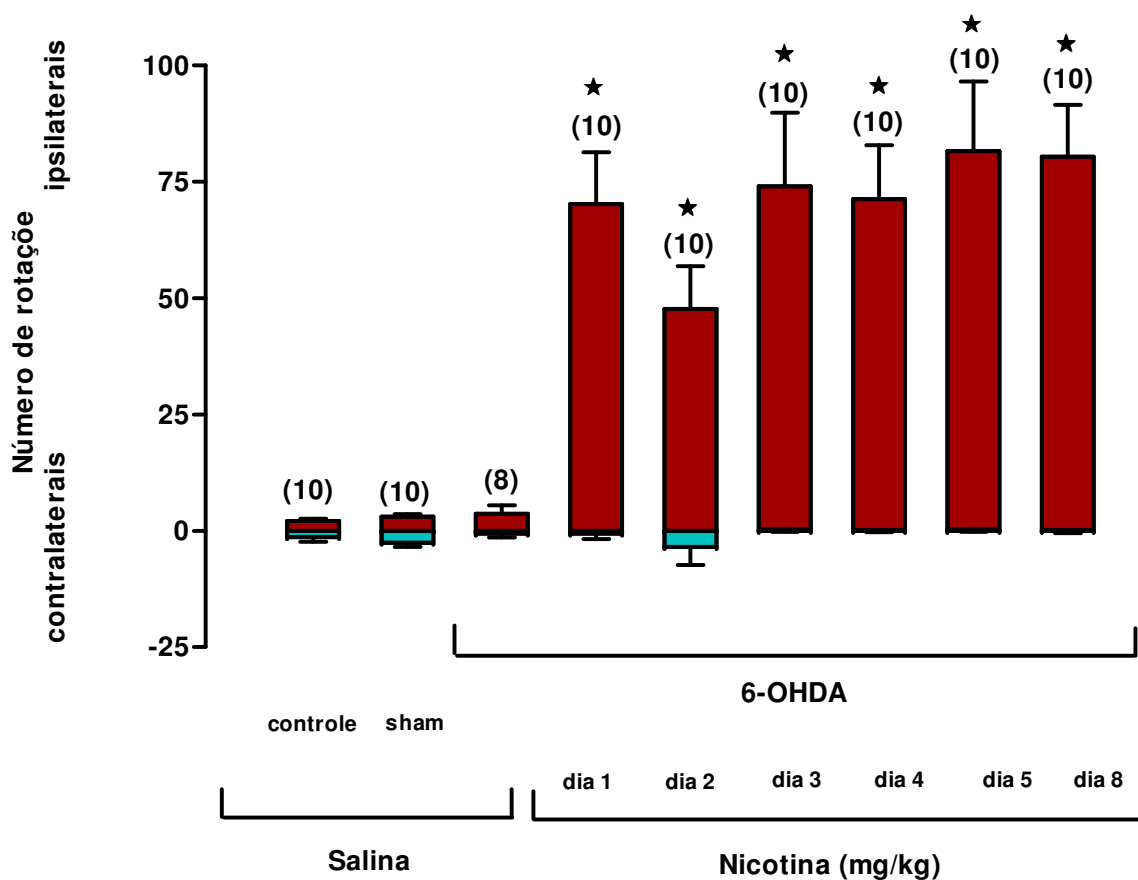


Figura 14: Efeito da administração prolongada (durante cinco dias) de nicotina (0,5 mg/kg) sobre número de rotações ipsilaterais e contralaterais de ratos unilateralmente lesados com 6-OHDA com início quatorze dias após a cirurgia. Os valores representam a média $\pm$ EPM do número de rotações ipsilaterais (valores positivos) e contralaterais (valores negativos) observados durante 30 min após o desafio com salina (0,0) ou apomorfina (s.c.). $\square$ $p < 0,05$ comparado ao grupo salina (controle, sham e aos animais lesados com 6-OHDA desafiados com salina). ANOVA de uma via seguido do teste de Newman Keuls.

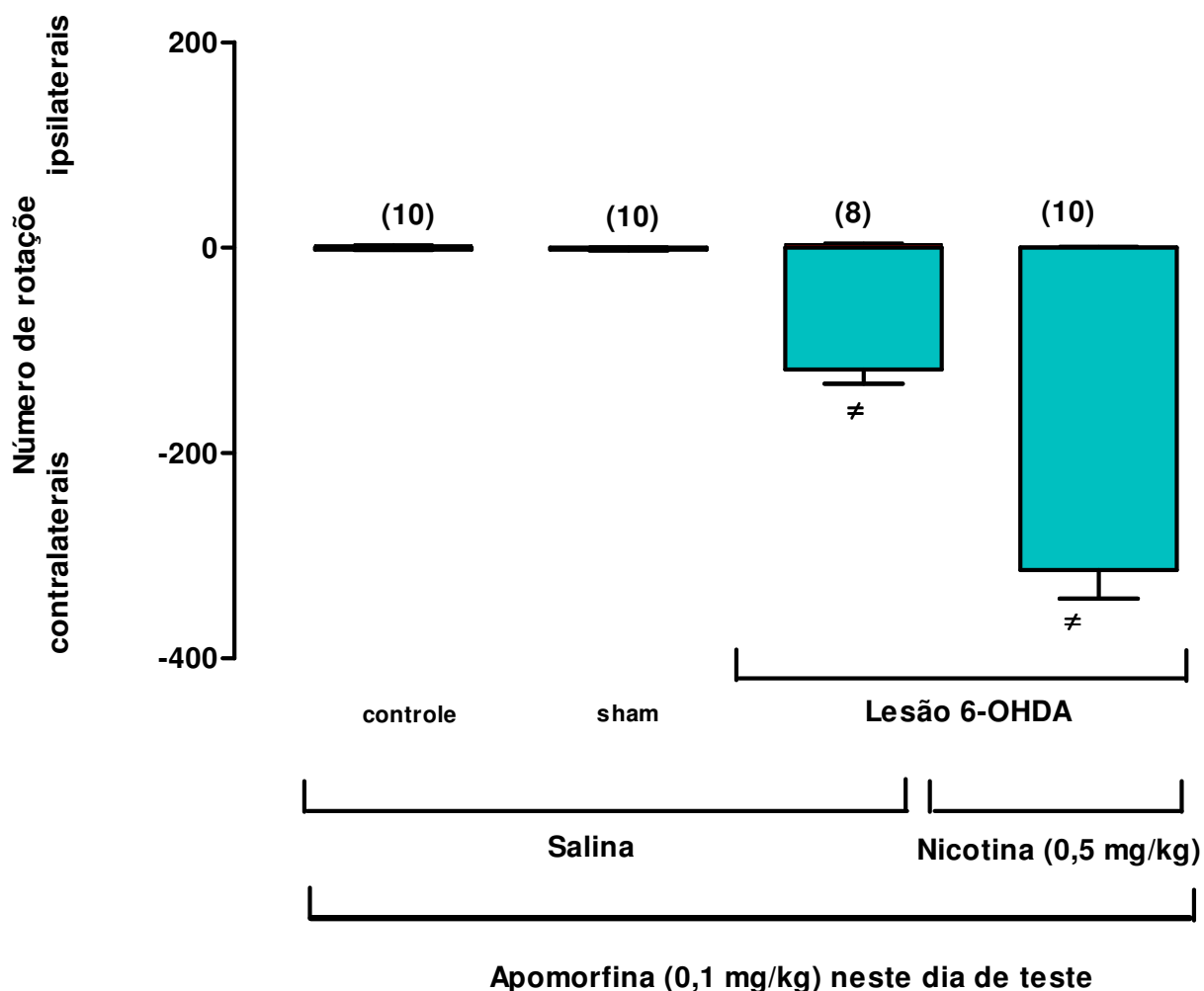


Figura 15: Efeito da administração da mesma dose de apomorfina (0,1 mg/kg) (segundo dia – quinze dias após a cirurgia) sobre número de rotações ipsilaterais e contralaterais de ratos unilateralmente lesados com 6-OHDA tratados com nicotina (0,5 mg/kg) prolongada. Os valores sob o eixo das abscissas correspondem às doses de nicotina administrada aos animais no dia anterior ao teste. No dia do teste todos os animais receberam o mesmo desafio de apomorfina (0,1 mg/kg). Os valores das barras representam a média $\pm$ EPM do número de rotações ipsilaterais (valores positivos) e contralaterais (valores negativos) observados durante 30 min após o desafio com apomorfina. * $p < 0,05$ comparado aos grupos controle e sham que no dia anterior foram desafiados com salina. ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls.

De acordo com a Figura 16, houve um aumento no número de rotações ipsilaterais a lesão nos animais que receberam tratamento prolongado e agudo com nicotina 0,5 mg/kg. Este aumento foi estatisticamente significativo em relação aos animais lesados com 6-OHDA que receberam salina ($F(3,30) = 15,99$ e $p < 0,05$). Não houve alteração significativa no número de rotações contralaterais a lesão ($F(3,30) = 1,84$ e $p = 0,16$).

No dia seguinte, os animais de todos os grupos no dia anterior receberam desafio com a mesma dose de apomorfina 0,1 mg/kg. Estes animais foram observados durante 30 min. De acordo com a Figura 17, observou-se um aumento significativo no número de rotações contralaterais a lesão em todos os grupos ($F(3,30) = 11,12$ e $p < 0,05$) em relação aos animais lesados que receberam salina no dia anterior. O número de rotações ipsilaterais a lesão neste dia de teste não foi alterado ($F(3,30) = 1,91$ e $p = 0,15$).

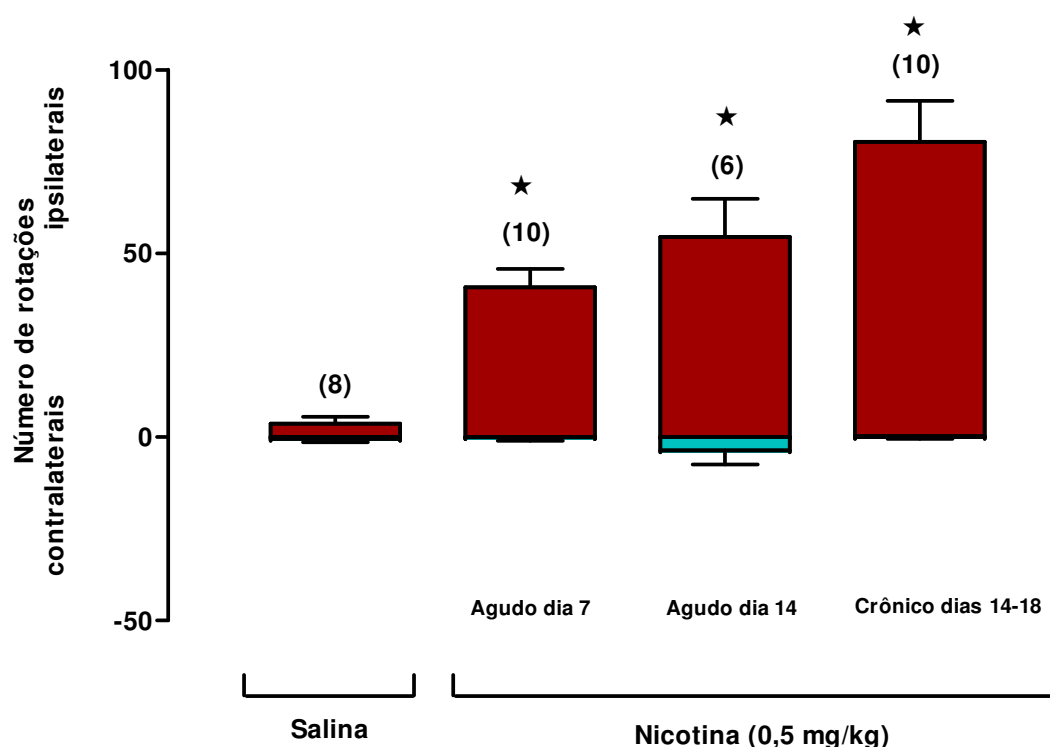


Figura 16: Efeito da administração aguda e prolongada de nicotina (0,5 mg/kg) sobre o comportamento rotatório de ratos unilateralmente lesados com 6-OHDA sete e quatorze dias após a cirurgia. Os tratamentos agudos ocorreram 7 ou 14 dias após a lesão com 6-OHDA. O tratamento crônico foi aplicado 1 vez ao dia entre os dias 14-18. Os valores das barras representam a média $\pm$ EPM do número de rotações ipsilaterais (valores positivos) e contralaterais (valores negativos) observados durante 30 min após o último desafio com apomorfina. □ $p < 0,05$ comparado aos grupos que não foram lesados com 6-OHDA; # $p < 0,05$ comparado ao grupo 6-OHDA que no dia anterior foi desafiado com salina. ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls.

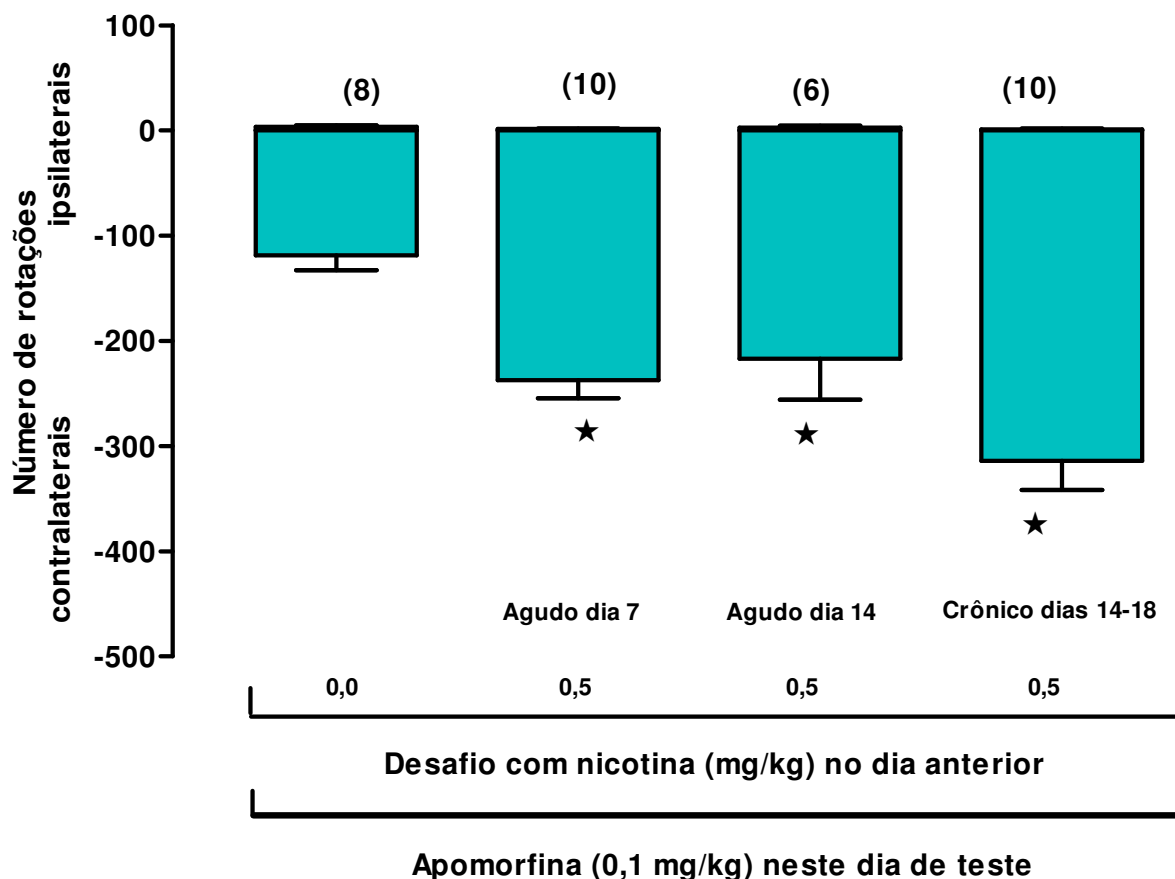


Figura 17: Efeito da administração da mesma dose de apomorfina (0,1 mg/kg) (segundo dia – oito e quinze dias após a cirurgia) sobre número de rotações ipsilaterais e contralaterais de ratos unilateralmente lesados com 6-OHDA, após tratamento agudo ou prolongado com nicotina (0,5 mg/kg). Os tratamentos agudos ocorreram sempre 1 dia antes do teste aplicado 7 ou 14 dias após a lesão com 6-OHDA. O tratamento prolongado foi aplicado nos 5 dias anteriores ao teste aplicado 18 dias após a lesão com 6-OHDA. Os valores sob o eixo das abscissas correspondem às doses de nicotina administradas aos animais no dia anterior ao teste. No dia do teste todos os animais receberam o mesmo desafio de apomorfina (0,1 mg/kg). Os valores das barras representam a média $\pm$ EPM do número de rotações ipsilaterais (valores positivos) e contralaterais (valores negativos) observados durante 30 min após o desafio com apomorfina. □ $p < 0,05$ comparado aos grupos que não foram lesados com 6-OHDA; ≠ $p < 0,05$ comparado ao grupo 6-OHDA que no dia anterior foi desafiado com salina; ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls.

5.6. Experimento 6 – análise neuroquímica

Os dados obtidos através da análise neuroquímica (Figura 18) mostram que houve uma redução significativa na dosagem de DA e de seu metabólito DOPAC no estriado ipsilateral em relação ao estriado intacto de ratos unilateralmente lesados com 6-OHDA no FPM ($F(5,18) = 96,35$ e $p < 0,05$), confirmando desta maneira a ocorrência da lesão destes animais com 6-OHDA. Houve uma redução embora não significativa na dosagem do metabólito HVA no estriado ipsilateral em relação ao contralateral.

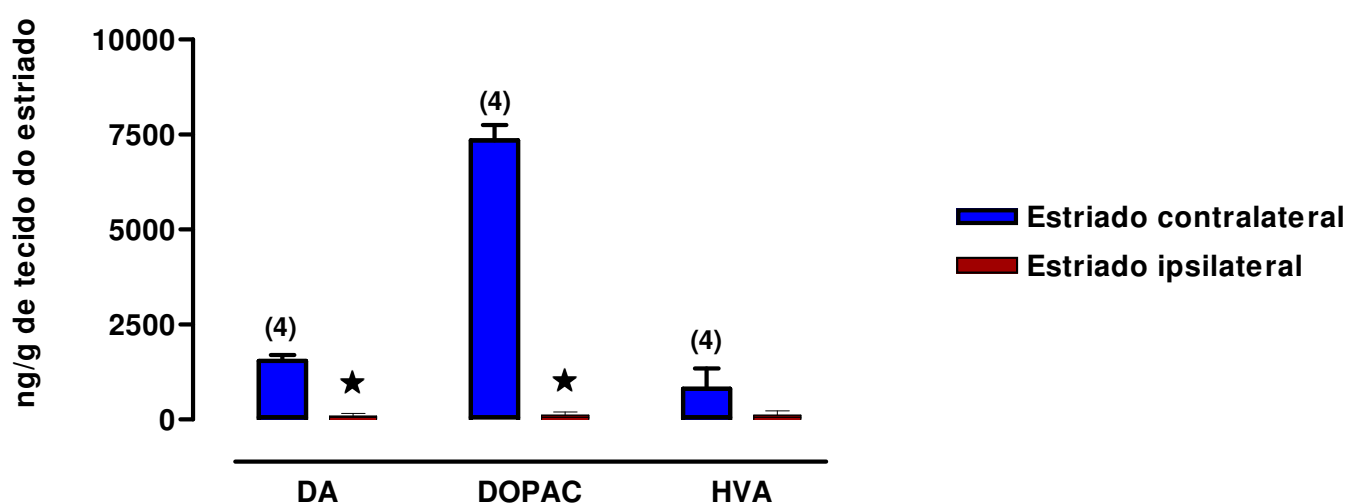


Figura 18: Dosagem de catecolaminas dopamina (DA), ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) e de ácido homovanílico (HVA) no estriado ipsilateral e contralateral a lesão com 6-OHDA no FPM oito dias após a cirurgia. Os valores são dados em ng/g de tecido. □ $p < 0,05$ em relação ao lado contralateral a lesão. ANOVA de uma via seguido do teste de Newman Keuls.

6. DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram que a administração de cafeína e/ou nicotina foi capaz de melhorar a função motora de ratos tornados parkinsonianos.

Os resultados da rotação espontânea (experimento 1) mostram que animais lesados no FPM com a neurotoxina 6-OHDA apresentaram rotação espontânea ipsilateral a lesão um e sete dias após a lesão. Este experimento foi realizado por sugestão de SCHWARTING (comunicação pessoal), pois resultados obtidos por FORNAGUERA e SCHWARTING (1999) afirmam que esta rotação espontânea pode ser usada como método de verificar a efetividade da lesão dos animais com 6-OHDA.

Assim, a rotação espontânea foi realizada no primeiro e sétimo dias após a lesão dos animais com 6-OHDA. Como resultado, os animais apresentaram rotação ipsilateral à lesão no primeiro e sétimo dias após lesão, corroborando a ocorrência da lesão.

Os resultados do experimento 2 (teste de rotação com diferentes doses de apomorfina) mostram que efetivamente houve lesão unilateral dos neurônios dopaminérgicos da SNc quando a neurotoxina 6-OHDA foi administrada no FPM, pois a administração subcutânea (s.c.) de diferentes doses de apomorfina induziu de forma dose-dependente aumento do comportamento de rotação contralateral a lesão estatisticamente significativa nos animais uma semana após a lesão em comparação aos animais controle e sham desafiados com salina ou apomorfina (0,1 mg/kg) e em comparação aos animais lesados mas que receberam salina. Estes dados estão de acordo com os dados da literatura, os quais mostram que após lesão da SNc e conseqüente perda de DA estriatal os animais apresentam rotações contralaterais ao lado lesado (e de maior atividade) quando desafiados com agonistas dopaminérgicos, como a apomorfina devido a uma estimulação dos receptores dopaminérgicos supersensibilizados no estriado desnervado (SCHWARTING e HUSTON, 1996; HEFTI *et al.*, 1980; DEUMENS *et al.*, 2002). Em conjunto estes resultados sugerem que todos os animais utilizados apresentavam uma lesão da SNc e que o procedimento padronizado pode ser usado como um teste válido para drogas antiparkinsonianas.

A apomorfina é um agonista do receptor de DA que provoca rotações contralaterais à lesão pela estimulação tanto dos receptores dopaminérgicos do subtipo D₁ e D₂ supersensibilizados no lado lesado (ipsilateral) (UNGERSTEDT,

1971c; UNGERSTEDT e ARBUTHNOTT, 1970; CREESE *et al.*, 1977; HERREA-MARSCHITZ e UNGERSTEDT, 1984).

Esta abordagem tem sido utilizada como modelo animal da doença de Parkinson e também para testar novas drogas e estratégias terapêuticas. A lesão da via nigroestriatal provoca uma assimetria funcional devido a uma supersensibilidade dos receptores dopaminérgicos pós-sinápticos no estriado desnervado e que foi evidenciada através da observação do comportamento de rotação eliciado por agonistas diretos (apomorfina) ou indiretos (anfetamina) dos receptores dopaminérgicos (UNGERSTEDT, 1971a,b; UNGERSTEDT e ARBUTHNOTT, 1970; ROBINSON e BECKER, 1983; LYNCH e CAREY, 1989; POLLACK e YATES, 1999).

No segundo dia de teste de rotação com apomorfina no experimento 2, os animais de todos os grupos receberam a mesma dose de apomorfina (0,1 mg/kg, s.c.). Neste dia de teste, observou-se um aumento dose-resposta no número de rotações contralaterais a lesão, apesar de todos terem recebido a mesma dose de apomorfina. Esta resposta provavelmente ocorreu porque a apomorfina, quando administrada em diferentes doses no dia anterior, pode ter provocado uma sensibilização dose-dependente dos receptores dopaminérgicos no estriado ipsilateral a lesão.

Numerosos estudos mostram que uma única exposição (chamada de priming) a um agonista dopaminérgico aumenta o comportamento de rotação eliciado por subsequentes desafios com agonistas dopaminérgicos (DI CHIARA *et al.*, 1992). Em pacientes portadores da doença de Parkinson, o efeito de priming é também observado em pacientes expostos a L-DOPA, e este é um dos fatores que ocasiona o desenvolvimento das complicações da resposta motora se estes pacientes são tratados em seguida com L-DOPA ou com um agonista do receptor dopaminérgico do subtipo D₂ (UNGERSTEDT, 1968).

A introdução da L-DOPA revolucionou o tratamento da doença de Parkinson (LANG e OBESO, 2004). Contudo, flutuações motoras e discinesias complicam o tratamento da L-DOPA na maioria dos pacientes dentro de 5-10 anos do início do tratamento (MUENTER e TYCE, 1971; MARSDEN e PARKES, 1976; MARSDEN *et al.*, 1982; OBESO *et al.*, 2000a,b; AHLSSKOG e MUENTER, 2001). Isto estimula a pesquisa por novos agentes antiparkinsonianos. Além disso, agonistas

dopaminérgicos (bromocriptina, pergolide, lisuride e pramipexole) também apresentam eficácia reduzida após anos de tratamento (LANG e OBESO, 2004). Do mesmo modo, a associação destes agentes com uma droga que pudesse aumentar a afinidade dos agonistas dopaminérgicos a seus receptores poderia ser uma ferramenta útil para potencializar os efeitos dos agonistas dopaminérgicos e reduzir sua ineficácia.

Desta maneira, um outro tratamento seria muito interessante e neste caso os antagonistas dos receptores adenosinérgicos do subtipo A_{2A} são candidatos (KOGA *et al.*, 2000).

Neste presente estudo, os resultados do experimento 3, mostram que a cafeína, um antagonista dos receptores adenosinérgicos do subtipo A_{2A} administrada nas doses de 1,0, 5,0 e 10,0 mg/kg (s.c.) a ratos unilateralmente lesados com 6-OHDA no FPM induziu um aumento nas rotações ipsilaterais ao invés de contralaterais. Este aumento foi estatisticamente significativo em relação ao grupo tratado com salina nas doses de 5,0 e 10,0 mg/kg, indicando ser um efeito dependente da dose. Além disso, animais lesados tratados com cafeína apresentaram aumento estatisticamente significativo no número de rotações ipsilaterais em relação ao grupo lesado com 6-OHDA que recebeu salina no dia do teste, mostrando que provavelmente a cafeína produziu este efeito de aumentar o número de rotações por estar aumentando a afinidade dos receptores dopaminérgicos existentes a se ligarem com a DA e então produzir o comportamento.

Estes resultados sugerem que a cafeína, administrada no primeiro dia de teste do experimento 3, deve estar promovendo uma sensibilidade dose-dependente do comportamento de rotação dos animais no dia seguinte, quando estes foram desafiados com a mesma dose de apomorfina (0,1 mg/kg), pois os animais lesados que no dia do teste com cafeína receberam salina apresentaram um número inferior de rotações contralaterais em relação aos animais pré-tratados com cafeína no dia anterior.

Rotações ipsilaterais (mesmo lado da lesão) ocorrem após desafio com drogas que induzem a liberação de DA, como os agonistas indiretos dos receptores dopaminérgicos, os quais produzem um desbalanço de DA através da ativação dos

terminais nigroestriatais intactos no lado contralateral. (UNGERSTEDT, 1976; HEFTI *et al.*, 1980; DEUMENS *et al.*, 2002).

Desta maneira, o aumento da resposta do comportamento de rotação é geralmente usado como um índice da habilidade de drogas dopaminérgicas em induzirem complicações motoras (POLLACK *et al.*, 1997; HENRY *et al.*, 1998; KASHIHARA *et al.*, 2000; VAN KAMPEN e STOESSL, 2000).

Quando os mesmos animais, no dia seguinte ao experimento 3, foram desafiados com uma única dose de apomorfina (0,1 mg/kg, s.c.), observou-se um aumento do número de rotações contralaterais à lesão, resultado esperado pelo fato da apomorfina ser uma agonista direto dos receptores dopaminérgicos. Surpreendentemente, este aumento foi dose-dependente, indicando que a cafeína, no dia anterior, pode ter promovido uma sensibilização dos receptores dopaminérgicos no estriado contralateral à lesão, fazendo com que no dia do teste com a mesma dose de apomorfina o comportamento de rotação apresentasse um aumento dependente da dose de cafeína usada no dia anterior.

Diversos estudos mostram que a adenosina possui um papel oposto ao da DA no cérebro, já que os antagonistas da adenosina, como a cafeína, potencializam os efeitos motores dos agonistas dopaminérgicos e que este antagonismo é devido a interações entre os subtipos de receptores no estriado, principalmente A_{2A} e D_2 , os quais estão co-localizados nos neurônios estriadopalidais (FERRÉ *et al.*, 1992, 1997; FERRÉ, 1997; SVENNINGSSON *et al.*, 1997b). No modelo de rotação de UNGERSTEDT (1970), o comportamento de rotação ipsilateral reflete principalmente um aumento na liberação de DA na via nigroestriatal intacta (PYCOCK e MARSDEN, 1978).

Alguns estudos sugerem que os déficits de DA produzem modificação na transmissão dopaminérgica (PINNA *et al.*, 2002; EKONOMOU *et al.*, 2004), facilitando a atividade dos receptores A_{2A} (MORELLI *et al.*, 1995). Como a estimulação dos receptores A_{2A} possui um papel negativo no controle do comportamento motor (HAUBER e MUNKLE, 1997; MORELLI *et al.*, 1994; RIMONDINI *et al.*, 1997) o bloqueio destes receptores pode ser uma estratégia terapêutica útil no aumento da

eficácia dos agonistas dos receptores dopaminérgicos (RICHARDSON *et al.*, 1997; KASE *et al.*, 2003; MORELLI *et al.*, 2003; FISONE *et al.*, 2004).

Existem relatos de que a administração de cafeína a ratos lesados com 6-OHDA produziu rotações contralaterais e potencializou o comportamento de rotação induzido por agonistas dopaminérgicos como a L-DOPA e apomorfina (FUXE e UNGERSTEDT, 1974; FREDHOLM *et al.*, 1983; HERRERA-MARSCHITZ *et al.*, 1988; JIANG *et al.*, 1993; GARRETT e HOLTZMAN, 1995). Isso indica que o bloqueio dos receptores A_{2A} pela cafeína alterou a transmissão dopaminérgica e isto contribuiu para a melhora de parâmetros motores em modelos animais da doença de Parkinson (PINNA *et al.*, 2005).

No estudo aqui apresentado, a cafeína, em diferentes doses, apresentou um efeito de aumento do número de rotações ipsilaterais a lesão. Diferenças nos protocolos experimentais podem ter contribuído para esta discrepância. A maioria dos estudos da literatura tem usado doses mais altas de cafeína (20-40 mg/kg) em associação com agonista dopaminérgico (CASAS *et al.*, 1999; CASAS *et al.*, 2000; PRAT *et al.*, 2000; JOGHATAIE *et al.*, 2004), enquanto que neste trabalho a cafeína foi usada sozinha. Além disso, o intervalo entre a cirurgia e o comportamento rotacional na literatura varia entre 2 – 4 semanas ao invés de uma semana como neste estudo presente.

Além disso, uma outra explicação para esta diferença pode ter sido a região de administração lenta da 6-OHDA. Nesta linha, a 6-OHDA provocou predominantemente rotações contralaterais exceto quando infundida na parte mais lateral da SNc, onde ocasionou rotações ipsilaterais. Alguns estudos prévios têm relatado esta variação no comportamento de rotação em ratos lesados com 6-OHDA (COSTALL *et al.*, 1976; THAL *et al.*, 1979; REDGRAVE e MITCHELL, 1982; HIRSCHHORN *et al.*, 1983; SCHWARTING e HUSTON, 1996; OLDS *et al.*, 2006).

Assim, os dados deste experimento 3 sobre o efeito da cafeína na rotação podem ser explicados pelo fato de que a cafeína possa estar liberando DA no estriado contralateral (intacto) ao sítio da lesão e este aumento na atividade no lado intacto fez com que os animais apresentassem um comportamento de rotação ipsilateral a lesão.

Embora tenha sido primeiramente sugerido que estes efeitos dos antagonistas adenosinérgicos pudessem ser principalmente mediados pela existência de interações antagonistas específicas entre receptores dopaminérgicos e adenosinérgicos estriatais (FERRÉ *et al.*, 1992), alguns achados experimentais contradizem esta hipótese. Desta maneira, resultados recentes sugerem que antagonistas seletivos dos receptores adenosinérgicos A₁ e A_{2A} não são capazes de induzir qualquer comportamento de rotação quando administrados sozinhos, mas que ambos podem fortemente potencializar o comportamento de rotação induzido por agonistas dos receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ (PINNA *et al.*, 1996; POPOLI *et al.*, 1996).

Resultados obtidos com camundongos reserpinizados (KANDA *et al.*, 1998; SHIOZAKI *et al.*, 1999; GRONDIN *et al.*, 1999) sugerem que algum grau de atividade dopaminérgica é necessário para obtenção da atividade motora induzida pela cafeína. Entretanto, após a reserpinização (GIMÉNEZ-LLORT *et al.*, 1995) ou após lesão induzida por 6-OHDA (GARRETT e HOLTZMAN, 1995), o bloqueio da neurotransmissão dopaminérgica se opõe à atividade motora induzida por antagonista adenosinérgico. Além disso, antagonistas dos receptores adenosinérgicos A₁ e A_{2A} podem ser úteis tanto nos estágios iniciais da doença de Parkinson, como em estágios avançados devido a existência de interações específicas entre A₁ e D₁ e entre A_{2A} e D₂ (FERRÉ *et al.*, 2001).

Além disso, resultados de FENU e MORELLI (1998) mostram a existência de sensibilização cruzada entre os efeitos de ativação motora dos agonistas dopaminérgicos e cafeína em ratos com lesão unilateral com 6-OHDA da via nigroestriatal. Na verdade, a estimulação prévia dos receptores dopaminérgicos parece ser necessária para que ocorra a indução do comportamento de rotação (FERRÉ *et al.*, 2001).

A co-localização dos receptores adenosinérgicos A_{2A} e dos receptores dopaminérgicos D₂ nos neurônios estriato-palidais fornece uma base anatômica para a existência de uma interação antagonista funcional entre estes receptores (PINNA *et al.*, 2005). A primeira evidência bioquímica de uma interação entre receptores A_{2A} e D₂ originou-se de observações realizadas por FERRÉ *et al.* (2001) as quais mostraram que a estimulação dos receptores adenosinérgicos A_{2A} diminuiu a afinidade dos

receptores dopaminérgicos D_2 . A interação A_{2A} - D_2 parece ser mais potente no estriado sem inervação dopaminérgica e com receptores dopaminérgicos D_2 supersensibilizados (FERRÉ *et al.*, 1992). A administração CGS 21680, um agonista dos receptores adenosinérgicos A_{2A} reduziu o comportamento de rotação contralateral induzido por agonista dopaminérgico em ratos unilateralmente lesados com 6-OHDA (MORELLI *et al.*, 1994). Em contraste, os antagonistas dos receptores adenosinérgicos, como a cafeína, produziram efeitos estimulantes motores os quais também parecem estar mais relacionados a uma ação nos receptores adenosinérgicos A_{2A} do que nos receptores adenosinérgicos A_1 (GRIEBEL *et al.*, 1991; PINNA *et al.*, 2005; SVENNINGSSON *et al.*, 1997a).

Além disso, estudos em modelos animais da doença de Parkinson causados por neurotoxinas como o MPTP e a 6-OHDA têm mostrado que os antagonistas dos receptores A_{2A} melhoram os prejuízos motores e potencializam o comportamento motor estimulado por agonistas dopaminérgicos (PINNA *et al.*, 1996; POLLACK AND FINK, 1996; FENU *et al.*, 1997; KANDA *et al.*, 1998; GRONDIN *et al.*, 1999). Evidências clínicas recentes mostraram que os antagonistas dos receptores adenosinérgicos A_{2A} são efetivos na redução dos prejuízos motores em pacientes parkinsonianos possuindo também baixo risco de induzirem discinesias (CHASE *et al.*, 2003; KASE *et al.*, 2003; LEWITT, 2004).

De acordo com os resultados deste estudo, a cafeína administrada em diferentes doses no primeiro dia de teste pode ter promovido a liberação de DA e sensibilizando os receptores dopaminérgicos, pois no dia seguinte, quando os animais foram desafiados com uma única dose de apomorfina, houve um aumento dose-dependente das rotações contralaterais à lesão. Estes resultados são corroborados pela literatura, que mostra que ratos com lesão unilateral da via dopaminérgica nigroestriatal com 6-OHDA apresentam sensibilização comportamental após tratamento repetido com agonistas dopaminérgicos (POLLACK e YATES, 1999). Neste caso, não houve tratamento prévio com agonista dopaminérgico, mas como a cafeína pode ter causado liberação endógena de DA, no dia seguinte quando os animais receberam um agonista dopaminérgico (apomorfina), o comportamento observado foi similar àqueles previamente tratados com um agonista da DA.

Juntos, estes dados sugerem que a cafeína foi capaz de melhorar os déficits motores em ratos com lesão dopaminérgica da via nigroestriatal. Os mecanismos envolvidos nesta ação podem estar relacionados a um aumento na liberação de DA no estriado intacto (contralateral a lesão), já que os ratos unilateralmente lesados com 6-OHDA no FPM apresentaram comportamento de rotação ipsilateral à lesão quando desafiados com as doses de cafeína utilizadas neste trabalho.

Os estudos sobre os efeitos da nicotina (experimento 4) indicam que em baixas doses (0,1, 0,5 e 1,0 e 5,0 mg/kg, s.c.) esta droga foi capaz de aumentar o número de rotações ipsilaterais. Este aumento foi estatisticamente significativo nas doses de 0,5 e 1,0 mg/kg em relação aos animais que receberam salina (controle, sham e 6-OHDA). Além disso, nossos dados do segundo dia, quando todos os animais foram desafiados com a mesma dose de apomorfina (0,1 mg/kg, s.c.), mostram que houve um aumento dose-dependente das rotações contralaterais induzidas por apomorfina relacionadas à administração prévia de nicotina no primeiro dia nas doses de 0,1 a 1,0 mg/kg, pois os animais desafiados com estas doses de nicotina apresentaram um aumento significativo no número de rotações contralaterais em relação aos animais lesados que receberam salina no dia anterior. Estes resultados sugerem que o tratamento com diferentes doses de nicotina no primeiro dia de teste deve estar promovendo uma sensibilização dose-dependente do comportamento de rotação dos animais no segundo dia de teste, após desafio de todos com a mesma dose de apomorfina 0,1 mg/kg, exceto na maior dose de nicotina 5,0 mg/kg, pois o aumento no número de rotações foi dose-dependente do tratamento prévio com nicotina.

Estes dados são sugestivos de uma sensibilização dos receptores dopaminérgicos (no segundo dia) induzida pela nicotina administrada no primeiro dia.

Estes resultados são confirmados por outros estudos, que mostram que ratos com lesão unilateral da via dopaminérgica nigroestriatal com 6-OHDA apresentam sensibilização comportamental após tratamento repetido com agonistas dopaminérgicos (POLLACK e YATES, 1999). A literatura mostra que a nicotina parece melhorar de maneira significativa os sintomas de pacientes com doença de Parkinson (KELTON *et al.*, 2000) pelo aumento nos níveis de DA sináptica na SN (KITA *et al.*, 1992). Em nosso estudo, não houve tratamento prévio com agonista dopaminérgico,

mas a nicotina pode ter causado liberação endógena de DA, pois no dia seguinte quando os animais receberam um agonista dopaminérgico (apomorfina), o comportamento observado foi o mesmo esperado se tivessem sido previamente tratados com um agonista da DA.

Desta maneira, os dados do experimento 4 sugerem que a nicotina foi capaz de melhorar os déficits motores em ratos com lesão dopaminérgica da via nigroestriatal, ao promover um aumento da resposta comportamental administrada previamente a um agonista dopaminérgico, potencializando seu efeito. Os mecanismos envolvidos nesta ação podem estar relacionados a um aumento na liberação de DA no estriado intacto (contralateral a lesão), pois ratos unilateralmente lesados com 6-OHDA no FPM apresentaram comportamento de rotação ipsilateral à lesão quando desafiados com as doses de nicotina utilizadas neste trabalho.

A ampla ocorrência de receptores nicotínicos da acetilcolina em localizações pré-sinápticas no sistema nervoso central é bem estabelecida (WONNACOTT, 1997; WONNACOTT *et al.*, 2000). As ações modulatórias dos receptores nicotínicos pré-sinápticos, tanto por estimular a liberação de neurotransmissor quanto por aumentar a eficácia sináptica (GRAY *et al.*, 1996) são consideradas parte de um importante papel destes receptores nicotínicos neuronais (ROLE e BERG, 1996). Além da maciça liberação de DA através de estimulação nicotínica, esta estimulação tem sido estudada devido às propriedades reforçadoras da DA expressas pela ativação locomotora. Por liberar DA, a nicotina também apresenta efeitos reforçadores. Deste modo, por liberar DA, ela também poderia ser usada no tratamento da doença de Parkinson (MENZAGHI *et al.*, 1997).

Mecanismos colinérgicos estão envolvidos na regulação das vias dopaminérgicas nigroestriatal e mesolímbica/mesocortical (DAMSMA *et al.*, 1988; BENWELL e BALFOUR, 1992). Pouca atenção tem sido dada aos efeitos da nicotina na via nigroestriatal que quando sofre degeneração apresenta um papel fundamental na patofisiologia da doença de Parkinson (JANHUNEN *et al.*, 2005). A administração aguda de nicotina *in vivo* provoca aumento da concentração de DA extracelular no caudado-putamen quando usada sistemicamente (DAMSMA *et al.*, 1988; JANHUNEN e AHTEE, 2004) ou localmente (TOTH *et al.*, 1992). Desta maneira, a nicotina nas

doses utilizadas neste trabalho provavelmente promoveu um aumento nos níveis de DA no lado não lesado (contralateral), o qual ativou os receptores dopaminérgicos e produziu um aumento no número de rotações ipsilaterais.

Embora a administração aguda de nicotina evidentemente ativa a via dopaminérgica nigroestriatal, alguns estudos têm mostrado que ela produz rotações contralaterais (FUXE *et al.*, 1977; KAAKKOLA, 1981) ou ipsilaterais (JANHUNEN *et al.*, 2005).

Alguns estudos relatam esta variação do comportamento rotatório pela 6-OHDA. Assim, 6-OHDA provoca principalmente rotações contralaterais, exceto quando é infundida na parte mais lateral da SNc, desta maneira promovendo principalmente rotações contralaterais. Além disso, quando a 6-OHDA foi infundida na parte mais central e medial da SNc alguns animais apresentam comportamento contralateral. (COSTALL *et al.*, 1976; THAL *et al.*, 1979; REDGRAVE e MITCHELL, 1982; HIRSCHHORN *et al.*, 1983; SCHWARTING e HUSTON, 1996; OLDS *et al.*, 2006). Por outro lado, com o objetivo de trabalhar com amostras mais homogêneas, muitos autores excluem os animais que não apresentam rotações contralaterais (SCHWARTING e HUSTON, 1996; TAKEDA *et al.*, 2005; LANE *et al.*, 2006).

De acordo com os dados de JANHUNEN *et al.* (2005), a administração repetida de nicotina (0,5 mg/kg, s.c.) uma vez ao dia durante cinco dias provocou um aumento no número de rotações ipsilaterais a qual foi gradualmente aumentada mostrando um desenvolvimento gradual de uma sensibilidade induzida pela nicotina.

A sensibilização causada por psicoestimulantes parece ser dependente da ativação dos receptores nicotínicos e seu bloqueio com o uso de antagonistas inibe a indução da sensibilização comportamental (SCHOFFELMEER *et al.*, 2002). Desta maneira, é possível que a administração de uma grande dose de um agonista dos receptores nicotínicos, que provavelmente dessensibiliza/inativa alguns subtipos de receptores nicotínicos, possa inibir o desenvolvimento do comportamento de sensibilização no comportamento de rotação (JANHUNEN *et al.*, 2005). Este fato pode explicar a ausência de rotações ipsilaterais quando uma dose mais alta de nicotina (5,0 mg/kg, s.c.) foi administrada no presente estudo. Estes achados devem estar relacionados aos efeitos benéficos da nicotina na doença de Parkinson

(FAGERSTRÖM *et al.*, 1994; KELTON *et al.*, 2000) por permitir que as sinapses dopaminérgicas remanescentes compensem a deficiência funcional de DA.

A natureza de longa-duração da sensibilização comportamental pode ser atribuída a uma resposta persistentemente aumentada dos neurônios que inervam o núcleo accumbens, como os neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral (VTA) e neurônios glutamatérgicos do córtex pré-frontal e amígdala basolateral (PIERCE e KALIVAS, 1997; WHITE e KALIVAS, 1998; VANDERSCHUREN e KALIVAS, 2000).

Uma interação central entre os sistemas dopaminérgico e colinérgico é amplamente documentada (CLARKE, 1995; LEVIN e ROSE, 1995; NISELL *et al.*, 1995; STOLERMAN *et al.*, 1995; DANI e HEINEMANN, 1996; WONNACOTT, 1997; BALFOUR *et al.*, 1998). Interações entre a neurotransmissão dopaminérgica e nicotínica nas vias nigroestriatal e mesolímbica podem ser responsáveis pelos efeitos locomotores observados nestes estudos (CLARKE, 1990; RICHARDSON e TIZABI, 1994; MUSEO e WISE, 1995).

A nicotina estimula ou deprime a atividade locomotora dependendo da dose, da duração da exposição e do procedimento de administração. Baixas doses agudas de nicotina aumentam a atividade locomotora (BENWELL e BALFOUR, 1992) enquanto que após doses mais altas, a atividade locomotora é inicialmente diminuída e um comportamento estereotipado pode ocorrer (CLARKE e KUMAR, 1983).

De acordo com o experimento 5, a nicotina (0,5 mg/kg) administrada prolongadamente não potencializou o comportamento de rotação ipsilateral durante os cinco dias. Entretanto quando os animais são desafiados com apomorfina (0,1 mg/kg) no dia seguinte, observou-se um aumento das rotações contralaterais de maneira significativa em relação aos animais lesados que receberam salina no dia anterior, mostrando que a nicotina pode estar de alguma maneira aumentando a liberação de DA estriatal e provocando esta sensibilidade comportamental.

Além destes resultados, também foi observado no experimento 5 que a nicotina 0,5 mg/kg administrada de maneira aguda e prolongada, uma e duas semanas após a lesão com 6-OHDA, provocou um aumento das rotações ipsilaterais de maneira significativa em comparação aos animais lesados que receberam salina no dia do

teste. Este aumento mostrou-se tempo-dependente da lesão, pois os animais desafiados de maneira aguda com a mesma dose de nicotina duas semanas após a lesão apresentaram um maior número de rotações ipsilaterais em relação aos animais desafiados uma semana depois da lesão, embora este aumento não tenha sido estatisticamente significativo. Do mesmo modo, os animais tratados prolongadamente com nicotina (0,5 mg/kg) apresentaram um maior número de rotações ipsilaterais em relação aos animais desafiados agudamente com nicotina. A partir destes resultados conclui-se que a nicotina possa estar liberando DA no estriado, pois aumentou o número de rotações ipsilaterais nos animais lesados que não receberam nicotina no dia anterior mas que quando desafiados com uma única dose de apomorfina (0,1 mg/kg) apresentaram um número significativo de rotações contralaterais.

Como duas semanas após a lesão este aumento do número de rotações induzido pelo tratamento com nicotina foi maior em relação aos resultados obtidos uma semana após a lesão, pode ser que tenha ocorrido uma maior sensibilidade dos receptores dopaminérgicos duas semanas após a lesão.

No dia seguinte, quando estes mesmos animais foram desafiados com apomorfina (0,1 mg/kg) observou-se um aumento não significativo no número de rotações contralaterais tempo-dependente da lesão, mas significativo em relação aos animais lesados que receberam salina no dia anterior. A partir destes dados, acredita-se que o pré-tratamento com nicotina (0,5 mg/kg), agudo e prolongado, no dia anterior, por ter liberado DA no estriado, tenha provocado uma sensibilização comportamental quando os animais foram desafiados com apomorfina (0,1 mg/kg) no dia seguinte.

Os dados da neuroquímica (experimento 6) mostram uma diminuição significativa na quantidade de DA e do seu metabólito DOPAC no estriado ipsilateral à lesão com 6-OHDA em relação ao lado intacto (contralateral), indicando que a lesão com 6-OHDA realmente levou a uma perda dos neurônios dopaminérgicos que se projetam ao estriado e uma conseqüente perda de dopamina estriatal. A dosagem de HVA também se mostrou reduzida, porém não foi estatisticamente significativa.

7. CONCLUSÕES

Dos resultados a partir da rotação espontânea (experimento 1) conclui-se que a neurotoxina 6-OHDA administrada no FPM foi capaz de provocar lesão da SNc dos animais pois os mesmos apresentaram rotação espontânea um e sete dias após a lesão, cujo resultado esta de acordo com a literatura.

Do experimento 2 (rotação induzida por apomorfina) conclui-se que diferentes doses de apomorfina, um agonista direto dos receptores dopaminérgicos, provocou um aumento dose-dependente das rotações contralaterais uma semana após a lesão com 6-OHDA.

Os resultados obtidos a partir do experimento 3 (rotação induzida por cafeína) permitem concluir que a cafeína possa estar provocando uma liberação de DA porque os animais mostraram um aumento dose-dependente nas rotações ipsilaterais quando desafiados com esta droga. Também pode ter produzido uma sensibilidade nos receptores dopaminérgicos pois os animais lesados apresentam um aumento dose-dependente nas rotações quando desafiados com a mesma dose de apomorfina.

No experimento 4, as rotações ipsilaterais dose-dependentes induzidas por nicotina permitem concluir que esta droga possa estar liberando DA no estriado e esta liberação pode ter sensibilizado os receptores dopaminérgicos provocando, no dia do desafio com uma única dose de apomorfina, um aumento dose-dependente das rotações contralaterais nos animais lesados.

A partir dos dados obtidos do experimento 5, onde a nicotina foi administrada aguda e prolongadamente, pode-se concluir que a nicotina prolongada não aumentou o número de rotações durante os cinco dias de tratamento, mas pode ter liberado DA pois os animais desafiados com apomorfina apresentaram um maior número de rotações. Ainda neste experimento 5, os animais tratados prolongadamente com nicotina apresentaram um maior número de rotações ipsilaterais em relação aqueles que receberam desafio de nicotina, podendo-se concluir que a nicotina possa estar liberando DA no estriado e desta maneira permitindo a ocorrência de uma possível sensibilidade dos receptores dopaminérgicos duas semanas após a lesão quando os animais receberam apomorfina.

Os resultados da neuroquímica (experimento 6) permitem uma conclusão de que a lesão da SNc com 6-OHDA realmente levou a uma perda dos neurônios

dopaminérgicos que se projetam ao estriado e uma conseqüente perda de dopamina estriatal, pois mostram uma diminuição significativa na quantidade de DA e do seu metabólito DOPAC no estriado ipsilateral à lesão com 6-OHDA em relação ao lado intacto (contralateral), comprovando a ocorrência da lesão dos neurônios dopaminérgicos que se projetam ao estriado com a neurotoxina 6-OHDA.

Desta maneira conclui-se, a partir dos dados acima apresentados e justificados, que o modelo animal da doença de Parkinson a partir da lesão da SNc pela injeção lenta de 6-OHDA no FPM produziu um ótimo modelo da doença capaz de estudar o comportamento assimétrico de animais e alterações do comportamento motor quando estes foram desafiados com agonistas dos receptores dopaminérgicos, como a apomorfina.

Além disso, permitiu o estudo de possíveis drogas antiparkinsonianas, como a cafeína e nicotina, as quais neste estudo parecem possibilitar a liberação DA e desta maneira podem ser capazes de sensibilizar o comportamento motor dos animais.

Embora os resultados aqui apresentados sejam oriundos de estudos animais, e portanto, devam ser vistos com cautela, podem fazer parte de uma estratégia no estudo do tratamento da doença de Parkinson.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, L.M.V.; NOBRE Jr., H.V.; MACÊDO, D.S.; OLIVEIRA, A. A.; FREITAS, R. M.; VASCONCELOS, S.M.; CUNHA, G.M.A.; SOUSA, F.C.F.; VIANA, S.B. Neuroprotective effects of caffeine in the model of 6-hydroxydopamine lesion in rats. **Pharmacol. Biochem. Be.**, in press, 2006.

AHLSKOG, J.E. e MUENTER, M.D. Frequency of L-dopa related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. **Movement Disord.**, v. 16, p. 448-458, 2001.

ALBIN, R.L., YOUNG, A.B.; PENNEY, J.B. The functional anatomy of basal ganglia disorders. **Trends Neurosci.**, v. 12, p. 366-375, 1989.

ALFAVARO, T.M.; VIGRA, E.; OLIVEIRA, C.R.; CUNHA, R.A. Effect of free radicals on adenosine A (2A) and dopamine D2 receptors in the striatum of young adult and aged rats. **Neurochem.**, v. 45, p. 733-738, 2004.

AUBERT, I.; ARAUJO, D.M.; CECYRE, D.; ROBITAILLE, Y.; GAUTHIER, S.; QUIRION, R. Comparative alterations of nicotinic and muscarinic binding sites in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **J. Neurochem.**, v. 58, p. 529-541, 1992.

AUBERT, I.; GHORAYEB, I.; NORMAND, E.; BLOCH, B. Phenotypical characterization of the neurons expressing the D1 and D2 dopamine receptors in the monkey striatum. **J. Comp. Neurol.**, v. 418, p.32, 2000.

AUGOOD, S.J.; HOLLINGSWORTH, Z.R., STANDAERT, D.G.; EMSON, P.C.; PENNEY Jr., J.B. Localization of dopaminergic markers in the human subthalamic nucleus. **J. Comp. Neurol.**, v. 421, p. 247-255, 2000.

BALFOUR, D.J.; BENWELL, M.E.; BIRREL, C.E.; KELLY, R.J.; AL-ALOUL, M. Sensitization of the mesoaccumbens dopamine response to nicotine. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 59, p. 1021-1030, 1998.

BALUCHNEJADMOJARAD, T. e ROGHANI, M. Evaluation of functional asymmetry in rats with dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal system using elevated body swing test. **Physiology and Behavior**, v. 82, p. 369-373, 2004.

BARNEOUD, P.; PARMENTIER, S.; MAZADIER, M.; MIQUET, J.M.; BOIREAU, A.; DUBEDAT, P.; BLANCHARD, J.C. Effects of complete and partial lesions of the dopaminergic mesotelencephalic system on skilled forelimb use in the rat. **Neuroscience**, v. 67, p. 837-848, 1995.

BEAL, M.F. Experimental models of Parkinson's disease. **Nat. Rev., Neurosci.**, v. 2, p. 325-332, 2001.

BENWELL, M.E.M. e BALFOUR, D.J.K. The effect of acute and repeated nicotine treatment on nucleus accumbens dopamine and locomoto activity. **Br. J. Pharmacol.**, v. 105, p. 849-856, 1992.

BERGMAN, H.; WICHMANN, T.; DELONG, M.R. Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. **Science**, v. 249, p. 1436-1438, 1990.

BEZARD, E., DOVERO, S., PRUNIER, C. *et al.* Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive MPTP-lesioned macaque model of Parkinson's disease. **J. Neurosci.**, v. 21, p. 6853-6861, 2001.

BIBBIANI, F.; OH, J.D.; PETZER, J.P.; CASTAGNOLI Jr., N.; CHEN, J.F.; SCHWARZSCHILD, M.A.; CHASE, T.N. A2A antagonist prevents dopamine agonist-induced motor complications in animal models of Parkinson's disease. **Exp. Neurol.**, v. 184, p. 285-294, 2003.

BJÖRKLUND, A. Neural transplantation: an experimental tool with clinical possibilities. **Trends Neurosci.**, v. 14, p. 319-322, 1991.

BJÖRKLUND, L.M.; SANCHEZ-PERNAUTE, R.; CHUNG, S.; ANDERSSON, T.; CHEN, I.Y.; McNAUGHT, K.S.; BROWNELL, A.L.; JENKINS, B.G.; WAHLSTEDT, C.; KIM, K.S.; ISACSON, O. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.**, v. 99, p. 2344-2349, 2002.

BLUM, D.; TORCH, S.; LAMBERG, N.; NISSOU, M.; BENABID, A.L.; SADOUL, R.; VERNA, J.M. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. **Prog. Neurobiol.**, v. 65, p. 135-172, 2001.

BRODY, A.L.; OLMSTEAD, R.E.; LONDON, E.D.; FARAHI, J.; MEYER, J.H.; GROSSMAN, P.; LEE, G.S.; HUANG, J.; HAHN, E.L.; MANDELKERN, M.A. Smoking-induced ventral striatum dopamine release. **American J. Psychiatry**, v. 161, p. 1211-1218, 2004.

CALABRESI, P. Electrophysiology of dopamine-denervated striatal neurons; implications for Parkinson's disease. **Brain**, v. 116, p. 433-452, 1993.

CASAS, M.; PRAT, G.; ROBLEDO, P.; BARBANOJ, M.; KULISEVSKY, J.; JANÉ, F. Repeated co-administration of caffeine and bromocriptine prevents tolerance to the effects of caffeine in the turning behavior animal model. **Eur. Neuropsychopharm.**, v. 9, p. 515-521, 1999.

CASAS, M.; PRAT, G.; RUBIO, A.; BARBANOJ, M.; JANÉ, F. Lack of synergism between caffeine and SKF 38393 on rotational behavior in 6-hydroxydopamine-denervated rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 396, p. 93-99, 2000.

CHASE, T.N.; BIBBIANI, F.; BARA-JIMENEZ, W.; DIMITROVA, T.; OH-LEE, J.D. Translating A2A antagonist KW6002 from animal models to parkinsonian patients. **Neurology**, v. 61, (11 Suppl. 6), p. S107-S111, 2003.

CHEN, J.F.; MORATALLA, R.; IMPAGNATIELLO, F.; GRANDY, D.K.; CUELLAR, B.; RUBINSTEIN, M. *et al.* The role of D(2) dopamine receptor (D(2)R) in A(2A) adenosine receptor A(2A)R-mediated behavioral and cellular responses as revealed by A(2A) and D(2) receptor knockout mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 1970-1975, 2001a.

CHEN, J.F. e OBERING, C. A review of intermittent subcutaneous apomorphine injections for the rescue management of motor fluctuations associated with advanced Parkinson's disease. **Clin. Ther.**, v. 27, p. 1710-1724, 2005.

CHEN, J.F.; XU, K.; PETZER, J.P.; STAAL, R.; XU, Y.H.; BEILSTEIN, M. *et al.* Neuroprotection by caffeine and A(2A) adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. **J. Neurosci.**, v. 21, p. 143, 2001b.

CLARK, P.B.S.; PERT, A. Autoradiographic evidence for nicotine receptors on nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic neurons. **Brain Res.**, v. 348, p. 355-385, 1985.

CLARKE, P.B.S. Dopaminergic mechanisms in the locomotor stimulant effects of nicotine. **Biochem. Pharmacol.**, v. 40, p. 1427-1432, 1990.

CLARKE, P.B.S. Nicotinic receptors and cholinergic neurotransmission in the central nervous system. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 757, p. 73-83, 1995.

CLARKE, P.B.S. e KUMAR, R. The effects of nicotine on locomotor activity in nontolerant and tolerant rats. **Brit. J. Pharmacol.**, v. 78, p. 329-337, 1983.

CORVOL, J.C.; STUDLER, J.M.; SCHONN, J.S.; GIRAULT, J.A.; HERVE, D. Galpha(olf) is necessary for coupling D1 and D2 receptors to adenylyl cyclase in the striatum. **J. Neurochem.**, v. 76, p. 1585-1588, 2001.

COSTALL, B.; MARSDEN, C.D.; NAYLOR, R.J.; PYCOCK, C.J. Relationship between striatal and mesolimbic dopamine dysfunction and nature of circling responses following 6-hydroxydopamine and electrolytic lesions of ascending dopamine systems of rat brain. **Brain Res.**, v. 118, p. 87-113, 1976.

COURT, J.A.; LLOYD, S.; THOMAS, N.; PIGGOTT, M.A.; MARSHALL, E.F.; MORRIS, C.M.; LAMB, H.; PERRY, R.H.; JOHNSON, M.; PERRY, E.K. Dopamine and nicotinic receptor binding and the levels of dopamine and homovanillic acid in human brain related to tobacco use. **Neurosci.**, v. 87, p. 63-78, 1998.

COURT, J.A.; MARTIN-RUIZ, C.; GRAHAM, A.; PERRY, E. Nicotinic receptors in human brain: topography and pathology. **J. Chem. Neuroanat.**, v. 20, p. 281-298, 2000.

COURT, J.A. e PERRY, E.K. CNS nicotinic receptors: possible therapeutic targets in neurodegenerative disorders. **CNS Drugs**, v. 2, p. 216-233, 1994.

COURT, J.A. e PERRY, E.K. Distribution of nicotinic receptors in the CNS. In: STONE, T.W. **CNS Neurotransmitters and Neuromodulators**. London: CRC, 1995.

CREESE, I.; BURT, D.R.; SNYDER, S.H. Dopamine receptor binding enhancement accompanies lesion-induced behavioral supersensitivity. **Science**, v. 197, p. 596-598, 1977.

DA CUNHA, C.; SILVA, M.H.C.; WIETZIKOSKI, S.; WIETZIKOSKI, E.; FERRO, M. M.; KOUZMINE, I.; CANTERAS, N.S. Place learning strategy of substantia nigra pars compacta-lesioned rats. **Behav. Neurosci.**, 2006.

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

DAMSMA, G.; WESTERINK, B.H.; DE VRIES, J.B.; HORN, A.S. The effect of systemically applied cholinergic drugs on the striatal release of dopamine and its metabolites, as determined by automated brain dialysis in conscious rats. **Neurosci. Lett.**, v. 89, p. 349-354, 1988.

DANI, J.A. e BERTRAND, D. Nicotine acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous systems. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 47, p. 699-729, 2007.

DANI, J.A. e HEINEMANN, S. Molecular and cellular aspects of nicotine abuse. **Neuron**, v. 16, p. 905-908, 1996.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, v. 39, p. 889-909, 2003.

DELEU, D.; HANSSENS, Y.; NORTHWAY, M.G. Subcutaneous apomorphine: an evidence-based review of its use in Parkinson's disease. **Drugs Aging**, v. 21, p. 687-709, 2004.

DELFINO, M.A.; STEFANO, A.V.; FERRARIO, J.E.; TARAVINI, I.R.E.; MURER, M.G.; GERSHANIK, O.S. Behavioral sensitization to different dopamine agonists in a parkinsonian rodent model of drug-induced dyskinesias. **Behav. Brain Res**, v. 152, p. 297-306, 2004.

DELONG, M.R. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. **Trends Neurosci.**, v. 13, p. 281-285, 1990.

DEUMENS, R.; BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Exp. Neurol.**, v. 175, p. 303-317, 2002.

DI CHIARA, G.; MORELLI, M.; BARONE, P.; PONTIERI, F. Priming as a model of behavioral sensitization. **Dev. Pharmacol. Ther.**, v. 18, p. 223-227, 1992.

DUVOISIN, R.C.; HEIKKILA, R.E.; MANZINO, L. Pergolide-induced circling in rats with 6-hydroxydopamine lesion in the nigrostriatal pathway. **Neurology**, v. 32, p. 1387-1391, 1982.

DWORKIN, S.I.; VRANA, S.L.; BROADBENT, J.; POBINSON, J.H. Comparing the reinforcing effect of nicotine, caffeine, methylphenidate and caffeine. **Med. Chem. Res.**, v. 2, p. 593-602, 1993.

EIDELBERG, E.; BROOKS, B.A.; MORGAN, W.W.; WALDEN, J.G.; KOKEMOOR, R.H. Variability and functional recovery in N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinsonism in monkeys. **Neuroscience**, v. 18, p. 817-822, 1986.

EKONOMOU, A.; POULOU, P.D.; MATSOKIS, N.; ANGELATOU, F. Stimulation of adenosine A2A receptors elicits zif/268 and NMDA epsilon2 subunit mRNA expression in cortex and striatum of the "weaver" mutant mouse, a genetic model of nigrostriatal dopamine deficiency. **Neuroscience**, v. 123, p. 1025-1036, 2004.

EL YACOUBI, M.; LEDENT, C.; MENARD, J.F.; PARMENTIER, M.; COSTENTIN, J.; VAUGEOIS, J.M. The stimulant effects of caffeine on locomotor behaviour in mice are mediated through its blockade of adenosine A(2A) receptors. **Br. J. Pharmacol.**, v. 129, p. 1465-1473, 2000.

EVANS, S.M.; GRIFFITHS, R.R. Caffeine tolerance and choice in humans. **Psychopharmacology**, v. 108, p. 51-59, 1992.

FAGERSTRÖM, K.O.; POMERLEAU, O.; GIORDANI, B.; STELSON, F. Nicotine may relieve symptoms of Parkinson's disease. **Psychopharmacology**, v. 116, p. 117-119, 1994.

FAHN, S. e PRZEDBORSKI, S. Parkinsonism. In: Rowland, L.P. (Ed.). **Merritt's neurology**. New York: Lippincott Williams & Wilkins, p. 679-693, 2000.

FAHN, S. e SULZER, D. Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson's disease. **NeuroRx**, v.1, p. 139-154, 2004.

FENU, S. e MORELLI, M. Motor stimulant effects of caffeine in 6-hydroxydopamine-lesioned rats are dependent on previous stimulation of dopamine receptors: a different role of D1 and D2 receptors. **Eur. J. Neurosci.**, v. 10, p. 1878-1884, 1998.

FENU, S.; PINNA, A.; ONGINI, E.; MORELLI, M. Adenosine A2A receptor antagonism potentiates L-DOPA-induced turning behaviour and c-fos expression in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 321, p. 143-147, 1997.

FERRÉ, S. Adenosine-dopamine interactions in the ventral striatum. Implications for the treatment of schizophrenia. **Psychopharmacology**, v. 133, p. 107-120, 1997.

FERRÉ, S.; FREDHOLM, B.B.; MORELLI, M.; POPOLI, P.; FUXE, K. Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanisms in the basal ganglia. **TINS**, v. 20, p. 482-487, 1997.

FERRÉ, S.; FUXE, K.; VON EULER, G.; JOHANSSON, B.; FREDHOLM, B.B. Adenosine-dopamine interactions in the brain. **Neuroscience**, v. 51, p. 501-512, 1992.

FERRÉ, S.; POPOLI, P.; GIMÉNEZ-LLORT, R.; MULLER, C.E.; STRÖMBERG, I.; ÖGREN, S.O.; FUXE, K. Adenosine/dopamine interaction: implications for the treatment of Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat. D.**, v. 7, p. 235-241, 2001.

FERRO, M. M.; BELLISSIMO, M.I.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; ANGELUCCI, M.E.M.; CANTERAS, N.S.; DA CUNHA, C. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: Histological, neurochemical, motor and memory alterations. **J. Neurosci. Meth.**, v. 148, p. 78-87, 2005.

FINK, J.S.; WEAVER, D.R.; RIVKEES, S.A.; PETERFREUND, R.A.; POLLACK, A.E.; ADLER, E.M.; REPERT, S.M. Molecular cloning of the rat A2 adenosine receptor: co-expression with D2 dopamine receptors in rat striatum. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, v. 14, p. 186-195, 1992.

FISONE, G.; BORGKVIST, A.; USIELLO, A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 61, p. 857-872, 2004.

FLINT, M.B. Experimental models of Parkinson's disease. **Nature Reviews**, v. 2, p. 325-332, 2001.

FORGACS, P.B. e BODIS-WOLLNER, I. Nicotinic receptors and cognition in Parkinson's disease: the importance of neuronal synchrony. **J. Neural. Transm.**, v. 111, p. 1317-1331, 2004.

FORNAGUERA, J. e SCHWARTING, R.K.W. Early behavioral changes after nigro-striatal system damage can serve as predictors of striatal dopamine depletion. **Prog. Neuro-Psychoph. Biol. Psychiat.**, v. 23, p. 1353-1368, 1999.

FREDHOLM, B.B.; ABBRACCHIO, M.P.; BURNSTOCK, G.; DALY, J.W.; HARDEN, T.K.; JACOBSON, K.A. *et al.* Nomenclature and classification of purinoceptors. **Pharmacol. Rev.**, v. 46, p. 143-156, 1994.

FREDHOLM, B.B.; HERRERA-MARSCHITZ, M.; JONZON, B.; LINDSTROM, K.; UNGERSTEDT, U. On the mechanisms by which methylxanthines enhance apomorphine-induced rotation behaviour in the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 19, p. 535-541, 1983.

FREDHOLM, B.B.; SVENNINGSSON, P. Adenosine-dopamine interactions: development of a concept and some comments on therapeutic possibilities. **Neurology**, v. 61 (11 Suppl. 6), p. S5-S9, 2003.

FUKUZAKI, K.; KAMENSONO, T.; NAGATA, R. Effects of ropinirole on various parkinsonian models in mice, rats and cynomolgus monkeys. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 65, p. 503-508, 2000.

FUXE, K.; AGNATI, L.; ENEROTH, P.; GUSTAFSSON, J.A.; HOKFELT, T.; LOFSTROM, A.; SKETT, B.; SKETT, P. The effect of nicotine on central catecholamine neurons and gonadotropin secretion. I. Studies in the male rat. **Med. Biol.**, v. 55, p. 148-157, 1977.

FUXE, K.; FERRÉ, S.; CANALS, M.; TORVINEN, M.; TERASMAA, A.; MARCELLINO, D.; S.R., STAINES, W.; JACOBSEN, K.X.; LLUIS, C.; WOODS, A.S.; AGNATI, L.F.; FRANCO, R. Adenosine A2A and dopamine D2 heteromeric receptor complexes and their function. **J. Mol. Neurosci.**, v. 26, p. 209-220, 2005.

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

FUXE, K. e UNGERSTEDT, U. Action of caffeine and theophyllamine on supersensitive dopamine receptors: considerable enhancement of receptor response to treatment with L-DOPA and dopamine agonists. **Med. Biol.** , v. 52, p. 48-54, 1974.

GARRETT, B.E. e HOLTZMAN, S.G. Does adenosine receptor blockade mediate caffeine-induced rotational behaviour? **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 274, p. 207-214, 1995.

GIMÉNEZ-LLORT, L.; MARTÍNEZ, E.; FERRÉ, S. Dopamine-independent and adenosine-dependent mechanisms involved in the effects of *N*-methyl-D-aspartate on motor activity in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 275, p. 171-177, 1995.

GLINKA, Y.; GASSEN, M.; YODIM, M.B. Mechanisms of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. **J. Neural Transm. Suppl.**, v. 50, p. 55-66, 1997.

GLINKA, Y.; TIPTON, K.F.; YODIN, M.B. Nature of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6-hydroxydopamine. **Journal of Neurochemistry**, v. 66, p. 2004-2010, 1996.

GRAY, R.; RAJAN, A.S.; RADCLIFFE, K.A.; YAKEHIRO, M.; DANI, J.A. Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. **Nature**, v. 383, p. 713-716, 1996.

GRIEBEL, G.; SAFFROY-SPITTLER, M.; MISSLIN, R.; REMMY, D.; VOGEL, E.; BOURGUIGNON, J.J. Comparison of the behavioural effects of an adenosine A1/A2-receptor antagonist, CGS 15943A, and an A1-selective antagonist, DPCPX. **Psychopharmacology**, v. 103, p. 541-544, 1991.

GRIFFITHS, R.R.; MUMFORD, G.K. Caffeine - a drug of abuse? In: BLOOM, F.E.; KUPFER, D.J. (Eds.). **Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress**. Raven Press: New York, p. 1699-1713, 1995.

GRONDIN, R.; BÉDARD, P.J.; HADJ TAHAR, A.; GREGOIRE, L.; MORI, A.; KASE, H. Antiparkinsonian effect of a new selective adenosine A2A receptor antagonist in MPTP-treated monkeys. **Neurology**, v. 52, p. 1673-1677, 1999.

GUREVICH, E.V. e JOYCE, J.N. Distribution of dopamine D3 receptor expressing neurons in the human forebrain: comparison with D2 receptor expressing neurons. **Neuropsychopharmacol.**, v. 20, p. 60-80, 1999.

GUZMAN, J.N.; HERNANDEZ, A.; GALARRAGA, E. *et al.* Dopaminergic modulation of axon collaterals interconnecting spiny neurons of the rat striatum. **J. Neurosci.**, v. 23, 8931-8940, 2003.

HAUBER, W. e MUNKLE, M. Motor depressant effects mediated by dopamine D2 and A2A receptors in the nucleus accumbens and the caudate-putamen. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 323, p. 127-131, 1997.

HEFTI, F.; MELAMED, E.; SAHAKIAN, B.J.; WURTMAN, R.J. Circling behavior in rats with partial, unilateral nigrostriatal lesions: effect of amphetamine, apomorphine, and L-dopa. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 12, p. 185-188, 1980.

HEIKKILA, R.E.; BABINGTON, R.G.; HOULIHAN, W.J. Pharmacological studies with several analogs of mazindol: correlation between effects on dopamine uptake and various responses. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 71, p. 277-286, 1981.

HEIKKILA, R.E. SONSALLA, P.K. DUVOISIN, R.C. Biochemical's models of Parkinson's disease. In **Neuromethods, Drugs as Tools in Neuroscience Research**, Boulton, A.B. Baker, G.B. e Juorio, A.V. (Eds), New Jersey: Humana Press, Clifton, v. 12, p. 351-384, 1989.

HEJMADI, M.V.; DAJAS-BAILADOR, F.; BARNS, S.M.; JONES, B.; WONNACOTT, S. Neuroprotection by nicotine against hypoxia-induced apoptosis in cortical cultures involves activation of multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 24, p. 779-786, 2003.

HENRY, B.; CROSSMAN, A.R.; BROTHIE, J.M. Characterization of enhanced behavioral responses to L-Dopa following repeated administration in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model of parkinson's disease. **Exp. Neurol.**, v. 151, p. 334-342, 1998.

HERRERA-MARSCHITZ, M.; CASAS, M.; UNGERSTEDT, U. Caffeine produces contralateral rotation in rats with unilateral dopamine denervation: comparisons with apomorphine-induced responses. **Psychopharmacology**, v. 94, p. 38-45, 1988.

HERRERA-MARSCHITZ, M. e UNGERSTEDT, U. Evidence that apomorphine and pergolide induce contralateral rotation in rats by different actions on D and D₂ receptor sites. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 98, p.165-176, 1984.

HERVE, D., LE MOINE, C.; CORVOL, J.C.; BELLUSCIO, L.; LEDENT, C.; FIENBERG, A.A.; JABER, M.; STUDLER, J.M.; GIRAULT, J.A. Galpha(olf) levels are regulated by receptor by receptor usage and control dopamine and adenosine action in the striatum. **J. Neurosci.**, v. 21, p. 4390-4399, 2001.

HILLION, J.; CANALS, M.; TORVINEN, M.; CASADO, V.; SCOTT, R.; TERASMAA, A.; HANSSON, A.; WATSON, S.; OLAH, M.E.; MALLOL, J.; CANELA, E.I.; ZOLI, M.; AGNATI, L.F.; IBANEZ, C.F.; LLUIS, C.; FRANCO, R.; FERRÉ, S.; FUXE, K. Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 18091-18097, 2002.

HIRSCHHORN, I.D.; HITTNER, D.; GARDNER, E.L.; CUBELLS, J.; MAKMAN, M.H. Evidence for a role of endogenous opioids in the nigrostriatal system – influence of naloxone and morphine on nigrostriatal dopaminergic supersensitivity. **Brain Res.**, v. 270, p. 109-117, 1983.

HODAIE, M.; NEIMAT, J.S.; LOZANO, A.M. The dopaminergic nigrostriatal system and Parkinson's disease: molecular events in development, disease, and cell death, and new therapeutic strategies. **Neurosurgery**, v. 60, p. 17-30, 2007.

HOGG, R.C. e BERTRAND, D. Partial agonists as therapeutic agents at neuronal nicotinic acetylcholine receptors. **Biochem. Pharmacol.**, v. 73, p. 459-468, 2007.

HORNYKIEWICZ, O. Parkinson's disease and the adaptive capacity of the nigrostriatal dopamine system: possible neurochemical mechanisms. **Advances in Neurology**, v. 60, p. 140-147, 1986.

HURLEY, M.J. e JENNER, P. What has been learnt from study of dopamine receptors in Parkinson's disease? **Pharmacol. And Ther.**, v. 11, p. 715-728, 2006.

HURLEY, M.J.; MASH, D.C.; JENNER, P. Dopamine D1 receptor expression in human basal ganglia and changes in Parkinson's disease. **Mol. Brain Res.**, v. 87, p. 271-279, 2001.

IANCU, R.; MOHAPEL, P.; BRUNDIN, P.; PAUL, G. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 162, p. 1-10, 2005.

INAJI, M.; OKAUCHI, T.; ANDO, K.; MAEDA, J.; NAGAI, Y.; YOSHIZAKI, T.; OKANO, H.; NARIAI, T.; OHNO, K.; OBAYASHI, S.; HIGUCHI, M.; SUHARA, T. Correlation between quantitative imaging and behavior in unilaterally 6-OHDA-lesioned rats. **Brain Research**, v. 1064, p. 136-145, 2005.

ISHIDA, Y.; KAWAI, K.; MAGATA, Y.; ABE, H.; YOSHIMOTO, M.; TAKEDA, R.; HASHIGUCHI, H.; MUKAI, T.; SAJI, H. Alteration of striatal [¹¹C]raclopride and 6-[¹⁸F]fluoro-L-3,4-dihydroxyphenylalanine uptake precedes development of methamphetamine-induced rotation following unilateral 6-hydroxydopamine lesions of medial forebrain bundle in rats. **Neuroscience Letters**, v. 389, p. 30-34, 2005.

ISHIKAWA, A. e MIYATAKE, T. Effects of smoking in patients with early-onset Parkinson's disease. **J. Neurol. Sci.**, v. 117, p. 28-32, 1993.

IZUMI, Y.; SAWADA, H.; SAKKA, N.; YAMAMOTO, N.; KUME, T.; KATSUKI, H.; SHIMOHAMA, S.; AKAIKE, A. *p*-Quinone mediates 6-hydroxydopamine-induced

dopaminergic neuronal death and ferrous iron accelerates the conversion of *p*-quinone into melanin extracellularly. **Journal of Neuroscience Research**, v. 79, p. 849-860, 2005.

JANHUNEN, S. e AHTEE, L. Comparison of the effects of nicotine and epibatidine on the striatal extracellular dopamine. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 494, p. 167-177, 2004.

JANHUNEN, S.; TUOMINEN, R.K.; AHTEE, L. Comparison of the effects of nicotine and epibatidine given in combination with nomifensine on rotational behaviour in rats. **Neurosci. Lett.**, v. 381, p. 314-319, 2005.

JANSON, A. M.; FUXE, K.; AGNATI, L.F.; KITAYAMA, J.; HARFSTRAND, A.; ANDERSSON, K.; GOLDSTEIN, M. Chronic nicotine treatment counteracts the disappearance of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive nerve cell bodies, dendrites and terminals in the mesostriatal dopamine system of the male rat after partial hemitransection. **Brain Research**, v. 455, p. 332-345, 1988.

JANSON, A.M.; MOLLER, A. Chronic nicotine treatment counteracts nigral cell loss induced by a partial mesodiencephalic hemitransection: an analysis of the total number and mean volume of neurons and glia in substantia nigra of the male rat. **Neuroscience**, v. 57, p. 931-941, 1994.

JEYARASASINGAM, G.; QUIK, M. Nicotine partially protects ventral mesencephalic cells from MPP⁺ neurotoxicity in vitro. **P. Phys. Soc. Neurosci.**, 1999a.

JEYARASASINGAM, G.; QUIK, M. Nicotinic receptor mediated protection against dopaminergic neuron degeneration in mesencephalic cell cultures. **Proceedings of the International Symposium on Nicotine**, 1999b.

JIANG, H.; JACKSON-LEWIS, V.; MUTHANE, U.; DOLLISON, A.; FERREIRA, M.; ESPINOSA, A.; PARSONS, B.; PRZEDBORSKI, S. Adenosine receptor antagonists potentiate dopamine receptor agonist-induced rotational behavior in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. **Brain Res.**, v. 613, p. 347-351, 1993.

JOGHATAIE, M.T.; ROGHAMI, M.; NEGAHDAR, F.; HASHEMI, L. Protective effect of caffeine against neurodegeneration in a model of Parkinson's disease in rat: behavioral and histochemical evidence. **Parkinsonism Relat. Disord.**, v. 10, p. 465-468, 2004.

JOYCE, J.N. e MILLAN, M.J. Dopamine D3 receptor antagonists as therapeutic agents. **Drug Discov. Today**, v. 10, p. 917-925, 2005.

KAARKOLA, S. Effect of nicotine and muscarinic drugs on amphetamine- and apomorphine-induced circling behaviour in rats. **Acta Pharmacol. Tox.**, v. 48, p. 162-167, 1981.

KAARKOLA, S.; TERÄVÄINEN, H. Animal models of parkinsonism. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 67, p. 95-100, 1990.

KALDA, A.; YU, L.; OZTAS, E.; CHEN, J.F. Novel neuroprotection by caffeine and adenosine A_{2A} receptor antagonists in animal models of Parkinson's disease. **J. Neurol. Sci.**, v. 248, p. 9-15, 2006.

KANDA, T.; JACKSON, M.J.; SMITH, L.A.; PEARCE, R.K.; NAKAMURA, J.; KASE, H.; KUWANA, Y.; JENNER, P. Adenosine A_{2A} antagonist: a novel antiparkinsonian agent that does not provoke dyskinesia in parkinsonian monkeys. **Ann. Neurol.**, v. 43, p. 507-513, 1998.

KASE, H.; AOYAMA, S.; ICHIMURA, M.; IKEDA, K.; ISHII, A.; KANDA, T.; KOGA, K.; KOIKE, N.; KUROKAWA, M.; KUWANA, Y.; MORI, A.; NAKAMURA, J.; NONAKA, H.; OCHI, M.; SAKI, M.; SHIMADA, J.; SHINDOU, T.; SHIOZAKI, S.; SUZUKI, F.; TAKEDA, M.; YANAGAWA, K.; RICHARDSON, P.J.; JENNER, P.; BEDARD, P.; BORRELLI, E.; HAUSER, R.A.; CHASE, T.N. Progress in pursuit of therapeutic A_{2A} antagonists: the adenosine A_{2A} receptor selective antagonist KW6002: research and development toward a novel nondopaminergic therapy for Parkinson's disease. **Neurology**, v. 61 (11 Suppl. 6), p. S97-S100, 2003.

KASHIHARA, K.; MANABE, Y.; SHIRO, Y.; WARITA, H.; ABE, K. Effects of repeated methyl levodopa administration on apomorphine sensitivity of rotational behavior and striatal Fos expression of rats with unilateral 6-OHDA lesions. **Neurosci. Res.**, v. 38, p. 273-279, 2000.

KELTON, M.C.; KAHN, H.J.; CONRATH, C.L.; NEWHOUSE, P.A. The effects of nicotine on Parkinson's disease. **Brain Cognition**, v. 43, p. 274-282, 2000.

KHAN, Z.U.; GUTIÉRREZ, A.; MARTIN, R.; PEÑAFIEL, A.; RIVERA, A.; DE LA CALLE, A. Dopamine D₅ receptors of rat and human brain. **Neuroscience**, v. 100, p. 689-699, 2000.

KIRIK, D.; ROSENBLAD, C.; BJORKLUND, A. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. **Exp. Neurol.**, v. 152, p. 259-277, 1998.

KITA, H. GABAergic circuits of the striatum. **Prog. Brain. Res.**, v. 99, p. 51-72, 1993.

KITA, T.; OKAMOTO, M.; NAKASHIMA, T. Nicotine-induced sensitization to ambulatory stimulant effect produced by daily administration into the ventral tegmental area and the nucleus accumbens in rats. **Life Sci.**, v. 50, p. 583-590, 1992.

KOGA, K.; KUROKAWA, M.; OCHI, M.; NAKAMURA, J.; KUWANA, Y. Adenosine A_{2A} receptor antagonist KF17837 and KW-6002 potentiate rotation induced by dopaminergic drugs in hemi-Parkinsonian rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 408, p. 249-255, 2000.

KOLB, B. e WHISHAW, I. Q. **Fundamentals of Neuropsychology**. New York: Freeman, 1990.

KOPIN, L.J. The pharmacology of Parkinson's disease therapy: an update. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 32, p. 467-495, 2003.

- KULL, B.; SVENNINGSSON, P.; FREDHOLM, B.B. Adenosine A(2A) receptors are colocalized with an activate g(olf) in rat striatum. **Mol. Pharmacol.**, v. 58, p. 771-777, 2000.
- KUMAR, R.; AGARWAL, A.K.; SETH, P.K. free radical-generated neurotoxicity of 6-hydroxydopamine. **Journal of Neurochemistry**, v. 64, p. 1703-1707, 1995.
- LANE, E.L.; CHEETHAM, S.C.; JENNER, P. Does contraversive circling in the 6-OHDA-lesioned rat indicate an ability to induce motor complications as well as therapeutic effects in Parkinson's disease? **Exp. Neurol.**, 197, 284-290, 2006.
- LANG, A.E. e OBESO, J.A. Challenges in Parkinson's disease: restoration of the nigrostriatal dopamine system is not enough. **Neurology**, v. 3, p. 309-316, 2004.
- LEE, C. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. **Clin. Chim. Acta**, v. 295, p. 141-154, 2000.
- LEVESQUE, M. e PARENT, A. The striatofugal fiber system in primates: a reevaluation of its organization based on single-axon tracing studies. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 102, p. 11888-11893, 2005.
- LEVEY, A.L.; HERSCH, S.M.; RYE, D.B.; SUNAHARA, R.K.; NIZNIK, H.B.; KITT, C.A. *et al.* Localization of D1 and D2 dopamine receptors in the brain with subtype-specific antibodies. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, p. 8861-8865, 1993.
- LEVIN, E.D. e ROSE, J.E. Acute and chronic nicotinic interactions with dopamine systems and working memory performance. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 757, p. 245-252, 1995.
- LEWITT, P.A. Off time reduction from adjunctive use of istradefylline (KW6002) in levodopa-treated patients with advanced Parkinson's disease. **Mov. Disord.**, v. 19 (Suppl. 9), p. S222, 2004.
- LI, S.P.; KIM, K.Y.; KIM, J.H.; PARK, M.S.; BAHK, J.Y.; KIM, M.O. Chronic nicotine and smoking treatment increases dopamine transporter RNAm expression in the rat midbrain. **Neurosci. Lett.**, v. 363, p. 29-32, 2004.
- LUETJE, C.W. Getting past the asterisk: the subunit composition of presynaptic nicotinic receptors that modulate striatal dopamine release. **Mol. Pharmacol.**, v. 65, p. 1333-1335, 2004.
- LYNCH, M.; CAREY, R.J. Amphetamine-induced rotation reveals post 6-OHDA lesion neurochemical reorganization. **Behav. Brain. Res.**, v. 32, p. 69-74, 1989.
- MA, Z.; WEI, X.; FONTANILLA, C.; NOELKER, C.; DODEL, R.; HAMPEL, H.; DU, Y. Caffeic acid phenethyl ester blocks free radical generation and 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. **Life Sci.**, v. 79, p. 1307-1311, 2006.

MARENCO, S.; CARSON, R.E.; BERMAN, K.F.; HERSCOVITCH, P.; WEINBERGER, D.R. Nicotine-induced dopamine release in primates measured with [^{11}C]raclopride PET. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, p. 259-268, 2004.

MARIN, C.; RODRIGUEZ-OROZ, M.C.; OBESO, J.A. Motor complications in Parkinson's disease and the clinical significance of the rotational behavior in the rat: Have we wasted our time? **Exp. Neurol.**, v. 197, p. 269-274, 2006.

MARSDEN, C.D. e PARKES, J.D. "On-off" effects in patients with Parkinson's disease on chronic levodopa therapy. **Lancet**, v. 1, p. 292-296, 1976.

MARSDEN, C.D.; PARKES, J.D.; QUINN, N. Fluctuations in disability in Parkinson's disease: clinical aspects. In: MARSDEN, C.D. and FAHN, S. (Eds.), **Movement Disord.**, Butterworth Scientific, New York:, pp. 96-122, 1982.

MARSHALL, J.F.; RICHARDSON, J.S.; TEITELBAUM, P. Nigrostriatal bundle damage and the hypothalamic syndrome. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, v. 87, p. 808-830, 1974.

MATSUBARA, K.; SHIMIZU, K.; SUNO, M.; OGAWA, T.; YAMADA, T.; NODA, T.; SATOMI, M.; OHTAKI, K.-I.; CHIBA, K.; TASAKI, Y.; SHIONO, H. Tansospirone, a 5-HT_{1A} agonist, ameliorates movement disorder via non-dopaminergic systems in rats with unilateral 6-hydroxydopamine-generated lesions. **Brain Res.**, 2006.

MAYEUX, R. Epidemiology of neurodegeneration. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 26, p. 81-104, 2003.

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

METMAN, L.V. Recognition and treatment of response fluctuations in Parkinson's disease: Review article. **Amino Acids.**, v. 23, p. 141-145, 2002.

MISRA, A.; VADLAMANI, N.; PONTANI, R.B. Effect of caffeine on cocaine locomotor stimulant activity in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 24, p. 761-764, 1986.

MIYOSHI, E.; WIETZIKOSKI, S.; CAMPLESSEI, M.; SILVEIRA, R.; TAKAHASHI, R.N.; DA CUNHA, C. Impaired learning in a spatial working memory version and in a cued version of the water maze in rats with MPTP-induced mesencephalic dopaminergic lesions. **Brain Research Bulletin**, v. 58, p. 41-47, 2002.

MORELLI, M. Adenosine A_{2A} antagonists: potential preventive and palliative treatment for Parkinson's disease. **Exp. Neurol.**, v. 184, p. 20-23, 2003.

MORELLI, M.; FENU, S.; PINNA, A.; DI CHIARA, G. Adenosine A₂ receptors interact negatively with dopamine D₁ and D₂ receptors in unilaterally 6-hydroxydopamine-lesioned rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 251, p. 21-25, 1994.

MORELLI, M.; PINNA, A.; WARDAS, J.; DI CHIARA, G. Adenosine A2 receptors stimulate c-fos expression in striatal neurons of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. **Neuroscience**, v. 67, p. 49-55, 1995.

MORENS, D.M.; GRANDINETTI, A.; RIED, D.; WHITE, L.R.; ROSS, G.W. Cigarette smoking and protections from Parkinson's disease. **Neurology**, v. 45, p.1041-1051, 1995.

MUENTER, M.D. e TYCE, G.M. L-dopa therapy of Parkinson's disease: plasma L-dopa concentration, therapeutic response, and side effects. **Mayo Clin. Proc.**, v. 46, p. 231-239, 1971.

MUSEO, E. e WISE, R.A. Cytisine-induced behavioral activation: delineation of neuroanatomical locus of action. **Brain Res.**, v. 670, p. 257-263, 1995.

NEHLIG, A.; DAVAL, J.-L.; DEBRY, G. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. **Brain Research Review**, v. 17, p. 139-170, 1992.

NEVE, K.A.; SEAMANS, J.K.; TRANTHAM-DAVIDSON, H. Dopamine receptor signaling. **J. Recept. Signal. Transduct. Res.**, v. 24, p. 165-205, 2004.

NEWHOUSE, P.A. e KELTON, M. Nicotinic systems in central nervous systems disease: degenerative disorders and beyond. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 74, p. 91-101, 2000.

NISELL, M.; NIMIKOS, G.G.; SVENSSON, T.H. Nicotine dependence systems and psychiatric disorders. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 76, p. 157-162, 1995.

OBESO, J.A.; OLANOW, C.W.; NUTT, J.G. Levodopa motor complications in Parkinson's disease. **Trends Neurosci.**, v. 23 (Suppl. 268), p. S1-S126, 2000a.

OBESO, J.A.; RODRIGUEZ-OROZ, M.C.; RODRIGUEZ, M.; DELONG, M.R.; OLANOW, C.W. Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: problems with the current model. **Ann. Neurol.**, v. 47, p. S22-S32, 2000b.

OLAH, M.E. Identification of A2A adenosine receptor domains involved in selective coupling to Gs. Analysis of chimeric A1/A2A adenosine receptors. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 337-344, 1997.

OLANOW, C.W.; OBESO, J.A.; STOCCHI, F. Continuous dopamine-receptor treatment of Parkinson's disease: scientific rationale and clinical implications. **Lancet Neurology**, v. 5, p. 677-687, 2006.

OLDS, M.E.; JACQUES, D.B.; KOPYOV, O. Relation between rotation in the 6-OHDA lesioned rat and dopamine loss in striatal and substantia nigra subregions. **Synapse**, v. 59, p. 532-544, 2006.

OLSSON, M.; NIKKHAH, G.; BENTLAGE, C.; BJORKLUND, A. Forelimb acinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. **J. Neurosci.**, v. 15, p. 3863-75, 1995.

PARINE, K.; MARCHAND, V.; DUMERY, B.; HIRSCH, E. Nicotine, but not cotinine, partially protects dopaminergic neurons against MPTP-induced degenerations in mice. **Brain Res.**, v. 890, p. 347-350, 2001.

PARKINSON, J. **An Essay on the Shaking Palsy**. Sherwood, Neely and Jones. London, 1817.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. 5^a ed. San Diego: Academic Press, 2005.

PERESE, D.A. ULMAN, J. VIOLA, J. EWING, S.E. BANKIEWICZ, K.S. A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model. **Brain Res.**, v. 494, p. 285-293, 1989.

PERRY, E.K.; MORRIS, C.M.; COURT, J.A.; CHENG, A.; FAIRBAIRN, A.F.; MCKEITH, I.G. Alteration in nicotine binding sites in Parkinson's disease, Lewy body dementia and Alzheimer's disease: possible index of early neuropathology. **Neuroscience**, v.64, p. 385-395, 1995.

PERRY, E.K.; SMITH C'.J.; COURT, J.A.; PERRY, R.H. Cholinergic nicotinic and muscarinic receptors in dementia of Alzheimer, Parkinson and Lewy body types. **J Neural Transm Park Dis Dement Sect**, v. 2, p. 149-158, 1990.

PIERCE, R.C. e KALIVAS, P.W. A circuitry model of the expression of behavioural sensitization to amphetamine-like psychostimulants. **Brain Res. Rev.**, v. 25, p. 192-216, 1997.

PIMLOTT, S.L.; PIGGOTT, M.; OWENS, J.; GREALLY, E.; COURT, J.A.; JAROS, E.; PERRY, R.H.; PERRY, E.K.; WYPER, MD. Nicotinic acetylcholine receptor distribution in Alzheimer's disease, Dementia with Lewy Bodies, Parkinson's disease and Vascular dementia: *in vitro* binding study using 5-[¹²⁵I]-A-85380. **Neuropsychopharmacol.**, v. 29, p. 108-116, 2003.

PINNA, A., CORSI, C.; CARTA, A.R.; VALENTINI, V.; PEDATA, F.; MORELLI, M. Modification of adenosine extracellular levels and adenosine A2A receptor mRNA by dopamine denervation. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 446, p. 75-82, 2002.

PINNA, A.; DI CHIARA, G.; WARDAS, J.; MORELLI, M. Blockade of A2A adenosine receptors positively modulates turning behaviour and c-Fos expression induced by D1 agonists in dopamine denervated rats. **Eur. J. Neurosci.**, v. 8, p. 1176-1181, 1996.

PINNA, A.; FENU, S.; MORELLI, M. Motor stimulant effects of the adenosine A2A receptor antagonist SCH 58261 do not develop tolerance after repeated treatments in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. **Synapse**, v. 39, p. 233-238, 2001.

PINNA, A.; VOLPINI, R.; CRISTALLI, G.; MORELLI, M. New adenosine A2A receptor antagonists: actions on Parkinson's disease models. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 512, p. 157-164, 2005.

POLLACK, A.E. e FINK, J.S. Synergistic interaction between an adenosine antagonist and a D1 dopamine agonist on rotational behavior and striatal c-Fos induction in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. **Brain Res.**, v. 743, p. 124-130, 1996.

POLLACK, A.E.; TURGEON, S.M.; FINK, J.S. Apomorphine priming alters the response of striatal outflow pathways to D2 agonist stimulation in 6-OHDA-lesioned rats. **Neuroscience**, v.79, p. 79-93, 1997.

POLLACK, A.E. e YATES, T.M. Prior D1 dopamine receptor stimulation is required to prime D2-mediated striatal fos expression in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. **Neuroscience**, v. 94, p. 505-514, 1999.

POPOLI, P.; GIMENEZ-LLORT, L.; PÈZZOLA, A.; REGIO, R.; MARTÍNEZ, E.; FUXE, K.; FERRÉ, S. Adenosine A1 receptor blockade selectively potentiates the motor effects induced by dopamine D1 receptor stimulation in rodents. **Neurosci. Lett.**, v. 218, p. 209-213, 1996.

PRAT, G.; ROBLEDO, P.; RUBIO, A.; BARBANOJ, M.; JANÉ, F.; CASAS, M. Effects of sub-chronic combined treatment with pergolide and caffeine on contralateral rotational behavior in unilateral 6-hydroxydopamine-denervated rats. **Brain Res.**, v. 868, p. 376-379, 2000.

PRIKHOJAN, A.; BRANNA, T.; YAHR, M.D. Comparative effects of repeated administration of dopamine agonists on circling behavior in rats. **J. Neural Transm.**, v. 107, p. 1159-1164, 2000.

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

PYCOCK, C.J. e MARSDEN, C.D. The rotating rodent: a two component system? **Eur. J. Pharmacol.**, v. 47, p. 167-175, 1978.

RADAD, K.; GILLE, G.; RAUSCH, W.-D. Short review on dopamine agonists: insight into clinical and research studies relevant to Parkinson's disease. **Pharmacological reports**, v. 57, 701-712, 2005.

RADCLIFFE, K.A. e DANI, J.A. Nicotinic stimulation produces multiple forms of increased glutamatergic synaptic transmission. **J. Neurosci.**, v. 18, p. 7075-7083, 1998.

REDGRAVE, P. e MITCHELL, I. Functional validation of projection topography in the nigrostriatal dopamine system. **Neurosci.**, v. 7, p. 885-894, 1982.

RICHARDSON, P.J.; GUBITZ, A.K.; FREEMAN, T.C.; DIXON, A.K. Adenosine receptor antagonists and Parkinson's disease: actions of the A2A receptor in the striatum. **Adv. Neurol.**, v. 80, p. 111-119, 1999.

RICHARDSON, P.J.; KASE, H.; JENNER, P.G. Adenosine A2A receptor antagonists as new agents for the treatment of Parkinson's disease. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 18, p.338-344, 1997.

RICHARDSON, S.A. e TIZABI, Y. Hyperactivity in the offspring of nicotine-treated rats: role of the mesolimbic and nigrostriatal dopaminergic pathways. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 47, p. 331-337, 1994.

RIMONDINI, R.; FERRÉ, S.; ÖGREN, S.O.; FUXE, K. Adenosine A2A agonists: a potential new type of atypical antipsychotic. **Neuropsychopharmacol.**, v. 17, p. 81-91, 1997.

RINNE, J.O.; MYLLYKYLA, T.; LONNBERG, P.; MARJAMAKI, P. A post-mortem study of brain nicotinic receptors in Parkinson's and Alzheimer's disease. **Brain Research**, v. 547, p. 167-170, 1991.

ROBINSON, T.E.; BECKER, J.B. The rotational behavior model: asymmetry in the effects of unilateral 6-OHDA lesions of the substantia nigra in rats. **Brain Research**, v. 264, p. 127-131, 1983.

ROLE, L.W. BERG, D.K. Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. **Neuron**, v. 16, p. 1077-1085, 1996.

ROSS, G.W.; ABBOTT, R.D.; PETROVITCH, H.; MORENS, D.M.; GRANDINETTI, A.; TUNG, K.H. Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson's disease. **JAMA**, v. 283, p. 2674-2679, 2000.

RUBBOLI, F.; COURT, J.A.; SALA, C.; MORRIS, C.M.; CHINI, B.; PERRY, E.; CLEMENTI, F. Distribution of nicotinic receptors in the human hippocampus and thalamus. **Eur. J. Neurosci.**, v. 6, p. 1596-1604, 1994.

ROUSE, S.T.; MARINO, M.J.; BRADLEY, S.R.; AWAD, H.; WITTMAN, M.; CONN, P.J. Distribution and roles of metabotropic glutamate receptors in the basal ganglia motor circuit: implications for treatment of Parkinson's disease and related disorders. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 88, p. 427-435, 2000.

SACCO, K.A.; BANNON, K.L.; GEORGE, T.P. Nicotinic receptors mechanisms and cognition in normal states and neuropsychiatric disorders. **J. Psychopharmacol.**, v.18, p. 457-474, 2004.

SCHENK, S.; VALADEZ, A.; HORGER, B.A.; SNOW, S.; WELLMAN, P.J. Interactions between caffeine and cocaine in tests of self-administration. **Behav. Pharmacol.**, v. 5, p. 153-158, 1994.

SCHIFFMANN, S.N.; JACOBS, O.; VANDERHAEGHEN, J.J. Striatal restricted adenosine A2 receptor (RDC8) is expressed by enkephalin but not by substance P neurons: an in situ hybridization histochemistry study. **J. Neurochem.**, v. 57, p. 1062-1067, 1991a.

SCHIFFMANN, S.N.; LIBERT, F.; VASSART, G.; VANDERHAEGHEN, J.J. Distribution OF adenosine A2 receptor mRNA in the human brain. **Neurosci. Lett.**, v. 130, p. 177-181, 1991b.

SCHNEIDER, M.B.; MURRIN, K.C.; PFEIFFER, R.F.; DEUPREE, J.D. Dopamine receptors: effect of chronic L-Dopa and bromocriptine treatment in an animal model of Parkinson's disease. **Clin. Neuropharmacol.**, v. 7, p. 247-257, 1984.

SCHOFFELMEER, A.N.; DE VRIES, T.J.; WARDEH, G.; VAN DE VEN, H.W.; VANDERSCHUREN, L.J. Psychostimulant-induced behavioral sensitization depends on nicotinic receptor activation. **J. Neurosci.**, v. 22, p. 3269-3276, 2002.

SCHWARTING, R.K.W. e HUSTON, J.P. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of the functional deficits, recovery and treatments. **Progress in Neurobiology**, v. 26, p. 226-242, 1996.

SEDELIS, M.; HOFELE, K.; AUBURGER, G.W.; MORGAN, S.; HUSTON, J.P.; SCHWARTING, R.K. MPTP susceptibility in the mouse: behavioral, neurochemical and histological analysis of gender and strain differences. **Behav. Genet.**, v. 30, p. 171-182, 2000.

SEDELIS, M.; SCHWARTING, R.K.; HUSTON, J.P. Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Behav. Brain. Res.**, v. 125, p. 109-125, 2001.

SHER, E.; CHEN, Y.; SHARPLES, T.J.; BROAD, L.M.; BENEDETTI, G. *et al.* Physiological roles of neuronal nicotinic receptor subtypes: new insights on the nicotinic modulation of neurotransmitter release, synaptic transmission and plasticity. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 4, p. 283-297, 2004.

SHIMOHAMA, S.; AKAIKE, A.; KIMURA, J. Nicotine-induced protection against glutamate cytotoxicity. Nicotinic cholinergic receptor-mediated inhibition of nitric oxide formation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 777, p. 356-361, 1996.

SHIOZAKI, S.; ICHIKAWA, S.; NAKAMURA, J.; KITAMURA, S.; YAMADA, K.; KUWANA, Y. Actions of adenosine A2A receptor antagonist KW-6002 on drug-induced catalepsy and hypokinesia. **Psychopharmacology**, v. 147, p. 90-95, 1999.

SINGH, A.; POTTER, A.; NEWHOUSE, P. Nicotinic acetylcholine receptor system and neuropsychiatric disorders. **J. Drugs**, v. 7, p. 1096-1103, 2004.

SMITH, A.D. e BOLAM, J.P. The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurons. **Trends Neurosci**, v. 13, p. 259-265, 1990.

SOKOLOFF, P. e SCHWARTZ, J.-C. Novel dopamine receptors half a decade later. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 16, p. 270-275, 1995.

STEINLEIN, O.K. Nicotinic receptor mutations in human epilepsy. **Prog. Brain Res.**, v. 145, p. 275-285, 2004.

STOLERMAN, I.P.; MIRZA, N.R.; SHOAIB, M. Nicotine psychopharmacology: addiction, cognition and neuroadaptation. *Med. Res. Rev.* 15, 47-72, 1995.

SVENNINGSSON, P.; LE MOINE, C.; FISONE, G.; FREDHOLM, B.B. Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A_{2A} receptors. **Prog. Neurobiol.**, v. 59, p. 355-396, 1999.

SVENNINGSSON, P.; LE MOINE, C.; AUBERT, I.; BURBAUD, P.; FREDHOLM, B.B.; BLOCH, B. Cellular distribution of adenosine A_{2A} receptor mRNA in the primate striatum. **J. Comp. Neurol.**, v. 399, p. 229-240, 1998a.

SVENNINGSSON, P.; LE MOINE, C.; KULL, B.; BLOCH, B.; FREDHOLM, B.B. Cellular expression of adenosine A_{2A} receptor messenger RNA in the rat central nervous system with special reference to dopamine innervated areas. **Neuroscience**, v. 80, p. 1171-1185, 1997b.

SVENNINGSSON, P.; LINDSKOG, M.; ROGNONI, F.; FREDHOLM, B.B.; GREENGARD, P.; FISONE, G. Activation of adenosine A_{2A} and dopamine D₁ receptors stimulates cyclic AMP-dependent phosphorylation of DARP-32 in distinct populations of striatal projection neurons. **Neuroscience**, v. 84, p. 223-228, 1998b.

SVENNINGSSON, P.; NOMITOS, G.G.; ONGINI, E.; FREDHOLM, B.B. Antagonism of adenosine A_{2A} receptors underlies the behavioural activating effect of caffeine and is associated with reduced expression messenger RNA for NGFI-A and NGFI-B in caudate-putamen and nucleus accumbens. **Neuroscience**, v. 79, p. 753-764, 1997a.

TAKEDA, R.; IKEDA, T.; TSUDA, F.; ABE, H.; HASHIGUCHI, H.; ISHIDA, Y.; NISHIMORI, Y. Unilateral lesions of mesostriatal dopaminergic pathway alters the withdrawal response of the rat hindpaw to mechanical stimulation. **Neurosci. Res.**, v. 52, p. 31-36, 2005.

TAYLOR, J.R.; ELSWORTH, J.D.; ROTH, R.H.; SLADEK JR, J.R.; REDMOND JR, D.E. Severe long-term 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinsonism in the vervet monkey (*Cercopithecus aethiops sabaeus*). **Neuroscience**, v. 81, p. 745-755, 1997.

THAL, L.; MISHRA, R.K.; GARDNER, E.L.; HOROWITZ, S.G.; VARMUZA, S.; MAKMAN, M.H. Dopamine antagonist binding increases in two behaviorally distinct striatal denervation syndromes. **Brain Res.**, v. 170, p. 381-386, 1979.

TIFFANY-CASTIGLIONI, E.; SANETO, R.P.; PROCTOR, P.H.; PEREZ-POLO Jr. Participation of active oxygen species in 6-hydroxydopamine toxicity to a human neuroblastoma cell line. **Biochem. Pharmacol.**, v. 31, p. 181-188, 1982.

TIZABI, Y.; AL-NAMAEH, M.; MANAYE, K.F.; TAYLOR, R.E. Protective effects of nicotine on ethanol-induced toxicity in cultured cerebellar granule cells. **Neurotoxicol. Res.**, v. 5, p. 315-321, 2003.

TOHGI, H.; UTSUGISAWA, K.; YOSHIMURA, M.; NAGANE, Y.; MIHARA, M. Alterations with aging and ischemia in nicotinic acetylcholine receptor subunits alpha4 and beta2 messenger RNA expression in *post-mortem* human putamen. Implications for susceptibility to Parkinsonism. **Brain Res.**, v. 791, p. 186-190, 1998.

TOTH, E.; SERSHEN, H.; HASHIM, A.; VIZI, E.S.; LAJTHA, A. Effect of nicotine on extracellular levels of neurotransmitters assessed by microdialysis in various brain regions: role of glutamic acid. **Neurochem. Res.**, v. 17, p. 265-271, 1992.

TRAUB, M.; WAGNER, H.R.; HASSAN, M.; JACKSON-LEWIS, V.; FAHN, S. The effects of chronic bromocriptine treatment on behaviour and dopamine receptor binding in the rat striatum. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 118, p. 147-154, 1985.

TZOURIO, C.; ROCCA, W.A.; BRETELER, M.M.; BALDERESCHI, M.; DARTIGUES, J.-F.; LOPEZ-POUSA, S.; MANUBENS-BERTRAN, J.- M.; ALPEROVITECH, A. Smoking and Parkinson's disease. **Neurol.**, v. 49, p. 1267-1272, 1997.

UNGERSTEDT, U.; ARBUTHNOTT, G.W. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. **Brain Research**, v. 24, p. 485-493, 1970.

UNGERSTEDT, U. 6-Hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurons. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 5, p. 107-110, 1968.

UNGERSTEDT, U. 6-hydroxydopamine-induced degeneration of the nigrostriatal dopamine pathway: the turning syndrome. **Pharmacol. Ther.**, v. 2, p. 37-40, 1976.

UNGERSTEDT, U. Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed by rotational behaviour. **Acta Physiol. Scand.**, v. 367, p. 49-68, 1971a.

UNGERSTEDT, U. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxydopamine-induced degeneration of the nigrostriatal dopamine system. **Acta Physiol. Scand. Suppl.**, v. 367, p. 89-93, 1971b.

UNGERSTEDT, U. Use of intracerebral injections of 6-hydroxydopamine as a tool for morphological and functional studies on central catecholamine neurons. In: Malmfors, T. and Thoenen, H. (Eds.), **6-hydroxydopamine and Catecholamine Neurons**. North-Holland, Amsterdam, pp. 315-332, 1971c.

VANDERSCHUREN, L.J.M.J. e KALIVAS, P.W. Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. **Psychopharmacology**, v. 151, p. 99-120, 2000.

VAN KAMPEN, J.M. e STOESSL, A.J. Dopamine D(1A) receptor function in a rodent model of tardive dyskinesia. **Neuroscience**, v. 1013, p. 629-635, 2000.

VISANJI, N.P.; O'NEILL, M.J.; DUTY, S. Nicotine, but neither the $\alpha 4\beta 2$ ligand RJD2403 nor an $\alpha 7$ nAChR subtype selective agonist, protects against a partial 6-hydroxydopamine lesion of the rat median forebrain bundle. **Neuropharmacology**, v.51, p. 506-516, 2006.

WADDINGTON, A.J.; CROSS, A.; LONGDEN, F.; OWEN, F.; POULTER, M. Apomorphine-induced rotation in the unilateral 6-OHDA-lesioned rat: relationship to changes in striatal adenylate cyclase activity and 3H-spiperone binding. **Neuropharmacology**, v. 18, p. 643-645, 1979a.

WADDINGTON, A.J.; CROSS, A.; LONGDEN, F.; OWEN, F.; POULTER, M. Functional distinction between DA-stimulated adenylate cyclase and 3H-spiperone binding sites in rat striatum. **Eur. J. Pharmacol.**, v.58, p. 341-342, 1979b.

WEST, A.R. e GRACE, A.A. Opposite influences of endogenous dopamine D1 and D2 receptor activation on activity states and electrophysiological properties of striatal neurons: studies combining in vivo intracellular recordings and reverse microdialysis. **J. Neurosci.**, v. 22, p. 294-304, 2002.

WHITE, F.J. e KALIVAS, P.W. Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. **Drug Alcohol Depend**, v. 51, p. 141-153, 1998.

WICHMANN, T. e DELONG, M.R. Neurotransmitters and disorders of the basal ganglia. In: SIEGEL, G.J. **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**. 7^a edição. Elsevier Academic Press: Canadá, 2006.

WONNACOTT, S.; KAISER, S.; MOGG, A.; SOLIAKOV, L.; JONES, I.W. Presynaptic nicotinic receptors modulating dopamine release in the rat striatum. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 393, p. 51-58, 2000.

WONNACOTT, S. Presynaptic nicotinic Ach receptors. **Trends Neurosci.**, v. 20, p. 92-98, 1997.

XU, K.; BASTIA, E.; SCHWARZSCHILD, M. Therapeutic potential of adenosine A2A receptor antagonists in Parkinson's disease. **Pharmacol. Ther.**, v. 105, p. 267-310, 2005.

ZIGMOND, M.J. Do compensatory processes underlie the preclinical phase of neurodegenerative disease? Insights from an animal model of parkinsonism. **Neurobiol. Dis.**, v. 4, p. 247-253, 1997.

