

IVANA KOUZMINE

ESTUDO DE MECANISMOS DOPAMINÉRGICOS, NICOTÍNICOS E
ADENOSINÉRGICOS EM MODELOS DE PARKINSONISMO INDUZIDO POR
6-HIDROXIDOPAMINA E MPTP EM RATOS


Orientador: Prof. Dr. Cláudio da Cunha.
Co-Orientadora: Dra. Maria Ines Bellissimo.

Curitiba
2004

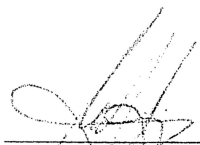


PARECER

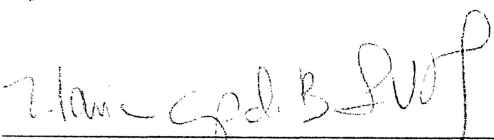
A Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado “**ESTUDO DE MECANISMOS DOPAMINÉRGICOS, NICOTÍNICOS e ADENOSINÉRGICOS EM MODELOS DE PARKINSONISMO INDUZIDO POR 6-OHDA e MPTP EM RATOS**”, de autoria da Pós-Graduanda **IVANA KOUZMINE**, e composta pelos Professores Dr. Cláudio da Cunha (UFPR); Dr. Ricardo Ramina (UNICAMP), Dr^a Maria Aparecida Barbato Frazão Vital (UFPR). De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a Pós-Graduanda foi APROVADA. Para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pelo orientador. Em Curitiba, 30 de novembro de 2004.



Dr. Cláudio da Cunha



Dr. Ricardo Ramina

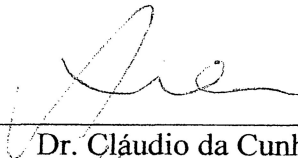


Dr^a Maria Aparecida Barbato Frazão Vital

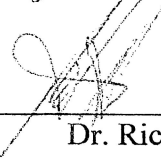


1 **ATA DO JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

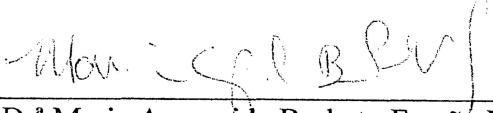
2 Aos trinta dias do mês de novembro do ano de dois mil e quatro, às 09:00 horas, no Sala
3 da PG-Botânica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná,
4 reuniu-se a Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado de autoria da Pós-
5 Graduanda em Farmacologia, **IVANA KOUZMINE**, intitulada: “ESTUDO DE
6 MECANISMOS DOPAMINÉRGICOS, NICOTÍNICOS E ADENOSINÉRGICOS EM
7 MODELOS DE PARKINSONISMO INDUZIDO POR 6-OHDA e MPTP EM
8 RATOS”, sob orientação do Prof. Dr. Cláudio da Cunha, presidida pelo Prof. Dr. Cláudio
9 da Cunha, e composta pelos professores: Dr. Ricardo Ramina (UNICAMP), Dr^a Maria
10 Aparecida Barbato Frazão Vital (UFPR) A Banca Examinadora iniciou os trabalhos. A
11 candidata teve quarenta e cinco minutos para expor oralmente seu trabalho, sendo em
12 seguida argüida durante quinze minutos por cada um dos membros da Banca, e tendo
13 trinta minutos para responder a cada uma das argüições. No final a Comissão
14 Examinadora emitiu o seguinte parecer: APROVADA. De
15 acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a
16 Pós-Graduanda foi APROVADA. Para a publicação o trabalho
17 deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pelo orientador. Nada
18 mais havendo a tratar, o Presidente deu por encerrada a sessão, da qual foi lavrada a
19 presente ata, que será assinada pelo Presidente e pelos demais Membros da Banca
20 Examinadora, em Curitiba, 30/11/2004.



Dr. Cláudio da Cunha



Dr. Ricardo Ramina



Dr^a Maria Aparecida Barbato Frazão Vital

IVANA KOUZMINE

ESTUDO DE MECANISMOS DOPAMINÉRGICOS, NICOTÍNICOS E
ADENOSINÉRGICOS EM MODELOS DE PARKINSONISMO INDUZIDO POR
6-HIDROXIDOPAMINA E MPTP EM RATOS

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

Orientador: Prof. Dr. Cláudio da Cunha.
Co-Orientadora: Dra. Maria Ines Bellissimo.

Curitiba
2004

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	V
LISTA DE SÍMBOLOS	V
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 ANIMAIS.....	15
3.2 CIRURGIAS.....	17
3.3 TESTE DO CAMPO ABERTO.....	19
3.4 LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS – VERSÃO MEMÓRIA OPERACIONAL.....	20
3.5 COMPORTAMENTO ESTEREOTIPADO.....	21
3.6 COMPORTAMENTO ROTATÓRIO.....	22
3.6.1 Rotação Induzida com Apomorfina em Ratos com Lesão por MPTP.....	22
3.6.2 Rotações Induzidas por Agonistas Diretos e Indiretos dos Receptores de DA após a Administração de MPTP na Região Central da SNc.....	23
3.6.3 Rotações Induzidas por Agonistas Indiretos da DA após Administração de 6- OHDA no FPM.....	23
3.6.4 Rotações Induzidas por Agonistas Diretos dos Receptores de DA após a Administração de 1 µg ou 20 µg de 6-OHDA no FPM ou na SNc.....	24
3.7 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA TH.....	24
3.8 DOSAGEM DE DOPAMINA.....	25
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
4. RESULTADOS	26
4.1 EFEITO DA LESÃO DA SNc COM MPTP SOBRE O TESTE DO CAMPO ABERTO.....	26

4.2 EFEITO DA LESÃO DA SNc COM MPTP SOBRE O DESEMPENHO DOS ANIMAIS NO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS – VERSÃO MEMÓRIA OPERACIONAL.....	27
4.3 EFEITO DA LESÃO DA SNc COM MPTP SOBRE O COMPORTAMENTO ESTEREOTIPADO.....	34
4.4 EFEITO DA LESÃO DA SNc COM MPTP SOBRE O COMPORTAMENTO ROTATÓRIO.....	35
4.4.1 Rotações Induzidas por Apomorfina.....	35
4.4.2 Rotações Induzidas por Agonistas Diretos e Indiretos do receptor DAérgico após a Administração de MPTP na Região Central da SNc Direita.....	37
4.4.3 Rotações Induzidas por Agonistas Diretos e Indiretos do Receptor DAérgico após a Administração de 6-OHDA no FPM.....	45
4.4.4 Rotações Induzidas por Agonistas Diretos do Receptor DAérgico após a Administração de 1 ou 20 µg de 6-OHDA no FPM.....	52
4.4.5 Rotações Induzidas por Agonistas Diretos do Receptor DAérgico após a Administração de 1 ou 20 µg de 6-OHDA na SNc.....	54
4.5 ALTERAÇÕES NOS NÍVEIS DE DA NO ESTRIADO DE RATOS COM LESÃO DA SNc.....	55
4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS LESÕES.....	55
5 DISCUSSÃO.....	57
6 REFERÊNCIAS.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA	- 6-hidroxi-dopamina
AP	- Antero-posterior
COMT	- Catecol-orto-metiltransferase
DA	- Dopamina
DAérgico	- dopaminérgico
DOPAC	- Ácido dihidroxifenilacético
DP	- Doença de Parkinson
DV	- Dorso-ventral
FPM	- Feixe prosencefálico medial
GABA	- Ácido gama-aminobutírico
Glu	- Glutamato
GPe	- Globo pálido externo
GPi	- Globo pálido interno
HVA	- Ácido homovalínico
HPLC	- Cromatografia de fase líquida de alta pressão
i.p.	- intraperitoneal
L-DOPA	- Di-hidroxifenilalanina
LL	- Latero-lateral
MAO	- Monoamina oxidase
MPP ⁺	- íon 1 metil-4-fenilpiridina
MPTP	- 1metil-4fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NA	- Noradrenalina
NAérgico	- noradrenérgico
s.c.	- subcutâneo
SN	- Substância negra
SNc	- Substância negra, parte compacta
SNC	- Sistema nervoso central
SNr	- Substância negra, parte reticulada
TH	- Tirosina hidroxilase
VTA	- Área tegmental ventral

LISTA DE SÍMBOLOS

r.p.m.- Rotações por minuto

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa que acomete principalmente pessoas com mais de 50 anos. O 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) e a 6-hidroxidopamina (6-OHDA) estão entre os modelos animais mais utilizados. Relatos anteriores demonstram que o modelo do MPTP é útil para se estudar déficits cognitivos, porém não se sabe se este é um modelo válido para o estudo de problemas motores. Já o modelo da 6-OHDA é bastante utilizado para estudar o efeito de possíveis drogas antiparkinsonianas. Estes dois modelos foram utilizados neste trabalho com a finalidade de avaliar as possíveis diferenças entre as lesões unilaterais e bilaterais da SNc sobre o comportamento exploratório, motor e em testes de memória operacional. Os efeitos de diferentes agonistas de receptores dopaminérgicos (DAérgicos), da nicotina e da cafeína foram estudados no modelo da 6-OHDA e do MPTP. Ratos Wistar machos foram lesados com MPTP ou 6-OHDA na substância negra parte compacta (SNc) ou no feixe prosencefálico medial (FPM) e foram submetidos aos seguintes testes: campo aberto, memória operacional no labirinto aquático, comportamento estereotipado e comportamento rotatório induzido por agonistas DAérgicos. Também foram feitas análises pós-morte como neuroquímica dos estriados direito e esquerdo dos animais e histologia do mesencéfalo por tirosina hidroxilase. Lesões bilaterais da SNc ou da SNc esquerda com MPTP induziram déficits na memória operacional. Além disso, observamos que este também é um modelo válido para o estudo de alterações motoras, já que tanto os ratos com lesão unilateral induzida por MPTP, como por 6-OHDA apresentaram comportamento rotatório quando desafiados com drogas dopaminérgicas, adenosinérgicas e nicotínicas. Os resultados de HPLC dos estriados mostraram que ocorreu depleção de DA no lado lesado, assim como a análise histológica mostrou a morte de neurônios da SNc do lado lesado.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder that affect mainly aged people. Lesions induced by the 6-hydroxydopamine (6-OHDA) and 1-methyl-4phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) has been successfully used as rat models of PD. MPTP and 6-OHDA models are among the most used models to study PD. Previous studies showed that the MPTP model is useful to study cognitive deficits of PD, however it is not know if this model is valid to study motor impairments. The unilateral lesion of the rat SNc with 6-OHDA is a model very used to study motor impairments. In the present study we compare the differences between unilateral and bilateral lesions of the SNc on motor and working memory tests. The effect of dopaminergic agonists, nicotine and caffeine were tested in MPTP or 6-OHDA unilaterally-lesioned rats. Adult male Wistar rats were lesioned by the infusion of MPTP or 6-OHDA into the substantia nigra pars compacta (SNc) or the medial forebrain bundle (FPM) and submitted to the open field, water maze, and turning behavior tests. Also, *post mortem* analysis of the striatal dopamine and SNc histology were analyse. The bilateral of left lesion of the SNc impaired working memory. Both MPTP and 6-OHDA unilaterally-lesioned rats presented turning behavior when challenged with dopaminergic, adenosinergic and nicotinic drugs. The depletion of striatal dopamine is conspicuous in the lesioned side, as well as the SNc dopaminergic cels.

1. INTRODUÇÃO

A participação do córtex cerebral no comando dos movimentos é conhecida desde o século XIX quando Eduard Hitzig e Gustav Fritsch utilizando estimulação elétrica na porção mais anterior do lobo frontal de cães, observaram como resposta discretos movimentos nos olhos desses animais. Estudos posteriores trouxeram maiores esclarecimentos sobre as áreas motoras e também forneceram os critérios utilizados para classificá-las. Atualmente sabemos que em humanos as áreas motoras são classificadas em: área motora primária, que ocupa o giro pré-central do lobo frontal e está relacionada com o comando dos movimentos voluntários, além de ser considerada o local do “alto comando motor”; área motora suplementar, localizada rostral e dorsalmente a área motora primária; área pré-motora, situada rostral e lateralmente a área motora primária, e área motora cingulada, posicionada na face medial do córtex, logo acima do corpo caloso (LENT, 2001). Além das áreas corticais, o cerebelo e as estruturas que compõe os núcleos da base, também estão relacionados com o controle motor, apresentando conexões com as regiões motoras e, por isso, podem também ser considerados como estruturas motoras (MIDDLETON & STRICK, 2000). Estas estruturas conectam-se entre si e participam do sistema funcional de controle motor. Elas permitem que os movimentos sejam executados com precisão e refinamento. Consequentemente, lesões nessas estruturas prejudicam o movimento, podendo ocasionar tremores, rigidez e hipocinesia, que é a perda parcial ou total do movimento do corpo (BHATIA & MARSDEN, 1994).

As estruturas que compõe os núcleos da base além de apresentarem conexões com o córtex motor primário, se conectam com áreas do córtex pré-frontal e pré-motor. Sendo assim, também podem influenciar diferentes tipos de funções cognitivas e motoras (ALEXANDER, DeLONG & STRICK, 1986). Além disso, os núcleos da base atuam no comando motor regulando os movimentos, sendo este controle feito através do sistema de comunicação córtex- núcleos da base- tálamo-

córtex, onde áreas específicas do córtex enviam informações através de neurônios glutamatérgicos (Glu) (SPENCER, 1976; DIVAC, FONNUM & STORM-MATHISEN, 1977) para determinadas partes do corpo estriado (núcleo caudado, putâmen e estriado ventral).

Dentre as estruturas que compõem os núcleos da base, a substância negra (SN), recebe este nome devido à presença de neuromelanina, um pigmento presente em neurônios catecolaminérgicos (GRAHAN, 1978; BOGERTS, 1981). A SN está dividida em duas partes: substância negra reticulada (SNr), que tem em sua maioria neurônios GABAérgicos e poucas células dopaminérgicas (DAérgicas) quando comparada substância negra compacta (SNc) (FALLON & LOUGHLIN, 1985) e a SNc, também denominada de área A9, que se encontra localizada acima da SNr, e é formada principalmente por corpos celulares de neurônios dopaminérgicos (DAérgicos) que projetam seus axônios para o núcleo caudado e putâmen, formando a via nigroestriatal (FALLON & LOUGHLIN, 1985). A maior parte das projeções da via nigroestriatal são ipsilaterais, ou seja, do mesmo lado, sendo escassas as projeções contra-laterais (FAAS & BUTCHER, 1981; LOUGHLIN & FALLON, 1982), e a maioria (95%) destas projeções partem de neurônios DAérgicos (VAN der KOOY, COSCINA & HATTORI, 1981).

Do estriado partem duas vias de saída para o tálamo: a direta e a indireta. Na via direta, neurônios que saem do estriado, liberam o neurotransmissor inibitório ácido gama-aminobutírico (GABA) e o neuropeptídeo substância P que vão inibir os neurônios GABAérgicos localizados no globo pálido interno (GPi) e na SNr. Com a inibição destes neurônios, cessa a inibição de neurônios do tálamo, liberando assim o movimento. Na via indireta, o estriado envia neurônios que contêm o GABA e encefalinas, que são peptídeos opióides, e que inibirão o globo pálido externo (GPe). O GPe também possui neurônios GABAérgicos que, ao serem inibidos, permitem que o núcleo subtalâmico libere o aminoácido excitatório Glu no GPi e na SNr excitando assim os neurônios GABAérgicos que vão inibir os neurônios do tálamo,

impedindo ou cessando o movimento (ALEXANDER & CRUTCHER, 1990) (Fig. 1).

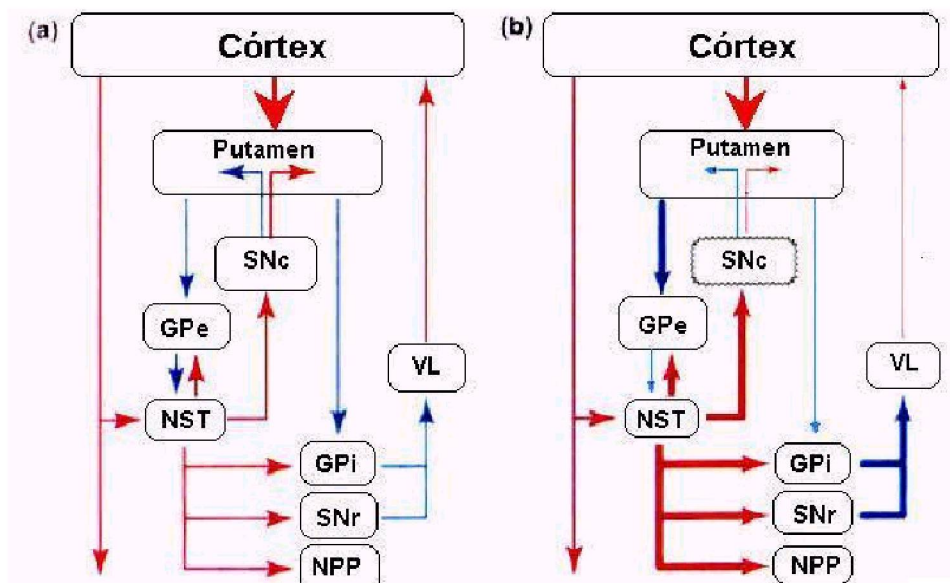


Fig. 1: Modelo simplificado das vias direta e indireta dos núcleos da base. As vias excitatórias estão representadas em vermelho, enquanto as inibitórias em azul. Em a): funcionamento em indivíduos normais, em b): funcionamento em indivíduos com DP. A espessura das setas indica a intensidade de sinal transmitido pela sinapse, mostrando o desequilíbrio provocado pela falta de dopamina no paciente parkinsoniano. SNc e SNr - substância negra compacta e reticulada; GPe e GPi - globo pálido externo e interno; NST - núcleo subtalâmico, NPP - núcleo pedúnculo pontino; VL - núcleo ventro-lateral do tálamo (OBESO et al., 2000).

Nas vias direta e indireta, os neurônios da SNc atuam liberando DA nos terminais sinápticos do estriado. Na via direta a DA liberada vai atuar principalmente sobre os receptores DAérgicos do tipo D1 estimulando neurônios que liberam GABA e substância P, que vão inibir o GPi e a SNr, desinibindo assim o tálamo e liberando movimentos. Já na via indireta, a DA, liberada no estriado pelos neurônios da SNc, vai atuar principalmente nos receptores DAérgicos do tipo D2 provocando a inibição de neurônios que liberam GABA e encefalinas no GPe, que por sua vez vai inibir o NST, que deixa de estimular o GPi e a SNr, desinibindo assim o tálamo e os movimentos. Portanto, a estimulação da via direta e a inibição

da via indireta pela DA, vai provocar uma facilitação na ocorrência de movimentos (ALEXANDER & CRUTCHER, 1990).

Os neurônios DAérgicos além de serem encontrados no mesencéfalo, também podem ser encontrados no diencéfalo e telencéfalo. No mesencéfalo existem três principais áreas de células DAérgicas: as áreas A8, A9 e A10. Os neurônios da área A8 estão localizados no feixe retrorrubral, os da área A9 na SNc e os da área A10 na área tegmentar ventral (VTA), originando o sistema mesolímbico. As fibras DAérgicas que se originam nestes núcleos ascendem ao telencéfalo pelo feixe prosencefálico medial (FPM), formando a via nigroestriatal que termina no corpo estriado, a via mesolímbica, que termina em áreas límbicas (hipocampo, amígdala, núcleo do leito da estria terminal, bulbo olfatório, núcleo septal lateral e núcleo accumbens) e a via mesocortical que termina no córtex frontal (BRANDÃO, 2001). No hipotálamo lateral o FPM une-se ao feixe noradrenérgico dorsal, recebendo fibras noradrenérgicas (NAérgicas), serotoninérgicas e colinérgicas (BRANDÃO, 2001).

A DA que é o neurotransmissor presente na SNc têm sua síntese iniciada pela conversão do aminoácido L-tirosina a dihidroxifenilalanina (L-DOPA) pela ação da enzima tirosina hidroxilase (TH). Uma vez formada, a L-DOPA será convertida a DA pela ação da enzima DOPA descarboxilase (RANG e col., 2003) (Fig. 2).

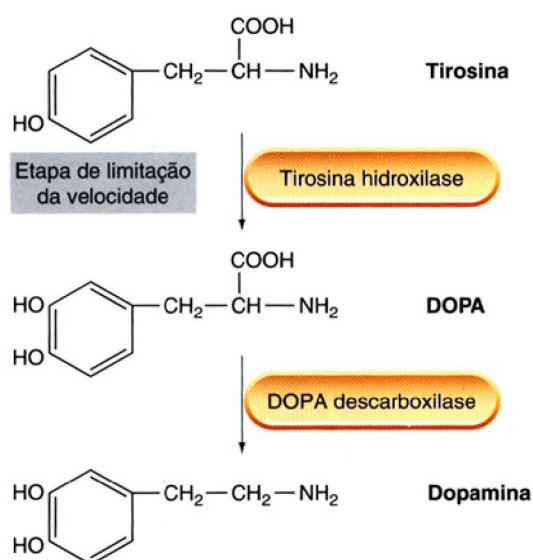


Fig. 2 – Síntese da DA. (RANG & col., 2003).

Quando liberada na fenda sináptica, a DA pode ser recaptada por um transportador específico de DA ou metabolizada por duas enzimas: a catecol-*o*-metiltransferase (COMT) e pela monoamina oxidase (MAO) (DELEU e col., 2002), sendo o ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) e o ácido homovanílico (HVA) os principais produtos dessa metabolização (RANG e col., 2003) (Fig.3).

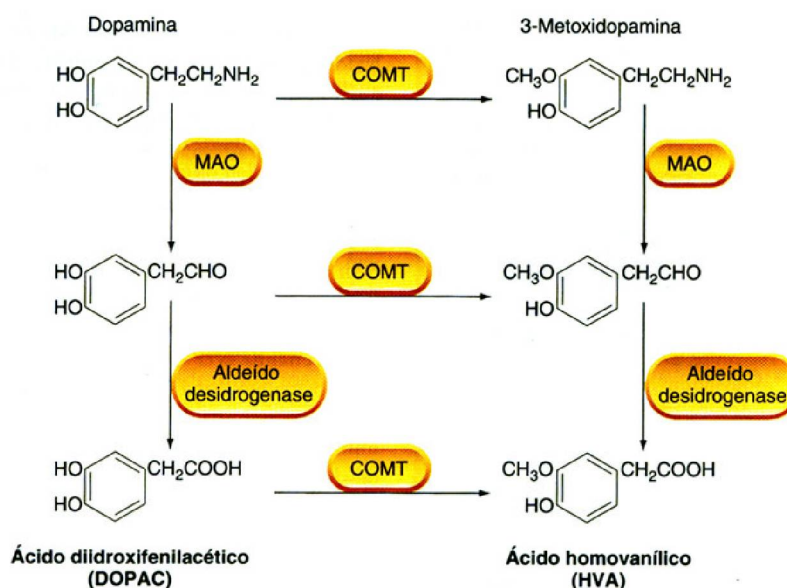


Fig.3 – Principais vias do metabolismo da DA no cérebro. MAO = monoamino-oxidase; COMT = catecol-orto-metiltransferase. (RANG & col., 2003).

Existem drogas que podem produzir no organismo efeitos semelhantes aos da DA, e são denominadas agonistas dos receptores DAérgicos. Estas drogas podem ligar-se aos receptores DAérgicos e mimetizar os efeitos da DA, e são denominadas agonistas diretos, sendo um exemplo a apomorfina. Outro tipo de agonista, o indireto, induz a liberação de DA na fenda sináptica. Outras drogas podem servir de substrato para a formação de DA, como a L-DOPA (DELEU e col., 2002). Existem drogas que, embora não sejam classificadas como agonistas DAérgicos, parecem induzir a liberação de DA, tais como a cafeína e a nicotina.

A apomorfina, uma droga lipofílica que apresenta também alta solubilidade em água, pode ser administrada em animais por via subcutânea (s.c.), já que requer

altas doses e provoca efeitos adversos, como êmese, quando administrada por via oral. Na terapia para Doença de Parkinson (DP), a apomorfina pode ser administrada junto com a L-DOPA ou em períodos nos quais a L-DOPA tem seu efeito diminuído (período “off” da levodopaterapia) (DELEU e col., 2002). Esta droga atua sobre os receptores DAérgicos D1, D2 e, em doses menores, atua principalmente sobre o receptor DAérgico pré-sináptico inibindo a recaptção de DA (DELEU e col., 2002). Já a anfetamina, é um agonista dopaminérgico indireto pois causa a liberação neuronal de catecolaminas. Ela pode provocar várias alterações comportamentais, tais como o comportamento estereotipado, ou seja, atividades normais realizadas repetidas vezes, tal como cheirar, e também alterações da atividade motora, como aumento da locomoção (RANG e col., 2003). A L-DOPA é uma das drogas mais usadas no tratamento da DP, e até o momento, este é o tratamento mais efetivo para a bradicinesia, que é a lentidão dos movimentos corporais e das reações físicas, e rigidez, porém não é muito efetivo no tratamento do tremor provocado pela DP (DELEU e col., 2002).

Além destas drogas que atuam sobre receptores DAérgicos ou liberando DA, tem-se também as metilxantinas, tais como a cafeína e a teofilina, que apresentam efeito estimulante sobre o sistema nervoso central (SNC). Estas drogas atuam antagonizando os receptores adenosinérgicos do tipo A₁ e A₂, ou seja, impedindo que o neurotransmissor adenosina ligue-se a estes receptores. A estimulação provocada pela cafeína leva a uma redução da fadiga, sem provocar euforia e estimulação motora tal como observado pela ação da anfetamina (RANG e col., 2003).

Outra droga que provoca excitação neuronal é a nicotina que age sobre os receptores colinérgicos nicotínicos de neurônios DAérgicos das vias nigroestriatal e mesolímbica, produzindo a liberação de DA (BENWELL, BALFOUR & KHADRA, 1994; VIZI e col., 1995; WONNACOTT, 1997).

Todas estas drogas que atuam sobre circuitos neuronais, provocando excitação ou inibição neuronal, podem alterar os processos de memória. As

memórias podem ser classificadas de acordo com o seu conteúdo em memórias declarativas e procedurais. A memória declarativa é a que registra fatos, eventos ou conhecimentos e pode ser dividida em episódica que se refere a eventos aos quais assistimos ou participamos e semânticas, relacionadas a conhecimentos gerais. A memória procedural é aquela na qual capacidades ou habilidades motoras são evocadas automaticamente, de forma inconsciente, o que é chamado de hábito (IZQUIERDO, 2002).

As principais estruturas nervosas responsáveis pelas memórias episódicas e semânticas são o hipocampo e o córtex entorrinal. Estas estruturas trabalham associadas entre si e comunicam-se com outras regiões do córtex, como o córtex cingulado e o córtex parietal (IZQUIERDO, 2002). Em animais, tarefas que utilizam memória espacial são usadas como um modelo das memórias dependentes do hipocampo. O'KEEFE e NADEL, em 1978, propuseram que a formação hipocampal fornece para o restante do sistema nervoso, um mapa espacial do ambiente.

Na memória de procedimentos, os circuitos responsáveis envolvem o núcleo caudado que é aferentado pela SNc e o cerebelo. As memórias ainda podem ser classificadas de acordo com seu tempo em memórias de longa duração, que levam tempo para serem consolidadas; e em memórias de curta duração, que duram no máximo algumas horas (IZQUIERDO, 2002). Outro tipo de memória é a memória operacional ou de trabalho que mantém por um curto período de tempo a informação que está sendo processada naquele momento. Esta memória é diferente das outras por não produzir traços bioquímicos e é processada principalmente no córtex pré-frontal, dependendo da atividade elétrica dos neurônios desta região. Alguns neurônios do córtex pré-frontal alteram seu padrão de disparo no início, outros no meio e outros no fim dos processos mentais que usam a memória de trabalho. O córtex pré-frontal atua junto com o córtex entorrinal, parietal superior, e cingulado anterior e com o hipocampo através de conexões com estas áreas (IZQUIERDO, 2002). O córtex pré-frontal recebe axônios de regiões vinculadas à regulação dos

estados de ânimo, dos níveis de consciência e emoções. Estes axônios modulam intensamente as células do lobo frontal que se encarregam da memória operacional, interferindo nesta memória de acordo com o estado emocional e de atenção. A memória operacional não é considerada como um tipo de memória por muitos, mas sim como um sistema no qual a informação fica o tempo suficiente para se saber se esta é uma informação nova, se é útil para o organismo e se deve ser armazenada ou se é uma informação que já consta em nossa memória. Para realizar esta busca, a memória operacional deve ter acesso rápido às demais memórias. Estas buscas são feitas através de conexões do córtex pré-frontal com o córtex entorrinal, com o hipocampo e com as demais áreas envolvidas nos processos de memória (IZQUIERDO, 2002).

Lesões e doenças que acometam os circuitos que envolvem as memórias podem provocar déficits cognitivos. Como exemplo poderíamos citar o paciente HM que após ter sido submetido a uma cirurgia de retirada do lobo temporal medial com a finalidade de diminuir as crises convulsivas, não conseguia lembrar-se de já ter estado em um local previamente apresentado ou de pessoas que conheceu após esta lesão (KANDEL, 2003).

Desordens neurodegenerativas também podem provocar prejuízos motores e de memória. Dentre as doenças neurodegenerativas podemos citar a DP, uma doença progressiva que afeta principalmente pessoas com mais de 50 anos e é causada pela morte de neurônios DAérgicos da SNc e conseqüente redução de DA no estriado. A depleção de DA no estriado causa um desequilíbrio no sistema de transmissão de sinais entre os centros do alto comando motor localizado no córtex e os núcleos da base (YOUJIM & RIEDERER, 2002).

É normal que certa quantidade de neurônios DAérgicos (em torno de 5% a cada década) morram durante o processo de envelhecimento (FEARNLEY & LEES, 1991; McGEER e col., 1989), porém na DP ocorre uma perda acelerada destes

neurônios e os sintomas motores surgem quando ocorre uma diminuição entre 70 a 80% de DA estriatal e perda de mais de 50% de neurônios DAérgicos da SNC (FEARNLEY & LEES, 1991; McGEER e col., 1989), sendo esta perda progressiva e rápida, podendo ser de 45% dos neurônios por década (DUNNET & BJÖRKLUND, 1994). Os mecanismos que levam a esta grande perda neuronal não foram completamente elucidados, porém pesquisas indicam que o estresse oxidativo, disfunções mitocondriais, excitotoxicidade, desequilíbrio na homeostasia de cálcio, processos inflamatórios, apoptose (DUNNET & BJÖRKLUND, 1994), fatores genéticos e ambientais (YOU DIM & RIEDERER, 1997) podem estar envolvidos.

A DP apresenta uma evolução progressiva, sendo que distúrbios na memória e no processo de aprendizado aparecem cedo. Esta doença leva o paciente a uma incapacidade física nas fases mais avançadas, com uma combinação de sintomas que inclui, em diversos graus de intensidade, tremor, rigidez, acinesia, bradicinesia e perda dos reflexos do ajuste postural, além de alterações da motricidade automática (MACHADO, 1993; AIRES, 1999).

A postura do indivíduo parkinsoniano fica alterada, com a cabeça e o tronco fletidos para frente, e o antebraço e o joelho permanecem ligeiramente flexionados. Devido a estas alterações, ocorre um deslocamento do centro de gravidade para frente ocasionando dificuldade em manter-se de pé e tendência à propulsão durante a marcha, com aceleração dos passos. Esta alteração no modo de andar é causada pela combinação da acinesia, rigidez e anormalidade postural. A acinesia, bradicinesia, e hipocinesia, que é a diminuição da atividade motora, descrevem o grau de incapacidade de realização de movimentos e provoca lentidão no início e na execução dos mesmos, além de indicar uma falta de atos motores automáticos, como balançar os braços ao andar (MACHADO, 1993). A acinesia provoca a paralisação dos movimentos, e, manifesta-se durante a marcha ou como dificuldade de iniciar movimentos ou por paradas bruscas do movimento dos membros inferiores. O indivíduo com DP caminha com dificuldade, em pequenos passos e apresenta perda

dos movimentos dos membros superiores. Esta perda de movimentos na qual o membro superior direito não avança juntamente com o membro inferior esquerdo, e vice-versa, pode ser o primeiro sinal da doença que se pode observar (YOUDIN & RIEDERER, 1997).

Outros sintomas não-motores podem surgir antes ou junto com os sintomas motores, tal como sudorese ou outros distúrbios do sistema nervoso autônomo e quadros psiquiátricos tal como a depressão em estágios mais avançados da doença (YOUDIN & RIEDERER, 1997). O tremor é predominantemente o de repouso e ocorre principalmente nas mãos, parando com o movimento do membro. Tem início, geralmente, em uma das mãos ou pés e vai se espalhando gradualmente.

Além dos sintomas motores e psiquiátricos, os pacientes com DP apresentam déficits cognitivos. Estes déficits são observados já no início da doença, sendo mais evidentes os distúrbios na memória de hábitos, habilidades e operacional visoespacial (DUBOIS & PILLON, 1997). Estes déficits cognitivos são percebidos em pessoas que ainda não apresentam demência (caracterizada principalmente pelo comprometimento da memória declarativa) que também pode se manifestar em fases mais avançadas da DP. A memória espacial visoespacial encontra-se prejudicada principalmente pela alteração dos processos de “busca” e não por uma alteração da função visoespacial propriamente dita. Os déficits de memória operacional causam um decréscimo da capacidade de processamento. Porém, a memória episódica de longa duração pode estar normal, dependendo do que é requerido (DUBOIS & PILLON, 1997). Porém, em alguns testes de memória explícita, os portadores de DP tiveram um desempenho inferior ao de pessoas normais na ordenação de materiais mostrados em seqüência. Os pacientes apresentam diminuição do controle interno da atenção, o que resulta em dificuldades motoras e de aprendizado (DUBOIS & PILLON, 1997). Além da memória operacional, outras funções executivas também aparecem alteradas na DP, sendo estas funções “processos mentais que exigem elaboração do comportamento em resposta a mudanças ambientais” (DUBOIS &

PILLON, 1997). Temos, portanto um quadro de déficits cognitivos com prejuízos de diferenciados diferentes tipos de memórias.

Devido a dificuldades impostas pela ética para vários estudos de patologias como a DP em humanos, modelos animais são muito utilizados. Estes modelos podem ser definidos como preparações experimentais desenvolvidas com o propósito de estudar uma condição patológica em diferentes espécies. Ainda, ao desenvolver um modelo animal, o propósito explícito pretendido deve ser considerado para tal preparação, já que este propósito determina o critério ao qual o modelo satisfaz e estabelece sua validade.

Dentre os modelos animais que reproduzem alguns dos sintomas observados na DP, pode-se mencionar o modelo da reserpina, no qual observa-se, após a administração intraperitoneal (ip) ou sc desta droga, a diminuição da concentração de catecolaminas, e conseqüente redução da atividade motora e tremor (GERLACH & RIEDERER, 1996). Este modelo vem sendo usado para o estudo de drogas que possam ser utilizadas na terapia contra a DP.

Outro modelo é o da indução de catalepsia por neurolépticos clássicos como o haloperidol, um antagonista do receptor D2, que produz efeitos similares aos da reserpina. A catalepsia em ratos é definida por rigidez muscular e inibição motora que pode ser induzida experimentalmente pela inibição da neurotransmissão DAérgica (GERLACH & RIEDERER, 1996). A administração de haloperidol em doses menores pode produzir também acinesia e bradicinesia (GERLACH & RIEDERER, 1996).

Outro modelo que mimetiza algumas alterações que ocorrem na DP é o da administração intracerebral de 6-hidroxiopamina (6-OHDA). Esta substância apresenta ação neurotóxica, provocando a destruição de neurônios catecolaminérgicos (DA e NA), e é um dos modelos mais utilizados de DP. Como a 6-OHDA não ultrapassa a barreira hematoencefálica, sua administração deve ser feita direto na estrutura cerebral que se deseja lesar (GERLACH & RIEDERER,

1996). Para dano mais específico de neurônios DAérgicos pode-se administrar um inibidor de alta afinidade do sistema de transporte de NA. Devido à lesão provocada pela 6-OHDA, os animais apresentam comportamento motor assimétrico quando submetidos a um forte estresse ou com a aplicação de agonistas de receptores da DA (GERLACH & RIEDERER, 1996). Em lesões mais mediais da SNc, este comportamento motor é expresso por rotações contra-laterais induzidas por agonistas diretos, como apomorfina, enquanto que agonistas indiretos, tal como a anfetamina, produzem rotações ipsilaterais (GERLACH & RIEDERER, 1996; HIRSCHHORN e col., 1983).

Outro modelo animal utilizado para mimetizar os sintomas de DP é o modelo do 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). Neste modelo diferentes espécies apresentam diferentes sensibilidades ao MPTP, por exemplo, a administração sistêmica é eficiente em primatas que necessitam de baixas doses para apresentar sintomas parkinsonianos. Já em ratos, a administração sistêmica de MPTP exige altas doses para que os sintomas de parkinsonismo sejam observados, e por isso a administração intracerebral é mais eficiente (GERLACH & RIEDERER, 1996).

O MPTP ao ser metabolizado pela enzima MAO do tipo B nas células da glia, produz o metabólito 1-metil-4-fenilpiridina (MPP^+), um potente agente oxidante. O MPP^+ por apresentar afinidade pelos transportadores de DA poderá ser captado pelas células DAérgicas e assim atuar seletivamente nestes neurônios. Os prováveis mecanismos que podem explicar a morte de neurônios DAérgicos promovida pela administração de MPTP são: inibição do complexo I mitocondrial; intenso estresse oxidativo; com conseqüente aumento excitotóxico de Ca^{2+} intracelular que provocaria excitotoxicidade, apoptose e morte neuronal (GERLACH & RIEDERER, 1996).

Já se sabe que lesões bilaterais da SNc com MPTP produzem, em ratos, efeitos na memória qualitativamente semelhantes aos observados na DP em

humanos (Da CUNHA e col., 2001, GEVAERD e col., 2001 a, 2002 b; MYIOSHI e col., 2002). Ratos com lesão bilateral da SNc apresentam deficiências de memória operacional e para aprender a tarefa do labirinto aquático de Morris com dica visual, mas não apresentam deficiência para aprender tarefas espaciais (MIYOSHI e col., 2002).

Neste trabalho serão utilizados dois modelos de DP em ratos: o modelo de lesão por MPTP e o modelo de lesão por 6-OHDA. O modelo do MPTP já foi validado para o estudo de déficits cognitivos em ratos e vem sendo usado em nosso laboratório para este fim (Da CUNHA e col., 2001, GEVAERD e col., 2001 a, 2002 b; MYIOSHI e col., 2002).

Porém, existem dúvidas se o MPTP é um modelo válido também para o estudo de alterações motoras associadas à DP. Para validá-lo como tal, foram testadas drogas que induzem rotações em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA, como apomorfina e anfetamina. Estas drogas foram administradas em ratos com lesão unilateral da SNc induzida por MPTP para se avaliar o comportamento rotatório dos ratos. Também estudamos os efeitos de drogas como nicotina e cafeína no modelo da 6-OHDA para testar seus efeitos sobre lesões unilaterais. Além disso, são estudadas as possíveis diferenças produzidas pela lesão da SNc esquerda, direita e bilateral da SNc sobre a memória operacional e comportamento motor de ratos. Sabe-se que lesões bilaterais na SNc provocam déficits na memória operacional, porém não se sabe se lesões unilaterais podem afetar a memória do mesmo modo. As diferenças que existem nos dois hemisférios cerebrais não foram elucidadas completamente, sendo que estudos como este envolvendo regiões que projetam separadamente para um ou outro hemisfério cerebral que auxiliem esta compreensão são importantes. Com a observação do comportamento dos ratos nos testes aplicados, pode-se gerar conhecimentos que venham auxiliar na compreensão dos mecanismos dos déficits motores e de memória na DP.

2. OBJETIVOS

- ✓ Comparar as possíveis diferenças entre as lesões unilaterais e bilaterais da SNc induzidas por MPTP sobre o comportamento exploratório no teste do campo aberto, motor assimétrico no teste de rotações induzidas por agonistas dos receptores DAérgicos, e no teste de memória operacional no labirinto aquático de Morris;
- ✓ Avaliar o efeito de diferentes agonistas de receptores DAérgicos no modelo de lesão unilateral por MPTP e 6-OHDA;
- ✓ Avaliar os efeitos da nicotina e cafeína sobre o comportamento rotatório de ratos no modelo da 6-OHDA, que é um modelo bem caracterizado para estudar este comportamento;
- ✓ Comparar o efeito de diferentes concentrações de 6-OHDA no teste de rotação induzida por agonistas dos receptores DAérgicos;
- ✓ Avaliar os efeitos da administração de MPTP na SNc sobre a quantidade de DA estriatal;
- ✓ Avaliar os efeitos da administração de MPTP na SNc e 6-OHDA no FPM sobre a sobrevivência de neurônios na SNc.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Para este trabalho foram utilizados ratos machos Wistar albinos com 280 g à 320 g no começo do experimento. Os animais foram mantidos a temperatura constante ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12 h, iniciando às 7:00 horas, com alimento e água a vontade. Os testes comportamentais de memória operacional e campo aberto foram realizados no período da manhã, enquanto que os testes de rotação foram realizados durante todo o dia.

Para os testes de memória operacional, campo aberto, rotações induzidas por apomorfina e dosagem de DA, os animais receberam injeção intranigral de salina ou 1 μmol de MPTP e foram divididos em 4 grupos:

- ✓ lesão bilateral: ratos que receberam MPTP na SNc dos dois hemisférios. N = 14;
- ✓ lesão do lado direito: ratos que receberam de MPTP somente na SNc do hemisfério direito. N = 15;
- ✓ lesão do lado esquerdo: ratos que receberam de MPTP somente na SNc do hemisfério esquerdo. N = 15;
- ✓ sham: ratos que passaram por todo o processo cirúrgico, porém não receberam MPTP bilateralmente. N = 15.

Para os testes de rotação com agonistas diretos e indiretos dos receptores DAérgicos os ratos receberam injeções de MPTP (1 μmol) ou de 6-OHDA (1, 8 ou 20 μg) na SNc ou no FPM e foram divididos nos seguintes grupos e sub-grupos:

- ✓ lesão unilateral direita por MPTP: ratos que receberam a injeção de MPTP na SNc;
- ✓ Salina: N = 10;

- ✓ Anfetamina: 1,0 mg/kg: N = 9; 5,0 mg/kg: N = 8; 7,5 mg/kg: N = 10; 10,0 mg/kg: N = 9;
- ✓ Apomorfina : 0,25 mg/kg: N = 10; 0,5 mg/kg: N = 10; 1,0 mg/kg: N = 8; 2,0 mg/kg: N = 10;
- ✓ L-DOPA 100 mg/kg: N = 10;
- ✓ Nicotina: 0,1 mg/kg: N = 10; 0,25 mg/kg: N = 10; 0,5 mg/kg: N = 10;
- ✓ lesão unilateral direita por MPTP: ratos que receberam a injeção de MPTP no FPM do lado direito:
 - ✓ Apomorfina 1 mg/kg: N = 10.
 - ✓ lesão unilateral direita por 6-OHDA: ratos que receberam a injeção de 6-OHDA (1 ou 20 µg) na SNc e foram desafiados com 1,0 mg/kg de apomorfina:
 - ✓ 1 µg de 6-OHDA: N = 9;
 - ✓ 20 µg de 6-OHDA: N = 10;
 - ✓ lesão unilateral direita por 6-OHDA: ratos que receberam a injeção de 6-OHDA (1 ou 20 µg) no FPM do lado direito;
 - ✓ 1 µg de 6-OHDA: N = 9;
 - ✓ 20 µg de 6-OHDA: N = 10;
- ✓ lesão unilateral esquerda: ratos que receberam a injeção de 6-OHDA (8 µg) no FPM do lado esquerdo;
 - ✓ Salina: N = 10;
 - ✓ Nicotina 0,5 mg/kg: N = 8;
 - ✓ Anfetamina: 0,5 mg/kg: N = 10; 1,0 mg/kg: N = 10;
 - ✓ Anfetamina 0,5 mg/kg + Nicotina: 0,5 mg/kg: N = 11; 1,0 mg/kg: N = 9;

- ✓ Anfetamina 1,0 mg/kg + Nicotina: 0,1 mg/kg: N = 8; 0,25 mg/kg: N = 10; 0,5 mg/kg: N = 9; 1,0 mg/kg: N = 9;
- ✓ Cafeína 0,3 mg/kg: N = 10;
- ✓ Anfetamina 1,0 mg/kg + Cafeína 1,0 mg/kg: N = 10;
- ✓ Anfetamina 1,0 mg/kg + Nicotina 1,0 mg/kg + Cafeína: 0,3 mg/kg: N = 10; 1,0 mg/kg: N = 10;
- ✓ controle: ratos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico.

O grupo com lesão esquerda pela administração de 6-OHDA no FPM foi submetido a análise histológica para se verificar o local e a extensão da lesão.

3.2 CIRURGIAS

Previamente à cirurgia estereotáxica, os animais receberam sulfato de atropina (0,4 mg/kg) com objetivo de suprimir a salivação e o agente anestésico equitesin (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) ambos administrados por via intraperitoneal (i.p.). Os ratos anestesiados foram submetidos à tricotomia da parte superior da cabeça, assepsia com álcool iodado e em seguida foram colocados no estereotáxico (David Kopf) (Fig.4).



Fig. 4 - Rato anestesiado, fixado ao aparelho estereotáxico.

Com um bisturi foi feita uma incisão na região superior da cabeça do animal, afastando-se os músculos expondo-se o osso. Através do Atlas neuroanatômico de PAXINOS e WATSON (1986) foram definidas as seguintes coordenadas estereotáxicas para a SNc: anteroposterior (AP), -5,0 mm do bregma; latero-lateral (LL) \pm 2,1 mm da linha média; dorsoventral (DV), - 7,7 mm do osso, e para o FPM AP, -1,9 mm do bregma; LL -1,9 mm da linha média; DV, - 7,2 mm do crânio. Após a localização das medidas das coordenadas, o crânio foi perfurado com uma broca dentária e uma agulha de 30 gauge foi introduzida na SNc ou no FPM. A agulha estava ligada a um tubo de polietileno conectado a uma seringa Hamilton de 10 μ l cujo embolo era impulsionado por uma bomba de microinfusão (Harvard Apparatus). O MPTP (1 μ mol) foi injetado em 1 μ l de solução salina com um fluxo de 0,333 μ l/min durante 3 minutos, aguardando-se dois minutos após o término da infusão antes de se retirar a agulha para se evitar refluxo. A 6-OHDA foi administrada nas concentrações de 1, 8 ou 20 μ g de 6-OHDA em 1 μ l de solução salina (NaCl 0,9%) com um fluxo de 0,25 μ l/min durante 4 minutos. Após a injeção aguardou-se quatro minutos antes de se retirar a agulha. A perfuração óssea foi fechada com cera de osso, e em seguida a pele foi suturada. O rato recebeu ainda 1 ml de bicarbonato de sódio para acelerar a eliminação do anestésico, permitindo assim, uma recuperação mais rápida. Após estes procedimentos, o animal foi retirado do estereotáxico, e colocado individualmente em uma caixa-moradia, e levado para o biotério. Os animais do grupo sham foram submetidos aos mesmos procedimentos porém 1 μ l de solução salina foi infundido em lugar da neurotoxina.

Durante cinco dias após a cirurgia, o animal recebeu em lugar da dieta sólida padrão, uma dieta líquida composta de farelo de ração com água. Ao final dos cinco dias de dieta os animais foram reagrupados em caixas contendo cinco animais.

3.3 TESTE DO CAMPO ABERTO

O Campo Aberto (Fig.5) consiste de uma arena circular branca com 100 cm de diâmetro, formado por três círculos concêntricos e 12 raios entre o círculo mais externo e o do meio e seis raios entre o círculo do meio e o central, e era cercado por cortinas para evitar que os movimentos do observador interferissem no comportamento do rato. Este teste foi realizado, pela manhã do 16º dia após a cirurgia.

O rato testado era retirado de sua gaiola e colocado no centro do Campo Aberto de costas para o experimentador e observado por 5 min., avaliando-se os seguintes parâmetros: número de vezes que o rato cruzou as linhas do campo aberto (ambulação), número de vezes que o animal se levantou e ficou apoiado nas duas patas traseiras para explorar visualmente a arena (levantar), tempo parado, número de bolos fecais e se o animal urinou ou não (XAVIER, 1999).



Fig. 5 – Fotografia ilustrando o piso do campo aberto.

3.4 LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS - VERSÃO MEMÓRIA OPERACIONAL

O teste de memória operacional no labirinto aquático de Morris foi realizado após 21 dias da cirurgia com os animais pertencentes aos seguintes grupos: sham, lesão bilateral, lesão unilateral direita e lesão unilateral esquerda por administração de MPTP na SNc.

O labirinto aquático é um tanque com 70 cm de profundidade e 170 cm de diâmetro. Este tanque era dividido imaginariamente em quatro quadrantes que passavam pelos pontos cardinais: norte, sul, leste e oeste, conforme representado na figura 6. No centro de um destes quadrantes era colocada uma plataforma de acrílico transparente com 11 cm de largura por 14 cm de comprimento, submersa dois cm em relação à superfície da água e na sala onde estava localizado o labirinto aquático foram colocadas dicas visuais nas paredes para auxiliar o rato a localizar a plataforma em cada dia de treino.

A prova consistia em submeter os animais, por um período de cinco dias consecutivos, a quatro tentativas consecutivas para achar a plataforma. Os animais em teste eram colocados de frente para a parede do tanque, em um dos vértices destes quadrantes, que variavam pseudo-randomicamente a cada tentativa. Após serem soltos de um destes vértices, os ratos nadavam livremente até achar a plataforma. Caso o animal não encontrasse a plataforma em até 60 s, ele era conduzido gentilmente até a mesma e lá permanecia por 20 segundos, sendo então era solto de outro vértice até completar as quatro tentativas. A cada dia de treino a plataforma permanecia no mesmo quadrante durante as tentativas de cada dia (Fig. 6). Os ratos eram liberados de posições que variavam entre perto e longe da plataforma de forma pseudorandômica. Com isso o rato não podia utilizar a memória formada para a localização da plataforma no dia anterior, sendo necessária a utilização, para cada dia de treino, de sua memória operacional. O teste foi filmado

e as latências e distâncias percorridas para achar a plataforma, a velocidade de natação e digitalização dos percursos percorridos até a plataforma foram analisadas por um programa de análise de imagens (CEFET, Curitiba, Brasil). Os animais foram considerados tigmotáxicos se durante todas as sessões permaneciam nadando próximos (até 10 cm) da borda da piscina.

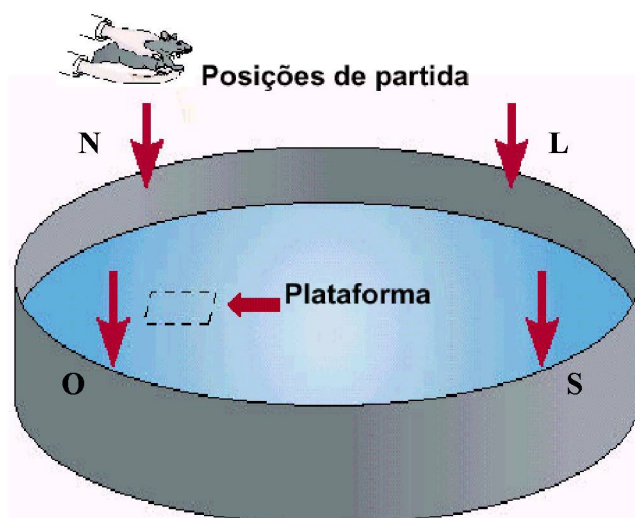


Fig. 6: Labirinto aquático de Morris, com plataforma submersa. As setas indicam diferentes pontos de partida.

3.5 COMPORTAMENTO ESTEREOTIPADO

Para o teste de comportamento estereotipado induzido pela administração de apomorfina na dose de 1 mg/kg por injeção s.c. foram utilizados 32 ratos divididos em dois grupos: com lesão por MPTP da SNc direita e controle. O comportamento estereotipado foi avaliado 10 min após a injeção de apomorfina e mensurado a cada 10 min por um período total de 100 min. Após as injeções os ratos foram colocados em gaiolas (15 x 31 x 26 cm) que permitiam observá-los completamente. Os animais começaram a ter seu comportamento estereotipado medido 10 min após a injeção e este comportamento era mensurado a cada 10 min. durante 100 min. Para a mensuração o animal foi avaliado segundo a escala proposta por Setler e col. (1976).

Nesta escala a cada tipo de comportamento atribuía-se um valor que variava entre 0 e 6, tal como representado na tabela 1:

Tabela 1: Representação dos valores da escala para a mensuração de comportamentos estereotipados proposta por Setler e col. (1976).

Valor	Comportamento
0	Adormecido ou parado;
1	ativo;
2	Predominantemente ativo, mas com curtos de farejar e/ou levantar estereotipado;
3	Atividade estereotipada constante tal como farejar, levantar ou balançar a cabeça, mas com atividade locomotora ainda presente;
4	Atividade estereotipada constante realizada em um só local;
5	Atividade estereotipada constante, mas com períodos curtos de lamber e/ou roer e morder as barras da gaiola;
6	Lamber e/ou roer e morder as barras da gaiola.

3.6 COMPORTAMENTO ROTATÓRIO

3.6.1 Rotações Induzidas por Apomorfina em Ratos com Lesão por MPTP

Sete dias após a cirurgia no FPM do hemisfério direito ou 28 dias após lesão bilateral, unilateral direita e unilateral esquerda por MPTP na SNc, os ratos foram desafiados com apomorfina (1 mg/kg s.c.), e iniciaram-se os testes de rotação induzida.

Após 15 min. da injeção, os ratos foram colocados em um recipiente de vidro redondo com 28 cm de diâmetro e as rotações no sentido horário ou anti-horário foram contadas pelos próximos 15 min. (HIEMKE e col., 2002; STANFORD e col.,

2002). Neste teste foi analisado o número de rotações ipsilaterais à lesão (no mesmo sentido da lesão) e contra-laterais à lesão (no sentido oposto a lesão).

3.6.2 Rotações Induzidas por Agonistas Diretos e Indiretos dos Receptores da DA após a Administração de MPTP na Região Central da SNc

Para o teste de rotações induzidas por agonistas diretos e indiretos dos receptores de DA, os ratos dos grupos controle e lesão unilateral direita com MPTP receberam uma das seguintes drogas:

Apomorfina –doses: 0,25; 0,5; 1,0 e 2 mg/kg, s.c.;

Nicotina –doses: 0,1; 0,25 e 0,5 mg/kg, s.c.;

Anfetamina - doses: 1,0; 5,0; 7,5 e 10,0 mg/kg, s.c.;

L-DOPA - dose: 100 mg/kg, i.p..

Apenas os animais que receberam L-DOPA foram testados 30 min. E 75 min após injeção desta droga, e o número de rotações foi contado durante 15 minutos após cada tempo de espera. Para as demais drogas foram utilizados os mesmos parâmetros utilizados para o desafio com apomorfina.

3.6.3 Rotações Induzidas por Agonistas Indiretos dos Receptores de DA após a Administração de 6-OHDA no FPM

Os ratos dos grupos controle e lesão unilateral esquerda do FPM com 6-OHDA foram submetidos a este teste de rotação induzida recebendo salina ou uma das drogas e doses mencionadas, ou a combinação de duas (anfetamina + nicotina ou anfetamina + cafeína) ou três dessas drogas:

Anfetamina (doses: 0,5 e 1,0 mg/kg, s.c.),

Nicotina (doses: 0,1; 0,25; 0,5 e 1,0 mg/kg, s.c.),

Cafeína (doses: 0,3 e 1,0 mg/kg, s.c.)

3.6.4 Rotações Induzidas por Agonistas Diretos dos Receptores da DA após a Administração de 1 ou 20 µg de 6-OHDA no FPM ou na SNc

Os ratos foram testados com um agonista direto após 7 dias da realização da cirurgia estereotáxica. Os animais receberam 1 mg/kg apomorfina s.c., e foram submetidos ao teste de rotação após 15 minutos, e a quantidade de rotações contra e ipsilaterais foram contadas durante o mesmo período de tempo.

3.7 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA TH

Após os testes comportamentais os ratos foram sacrificados por decaptação e os estriados foram removidos e armazenados em freezer -70°C até a realização da análise neuroquímica. O mesencéfalo de cada animal foi acondicionado individualmente em recipientes contendo solução de formalina a 4%. Esta solução foi trocada a cada três dias, pelo período de uma semana. Após este período os mesencéfalos foram colocados em solução crioprotetora composta de formalina 4% e sacarose a 25%.

Para a análise imunohistoquímica, o mesencéfalo, fixado e crioprotetado, foi colocado em um micrótomo de congelamento e foram feitas quatro séries de secções sagitais com 30 µm de espessura. Em uma das séries foi realizada imunohistoquímica para TH com um anticorpo monoclonal anti-TH produzido em camundongos (Incstar) na diluição de 1:5000. O anti-soro primário foi localizado usando uma variação do complexo avidina-biotina com um kit comercial (ABC Elite kit, Vector Laboratories).

3.8 DOSAGEM DE DA

Para a dosagem de DA os estriados previamente removidos foram processados em solução contendo 0,1 M de ácido perclórico, 147 ng/ml de ácido 3,4-di-hidroxibenzóico (DHBA, Sigma) como padrão interno e 0,02% de dissulfito de sódio. Esta solução foi adicionada aos tecidos na quantidade de 15 µl/mg de tecido úmido. As amostras contendo os tecidos em solução de homogeneização foram mantidas a 4 °C durante toda a noite, para que houvesse uma boa precipitação de proteínas e com isso, uma melhor purificação das amostras. No dia seguinte as amostras foram centrifugadas a 10.000 r.p.m., por 40 min, a 4°C, sendo o sobrenadante retirado e injetado no cromatógrafo. O cromatógrafo utilizado para a dosagem foi um cromatógrafo de fase líquida de alta pressão (HPLC), acoplado a um detector eletroquímico (marca Varian modelo 9080), com potencial de oxidação fixado em + 0,85 V, injetor de 20 µl e uma bomba Varian modelo 90120. A coluna utilizada foi uma C18 de fase reversa com 5 µm de tamanho de partícula e medindo 150 x 4,6 mm (Varian).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças entre os grupos em relação aos níveis de DA estriatal, velocidade de natação, distância percorrida e latência para achar a plataforma, ambulação, tempo parado, levantar e bolos fecais, e escores de comportamento rotatório foram analisados com o teste ANOVA seguida do teste de Duncan. As medidas repetidas foram consideradas um fator em testes de duas vias. As diferenças nos escores de comportamento estereotipado foram analisados pelo teste U de Mann-Whitney. Diferenças na frequência de micção e tigmotaxismo foi analisado pelos testes de χ^2 e Fisher, respectivamente.

4. RESULTADOS

4.1 EFEITO DA LESÃO DA SNc COM MPTP SOBRE O TESTE DO CAMPO ABERTO

Como pode ser visto na figura 8, os animais com lesão bilateral apresentaram maior atividade ambulatoria no teste do campo aberto - maior número de cruzamentos quando comparados ao grupo sham ($F(3,50) = 2,76$, $p = 0,05$ ANOVA de uma via; $p \leq 0,01$ teste *post-hoc* de Duncan). Os grupos com hemilesão não apresentaram diferenças entre si, nem em relação ao grupo com lesão bilateral e sham. Os demais parâmetros avaliados neste teste não apresentaram diferenças significantes entre os grupos: tempo parado ($F(3,51) = 1,46$, $p = 0,23$); levantar ($F(3,51) = 0,28$, $p = 0,83$); número de bolos fecais ($F(3,52) = 0,45$, $p = 0,71$); e urina (teste χ^2 , $p \geq 0,28$) (Fig. 8).

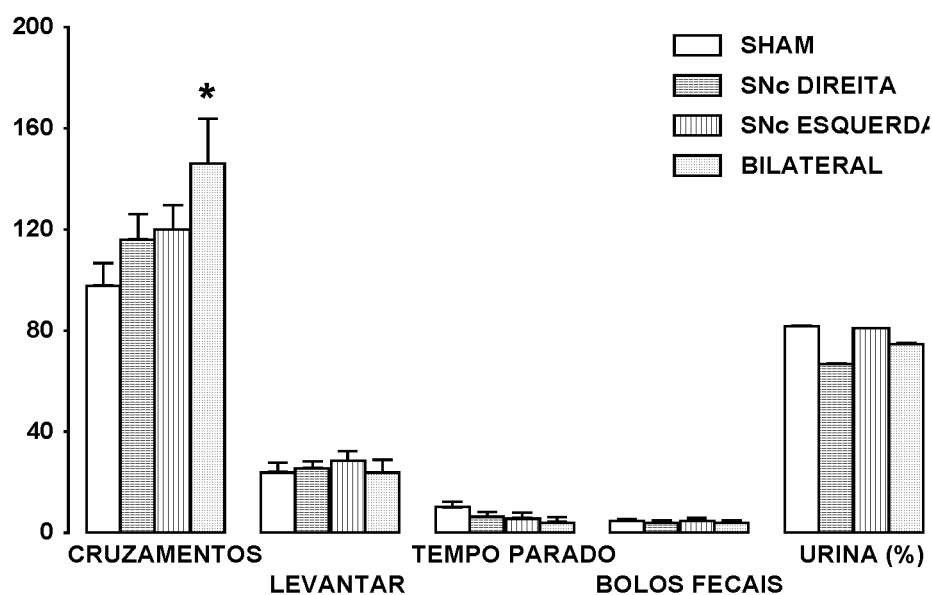


Fig. 8. Efeito da administração de 1 μ mol MPTP na SNc direita ou esquerda ou bilateral no número de cruzamentos, de levantar, de bolos fecais, no tempo parado e na presença de micção durante o teste do campo aberto. Os ratos de todos os grupos foram testados durante cinco minutos e um único treino. Os resultados estão expressos pela média. * $p \leq 0,05$.

Tabela 2: Resumo dos resultados obtidos no teste do campo aberto com os animais dos grupos com lesão unilateral direita ou esquerda e bilateral.

Lesão	Ambulação	Tempo parado	Levantar	Bolos fecais	Urina
Direita	-	-	-	-	-
Esquerda	-	-	-	-	-
Bilateral	↑	-	-	-	-

Onde: ↑ = aumento significativo do parâmetro avaliado no teste do campo aberto; (-) = sem diferença entre parâmetros avaliados. Os resultados de cada grupo foram comparados ao grupo sham; $p \leq 0,05$.

4.2 EFEITO DA LESÃO DA SNc COM MPTP SOBRE O DESEMPENHO DOS ANIMAIS NO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS - VERSÃO MEMÓRIA OPERACIONAL

Três semanas após a cirurgia, os ratos nadaram sem apresentar distúrbios motores graves, que poderiam afetar seu desempenho na tarefa de memória operacional do labirinto aquático. Estudos anteriores (Da CUNHA e col., 2001) mostraram que os ratos não se mostraram afáticos. Não houve diferença significativa na velocidade inicial de natação entre os grupos como mostra a tabela 3 ($F(3,53) = 0,59$, $p = 0,60$, ANOVA de uma via). Em uma ANOVA de duas vias, considerando-se as 20 tentativas como medida repetida, não se observaram diferenças significantes na velocidade de natação entre os grupos em relação ao fator tratamento ($F(3,52) = 0,46$, $p = 0,72$) ou ao fator tentativa ($F(19,88) = 0,83$, $p = 0,66$). Além disso, a latência de fuga na primeira tentativa para encontrar a plataforma submersa também não diferiu entre os grupos ($F(3,53) = 1,04$; $p = 0,38$, ANOVA de uma via) (Fig. 8A).

Tabela 3: Média das velocidades obtidas no teste do labirinto aquático – versão memória operacional, com os animais dos grupos com lesão bilateral, unilateral direita ou esquerda.

Grupos	Média ± erro padrão (cm/s)
Sham	28,88 ± 0,98
SNC esquerda	26,18 ± 1,70
SNC direita	25,10 ± 1,61
SNC bilateral	28,68 ± 3,03

Média da velocidade de natação dos ratos dos grupos sham, lesão bilateral, lesão unilateral direita e lesão unilateral esquerda por administração de MPTP na SNC no primeiro dia de treino no labirinto aquático de Morris.

Todos os animais lesados com MPTP na SNC apresentaram diferenças significantes quando comparados ao grupo sham, assim como os animais dos grupos unilaterais (direita ou esquerda) em relação aos do grupo bilateral. Porém, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos com lesão unilateral (direita ou esquerda) ($p \leq 0,01$, pós-teste de Duncan).

Os ratos com lesão bilateral demoraram mais tempo para encontrar a plataforma quando comparados com o grupo sham ($F(3,54) = 11,39$, $p \leq 0,001$ ANOVA de duas vias com medidas repetidas). Uma ANOVA de duas vias considerando as 20 tentativas como medidas repetidas mostrou um efeito significante do tratamento da lesão ($F(3,54) = 11,39$, $p \leq 0,001$), efeito significante do fator tentativa ($F(19,1026) = 15,56$, $p \leq 0,001$) e significância da interação entre tratamento e tentativa ($F(57,1026) = 1,37$, $p \leq 0,05$).

A análise da latência nas primeiras tentativas indica que os grupos com lesão direita e bilateral apresentaram diferenças quando comparados ao grupo sham ($F(3,54)=5,40$, $p \leq 0,005$, ANOVA de duas vias; $p < 0,05$, teste de Duncan) (Fig. 8B).

Na segunda tentativa de cada dia de treino, os grupos com lesão na SNC esquerda e bilateral apresentaram maior tempo de latência quando comparados ao grupo sham ($F(3,54) = 9,78$, $p \leq 0,001$, ANOVA de duas vias; $p < 0,05$, teste de Duncan) (Fig. 8C). Contudo, na terceira ($F(3,54) = 7,39$, $p \leq 0,001$, ANOVA de duas vias) e quarta ($F(3,54) = 7,42$, $p \leq 0,001$, ANOVA de duas vias) tentativas,

todos os grupos com lesão diferiram significativamente em relação ao grupo sham ($p \leq 0,05$, teste de Duncan) (Fig. 8 D e E).

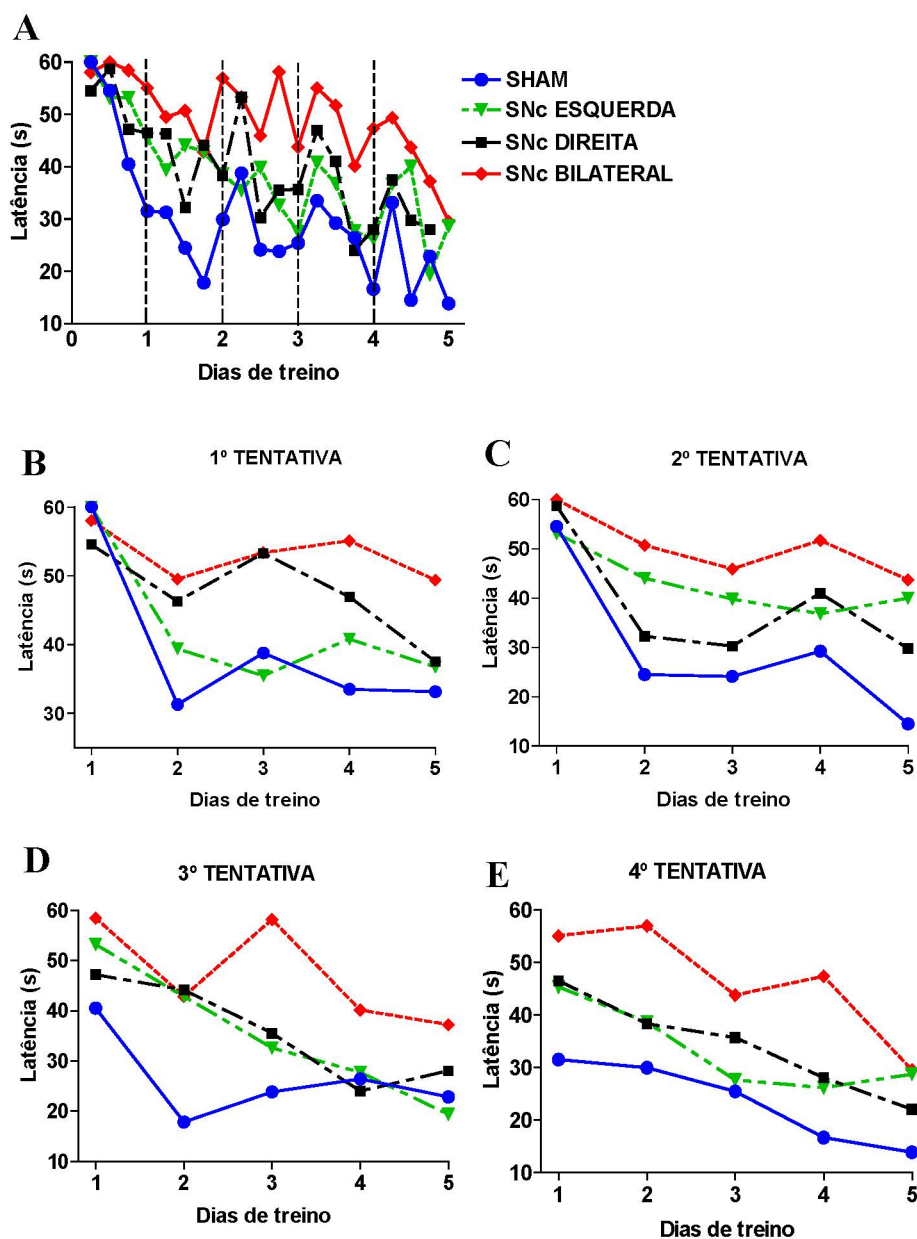


Fig. 8. Efeito da administração de 1 μmol MPTP na SNc direita ou esquerda ou bilateral no tempo para encontrar a plataforma submersa na versão de memória operacional do labirinto aquático. A plataforma permaneceu no mesmo local durante as quatro tentativas de cada dia, mas era colocada em outro local a cada dia de treino. Os resultados estão expressos pela média. A. Latência para encontrar a plataforma de todas as quatro tentativas dos cinco dias de treino. B. Latência para encontrar a plataforma nas primeiras tentativas dos cinco dias. C. Segundas tentativas dos cinco dias. D. terceiras tentativas dos cinco dias. E. quartas tentativas dos cinco dias.

A figura 9 mostra as distâncias percorridas pelos ratos para achar a plataforma. Em uma ANOVA de duas vias, considerando-se todas as tentativas como medidas repetidas, verificou-se significância do efeito da lesão ($F(3,52) = 3,56$, $p \leq 0,05$, ANOVA de duas vias com medida repetida), e no efeito do fator treino ($F(19,988) = 10,62$, $p \leq 0,001$), porém não houve interação significativa entre lesão e treino ($F(57,988) = 1,11$, $p = 0,27$).

O teste de Duncan mostrou uma diferença significativa entre a distância percorrida pelo grupo com lesão bilateral e o grupo sham ($p \leq 0,01$) e valores próximos ao crítico para os grupos com lesão unilateral esquerda ($p = 0,06$) e direita ($p = 0,09$) quando comparados ao grupo sham.

Os resultados de cada dia de treino foram analisados separadamente no teste ANOVA de duas vias, considerando o dia de treino como medida repetida.

Como se observa na figura 9 B não há efeito significativo da lesão por MPTP nas primeiras tentativas ($F(3,52) = 1,70$, $p = 0,17$). Na segunda tentativa os grupos com lesão na SNc esquerda e bilateral apresentaram diferenças significantes em relação ao grupo sham ($F(3,52) = 4,74$, $p \leq 0,001$, ANOVA; $p < 0,001$, teste de Duncan) (Fig. 9 C). Porém, na terceira tentativa apenas o grupo com lesão bilateral apresentou diferenças em relação ao grupo sham ($F(3,52) = 2,81$, $p \leq 0,05$, ANOVA; $p \leq 0,05$ teste de Duncan) (Fig. 9 D) e na quarta tentativa não foi observada diferença entre os grupos com lesão e o grupo sham ($F(3,52) = 1,70$, $p = 0,17$) (Fig. 9 E).

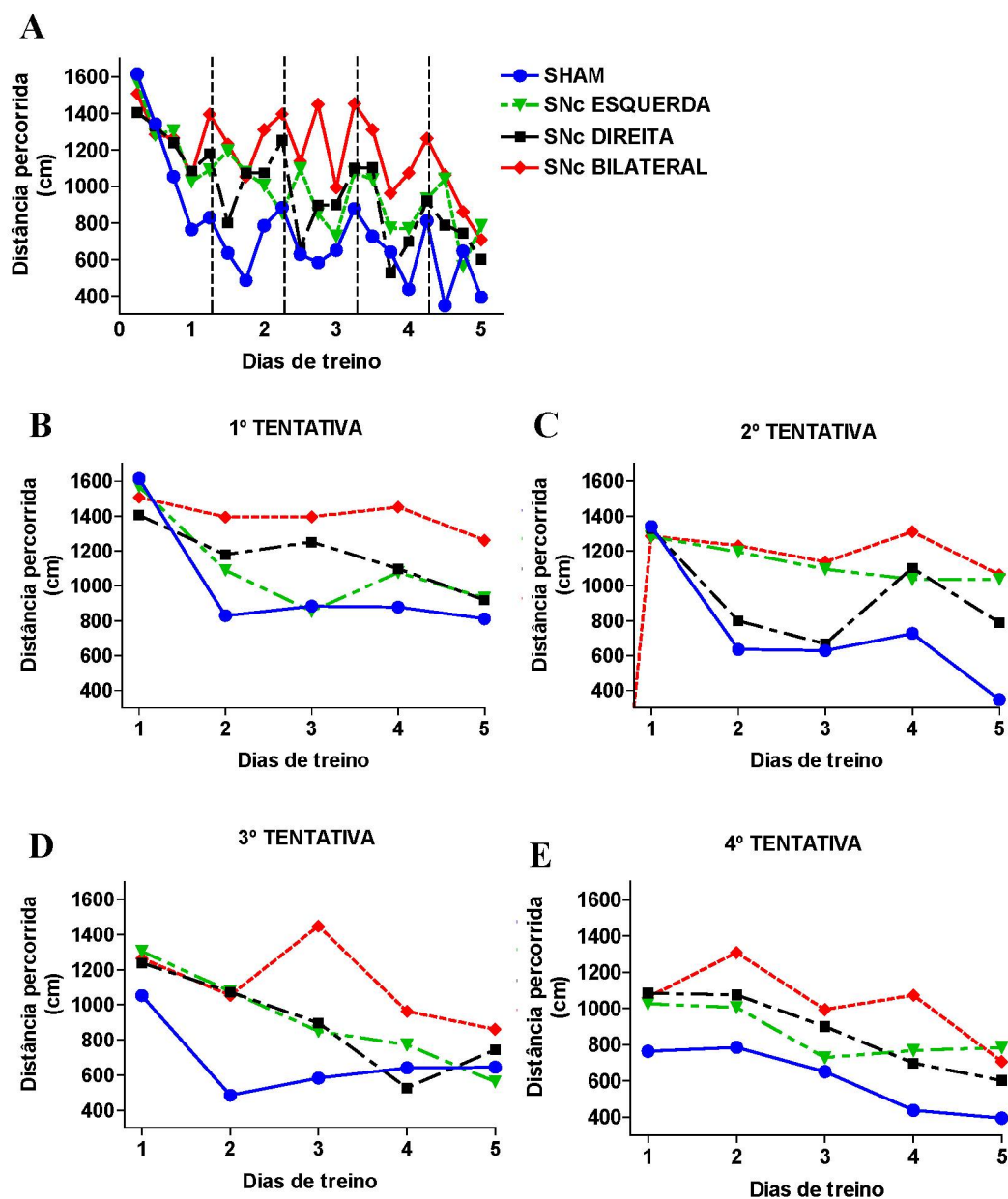


Fig. 9. Efeito da administração de 1 μ mol MPTP na SNc direita ou esquerda ou bilateral na distância de escape percorrida para encontrar a plataforma submersa na versão de memória operacional do labirinto aquático. A plataforma permaneceu no mesmo local durante as quatro tentativas de cada dia, mas era colocada em outro local a cada dia de treino. Os resultados estão expressos pela média. A. Distância percorrida durante todas as quatro tentativas dos cinco dias de treino. B. Distância percorrida nas primeiras tentativas dos cinco dias. C. Segundas tentativas dos cinco dias. D. terceiras tentativas dos cinco dias. E. quartas tentativas dos cinco dias.

As figuras 10 e 11 ilustram o caminho percorrido por um rato representante de cada grupo, este foi escolhido randomicamente e demonstra a real representação da trajetória percorrida por cada grupo de animais.

No terceiro dia de treino, os animais do grupo sham nadaram diretamente para a plataforma enquanto que os ratos com lesão unilateral ou bilateral nadaram por caminhos erráticos antes de encontrar a plataforma. Entretanto, estes ratos não apresentaram tigmotaxismo ou natação lateralizada. O comportamento tigmotáxico foi observado somente no primeiro dia de treino para a maioria dos ratos, contudo um número maior de ratos com lesão bilateral continuou apresentando este comportamento durante os demais dias de treino (tabela 4).

O caminho percorrido pelos ratos com lesão unilateral no segundo treino do segundo dia e do quinto dia de treino encontra-se na figura 11.

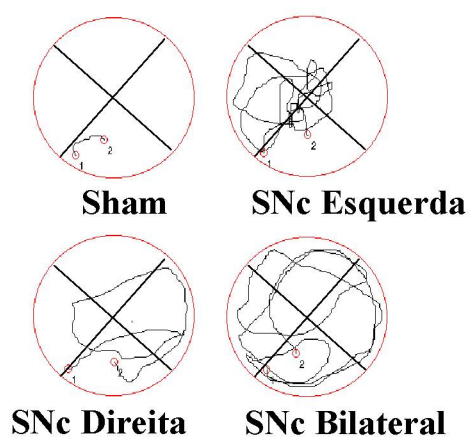


Fig 10. Representação dos caminhos percorridos durante a natação de ratos sham, com lesão unilateral esquerda, direita e lesão bilateral da SNc na última tentativa do último dia de treino no labirinto aquático. 1. Posição de saída. 2. Posição final na qual o rato encontrou a plataforma.

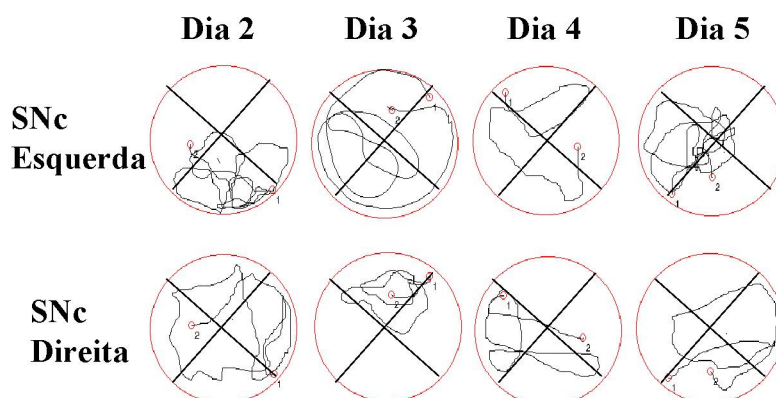


Fig. 11. Representação dos caminhos percorridos durante a natação de ratos com lesão unilateral na segunda tentativa do segundo ao quinto dia de treino no labirinto aquático. Os ratos eram colocados em posições de saída diferentes no labirinto aquático e a posição da plataforma permanecia a mesma durante o mesmo dia de treino, variando a cada dia. 1. Posição de saída. 2. Posição final na qual o rato encontrou a plataforma.

Tabela 4: Observação do comportamento tigmotáxico no teste do labirinto aquático – versão memória operacional, com os animais dos grupos sham, lesão bilateral, unilateral direita ou esquerda.

Grupo	Ocorrência/N	
	Tigmotáxico	Perseverança
Sham	0/15	2/15
SNc esquerda	2/14	2/14
SNc direita	1/15	7/15
SNc bilateral	5/14*	3/14

Efeito das lesões unilaterais direita e esquerda e lesão bilateral por injeção de MPTP na SNc no comportamento tigmotáxico e na perseverança durante o teste de memória operacional no labirinto aquático de Morris. O comportamento tigmotáxico é expresso como o número de animais tigmotáxicos durante todos os dias de treino no labirinto aquático. A preservação é expressa pelo número de animais que levaram mais tempo explorando o quadrante no qual a plataforma estava no dia de treino anterior na primeira tentativa do quinto dia de treino. N = número de animais de cada grupo. * $p \leq 0,05$ (teste de Fisher).

A posição de partida não afetou a eficiência do animal em encontrar a plataforma, como pode ser observado nas figuras 10, 9 A e 8 A que demonstram os caminhos, as distâncias e as latências respectivamente.

Tabela 5: Resumo dos resultados obtidos no teste do labirinto aquático – versão memória operacional, com os animais dos grupos com lesão bilateral, unilateral direita ou esquerda.

Lesão	Lat	Lat 1	Lat 2	Lat 3	Lat 4	Dist	Dist 1	Dist 2	Dist 3	Dist 4
Direita	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-
Esquerda	-	-	↑	-	-	-	-	↑	-	-
Bilateral	↑	↑	↑	-	-	↑	-	↑	↑	-

Onde: Lat = latência geral (média da latência de todas as tentativas); Lat 1 a 4 = latências para encontrar a plataforma das tentativas de 1 a 4; Dist = distância geral (média da distância de todas as tentativas); Dist 1 a 4 = distância das tentativas de 1 a 4; ↑ = aumento significativo em relação ao grupo sham; (-) sem diferença significativa em relação ao grupo sham.

4.3 EFEITO DA LESÃO DA SNc COM MPTP SOBRE O COMPORTAMENTO ESTEREOTIPADO

Como mostrado na Figura 12, os ratos que receberam injeção de MPTP na SNc do hemisfério direito não apresentaram diferenças significantes no padrão de comportamento estereotipado ao serem desafiados com apomorfina quando comparados aos animais pertencentes ao grupo controle ao serem desafiados com apomorfina ($p = 0,22$, teste de Mann-Whitney).

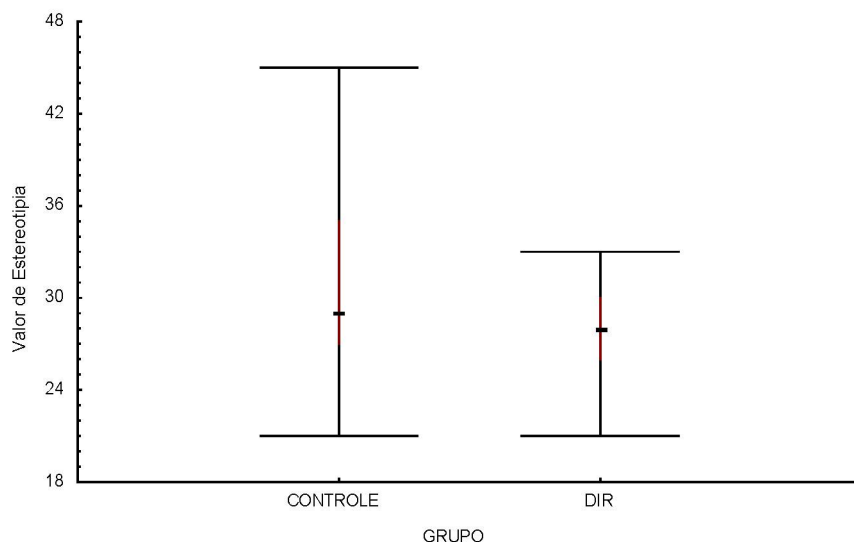


Fig. 12 – Valores do comportamento estereotipado da escala proposta por Setler e col. (1976) durante 100 min. após 10 min. da administração s.c. de 1 mg/kg de apomorfina em ratos do grupo controle e com lesão por MPTP na SNc do hemisfério direito. Os valores estão expressos pela mediana e intervalos de interquartis. $p = 0,224154$, teste de Mann-Whitney.

4.4 EFEITO DA LESÃO DA SNc COM MPTP SOBRE O COMPORTAMENTO ROTATÓRIO

4.4.1 Rotações Induzidas por Apomorfina

Quando desafiados com apomorfina (1,0 mg/kg), os animais com lesão na SNc direita apresentaram um comportamento rotatório ipsilateral (sentido horário), sendo este diferente em relação aos demais grupos ($F(3,48) = 9,54$, $p \leq 0,001$ ANOVA; $p \leq 0,01$, teste de Duncan) (Fig. 13). Os animais com lesão na SNc do lado esquerdo também apresentaram um comportamento rotatório ipsilateral à lesão (no sentido anti-horário) significativo quando comparado aos demais grupos ($F(3,45) = 9,03$, $p \leq 0,001$; $p \leq 0,01$, teste de Duncan) (Fig. 13). Por outro lado, os ratos com lesão bilateral não apresentaram alterações significantes no comportamento rotatório, tanto horário como anti-horário, em relação ao grupo sham ($p \geq 0,20$, teste

de Duncan). Portanto, observamos que à lesão com MPTP induziu rotações ipsilaterais à lesão quando os animais foram desafiados com apomorfina.

Porém, os ratos que receberam MPTP no FPM direito, ao serem desafiados com apomorfina (1 mg/kg, s.c.) não apresentaram alterações significantes em relação ao grupo sham no número de rotações ipsilaterais ($F(1,16) = 0,27$, $p = 0,61$) e contra-laterais ($F(1,16) = 0,26$, $p = 0,61$) à lesão (Fig. 14 e 15).

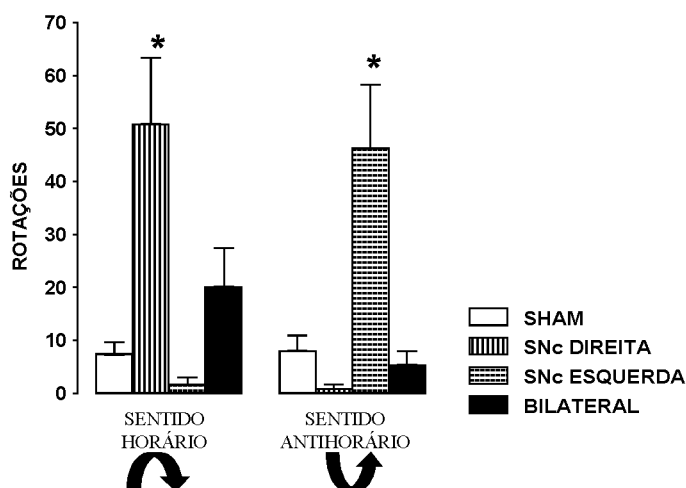


Fig. 13 – Efeito da lesão da SNc com MPTP sobre o comportamento rotatório induzido com apomorfina em ratos com lesão bilateral, unilateral direita ou esquerda. Os valores estão representados pela média \pm EPM. * $p \leq 0,01$, ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan,.

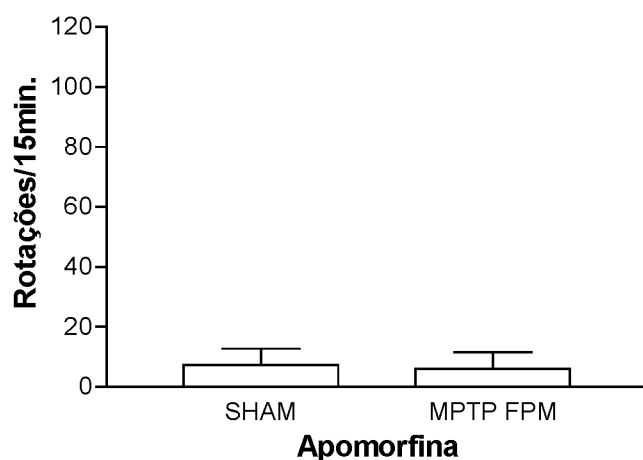


Fig. 14 - Efeito da administração de apomorfina (1,0 mg/kg) em ratos após a infusão unilateral MPTP no FPM direito, no número de rotações ipsilaterais. Os ratos receberam a injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média \pm erro padrão da média.

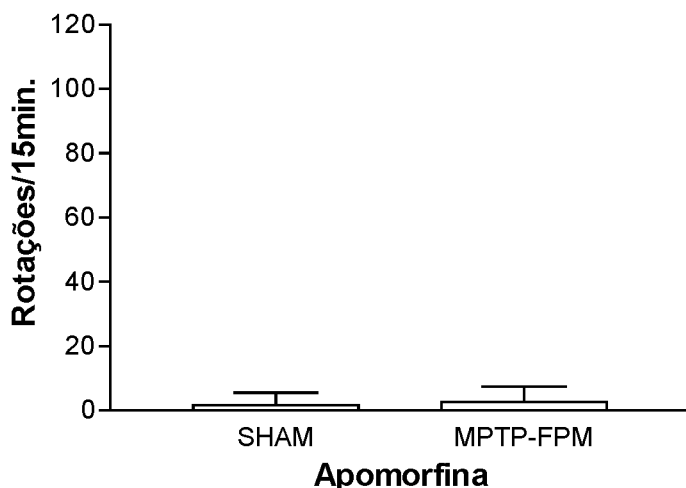


Fig. 15 - Efeito da administração de apomorfina (1,0 mg/kg) em ratos lesados unilateralmente com MPTP no FPM, no número de rotações no sentido anti-horário. Os ratos receberam a injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média \pm EPM.

Tabela 6: Resumo dos resultados obtidos no teste de rotação induzida por apomorfina com os animais dos grupos com lesão unilateral direita ou esquerda e bilateral.

Lesão	Rotação horária	Rotação anti-horária
SNC direita	↑	-
SNC esquerda	-	↑
SNC Bilateral	-	-
FPM direito	-	-

Onde: ↑ = aumento significativo do número de rotações; (-) = sem diferença significativa em relação ao grupo sham.

4.4.2 Rotações Induzidas por Agonistas Diretos e Indiretos do Receptor DAérgico após a Administração de MPTP na Região Central da SNC Direita

Os animais lesados com MPTP quando desafiados com anfetamina apresentaram um comportamento rotatório ipsilateral dose-dependente ($F(4,57)=22,71$, ANOVA de uma via, $p \leq 0,05$, $p \leq 0,001$ pós-teste de Duncan) (Fig. 16). Em todas as doses testadas não foram observadas alterações significantes no

número de rotações contra-laterais quando comparado aos animais que receberam salina ($F(4,57) = 0,2469$, ANOVA de uma via, $p = 0,9103$) (Fig. 17).

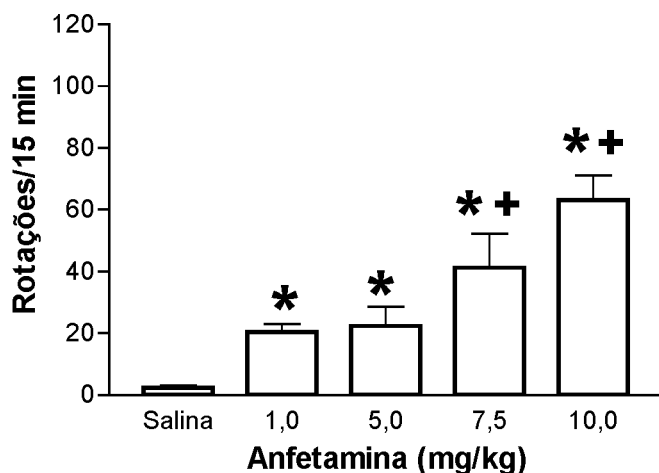


Fig. 16 - Efeito da administração de anfetamina em ratos com infusão unilateral de MPTP na SNc, no número de rotações ipsilaterais. Os ratos receberam uma injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média \pm EPM. * $p \leq 0,05$, em relação aos animais que receberam salina. + $p \leq 0,05$, em relação aos grupos que receberam anfetamina (1,0 e 5,0 mg/kg).

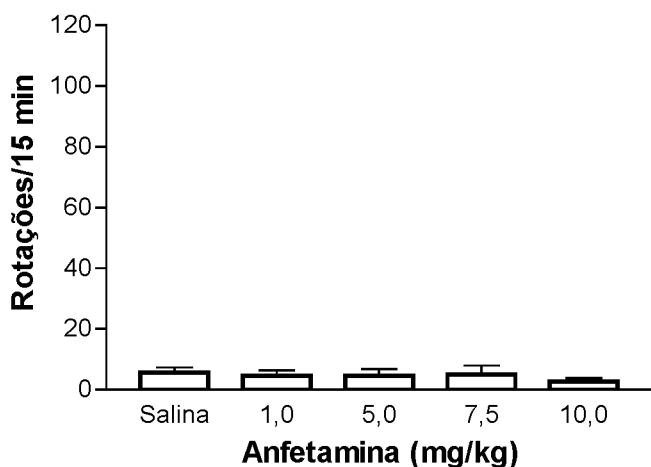


Fig. 17 - Efeito da administração de anfetamina (1,0 à 10,0 mg/kg) em ratos com infusão unilateral de MPTP na SNc, no número de rotações contra-laterais. Os ratos receberam uma injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média \pm EPM.

Os ratos do grupo controle que foram desafiados com anfetamina nas doses de 7,5 mg/kg e 10 mg/kg apresentaram um número significativamente maior de rotações no sentido horário em relação ao grupo salina ($F(4,52) = 5,43$, ANOVA de uma via, $p \leq 0,01$, teste de Duncan) (Fig. 18). Os ratos do grupo controle que

receberam anfetamina na dose de 1 mg/kg apresentaram maior número de rotações no sentido anti-horário em relação ao grupo salina ($F(4,52) = 3,25$, ANOVA de uma via, $p \leq 0,05$, teste de Duncan) (Fig.19), enquanto que os demais grupos não apresentaram diferenças entre si ($F(4,52) = 3,2502$, $p \geq 0,10$, teste de Duncan).

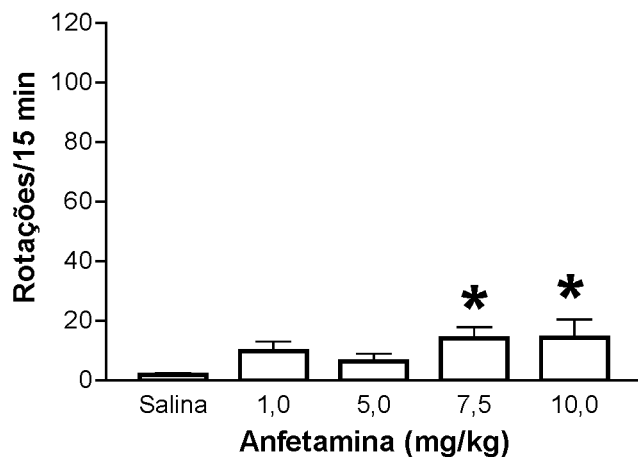


Fig. 18 - Efeito da administração de anfetamina em ratos não lesados, no número de rotações no sentido horário. Os ratos receberam uma injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média \pm EPM * $p < 0,05$.

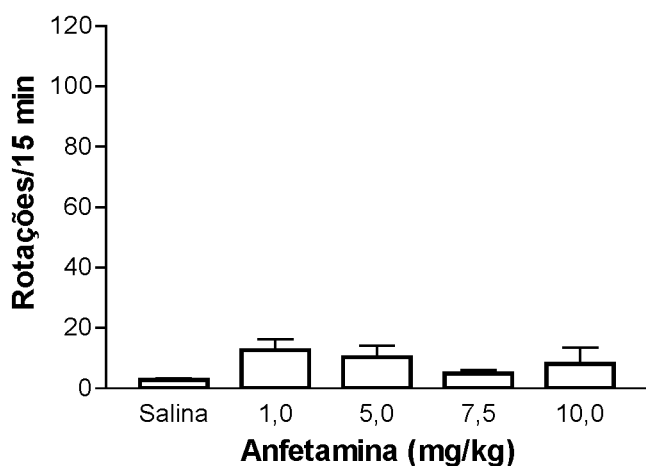


Fig. 19 - Efeito da administração de anfetamina em ratos não lesados, no número de rotações no sentido anti-horário. Os ratos receberam uma injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média \pm EPM.

Ao serem desafiados com apomorfina nas doses de 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg/kg, os ratos lesados com MPTP na SNc direita apresentaram um aumento dose-dependente de rotações ipsilaterais à lesão, sendo este número significativamente

maior que o número de rotações do grupo salina ($F(4,59) = 13,05$, ANOVA de uma via, $p < 0,001$, pós-teste de Duncan) (Fig. 20). Com relação ao número de rotações contra-laterais, os ratos lesados não apresentaram uma diferença significativa quando desafiados com as diferentes doses de apomorfina utilizadas neste trabalho quando comparadas ao grupo salina ($F(4,59) = 0,86$, ANOVA de uma via, $p = 0,49$) (Fig. 21).

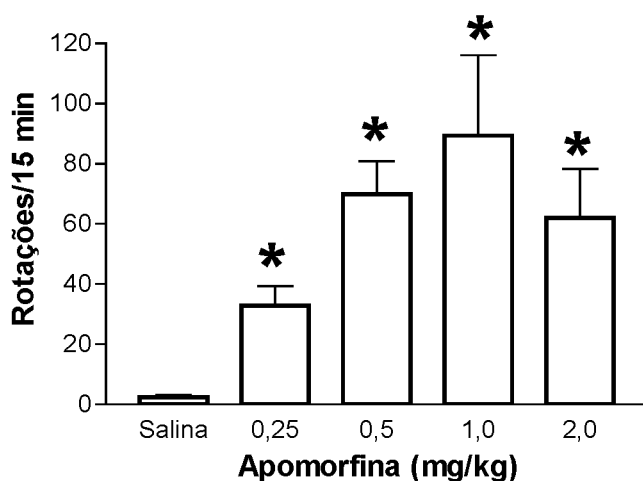


Fig. 20 - Efeito da administração de apomorfina em ratos que receberam infusão unilateral de MPTP na SNc, no número de rotações ipsilaterais. Os ratos receberam uma injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média \pm EPM. * $p < 0,05$.

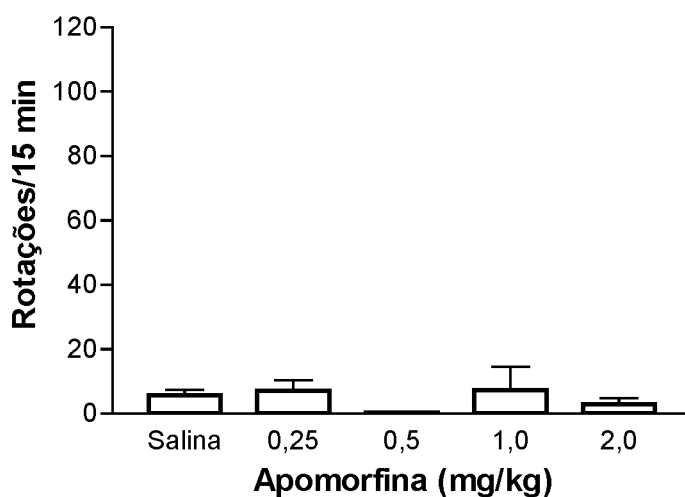


Fig. 21 - Efeito da administração de apomorfina em ratos com infusão unilateral de MPTP na SNc, no número de rotações contra-laterais. Os ratos receberam uma injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média \pm EPM.

Os animais do grupo controle não apresentaram diferenças significantes em relação as doses de 0,25 e 1,0 mg/kg nas rotações de sentido horário ($F(4,58) = 35,05$, ANOVA de uma via, $p > 0,15$, pós-teste de Duncan), porém quando desafiados com as doses de 0,5 e 2 mg/kg os ratos apresentaram maior número de rotações em relação aos demais grupos ($F(4,58) = 35,05$, ANOVA de uma via, $p \leq 0,001$) (Fig. 22). No sentido anti-horário os ratos não lesados não apresentaram diferenças entre as doses ($F(4,58) = 2,53$, ANOVA de uma via, $p = 0,050031$) (Fig. 23).

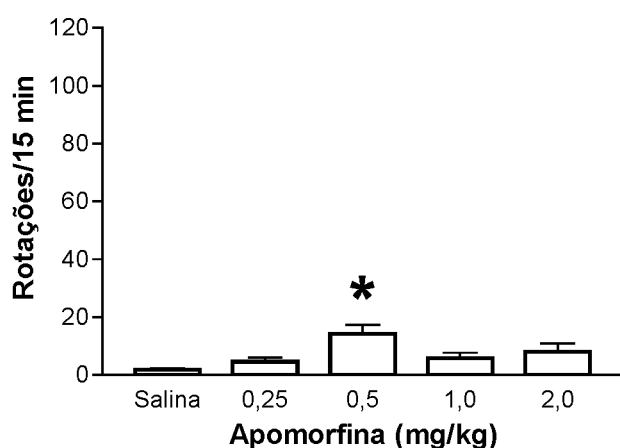


Fig. 22 - Efeito da administração de apomorfina (0,1 à 2,0 mg/kg) em ratos não lesados, no número de rotações no sentido horário. Os ratos receberam uma injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média \pm EPM. * $p \leq 0,05$.

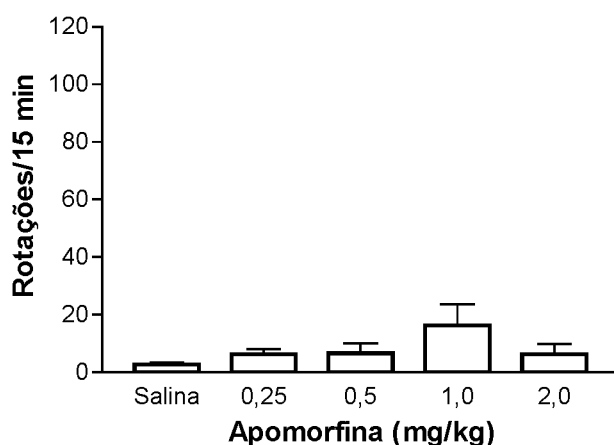


Fig. 23 - Efeito da administração de apomorfina em ratos não lesados, no número de rotações no sentido anti-horário. Os ratos receberam uma injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média \pm EPM.

Quando desafiados com L-DOPA (100 mg/kg, i.p.) os ratos lesados com MPTP não diferiram no número de rotações ipsilaterais em relação ao grupo que recebeu salina: $F(1,60) = 0,16$, ANOVA de uma via, $p = 0,89$) (Fig. 24). O número de rotações contra-laterais também não diferiu entre os grupos salina e L-DOPA ($F(1,60) = 0,82$, ANOVA de uma via, $p = 0,36$) (Fig. 25).

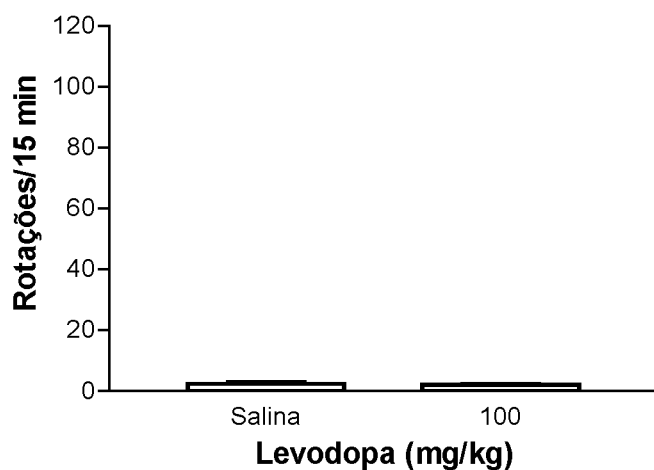


Fig. 24 – Efeito da administração de L-DOPA em ratos com infusão unilateral de MPTP na SNc, no número de rotações ipsilaterais. Os ratos receberam uma injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média \pm EPM.

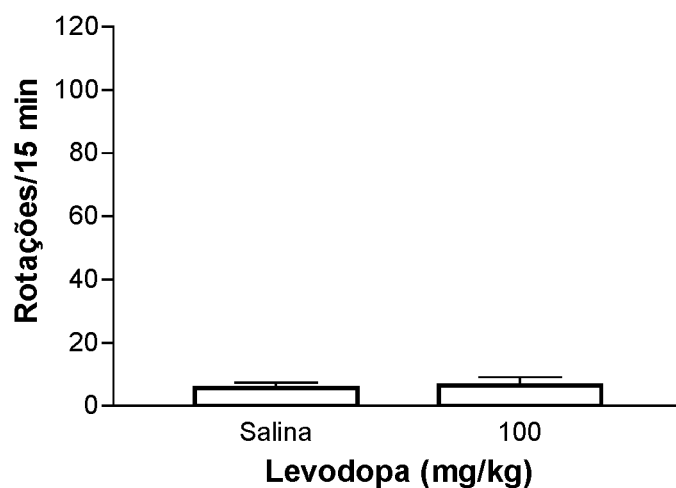


Fig. 25 - Efeito da administração de L-DOPA em ratos com infusão unilateral de MPTP na SNc, no número de rotações contra-laterais. Os ratos receberam uma injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média \pm EPM.

Os ratos de ambos os grupos, MPTP e controle, quando desafiados com nicotina não apresentaram diferenças significantes no número de rotações horárias em relação ao grupo salina ($F(3,52) = 0,98$, $p = 0,40$ e $F(3,52) = 0,27$, ANOVA de uma via, $p = 0,84$) e anti-horárias ($F(3,52) = 0,17$, $p = 0,91$ e $F(3,52) = 0,86$, $p = 0,46$) (Fig. 26 - 29).

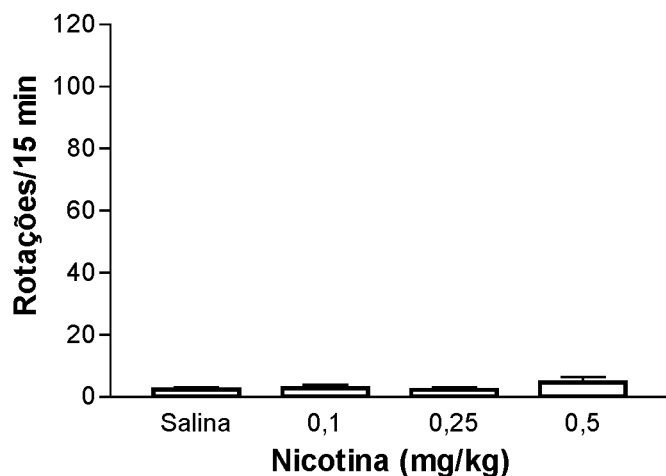


Fig. 26 - Efeito da administração de nicotina em ratos com infusão unilateral de MPTP na SNc, no número de rotações ipsilaterais. Os ratos receberam uma injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média \pm EPM.

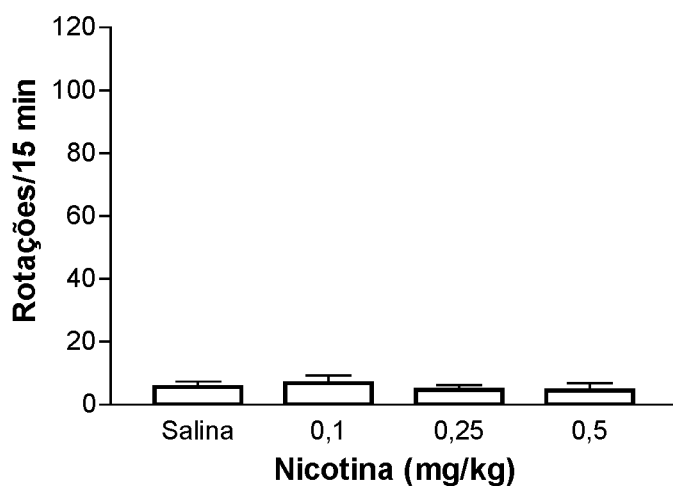


Fig. 27 - Efeito da administração de nicotina em ratos com infusão unilateral de MPTP na SNc, no número de rotações contra-laterais. Os ratos receberam uma injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média \pm EPM.

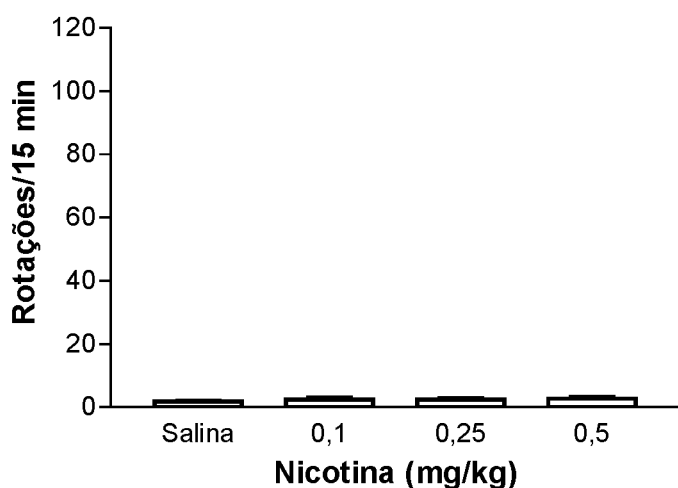


Fig. 28 - Efeito da administração de nicotina em ratos não lesados, no número de rotações no sentido horário. Os ratos receberam uma injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média \pm EPM.

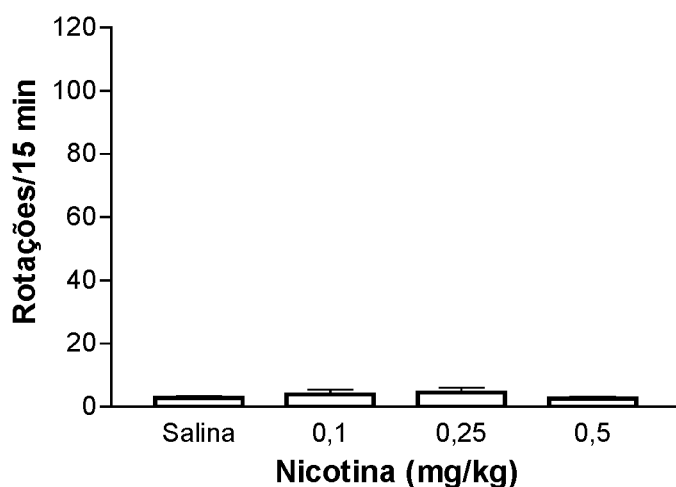


Fig. 29 - Efeito da administração de nicotina (0,1 à 0,5 mg/kg) em ratos não lesados, no número de rotações no sentido anti-horário. Os ratos receberam uma injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média \pm EPM.

Tabela 7: Resumo dos resultados obtidos no teste de rotação induzida por agonistas dos receptores DAérgicos com os animais do grupo com lesão unilateral da SNc direita induzida por MPTP.

Sentido de rotação	Anfetamina	Apomorfina	L-DOPA	Nicotina
Ipsilateral	↑	↑	-	-
Contra-lateral	-	-	-	-

Onde: ↑ = aumento do número de rotações; (-) = sem diferença no número de rotações. Os resultados de cada grupo foram comparados aos animais que receberam salina; $p \leq 0,05$.

4.4.3 Rotações Induzidas por Agonistas Indiretos do Receptor DAérgico após a Administração de 6-OHDA no FPM

Os ratos lesados unilateralmente com 8 μ g de 6-OHDA, quando desafiados com nicotina, apresentaram maior número de rotações anti-horário quando comparados ao grupo controle ($F(1,16)= 25,32$ ANOVA, $p < 0,001$) (Fig. 30). Porém, não houve diferença entre estes grupos no número de rotações no sentido horário ($F(1,16)= 1,354$, ANOVA, $p = 0,26$) (Fig. 31).

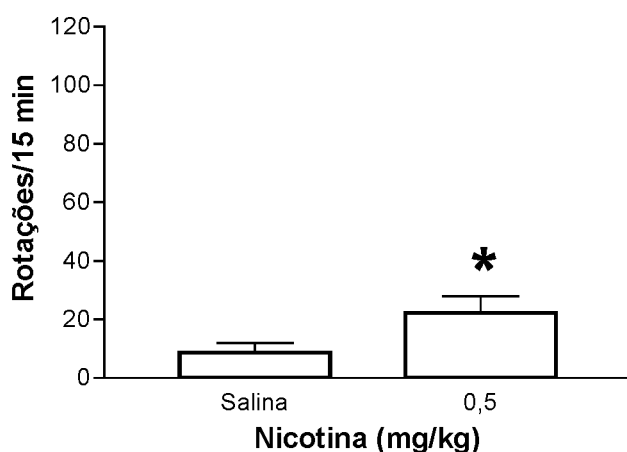


Fig. 30 – Efeito da administração de nicotina em ratos com infusão unilateral de 6-OHDA no FPM, no número de rotações ipsilaterais. Os ratos receberam uma injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média \pm EPM. * $p \leq 0,05$.

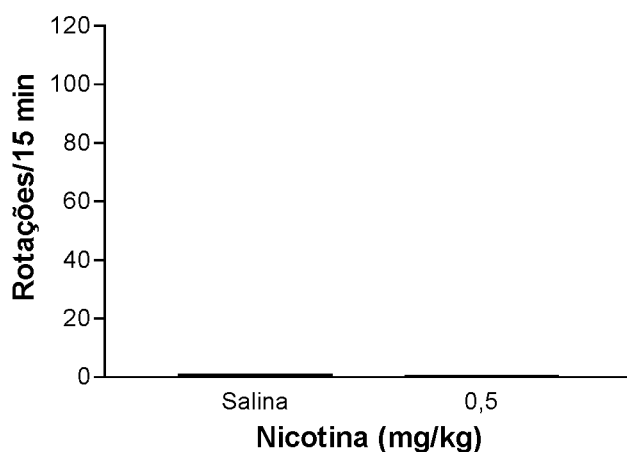


Fig. 31 - Efeito da administração de nicotina em ratos com infusão unilateral de 6-OHDA no FPM, no número de rotações contra-laterais. Os ratos receberam uma injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média \pm EPM.

A administração de anfetamina em ratos lesados com 6-OHDA no FPM provocou o aumento dose-dependente do número de rotações ipsilaterais à lesão de forma dose-dependente ($F(2,26) = 19,31$, ANOVA, $p < 0,05$, pós-teste de Duncan) (Fig. 32), enquanto que as mesmas doses de anfetamina não provocaram alterações no número de rotações horárias em relação ao grupo controle $F(2,26) = 2,01$, $p = 0,15$ (Fig. 33).

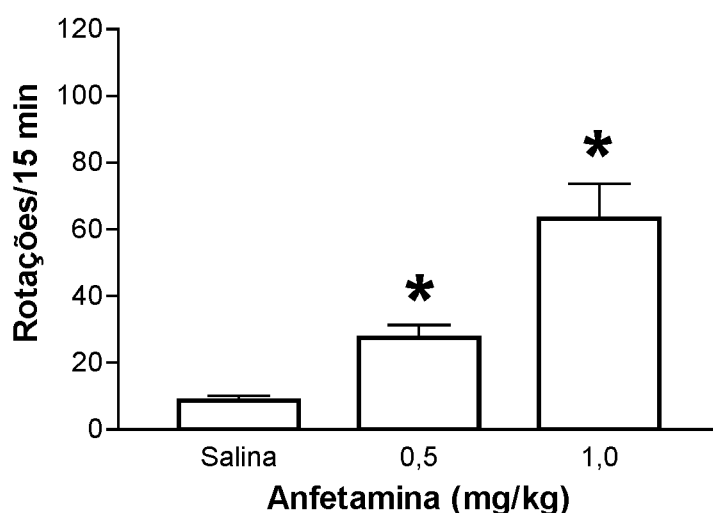


Fig. 32 – Efeito da administração de anfetamina em ratos com infusão unilateral de 6-OHDA no FPM, no número de rotações ipsilaterais. Os ratos receberam uma injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média \pm EPM. * $p \leq 0,05$.

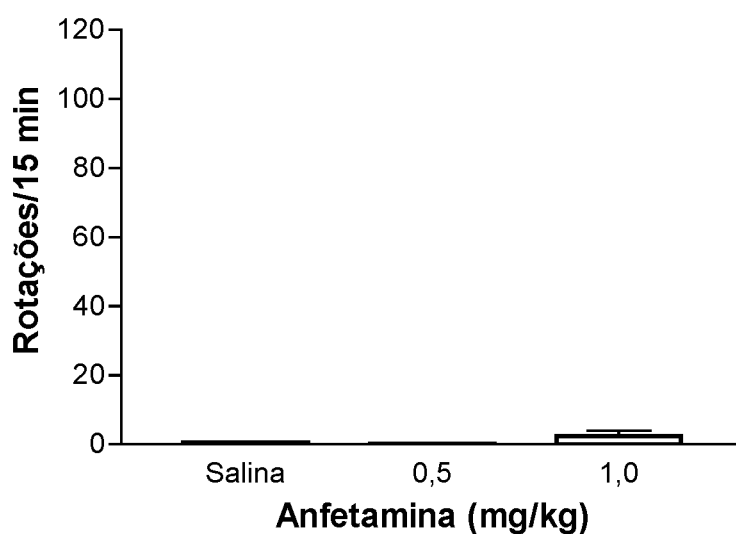


Fig. 33 – Efeito da administração de anfetamina em ratos com infusão unilateral de 6-OHDA no FPM, no número de rotações contra-laterais. Os ratos receberam uma injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média \pm EPM.

A administração de anfetamina (0,5 mg/kg, s.c.) mais nicotina nas doses de 0,5 mg/kg e 1 mg/kg não induziram aumento no número de rotações ipsilaterais à lesão em relação aos animais que receberam somente anfetamina, porém estes grupos diferiram dos animais do grupo que recebeu salina ($F(3,36) = 16,16$, ANOVA, $p \leq 0,01$, pós teste de Duncan) (Fig. 34). Não houve diferenças significantes entre os grupos no número de rotações contra-laterais ($F(3,36) = 0,97$, ANOVA, $p = 0,41$) (Fig. 35).

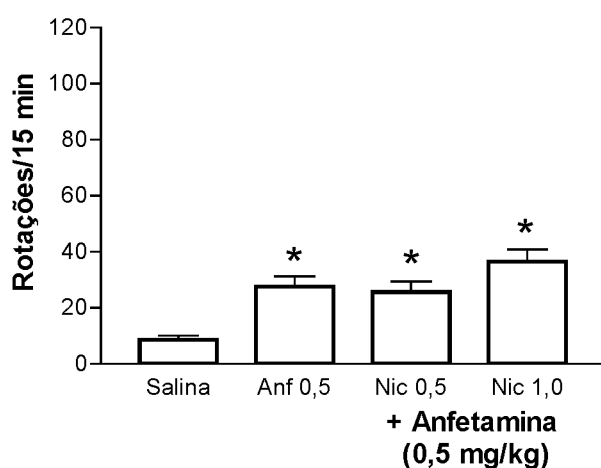


Fig. 34 - Efeito da administração de anfetamina (0,5 mg/kg) mais nicotina (0,5 e 1,0 mg/kg) em ratos com infusão unilateral de 6-OHDA no FPM, no número de rotações ipsilaterais. Os ratos receberam uma injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média \pm EPM.
* $p \leq 0,05$.

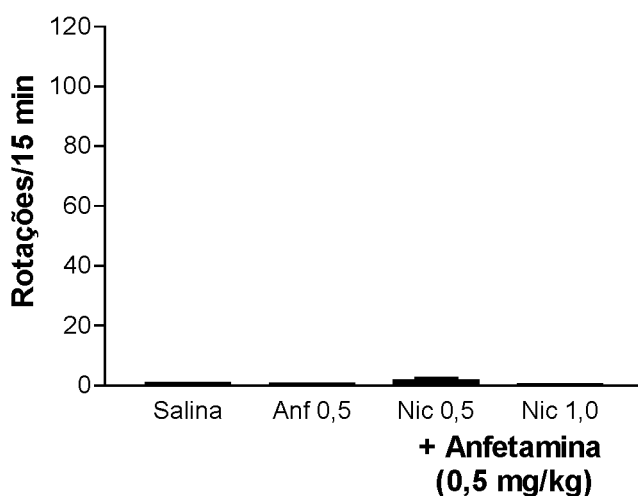


Fig. 35 - Efeito da administração de anfetamina (0,5 mg/kg) mais nicotina (0,5 e 1,0 mg/kg) em ratos com infusão unilateral de 6-OHDA no FPM, no número de rotações contra-laterais. Os ratos receberam uma injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média \pm EPM.

Os animais dos grupos que receberam anfetamina (1 mg/kg) ou anfetamina mais nicotina (0,1; 0,25; 0,5 ou 1,0 mg/kg) apresentaram diferenças significantes no número de rotações ipsilaterais à lesão quando comparados aos animais do grupo que recebeu salina, porém não apresentaram diferenças entre si ($F(5,49) = 15,195$, ANOVA, $p \leq 0,01$, pós-teste de Duncan) (Fig. 36). Quanto ao número de rotações no contra-laterais, não houve diferença entre os grupos ($F(5,49) = 1,38$, ANOVA, $p = 0,25$) (Fig. 37).

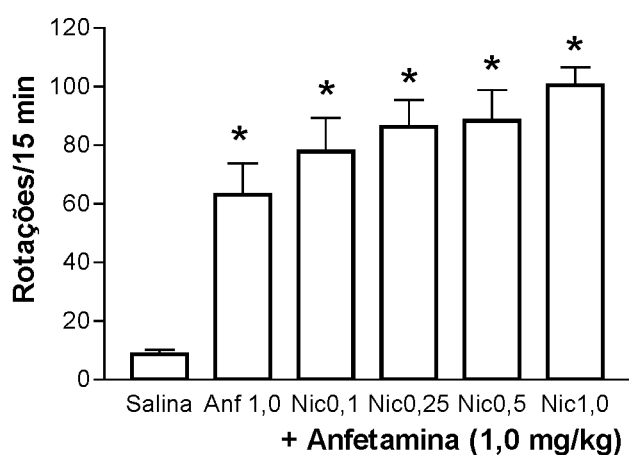


Fig. 36 - Efeito da administração de anfetamina (1,0 mg/kg) mais nicotina (0,1 à 1,0 mg/kg) em ratos com infusão unilateral de 6-OHDA no FPM, no número de rotações ipsilaterais. Os ratos receberam uma injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média \pm EPM. * $p \leq 0,05$.

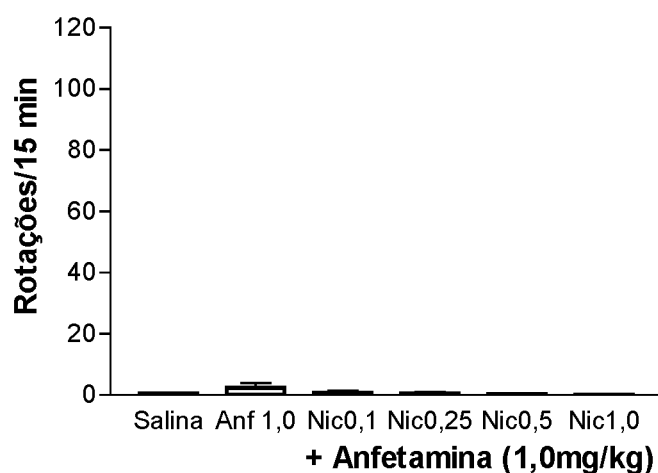


Fig. 37 - Efeito da administração de anfetamina (1,0 mg/kg) mais nicotina (0,1 à 1,0 mg/kg) em ratos com infusão unilateral de 6-OHDA no FPM, no número de rotações ipsilaterais. Os ratos receberam uma injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média \pm EPM.

Os ratos com lesão unilateral por 6-OHDA infundida no FPM apresentaram maior número de rotações ipsilaterais em relação ao grupo controle quando desafiados com cafeína (0,3, sc) ($F(1,18)= 5,17$, ANOVA, $p = 0,03$) (Fig. 38). Já em relação às rotações contra-laterais os grupos não diferiram significativamente ($F(1,18) = 3,00$, ANOVA, $p = 0,59$) (Fig. 39).

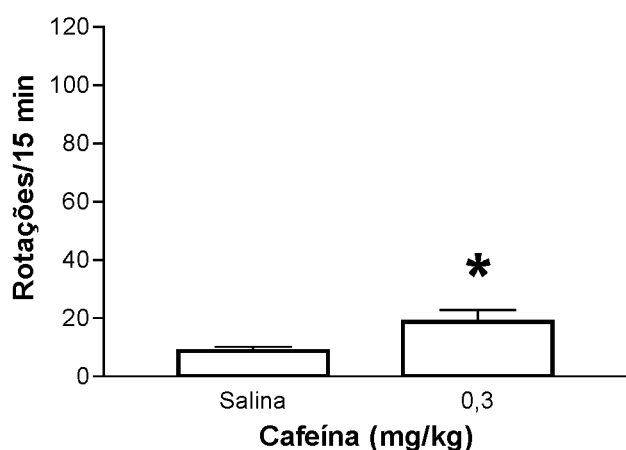


Fig. 38 - Efeito da administração de cafeína (0,3 mg/kg) em ratos com infusão unilateral de 6-OHDA no FPM, no número de rotações ipsilaterais. Os ratos receberam uma injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média \pm EPM. * $p \leq 0,05$.

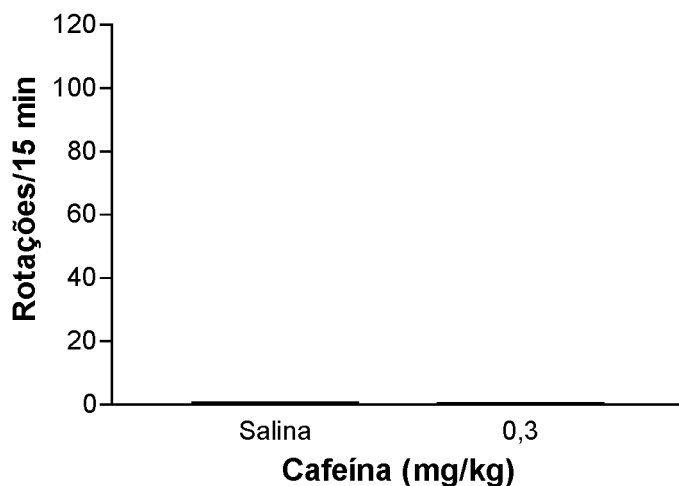


Fig. 39 - Efeito da administração de cafeína (0,3 mg/kg) em ratos com infusão unilateral de 6-OHDA no FPM, no número de rotações contra-laterais. Os ratos receberam uma injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média \pm EPM.

A administração de anfetamina 1 mg/kg mais cafeína 1 mg/kg não alterou o número de rotações no sentido ipsilateral à lesão em relação aos animais do grupo que recebeu anfetamina, mas, assim como o grupo que recebeu anfetamina apresentaram diferenças significantes em relação aos animais grupo que recebeu apenas salina ($F(2,26) = 25,87$, ANOVA, $p \leq 0,01$, pós-teste de Duncan) (Fig. 40). Já no número de rotações contra-laterais, os grupos não apresentaram diferenças entre si ($F(2,26) = 0,66$, ANOVA, $p = 0,52$) (Fig. 41).

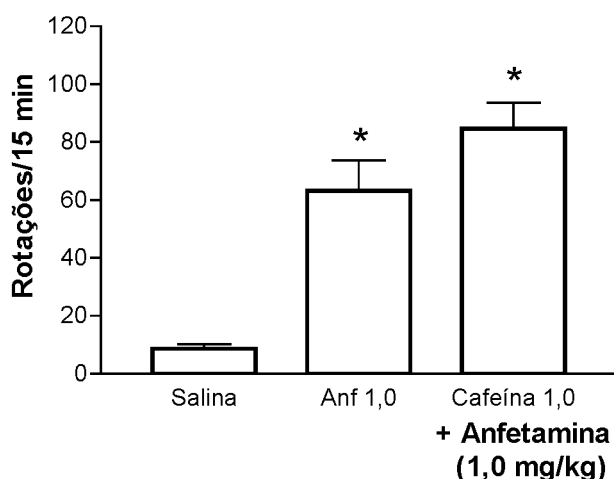


Fig. 40 - Efeito da administração de anfetamina (1,0 mg/kg) mais cafeína (1,0 mg/kg) em ratos com infusão unilateral de 6-OHDA no FPM, no número de rotações ipsilaterais. Os ratos receberam uma injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média \pm EPM. * $p \leq 0,05$.

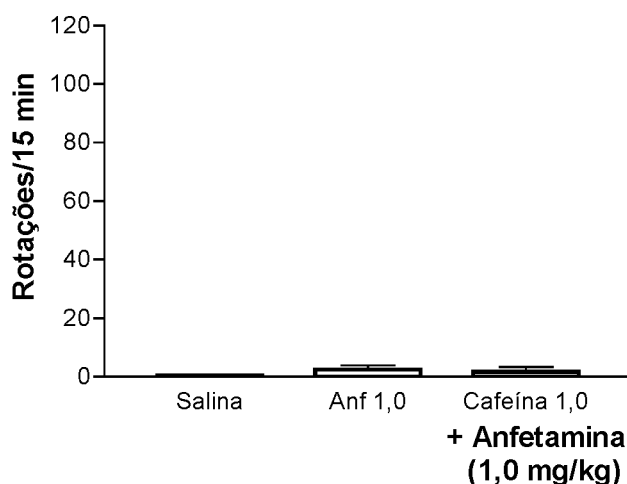


Fig. 41 - Efeito da administração de anfetamina (1,0 mg/kg) mais cafeína (1,0 mg/kg) em ratos com infusão unilateral de 6-OHDA no FPM, no número de rotações ipsilaterais. Os ratos receberam uma injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média \pm EPM.

Os ratos que receberam anfetamina (1 mg/kg, sc) mais nicotina (1 mg/kg, sc) mais cafeína (0,3 mg/kg ou 1 mg/kg) não apresentaram diferenças no número de rotações nos sentidos ipsilateral à lesão quando comparados aos ratos que receberam anfetamina. Os animais que receberam (F(2,26) = 1,407, ANOVA, p = 0,26) e contra-lateral (F(2,26) = 0,84, ANOVA, p = 0,91) à lesão em relação aos animais que receberam somente anfetamina (Fig. 42 e 43).

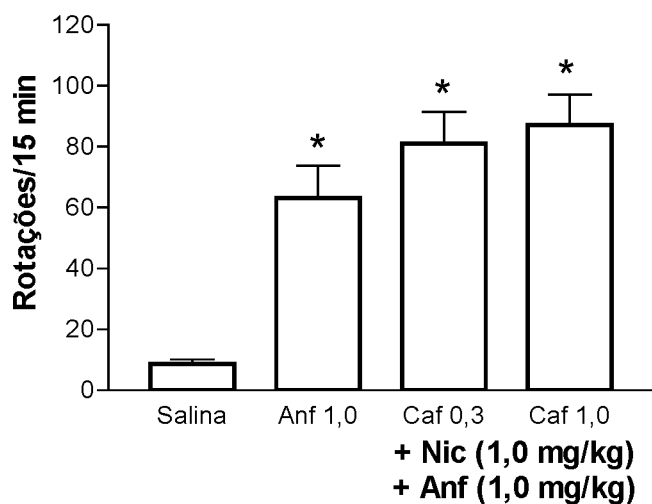


Fig. 42 - Efeito da administração de anfetamina (1,0 mg/kg) mais nicotina (1,0 mg/kg) mais cafeína (0,3 ou 1,0 mg/kg) em ratos com infusão unilateral de 6-OHDA no FPM, no número de rotações ipsilaterais. Os ratos receberam uma injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média ± EPM. * p ≤ 0,05.

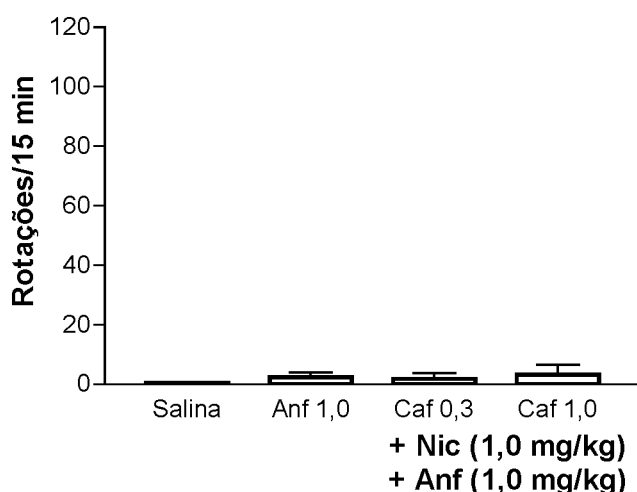


Fig. 43 - Efeito da administração de anfetamina (1,0 mg/kg) mais nicotina (1,0 mg/kg) mais cafeína (0,3 ou 1,0 mg/kg) em ratos com infusão unilateral de 6-OHDA no FPM, no número de rotações ipsilaterais. Os ratos receberam uma injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média ± EPM.

Tabela 8: Resumo dos resultados obtidos no teste de rotação induzida por agonistas dos receptores DAérgicos com os animais do grupo com lesão unilateral esquerda por 6-OHDA .

Sentido de rotação	#A 0,5	#A 1	#N 0,5	#C 0,3	*A 0,5	*A 0,5	*A 1	*A 1	*A1	*A 1	*A 1
					+ N 0,5	+ N 1	+ N 0,5	+ N 1	+ C 1	+ C 0,3	+ N 1
Ipsilateral	↑	↑	↑	↑	-	-	-	-	-	-	-
Contra-lateral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Onde: ↑ = aumento do número de rotações; (-) = sem diferença no número de rotações. A0,5 e A1 = anfetamina nas doses de 0,5 e 1 mg/kg; N0,5 e N1 = nicotina nas doses de 0,5 e 1 mg/kg; C0,3 e C1 = cafeína nas doses de 0,3 e 1 mg/kg; (#) = resultados comparados aos animais controle; (*) = resultados comparados aos animais que receberam anfetamina;

4.4.4 Rotações Induzidas por Agonistas Diretos do Receptor DAérgico após a Administração de 1 ou 20 µg de 6-OHDA no FPM

Ao serem desafiados com 1 mg/kg de apomorfina, os ratos lesados com 1 µg e 20 µg de 6-OHDA no FPM, não apresentaram diferenças no número de rotações no sentido ipsilateral à lesão em relação ao grupo sham ($F(2,24) = 2,36$, ANOVA, $p = 0,11$) (Fig. 44) Porém, no sentido contra-lateral, os ratos que receberam 20 µg de 6-OHDA no FPM apresentaram maior número de rotações quando comparados com os grupos sham e o grupo que recebeu 1 µg de 6-OHDA ($F(2,24) = 11,19$, ANOVA, $p \leq 0,001$, pós-teste de Duncan), enquanto que o grupo sham não diferiu do grupo que recebeu 1 µg de 6-OHDA ($p = 0,87$, pós-teste de Duncan) (Fig. 45).

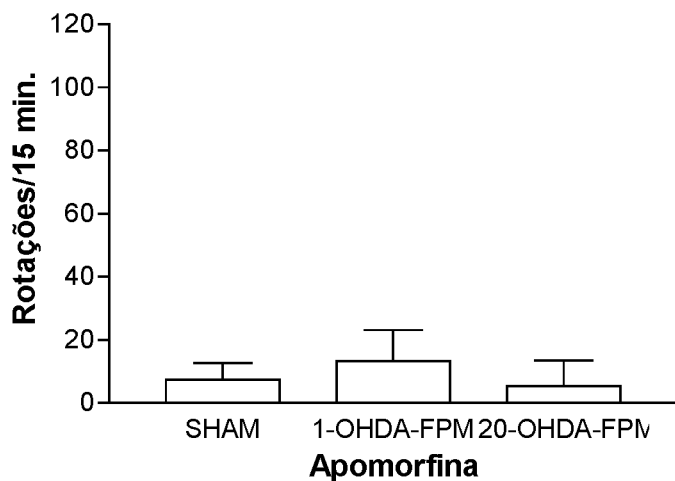


Fig. 44 - Efeito da administração de apomorfina (1,0 mg/kg) em ratos lesados unilateralmente com 6-OHDA no FPM direito, no número de rotações ipsilaterais. Os ratos receberam a injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média \pm EPM.

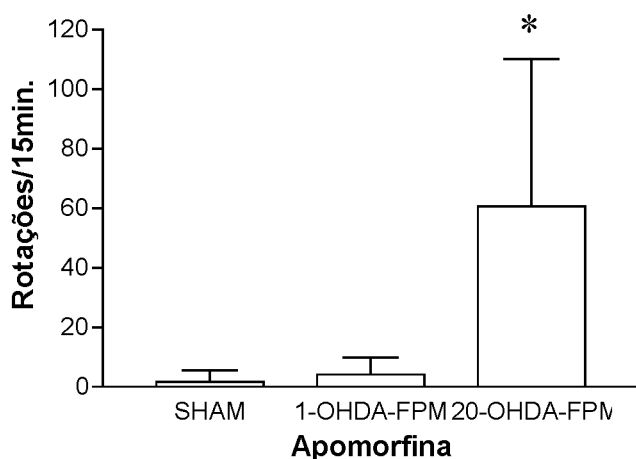


Fig. 45 - Efeito da administração de apomorfina (1,0 mg/kg) em ratos lesados unilateralmente com 6-OHDA no FPM direito, no número de rotações no contra-laterais. Os ratos receberam a injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média \pm EPM. * $p \leq 0,05$.

Tabela 9: Resumo dos resultados obtidos no teste de rotação induzida por apomorfina com os animais do grupo com lesão unilateral esquerda por 6-OHDA no FPM.

Sentido de rotação	6-OHDA 1 μ g	6-OHDA 20 μ g
Horário	-	-
Anti-horário	-	↑

Onde: ↑ = aumento do número de rotações; (-) = sem diferença no número de rotações. Os resultados de cada grupo foram comparados ao grupo sham.

4.4.5 Rotações Induzidas por Agonistas Diretos do Receptor DAérgico após a Administração de 1 µg ou 20 µg de 6-OHDA na Região Central da SNc

Os ratos com lesão da SNc por 6-OHDA ao serem desafiados com apomorfina 1 mg/kg não apresentaram diferenças no número de rotações ipsilaterais à lesão ($F(2,23) = 1,70$, ANOVA, $p = 0,20$) (Fig. 46). Quanto às rotações contra-laterais os animais também não apresentaram diferenças significantes entre os grupos ($F(2,23) = 1,59$, ANOVA, $p = 0,22$) (Fig. 47).

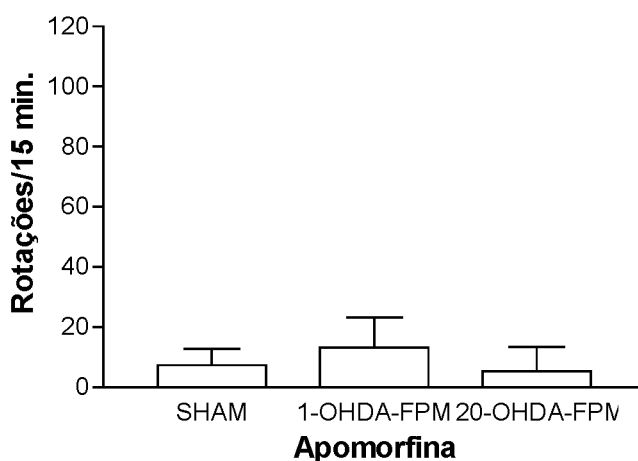


Fig. 46 - Efeito da administração de apomorfina (1,0 mg/kg) em ratos lesados unilateralmente com 6-OHDA na região central da SNc direita, no número de rotações ipsilaterais. Os ratos receberam a injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média \pm EPM.

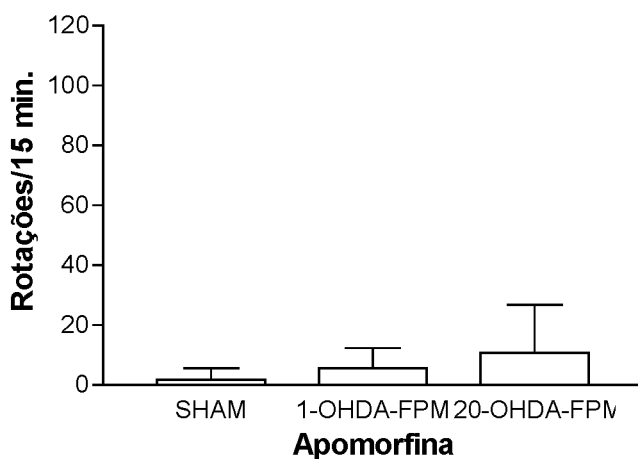


Fig. 47 - Efeito da administração de apomorfina (1,0 mg/kg) em ratos lesados unilateralmente com 6-OHDA na região central da SNc direita, no número de rotações contra-laterais. Os ratos receberam a injeção s.c. 15 min. antes do teste. Os valores estão representados pela média \pm EPM.

4.5 ALTERAÇÕES NOS NÍVEIS DE DA NO ESTRIADO DE RATOS COM LESÃO DA SNc

A figura 48 demonstra que o tratamento com MPTP na SNc provocou um decréscimo de até 80% na concentração de DA estriatal no grupo com lesão bilateral quando comparado ao grupo sham. Os animais com lesão unilateral direita ou esquerda também apresentaram um decréscimo quando comparados ao grupo sham ou quando se compara o lado lesado com o lado não lesado ($F(7,99) = 5.95$, $p < 0,001$, ANOVA de uma via, $p < 0,05$, teste de Duncan).

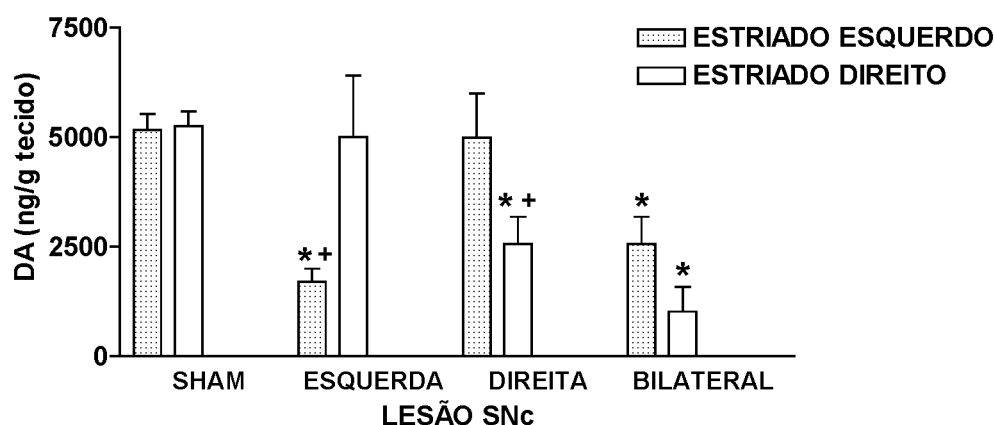


Fig. 48 - Efeito da administração de 1 μ mol MPTP na SNc do rato na concentração de DA estriatal. As barras representam a média \pm EPM. * $p = 0,05$ comparado com o grupo sham, + $p = 0,05$ comparado com o lado oposto, pós-teste de Duncan.

4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS LESÕES

A administração de MPTP intranigral provocou diminuição de neurônios imunorreativos à TH nesta área, sendo que esta administração provocou uma lesão mais centrada próxima ao sítio de injeção, sem atingir as áreas vizinhas (Fig. 49A).

Enquanto que a administração de 6-OHDA no FPM esquerdo provocou lesão completa de neurônios imunorreativos à TH em todo mesencéfalo esquerdo do rato lesionado, atingindo a VTA e a SNr (Fig. 49B).

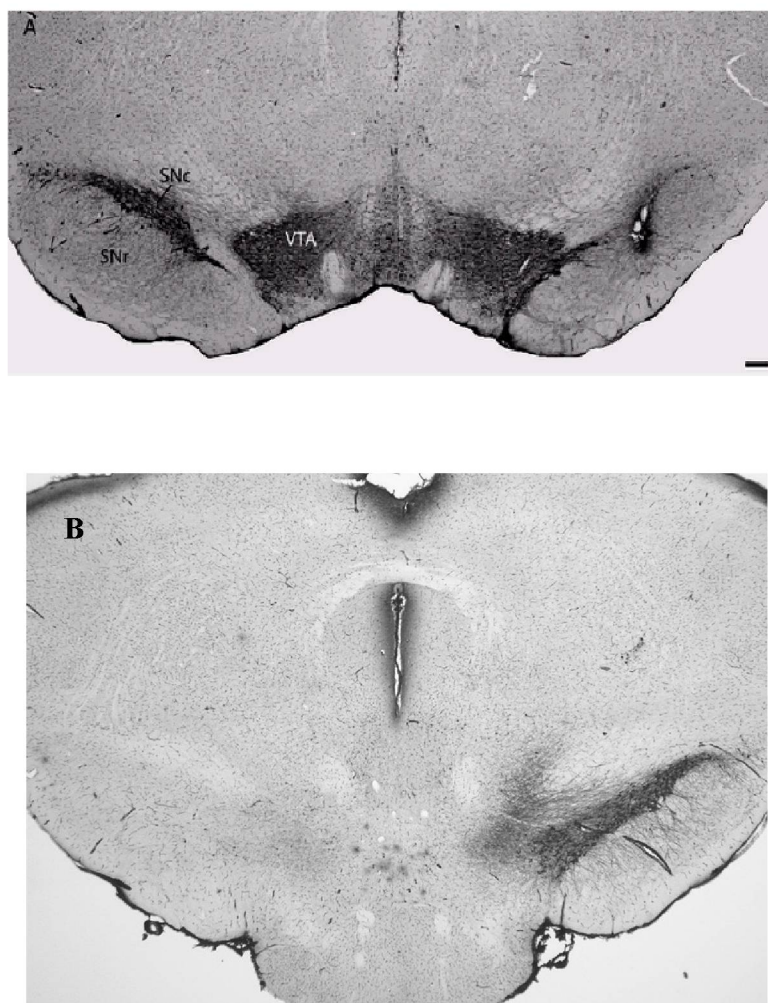


Fig. 49. Micrografia de campo claro representativa de uma fatia do mesencéfalo rato imunorreativo para tirosina hidroxilase. **A** - O animal recebeu uma microinfusão de 1 μmol de MPTP na SNc direita. **B** - O animal recebeu uma microinfusão de 8 mg de 6-OHDA no FPM esquerdo.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho foram comparados dois modelos animais da DP: o modelo de lesão da via nigroestriatal com MPTP, já validado em nosso laboratório para estudos de déficits cognitivos (Da CUNHA e col., 2001), e o modelo de lesão da via nigroestriatal com 6-OHDA, mais utilizado como modelo de alterações motoras e para o estudo da ação de drogas antiparkinsonianas. Além disso, neste trabalho foram administrados MPTP e 6-OHDA na SNc e no FPM para se avaliar o efeito de cada uma destas drogas nestes diferentes sítios. Embora a administração tenha sido feita em locais diferentes estas vias estão interligadas, visto que o FPM envia projeções para a SNc e, portanto, a administração 6-OHDA no FPM também promove lesão da SNc e da VTA (Fig. 49B).

Vários estudos têm demonstrado que animais com lesão da via nigroestriatal por MPTP provocam déficits na memória operacional de ratos (Da CUNHA e col., 2001, GEVAERD e col., 2002a; 2002b; MIYOSHI e col., 2002), de camundongos (TANILA e col., 1998) e de macacos (SCHNEIDER & KOVELOWSKI, 1990).

Em relação às alterações produzidas na memória, nossos resultados vão de encontro com os dados da literatura, visto que os ratos com lesão na SNc esquerda ou bilateral apresentaram prejuízos na memória operacional. Este resultado sugere que a SNc tem um papel importante na memória operacional, como já demonstrado em estudos anteriores.

Como a SNc envia muitas aferências DAérgicas para o estriado dorsal, era de se esperar que lesões nesta estrutura provocassem déficits cognitivos em testes de memória operacional. Porém, no estudo realizado por PACKARD e WHITE (1990) com ratos em um labirinto radial de 8 braços foi demonstrado que os animais não apresentavam dificuldade em lembrar dos braços já visitados, o que sugere que não apresentaram um déficit de memória operacional. Em outro estudo utilizando ratos com lesão no estriado dorsomedial e dorsolateral, para o teste do labirinto radial de

oito braços, MAIR e col. (2002) também não observaram déficits na memória operacional. Estes dados aparentemente contraditórios podem ser devido a diferenças na natureza dos testes do labirinto radial e do labirinto aquático, que exigem diferentes participações do estriado dorsal e da SNc.

No labirinto radial de oito braços os ratos são liberados de uma arena central e, associam diferentes dicas visuais para cada braço, assim se utilizando uma memória mais dependente de dicas visuais (WHITE & McDONALD, 2002). Já no teste de memória operacional no labirinto aquático, os ratos começavam a nadar de lugares diferentes do tanque a cada tentativa. Porém, nas sessões conduzidas no mesmo dia, a plataforma estava no mesmo lugar, sendo que o animal precisa associar diferentes dicas para encontrar a plataforma. Outra diferença é que os braços do labirinto radial permaneceram no mesmo lugar ao longo dos dias de treino, e no teste de memória operacional no labirinto aquático, a posição da plataforma variava a cada dia de treino, permanecendo na mesma posição apenas durante as 4 tentativas de cada dia. Ou seja, a cada dia de treino no labirinto aquático os animais precisavam remapear o labirinto para achar a nova posição da plataforma, usando informações espaciais. Enquanto que no labirinto radial os animais podiam utilizar a memória dos dias anteriores para prever em qual braço estava a comida, reduzindo a dependência da utilização da memória operacional, utilizando informações não necessariamente espaciais.

Outras interpretações podem ser dadas para explicar a maior dificuldade dos ratos com lesão da SNc por MPTP em encontrar a plataforma, tais como: problemas motores e/ou comportamento rotatório; tigmotaxia; dificuldade em aprender que existe uma plataforma no labirinto aquático que muda de lugar a cada dia, ou seja, dificuldade em aprender a regra “win-shift”; dificuldade para aprender que durante as quatro tentativas de cada dia a plataforma permanece no mesmo lugar, ou seja, dificuldade para aprender a regra “win-stay”; déficit atencional; negligência sensorial; dificuldade de organizar uma representação mental do espaço.

Pacientes na fase inicial da DP apresentam déficits de memória operacional, mesmo antes de apresentar problemas motores (DUBOIS & PILLON, 1997). À lesão com MPTP da SNc de ratos mimetiza os sintomas desta fase inicial da DP, visto que os animais lesados apresentam déficits na memória operacional sem alterações motoras (Da CUNHA e col., 2001; MIYOSHI e col., 2002; Da CUNHA e col., 2003). Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que os ratos lesados com MPTP nadaram na mesma velocidade que os animais controle e não apresentaram anormalidades no modo de natação ou de locomoção. Ainda, se a hipocinesia tivesse afetado os ratos lesados, estes não teriam apresentado no teste do campo aberto uma ambulação maior, assim como os ratos com lesão bilateral ou igual ao do grupo sham, como os ratos com lesão unilateral.

No modelo animal de lesão unilateral da SNc induzida por 6-OHDA, os animais geralmente apresentam comportamento rotatórios quando desafiados com agonistas DAérgicos (SCHWARTING & HOUSTON, 1996). Pode ocorrer também, comportamento rotatório espontâneo quando a depleção estriatal for superior a 92% (SCHWARTING, BONATZ, CAREY & HOUSTON, 1991). Os resultados deste trabalho mostraram que a depleção de DA provocada pelo MPTP não ultrapassou os 80%, e o comportamento rotatório espontâneo não foi observado em ratos com lesão unilateral. Rotações só foram observadas quando estes animais foram desafiados com drogas DAérgicas. Portanto podemos descartar a possibilidade de que um comportamento rotatório estivesse mascarando o desempenho no teste de memória operacional nestes ratos.

As diferenças no padrão comportamental observado no primeiro dia de treino podem ser atribuídas ao comportamento tigmotáxico dos animais. Comportamento semelhante foi relatado por DEVAN e colaboradores (1999), no qual ratos com lesão no estriado dorsomedial apresentavam o comportamento tigmotáxico no primeiro dia de treino, porém este comportamento se extinguiu após 10 dias de treino. Neste trabalho observamos que o comportamento tigmotáxico não esteve

presente nos últimos dias de treino para a maioria dos animais com lesão unilateral. Porém, um maior número de animais do grupo com lesão bilateral apresentaram este comportamento durante os cinco dias de treino. Este comportamento poderia ter contribuído para a pior performance de memória operacional do grupo bilateral, porém, uma análise mais apurada, onde foram excluídos os dados dos animais tigmotáxicos (dados não mostrados) não demonstrou diferença qualitativa da análise estatística apresentada na qual todos os ratos foram computados.

Os diferentes déficits de memória apresentados pelos ratos com lesão da SNc direita ou esquerda por MPTP podem indicar particularidades destas estruturas cerebrais envolvidas no processo de memória. Os ratos com lesão da SNc direita demoraram mais tempo para encontrar a plataforma na primeira tentativa, enquanto que os ratos com lesão da SNc esquerda demoraram mais na segunda tentativa. Nas demais tentativas os animais com hemilesão compensaram seus déficits devido à integridade do lado não lesado. Esta interpretação explica porque os ratos com lesão bilateral demoraram mais tempo para encontrar a plataforma em todas as tentativas.

Quando se utilizou a distância percorrida para achar a plataforma como critério para medir a eficiência dos animais, os grupos com lesão bilateral e unilateral esquerda da SNc mostraram um déficit para encontrar a plataforma na segunda tentativa dos treinos. Na terceira tentativa, apenas o grupo com lesão bilateral apresentou déficit quando avaliado pela distância percorrida.

A dificuldade dos animais em encontrar a plataforma na primeira tentativa pode ter sido devida a um aprendizado deficiente da regra “win-shift”, ou seja, pelo fato da plataforma ter mudado de posição a cada dia de treino ou, pode refletir uma deficiência em ter aprendido que havia uma plataforma no tanque e que ela estava no centro de um dos quadrantes.

Os ratos com lesão unilateral direita da SNc, mas não aqueles com lesão esquerda, apresentaram dificuldades em achar a plataforma na primeira tentativa do segundo ao quinto dia de treino. Estes dados sugerem que a SNc direita pode

desempenhar um papel importante no aprendizado de que existe uma plataforma em um dos quadrantes ou no aprendizado da regra de “win-shift”. Porém, quando se comparam as distâncias percorridas pelos ratos para encontrar a plataforma, este déficit não é observado.

Os ratos com lesão da SNc esquerda, mas não os ratos com lesão da SNc direita, apresentaram déficits para encontrar a plataforma na primeira tentativa do segundo ao quinto dia de treino. O tempo que os animais levaram para encontrar a plataforma na segunda tentativa é a melhor medida de memória operacional. Este resultado sugere de forma consistente que a SNc esquerda é importante para a memória operacional espacial. Esta interpretação é coerente com relatos de deficiências de memória operacional espacial observada em paciente com DP (CARBON & MARIE, 2003; COSTA e col., 2003; CRUCIAN & OKUN, 2003; DUBOIS & PILLON, 1997; HODGSON e col., 1999; OWEN e col., 1997).

Outra explicação para o déficit observado após à lesão na SNc esquerda é que à lesão prejudica os animais no aprendizado da regra de win-stay, sendo necessário que o animal se lembre deste lugar para achá-la. Entretanto esta regra parece ser facilmente aprendida pelos ratos dos grupos sham e com lesão da SNc direita, já que nenhuma melhora foi observada após o segundo dia de treino. Isto sugere que este tipo de memória é mediado pelo sistema hipocampal e não pelo sistema nigroestriatal, que supostamente está relacionado com um aprendizado mais lento e gradual (WHITE & McDONALD, 2002). Além disso, esta explicação alternativa não é coerente com o fato de que o rato gasta menos tempo para achar a plataforma na terceira e quarta tentativas. Como eles poderiam não ter aprendido a regra do “win-stay”? Uma possível explicação seria que após os animais terem aprendido a regra “win-stay”, seria possível que o déficit apresentado pelo grupo com lesão unilateral da SNc direita por MPTP tenha sido achar a plataforma na primeira tentativa do dia seguinte, quando a plataforma mudou de lugar. Contudo, os resultados demonstraram que este fato ocorreu com 7 dos 15 animais deste grupo e

este fato pode não ter sido observado no grupo com lesão bilateral da SNc devido à alta incidência de tigmotaxismo. Esse fenômeno pode ter refletido a tendência de ratos com lesão na SNc em localizar objetos mais facilmente por coordenadas espaciais do que por dicas visuais (Da CUNHA e col., 2003).

Outro fato importante é extraído da observação de que ratos com lesão do estriado dorsolateral mostrou que estes apresentavam maior preferência pelo comportamento orientado por coordenadas espaciais do que por uma resposta do tipo “virar à direita” ou “virar à esquerda”. Este fato é importante para dar suporte à teoria de que o sistema de memória estriatal está relacionado com associações estímulo-resposta (S-R) enquanto que o sistema de memória hipocampal está relacionado à associação de múltiplos estímulos, como um mapa espacial (WHITE & McDONALD, 2002).

Estudos anteriores mostraram que ratos com lesão bilateral da SNc podem aprender, da mesma maneira que os animais do grupo controle, como achar uma plataforma escondida no labirinto aquático caso ela seja mantida no mesmo lugar durante todos dias de treino (MIYOSHI e col., 2002; Da CUNHA e col., 2003). Este é um bom argumento para descartar a possibilidade de que lesões na SNc podem diminuir a habilidade do rato em utilizar dicas externas ao labirinto aquático para formar um mapa espacial e achar a plataforma. Entretanto, o déficit diferencial observado em ratos com lesão unilateral da SNc também pode ser explicado por déficits que afetaram a representação do campo visual do rato contra-lateral à lesão. Uma aparente negligência do campo visual contra-lateral e de outras modalidades de estímulos sensoriais tem sido observada em animais com lesão unilateral da via DAérgica nigroestriatal (DUNNETT & IVERSEN, 1982; FAIRLEY & MARSHALL, 1986; LJUNGBERG & UNGERSTEDT, 1976; MARSHALL, BERRIOS & SAWYER, 1980; SCHNEIDER, MCLAUGHLIN & ROELTGEN, 1992). No presente estudo, se houvesse ocorrido uma negligência sensorial que afetasse a representação mental do campo visual contra-lateral à lesão do rato,

seriam esperados desempenhos piores para encontrar a plataforma quando esta estivesse posicionada contra-lateralmente à lesão da SNc. Como não foram encontradas diferenças significantes para o rato encontrar a plataforma quando esta estava posicionada contra ou ipsilateralmente à lesão, estes resultados não podem explicar a teoria da negligência da representação sensorial contra-lateral.

Portanto, este estudo sugere que a SNc esquerda tem um importante papel na memória espacial operacional em ratos. Enquanto que a SNc direita pode ser importante para o aprendizado da regra “win-shift” e outras regras implícitas na versão da memória operacional no teste do labirinto aquático. Além disso, nosso estudo apresenta evidências para rejeitar a possibilidade que um déficit motor ou a teoria da negligência da representação sensorial contra-lateral que pudessem estar afetando a performance de ratos com lesão da SNc no teste do labirinto aquático.

Animais lesados com 6-OHDA apresentam comportamento motor assimétrico quando submetidos à aplicação de agonistas de receptores da DA ou a um forte estresse (GERLACH & RIEDERER, 1996), e mais raramente, comportamento rotatório espontâneo (GERLACH & RIEDERER, 1996; SCHWARTING & HUSTON, 1996). Este comportamento rotatório espontâneo ocorre em ratos que apresentam lesões unilaterais que promovam diminuição de grande número neurônios DAérgicos, e pode ou não se extinguir, após determinado período (GERLARCH & RIEDERER, 1996).

Neste trabalho, foi observado comportamento rotatório espontâneo em ratos com lesão por 6-OHDA (20 μ) no FPM durante os primeiros dias após a cirurgia. Este comportamento rotatório, ipsilateral à lesão, que dura pouco tempo, pode ocorrer também quando são feitas lesões na parte anterior da SNc ou na VTA (GERLARCH & RIEDERER, 1996). Enquanto que um comportamento rotatório ipsilateral persistente ocorre quando a 6-OHDA é administrada no hipotálamo medial (no FPM), provavelmente provocado uma perda de todos os neurônios DAérgicos mesencefálicos e uma, depleção total nos níveis de DA neostriatal (SCHWARTING & HUSTON, 1996).

A lesão induzida por 6-OHDA no FPM em nosso trabalho, produziu lesão total na SNc e na VTA, o que explicaria este comportamento rotatório espontâneo. Porém, de acordo com outros trabalhos da literatura, o comportamento rotatório espontâneo cessou no período de cinco dias após a cirurgia. Nos demais grupos lesados que receberam infusão unilateral de outras doses de 6-OHDA ou MPTP no FPM ou na SNc, este comportamento rotatório espontâneo não ocorreu.

Os animais com lesões unilaterais menores, que não apresentavam este comportamento, a administração de drogas que atuam diretamente nos receptores DAérgicos e induzem rotações contra-laterais à lesão (UNGERSTED & ARBUTHNOTT, 1970; UNGERSTED, 1971; DÍAZ-VÉLIZ e col., 2002; METZ & WHISHAW, 2002; NICHOLS e col., 2002), ou na indução da liberação de DA podem induzir rotações ipsilaterais à lesão (GERLACH & RIEDERER, 1996; METZ & WHISAW, 2002).

Sabe-se que lesões feitas pela administração de 6-OHDA no estriado (ANDÉN e col., 1966; UNGERSTED & ARBUTHNOTT, 1970; PRZEDBORSKI, 1995), na SNc (DURING e col., 1992; van OOSTEN & COOLS, 2002), na parte rostral da VTA e no hipotálamo lateral (UNGERSTED, 1971) ou ainda no FPM (HENRY e col., 1998; RUSKIN e col., 1999; DELFINO e col., 2004) de ratos também causam comportamento rotatório quando eles são desafiados com agonistas dos receptores DAérgicos. Uma explicação para este fato é que fibras eferentes do estriado inibem a atividade motora ipsilateral e esta influência inibitória é diminuída pela ativação dos receptores DAérgicos do estriado, ou seja, a estimulação destes receptores aumenta a atividade motora (GERLACH & RIEDERER, 1996). Assim, a administração de agonistas diretos produzirá resposta aumentada, visto que os receptores DAérgicos estarão supersensibilizados no lado lesado e poderão induzir rotações contra-laterais à lesão, enquanto que, agonistas indiretos produzirão seu efeito principalmente do lado não lesado, onde há mais terminações nervosas para liberar DA, induzindo assim rotações ipsilaterais (GERLACH & RIEDERER, 1996).

Neste trabalho, observamos comportamento rotatório ipsilateral à lesão em ratos com lesão induzida pela administração de 6-OHDA no FPM. Como já citado na literatura, estes animais, ao serem desafiados com anfetamina, apresentaram rotações ipsilaterais à lesão, e também observamos que este comportamento ocorre de forma dose-dependente. As rotações ipsilaterais podem ser explicadas pela maior liberação de DA no lado não lesado, visto que este apresenta mais terminais DAérgicos que o lado lesado (GERLACH & RIEDERER, 1996; HIRSCHHORN e col., 1983).

As doses maiores de 6-OHDA no FPM produziram ainda, lesões totais no mesencéfalo (Fig. 49b) e maior intensidade de rotações. Além disso, a administração de apomorfina em ratos com lesão unilateral direita por 6-OHDA (20 µg) no FPM induziu rotações contra-laterais, como também observado na literatura (UNGERSTED & ARBUTHNOTT, 1970; UNGERSTED, 1971; DÍAZ-VÉLIZ e col., 2002; METZ & WHISHAW, 2002; NICHOLS e col., 2002). Este comportamento rotatório contra-lateral à lesão pode ser explicado pela hiperexpressão dos receptores DAérgicos na porção lesada do estriado. Ou seja, os receptores do lado lesado estariam mais sensíveis aos agonistas dos receptores DAérgicos que aqueles do lado não lesado, sendo que agonistas diretos estariam liberando o movimento (GERLACH & RIEDERER, 1996). Já a menor dose de 6-OHDA não induziu rotações, provavelmente devido ao tamanho reduzido da lesão, pois é citado que diferentes tamanhos (SCHWARTING & HUSTON, 1996) e locais de lesão (HIRSCHHORN e col., 1983) podem influenciar a intensidade e o sentido da rotação.

Valendo-se do fato de que o modelo de lesão unilateral produzido por administração de 6-OHDA já está bem caracterizado para o estudo de rotações induzidas por agonistas DAérgicos, utilizamos também este modelo para estudar o efeito da nicotina e da cafeína sobre o comportamento rotatório.

A administração de nicotina ou cafeína promoveu aumento do comportamento rotatório ipsilateral. Este efeito também foi observado pela

administração de anfetamina nos ratos lesados com 6-OHDA no FPM que, como se sabe, induz a liberação de DA. Portanto, é provável que a nicotina e a cafeína estejam induzindo a liberação de DA nos terminais sinápticos do lado não lesado. Estes resultados sugerem que a nicotina e a cafeína estejam atuando como agonistas indiretos, em concordância com os resultados da literatura onde alguns autores utilizando microdiálise ou sinaptossomas observaram liberação de DA após a administração de nicotina (KULAK e col., 1997; KAISER e col., 1998).

É importante ressaltar que este estudo sugere que os efeitos da nicotina e da cafeína podem ser relevantes em tratamentos farmacológicos, uma vez que produziram efeitos robustos sobre o comportamento motor de ratos. Assim, agonistas nicotínicos e adenosinérgicos possivelmente apresentem um efeito benéfico no tratamento dos sintomas da DP por promover a liberação de DA nos terminais não lesados. Teoricamente este efeito poderia ser mais benéfico nos estágios iniciais da doença, onde o paciente ainda apresenta um percentual maior de fibras DAérgicas preservadas, mas a falta de efeito em ratos com lesão com MPTP que mimetiza as fases iniciais da doença sugerem que um efeito mais robusto vai ser observado mesmo nas fases avançadas da doença.

Também, a administração concomitante de anfetamina, cafeína e/ou nicotina não alterou o número de rotações, sugerindo que não ocorre um efeito aditivo destas drogas. A não aditividade destes efeitos sugere que ambas as drogas atuam por um mesmo mecanismo de ação e que este é saturável. Talvez, o provável efeito benéfico dos agonistas nicotínicos no tratamento da DP seja mais evidente nas fases iniciais da doença. Infelizmente, para a terapia, este resultado sugere que não se poderá observar um efeito aditivo quando estas drogas forem administradas em conjunto.

Além do modelo da 6-OHDA que pode avaliar o comportamento motor, o modelo do MPTP também poderia ser um bom modelo para se avaliar o sintomas motores das fases iniciais da DP. Neste trabalho, os ratos lesados com MPTP e desafiados com anfetamina apresentaram rotações ipsilaterais, novamente estes resultados vão de encontro com os dados apresentados pela literatura (GERLACH &

RIEDERER, 1996; METZ & WHISAW, 2002). Porém, os animais que foram lesados unilateralmente com MPTP na parte central da SNc, apresentaram rotações ipsilaterais com todas as doses de apomorfina, semelhante ao que ocorreu em outros trabalhos aos ratos lesados unilateralmente com o MPP⁺ (KONDO e col., 2004, COSTALL e col., 1976, e GARDNER e col., 1976). Este resultado sugere que no modelo do MPTP existem algumas diferenças quanto ao mecanismo ou efeitos fisiológicos quando comparado ao modelo da 6-OHDA.

O local da lesão pode explicar porque os ratos com lesão na SNc por MPTP rotacionam no sentido ipsilateral à lesão, visto que este sentido de rotação pode variar conforme a parte lesada, ou seja, lesões na parte mais medial da SNc de ratos produzem rotações contra-laterais à lesão quando desafiados com apomorfina, enquanto que lesões mais laterais da SNc provocam rotações ipsilaterais à lesão (HIRSCHHORN e col., 1983). Estas diferenças de local da lesão não interferem no sentido das rotações induzidas por agonistas indiretos (COSTALL e col., 1976; GARDNER e col., 1976; HIRSCHHORN e col., 1983), somente no sentido de rotação dos agonistas diretos, como é o caso da apomorfina, que em nosso trabalho induziu elevado número de rotações ipsilaterais no modelo do MPTP. Alguns estudos sugerem ainda, que a intensidade e a direção da rotação induzida por anfetamina podem indicar um processo de reorganização estrutural ou a influência do sistema mesolímbico (METZ & WHISAW, 2002). Estas teorias não podem ser descartadas para explicar porque os animais com lesão unilateral com MPTP neste trabalho apresentam rotações ipsilaterais à lesão, porém são necessários mais estudos para se comprovar ou não a influência de lesões do sistema mesolímbico no sentido de rotação induzidas por MPTP.

A indução de comportamento rotatório, em ratos com lesão unilateral por MPTP, com apomorfina, ocorreu de forma dose-dependente. O aumento do número de rotações atingiu um pico com a dose de 1,0 mg/kg, e tendeu a diminuição a partir desta dose. Além disso, observamos que comportamentos como bater os dentes na

borda do recipiente onde o animal era colocado para realização do teste, ocorreram com as maiores doses de apomorfina (1,0 e 2,0 mg/kg) utilizadas neste trabalho. Este comportamento estereotipado talvez pudesse ser explicado pela utilização de doses elevadas de apomorfina, que podem provocar comportamentos deste tipo (HIEMKE e col, 2002). Uma competição entre comportamentos estereotipados como este e o comportamento rotatório poderia explicar por que as maiores doses de apomorfina induzissem diminuição no número de rotações como foi observado neste trabalho.

A literatura cita que a administração i.p. de L-DOPA nas doses de 8 mg/kg (METZ & WHISAW, 2002), 4 mg/kg (ADAMS & KEEFE, 1999) e 100 mg/kg (HENRY e col, 1998) combinada com benserazida provoca rotações contra-laterais à lesão induzida por 6-OHDA administrada no FPM (UNGERSTED, 1971; HENRY e col., 1998; ADAMS & KEEFE, 1999; METZ & WISHAW, 2002). Quando utilizamos animais que haviam sido lesados unilateralmente com MPTP na SNc e desafiados com L-DOPA, não observamos comportamento rotatório contra-lateral.

Além disso, neste trabalho verificamos, que nos animais com lesão bilateral da SNc por MPTP e testados no campo aberto, um aumento na ambulação após 16 dias da cirurgia estereotáxica, quando comparados ao grupo sham. Nossos resultados vão de encontro aos obtidos por PERRY e col. (2004) que também observaram, neste mesmo modelo e teste, aumento da ambulação de ratos, 7 e 14 dias após a cirurgia.

TANILA e col. (1998) sugeriram que o aumento da ambulação possa estar relacionado com a diminuição parcial dos níveis de DA. Como em nosso trabalho também observamos redução dos níveis de DA estriatal, este fato poderia explicar o aumento da ambulação observado em nossos resultados.

Assim como a 6-OHDA, vimos que o MPTP também provoca morte neuronal e diminuição da DA no estriado correspondente à lesão. Neste trabalho observamos que ao infundirmos MPTP na SNc houve perda de neurônios nesta estrutura sem, no

entanto atingir áreas próximas como a VTA. Contudo, quando infundimos 6-OHDA no FPM, verificamos lesão não só na SNc, mas também na VTA. Embora a 6-OHDA não apresente tanta especificidade, pois também pode lesar neurônios NAérgicos, é eficaz em promover lesões maiores, o que facilita o estudo de problemas motores.

Assim como encontramos na literatura (SUNDSTRON & JONSSON, 1985; MARKEY & SCHMUFF, 1986; HEIKKILA E SONSALLA, 1987; GEVAERD e col., 2001), estes dados demonstram que a administração de MPTP na SNc parece ter sido mais específica para células DAérgicas da SNc que a 6-OHDA no FPM, como demonstrado pela análise histológica deste trabalho.

Assim como a 6-OHDA, o MPTP também provoca redução de DA estriatal, porém, esta atinge principalmente o estriado dorsal e córtex pré-frontal, induzindo redução de aproximadamente 50% nos níveis de DA. Já no núcleo accumbens, hipocampo ou amígdala não se observa esta alteração nos níveis de DA (GEVAERD e col., 2001a). Embora o MPTP provoque depleção de DA e seus metabólitos, não são observadas alterações significantes nas concentrações de NA, serotonina e seus metabólitos (Da CUNHA e col., 2002). Assim como já descrito por GEVAERD e col. (2001b), os resultados da dosagem de DA no estriado aqui apresentados confirma que à lesão com MPTP provocou diminuição nos níveis da DA estriatal.

Deste estudo temos, portanto, uma validação do modelo do MPTP para o estudo de alterações cognitivas observadas na fase inicial da doença de Parkinson, com um efeito mais predominante da SNc esquerda. O modelo do MPTP mostrou-se também compatível com esta fase da doença no que diz respeito a uma lesão parcial da SNc, depleção parcial de DA estriatal e alterações motoras menos acentuadas e de natureza diferente das observadas com lesões maiores da SNc com 6-OHDA. Porém, com o desafio de drogas dopaminérgicas observamos que se pode obter resultados robustos quanto ao comportamento rotatório que podem auxiliar na seleção de drogas úteis para o tratamento da fase inicial desta doença. Neste sentido, nossos estudos demonstraram que a cafeína e a nicotina não produziram alterações

motoras significativas neste modelo, mas que provavelmente possam ser utilizadas em fases mais avançadas da doença por produzirem efeitos robustos em animais com lesão da SNc induzida pela 6-OHDA.

CONCLUSÕES

- ✓ A SNc esquerda parece ter papel importante na memória operacional de ratos, enquanto que a direita pode ser importante no aprendizado da regra “win-shift” e outras regras implícitas na versão da memória operacional no teste do labirinto aquático.
- ✓ A lesão bilateral da SNc provocou maior déficit cognitivo que as lesões unilaterais;
- ✓ Ainda, os ratos com lesão bilateral apresentaram maior ambulação no campo aberto, enquanto que não houve diferenças entre os grupos com lesão unilateral da SNc e o grupo sham. Estes fatos indicam que não houve comprometimento da função motora nestes animais.
- ✓ No modelo de lesão unilateral por MPTP agonistas indiretos podem induzir rotações ipsilaterais à lesão, como foi o caso da anfetamina. Enquanto que agonistas diretos como a apomorfina, induziram também rotações ipsilaterais à lesão, provavelmente devido à localização e extensão da lesão.
- ✓ A nicotina e cafeína provocaram rotações ipsilaterais à lesão tais como os agonistas indiretos apenas em animais com lesões induzidas por 6-OHDA, mas não por MPTP. Este resultado sugere que estas drogas devem produzir um melhor resultado clínico em fases mais adiantadas da DP.
- ✓ As diferentes doses de 6-OHDA produzem efeitos diferentes: ratos que receberam a dose de 1 µg no FPM ou na SNC e desafiados com agonistas DAérgicos não apresentaram alterações no número de rotações, enquanto que os animais que receberam as doses de 8 µg e 20 µg no FPM, mas não na SNc, apresentaram rotações ipsilaterais

quando desafiados com agonistas indiretos e contralaterais quando desafiados com agonistas diretos da DA.

- ✓ A análise neuroquímica mostrou redução nos níveis de DA estriatal no lado lesado, enquanto não houve alteração nos níveis no lado não lesado.
- ✓ A análise histológica mostrou redução parcial de neurônios reativos à TH na SNc dos animais lesados com MPTP, e redução total de neurônios reativos à TH na SNc de ratos lesados com 6-OHDA no FPM.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, A.C., KEEFE, K.A. Buprenorphine potentiates L-DOPA-induced contralateral rotation in 6-hydroxydopamine-treated rats. **Neuroscience Letters** 274, 25-28, 1999.
- AGYD, Y., JAVOY, F., GLOWINSKI, J., BOUVET, D., SOTELO, C. Injection of 6-hydroxydopamine into the substantia nigra of the rat. **Brain Research**. 58, 291-301, 1973.
- AIRES, M. M. **Fisiologia**. Rio de Janeiro. 2. Ed. Editora Guanabara Koogan, 1999. 934p.
- ALEXANDER., G.E., DeLONG, M.R., STRICK, P.L. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. **Annual Review of Neuroscience**. 9, 357 – 381, 1986.
- ANDÉN, N. E., DAHLSTRÖM, A., FUXE, K., LARSSON, K. Functional role of the nigro-neostriatal dopamine neurons. **Acta Pharmacologica**. 24, 263-274, 1966.
- BHATIA, K.P., MARSDEN, C.D. The behavioural and motor consequences of focal lesions of the basal ganglia in man. **Brain**. 117, 859 – 876, 1994.
- BENWELL, M. E. M., BALFOUR, D. J. K. & KHADRA, L. F. Studies on the influence of nicotine infusions on mesolimbic dopamine and locomotor responses to nicotine. **Clinical Investigation**. 72, 233–239, 1994.
- BOGERTS, B. A brainstem atlas of catecholaminergic neurons in man, using melanin as a natural marker. **Journal Comparative Neurology**. 197, 63 – 80, 1981.
- BRANDÃO, M. L. **Psicofisiologia - As bases Fisiológicas do Comportamento**. Editora Atheneu, São Paulo. Cap.2, 43-44, 2001.
- CARBON, M., MARIE, R. M. Functional imaging of cognition in Parkinson's disease. **Current Opinion in Neurology**. 16, 475-480, 2003.
- COSTA, A., PEPPE, A., DELL'AGNELLO, G., CARLESIMO, G. A., MURRI, L., BONUCCELLI, U., CALTAGIRONE, C. Dopaminergic modulation of visual-spatial working memory in Parkinson's disease. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**. 15, 55-66, 2003.

COSTALL, B., MARSDEN, C. D., NAYLOR, R. J., PYCOCK, C. J. The relationship between striatal and mesolimbic dopamine dysfunction and the nature of circling responses following 6-hydroxy-dopamine and electrolytic lesions of the ascending dopamine system of rat brain. **Brain Research**. 118, 87-113, 1976.

CRUCIAN, G. P., OKUN, M. S. Visual-spatial ability in Parkinson's disease. **Frontiers in Bioscience**. 8, 992-997, 2003.

Da CUNHA, C., GEVAERD, M.S., VITAL, M.A.B.F., MIYOSHI, E., ANDREATINI, R., SILVEIRA, R., TAKAHASHI, R. N., CANTERAS, N.S. Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. **Behavioural Brain Research**, 124; 9-18, 2001.

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

DELEU, D., NORTHWAY, M. G., HANSSENS, Y. Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of drugs used in the treatment of Parkinson's Disease. **Clinical Pharmacokinetic**. 41, (4), 261 – 309, 2002.

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. **Behavioural Brain Research**. 152, 297 – 306, 2004.

DEVAN, B. D., McDONALD, R. J., WHITE, N. M. Effects of medial and lateral cudate-putamen lesion on place- and cued-guided behaviors in the water maze: Relation to thigmotaxis. **Behavioural Brain Research**. 100, 5-14, 1999.

DÍAZ-VÉLIZ, G., MORA, S., DOSSI, M. T. GÓMEZ, P. ARRIAGAD, C. MONTIEL, J. ABOITIZ, F., SEGURA-AGUILAR, J. Behavioral effects of aminochrome e dopachrome injected in the rat substantia nigra. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 73, 843-850, 2002.

DUBOIS, B., PILLON, B. Cognitive deficits in Parkinson's disease. **Journal of Neurology**. n. 244, p. 2-8, 1997.

DUNNETT, S. B., IVERSEN, S. D. Sensorimotor impairments following localized kainic acid and 6-hydroxydopamine lesions of the neostriatum. **Brain Research**. 215, 147-161, 1982.

DUNNETT, S. B., BJÖRKLUND, A. Functional neural transplantation. **Raven**, New York. 1994.

FAIRLEY, P. C., MARSHALL, J. F. Dopamine in the lateral caudate-putamen of the rat is essential for somatosensory orientation. **Behavioural Neuroscience**. 100, 652-663, 1986.

FALLON, J. H., LOUGHLIN, S. E. Monoamine innervation of the forebrain: forebrain collateralization. **Brain Research Bulletin**. 9, 295 – 307, 1982.

FALLON, J. H., LOUGHLIN, S. E. **The rat nervous system**. Academic Press Australia, Australia. Cap.9, 356 – 358, 1985.

FASS, B., BUTCHER, L. L. Evidence for a crossed nigrostriatal pathway in rats. **Neuroscience Letters**. 22, 109 – 113, 1981.

FEARNLEY, J., LESS, A. J. Parkinson's disease: Neuropathology. **Brain**. 114, 2283 – 2301, 1991.

GARDNER, E. L., MISHRA, R. K., IORDANIDIS, P., KATZMAN, R., MAKMAN, M. H. Catalytic and receptor components of enhanced dopamine-stimulated adenylate cyclase in two behaviorally distinct striatal denervation syndromes. **Fed. Proc.** 35, 456, 1976.

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

GEVAERD, M. S., MIYOSHI, E., SILVEIRA, R., CANTERAS, N. S., TAKAHASHI, R.N., DA CUNHA, C. L-Dopa restores striatal dopamine level but fails to reverse MPTP-induced memory deficits in rats. **International Journal of Neuropsychopharmacology**. 4, p 361-370, 2001a.

GEVAERD, M. S., TAKAHASHI, R. N., DA CUNHA, C. Caffeine reverses the memory disruption induced by intra-nigral MPTP-injection in rats. **Brain Research Bulletin**. 55, 2. 2001b.

GRAHAM, D. G. Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. **Molecular Pharmacology**. 14, 933 – 643, 1978.

HEIKKILA, R. E., SONSALLA, P. K. The use of MPTP-treated mouse as an animal model of parkinsonism. **Canadian Journal of Neurological Sciences**. 14, 436-440, 1987.

HENRY, B., CROSSMAN, A. R., BROTCHE, J. M. Characterization of Enhanced Behavioral Responses to L-DOPA Following Repeated Administration in the 6-Hydroxydopamine-Lesioned Rat Model of Parkinson's Disease. **Experimental Neurology**. 151, 334-342, 1998.

HIENKE, C., GERMEYER, S., BIRKE, A., SCHMITT, U., DAHMEN, N., HAVEMANN-REINECKE, U. New dopamine D2 receptor polymorphisms in rats and association with apomorphine-induced stereotypies. **Brain Research**, n. 926, p. 1-9, 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 Research**. 270, 109-117, 1983.

HODGSON, T. L., DITTRICH, W. H., HENDERSON, L., Kennard, C. Eye movements and spatial working memory in Parkinson's disease. **Neuropsychology**. 37, 927-938, 1999.

IZQUIERDO, I. **Memória**. Porto Alegre. Editora ArtMed, 2002. 95 p.

JEYASINGHAM, R. A., BAIRD, A.L., MELDRUM, A., DUNNETT, S.B. Differential effects of unilateral striatal and nigrostriatal lesions on grip strength, skilled paw reaching and drug-induced rotation in the rat. **Brain Research Bulletin**. Vol. 55, No. 4, pp. 541-548, 2001.

KAISER, A.S.; SOLIAKOV, L.; HARVEY, S.C., LUETJE, C.W., WONNACOTT, S. Differential inhibition by α -conotoxin-MII of nicotinic stimulation of [3H]dopamine release from rat striatal synaptosomes and slices. **Journal of Neurochemistry**. 70, 1069-1076, 1998.

KANDEL, E.R, SCHWARTZ, J.H., JESSEL, T.M. **Princípios da Neurociência**. 4. ed. São Paulo. Editora Manole, 2003. Cap. 62 e 63.

KONDO, J., KITAMURA, Y., INDEN, M., TANIGUCHI, T. Hemiparkinsonian rat models: different sensitivity of dopaminergic neurotoxins. **International Congress Series**. 1260, 281-285, 2004.

KULAK, J.M.; NGUYEN, T.A.; OLIVEIRA, B.M.; MCINTOSH, J.M. α -conotoxin-MII blocks nicotine-stimulated dopamine release in rat striatal synaptomes. **Journal of Neuroscience**. 17, 5263-5270, 1997.

LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios – Conceitos fundamentais de Neurociência**. São Paulo. Editora Atheneu, 2001. 698p.

LJUNGBERG, T., UNGERSTEDT, U. Sensory inattention produced by 6-OHDA-induced degeneration of ascending DA neurons in the brain. **Experimental Neurology**, 53, 585- 609, 1976.

LOUGHLIN, S.E., FALLON, J.H. Mesostriatal projections from ventral tegmentum and dorsal raphe: Cells project ipsilaterally or contralaterally but not bilaterally. **Neuroscience Letters**. 32, 11 – 16, 1982.

MACHADO, A. P. M. **Neuroanatomia Funcional**. São Paulo. Editora Art Med, 1993. 2.Edição. 359p.

MAIR, R. G., KOCH, J. K., NEWMAN, J. B., HOWARD, J. R., BURK, J. A. Double dissociation within striatum between serial reaction time and radial maze delayed nonmatching performance in rats. **Journal of Neuroscience**. 22, 6756-6765, 2002.

MARKEY, S. P., SCHMUFF, N. R. The pharmacology of the parkinsonian syndrome producing neurotoxin MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) and structurally related compounds. **Medicinal Research Reviews**. 6, 389-429, 1986.

MARSHALL, J. F., BERRIOS, N. G., SAWYER, S. Neostriatal dopamine and sensory inattention. **Journal of Comparative Physiology and Psychology**. 94, 833-846, 1980.

MARTIN, J. H. **Neuroanatomia – Texto e Atlas**. Porto Alegre. Editora Artes Médicas, 1998. 2. Edição. 574p.

McGEER, P.L., ITAGAKI, S., AKIYAMA, H., McGEER, E.G. Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. **Annals of Neurology**. 24, 574 – 576, 1989.

METZ, G.A., WHISHAW, I. Q. Drug-induced rotation intensity in unilateral dopamine-depleted rats is not correlated with end point or qualitative measures of forelimb or hindlimb motor performance. **Neuroscience**, vol. III, n. 2, p. 325 - 336, 2002.

MIDDLETON, F.A., STRICK, P.L. Basal ganglia and cerebellar loops: motor and cognitive circuits. **Brain Research Interactive**. 31, 236 – 250, 2000.

MIYOSHI, E.; CAMPLESSEI, M.; SILVEIRA, R.; CANTERAS, N.S.; 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**, 58, 2002.

NICHOLS, N. F., CIMINI, M. G., HAAS, J. V., STATON, B. A., TEDROFF, J., SVENSSON, K. A. PNU-96391A (OSU6162) antagonizes the development of behavioral sensitization induced by dopamine agonists in a rat model for Parkinson's Disease **Neuropharmacology**. 43, 817–824, 2002

OWEN, A. M., IDDON, J. L., HODGES, J. R., SUMMERS, B. A., ROBBINS, T. W. Spatial and non-spatial working memory at different stages of Parkinson's disease. **Neuropsychology**. 35, 519-532, 1997.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**, 2. ed. San Diego. Academic Press. 1986.

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

PRZEDBORSKI, S., LEVIVIER, M., JIANG, H., FERREIRA, M., JACKSON-LEWIS, V., DONALDSON, D., TOGASAKI, D. M. Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. **Neuroscience**. v. 67, n. 3, p. 631-647, 1995.

RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M., MOORE, P. K. **Farmacologia**. Tradução da 5. ed. Rio de Janeiro. Elsevier. 2004

ROBINET, P.M., BARDO M.T. Dopamine D3 receptors are involved in amphetamine-induced contralateral rotation in 6-OHDA lesioned rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 70, 43–54, 2001.

RUSKIN, D. N., BERGSTROM, D. A., MASTROPIETRO, C. W., TWERY, M. J., WALTERS, J. R. Dopamine agonist-mediated rotation in rats with unilateral nigrostriatal lesions is not dependent on net inhibitions of rate in basal ganglia output nuclei. **Neuroscience**. Vol. 91, No. 3, pp. 935–946, 1999.

RUSTED, J. M., NEWHOUSE, P. A., LEVIN E. D. Nicotinic treatment for degenerative neuropsychiatric disorders such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **Behavioral Brain Research**, n. 113, p. 121-129, 2002.

SCHNEIDER, J. S., KOVELOWSKI, C. J. Chronic exposure to low doses of MPTP. I. Cognitive deficits in motor asymptomatic monkeys. **Brain Research**. 519,122–128, 1990.

SCHNEIDER, J. S., McLAUGHLIN, W. W., ROELTGEN, D. P. Motor and nonmotor behavioral deficits in monkeys made hemiparkinsonian by intracarotid MPTP infusion. **Neurology**. 42, 1565–1572, 1992.

SCHWARTING, R. K., BONATZ, A. E., CAREY, R. J., HUSTON, J. P. Relationships between indices of behavioral asymmetries and neurochemical changes following mesencephalic 6-hydroxydopamine injections. **Brain Research**. 554, 46-55, 1991.

SCHWARTING, R. K. W., HUSTON, J. P. Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of meso-striatal dopamine neurons and their physiological sequelae. **Progress in Neurobiology**. Vol. 49, 215-266, 1996.

STANFORD, J. A.; GASH, C. R.; GERHARDT, G. A. Aged F344 rats exhibit an increased proportion of dopamine agonist-excited striatal neurons. **Neurobiology of Aging**. v. 23;p. 263-270, 2002.

SUNDSTRON, E., JONSSON, G. Pharmacological interference with the neurotoxic action of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on central catecholamine neurons in the mouse. **European Journal of Pharmacology**. 110, 293-299, 1985.

TANILA, H., BJORKLUND, M., RIEKKINEN, P. Cognitive changes in mice following moderate MPTP exposure. **Brain Research Bulletin**. 45, 577-582, 1998.

UNGERSTED, U., ARBUTHNOTT, G. Quantitative recording of rotational behaviour in rats after 6- ydroxy-dopamine lesions of the nigro-striatal dopamine system. **Brain Research**. 24, 485-493, 1970.

UNGERSTED, U. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. **ACTA Physiologica Scandinava**. 367, 69-93, 1971.

VAN der COOY, D., COSCINA, D. V., HATTORI, T. Is there a non-dopaminergic nigrostriatal pathway? **Neuroscience**. 6, 345 – 357, 1981.

van OOSTEN R. V., COOLS, A. R. Differential effects of a small, unilateral, 6-hydroxydopamine-induced nigral lesion on behavior in high and low responders to novelty. **Experimental Neurology**. 173, 245–255, 2002.

VIZI, E. S., e col. Neurochemical evidence of heterogeneity of presynaptic and somatodendritic nicotinic acetylcholine receptors. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 757, 84–99, 1995.

XAVIER, G. F. **Técnicas para o Estudo do Sistema Nervoso**. São Paulo: Editora Plêiade, 1999. 241p.

WHITE, N. M., McDONALD, R. J. Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. **Neurobiology of Learning and Memory**. 77, 125-184, 2002.

WONNACOTT, S. Presynaptic nicotinic ACh receptors. **Trends Neuroscience**. 20, 92–98, 1997.

YODIM, M. B. H., RIEDERER, P. Understanding Parkinson's Disease. **Scientific American**, janeiro 2002.