

PATRÍCIA ANDRÉIA DOMBROWSKI GUTMANN

**ESTUDO DO EFEITO DA LESÃO DA SUBSTÂNCIA NEGRA
PARS COMPACTA SOBRE A LIBERAÇÃO
DE DOPAMINA NO ESTRIADO DE RATOS DURANTE O TESTE DE
ROTAÇÃO E DURANTE O TREINO NA
TAREFA DE ESQUIVA ATIVA DE DUAS VIAS**

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

Orientador: Prof. Dr. Cláudio da Cunha

CURITIBA – PR

2010

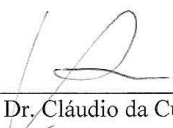


Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia




PARECER

A Comissão Examinadora da Tese de Doutorado “ESTUDO DO EFEITO DA LESÃO DA SUBSTÂNCIA NEGRA PARS COMPACTA SOBRE A LIBERAÇÃO DE DOPAMINA NO ESTRIADO DE RATOS DURANTE O TESTE DE ROTAÇÃO E DURANTE O TREINO NA TAREFA DE ESQUIVA ATIVA DE DUAS VIAS”, de autoria da pós-graduanda **PATRÍCIA ANDRÉIA DOMBROWSKI GUTMANN**, sob orientação do Prof. Dr. Cláudio da Cunha (UFPR) e composta pelos professores: Prof. Dr. Ivan Izquierdo (PUC-RS), Prof. Dr. Luiz Eugênio Mello (UNIFESP), Prof^a. Dr^a Maria Aparecida B. F. Vital (UFPR) e Prof^a. Dr^a. Joice Maria da Cunha (UFPR). De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, o pós-graduando foi APROUADA. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pelo seu orientador. Em Curitiba, 07 de outubro de 2010.



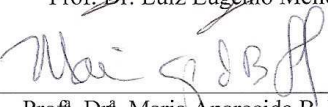
Prof. Dr. Cláudio da Cunha (Orientador)



Prof. Dr. Ivan Izquierdo (PUC-RS)



Prof. Dr. Luiz Eugênio Mello (UNIFESP)



Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida B. F. Vital (UFPR)



Prof^a. Dr^a. Joice Maria da Cunha (UFPR)

Centro Politécnico – Caixa Postal 19031 – CEP: 81531-990 – Curitiba/PR
Telefones: (41) 3361-1693 – Fax (41) 3266-2042 – pgfarmacologia@ufpr.br
<http://farmacologia.bio.ufpr.br/posgraduacao>

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Maurício e Marlene, ao meu irmão Gustavo, ao meu esposo César, pela admiração, carinho, amor e apoio constante! E ao bebê Gabriel que está no meu ventre, que mesmo antes de nascer, já é muito amado!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da Vida.

Ao meu pai Maurício, minha mãe Marlene e ao meu irmão Gustavo pelo amor, carinho, força e incentivo para que eu pudesse chegar até aqui. Amo muito vocês!

Ao meu esposo César, pelo amor, apoio, força e compreensão que me deu nesta importante etapa da minha vida. Te amo!

Ao Prof. Dr. Cláudio da Cunha, pela compreensão, pela ajuda, ensinamentos e pela excelente orientação que contribuíram em muito para a conclusão desta etapa. Muito obrigada pela confiança depositada em mim.

Aos demais professores do Departamento de Farmacologia e também de outras universidades pelos ensinamentos.

À farmacêutica Sílvia Nardi Cordazzo Genari pela amizade e pela ajuda no preparo das drogas.

A todos os meus amigos de laboratório, obrigada pelo apoio, ajuda e amizade. E também aos demais alunos do Departamento de Farmacologia pela amizade.

Aos funcionários do departamento de Farmacologia, obrigada pelo trabalho e dedicação.

A todos os meus amigos e familiares que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À Milene Cristina de Cravalho e ao professor Marcus Lira Brandão da Universidade de São Paulo, em Ribeirão Preto, pelos ensinamentos da técnica de microdiálise.

Ao Professor Charles Blaha e seus alunos, da Universidade de Memphis, Estados Unidos, por me receberem e me ensinarem muito no período em que estive realizando meu doutorado sanduíche em seu laboratório.

À Fundação Araucária e CAPES pelo apoio financeiro.

“O excelente mestre não é o que mais sabe, mas o que mais tem consciência do quanto não sabe. Não é o que é viciado em ensinar, mas o mais ávido a aprender. Não é o que declara os seus acertos, mas o que reconhece suas limitações.”

Augusto Cury

SUMÁRIO

Apresentação.....	viii
Lista de Abreviaturas.....	ix
Resumo.....	x
Abstract.....	xii
1.Introdução.....	14
2. Revisão de Literatura.....	15
2.1 Doença de Parkinson.....	15
2.2 Dopamina e Vias Dopaminérgicas.....	17
2.3 Neuroanatomia dos Núcleos da Base.....	19
2.4 Modulação Dopaminérgica dos Núcleos da Base.....	20
2.5 Modelos Animais da Doença de Parkinson.....	23
2.6 Os Núcleos da Base formam um entre vários Sistemas de Memória.....	28
2.7 Liberação tônica e fásica de dopamina.....	31
2.8.A técnica de microdiálise <i>in vivo</i> no estudo da liberação de neurotransmissores em animais acordados.....	33
3. Hipóteses e Predições.....	35
4. Objetivos.....	35
5. Materiais, Métodos e Resultados.....	36
6.Discussão Geral.....	36
7. Conclusão.....	41
8. Referências Bibliográficas.....	42
Anexo 1: Microdialysis study of striatal dopamine in MPTP-hemilesioned rats challenged with apomorphine and amphetamine (artigo científico).....	52
Anexo 2: Evidence that dopamine is released in the striatum to promote learning (artigo científico).....	62

APRESENTAÇÃO

Esta tese apresenta os resultados sob forma de dois artigos (anexos 1 e 2). Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se em cada artigo e representam a íntegra deste trabalho.

Na tese, o item 6, Discussão, apresenta comentários gerais a respeito dos resultados obtidos nos artigos. No item 7, Conclusão, são apresentadas as conclusões gerais da tese. As Referências Bibliográficas, item 8, referem-se às citações que aparecem na Introdução e na Discussão da tese.

LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA	6-Hidroxidopamina
CAR	resposta condicionada de esquiva (do inglês, <i>conditioned avoidance response</i>)
COMT	Catecol-o-metil-transferase
CS	Estímulo condicionado (do inglês, <i>conditioned stimulus</i>)
DA	Dopamina
DA _E	Dopamina extracelular estriatal
DAT	Transportador de dopamina (do inglês, <i>dopamine transporter</i>)
DOPAC	Ácido 3,4-diidroxifenilacético
DP	Doença de Parkinson
FPM	Feixe prosencefálico medial
GPe	Globo pálido externo
GPI	Globo pálido interno
HVA	Ácido homovanílico (do inglês, <i>homovanilic acid</i>)
LTD	Depressão de longa duração (do inglês, <i>long-term depression</i>)
LTP	Potenciação de longa duração (do inglês, <i>long-term potentiation</i>)
MAO	Monoaminoxidase
MPP ₊	1-metil-4-fenilpiridina
MPPP	1-metil-4-fenilpropionoxypiperidina
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
SHAM	O mesmo que simulado, falsamente lesado
SNC	Substância negra parte compacta
SNr	Substância negra parte reticulata
S-R-O	Memória estímulo-resposta-conseqüência (do inglês, <i>stimulus-response-outcome</i>)
STN	Núcleo subtalâmico (do inglês, <i>subthalamic nucleus</i>)
US	Estímulo incondicionado (do inglês, <i>unconditioned stimulus</i>)
VTA	Área tegmental ventral (do inglês, <i>ventral tegmental area</i>)

RESUMO

Os prejuízos motores observados na Doença de Parkinson (DP) aparecem somente depois da perda de mais de 70% da dopamina (DA) estriatal. No presente trabalho, usamos ratos que receberam uma infusão unilateral da neurotoxina 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) na substância negra parte compacta (SNc) e perderam em torno de 50% da DA estriatal como um modelo da fase inicial dessa doença. Embora esses animais não apresentem alterações motoras, eles rodam em direção ao lado lesado quando desafiados com drogas dopaminérgicas, como a apomorfina e a anfetamina. Este estudo tem como objetivo testar se isso ocorre porque essas drogas rompem os mecanismos compensatórios que mantêm inalterado o nível extracelular de DA no estriado (DA_E). Esta hipótese foi então testada em um estudo de microdiálise *in vivo* de liberação de DA no estriado de ratos MPTP. Ratos MPTP que não receberam nenhum tratamento farmacológico não apresentaram comportamento rotatório e seu nível basal não se alterou. Contudo, depois do tratamento com a apomorfina, o DA_E diminuiu em ambos os lados do animal MPTP, sendo dessa diminuição ainda mais acentuada no lado lesado apenas durante o tempo em que os animais apresentaram o comportamento rotatório ipsiversivo. Depois do tratamento com a anfetamina, o DA_E aumentou em ambos os lados, se tornando significativamente maior no lado não-lesado, isso também coincidindo com o tempo em que os animais começaram o comportamento rotatório ipsiversivo. Estes resultados estão de acordo com a hipótese de que a ausência de alterações motoras em ratos que mimetizam o modelo da fase inicial da DP depende da manutenção do DA_E por mecanismos compensatórios.

Assim como os pacientes na fase inicial da DP, estudos anteriores mostram que os ratos MPTP apresentam déficits cognitivos. Sabe-se que a DA tem um papel importante na recompensa e em outros comportamentos motivados, mas é ainda controverso se a sua função é codificar o valor hedônico dos estímulos, codificar a sua saliência, ou promover a aprendizagem. A segunda parte deste estudo teve por objetivo testar a hipótese de que a DA é liberada no estriado para promover o aprendizado, a qual implica que: (i) sua liberação no estriado aumenta durante a aprendizagem; (ii) esse aumento ocorre somente quando o aprendizado é possível;

(iii) depois de aprendida uma tarefa, os mesmos estímulos que promoveram o aprendizado não mais causam o aumento na liberação de DA; (iv) a aprendizagem é prejudicada por tratamentos que diminuam a liberação de DA ou bloqueiem os seus receptores. Essas predições também foram testadas por um estudo de microdiálise *in vivo*. Ratos controle e MPTP foram treinados para associar uma dica preditiva (som) com uma ação capaz de evitar um choque nas patas. Nós pudemos observar que: (i) o DA_E aumentou durante o aprendizado; (ii) depois do aprendizado, o som e o choque não mais causaram o aumento do DA_E; (iii) esse aumento não ocorreu quando o som e o choque foram apresentados de uma maneira imprevisível, não pareada e inescapável; (iv) a quantidade de DA liberada no estriado predizia o aprendizado; (v) o aprendizado não ocorreu em animais com uma lesão nos neurônios DA mesencefálicos ou tratados com antagonistas dos receptores dopaminérgicos. Este estudo apresenta evidências de que, pelo menos durante o aprendizado na esquia ativa de 2-vias, a DA é liberada no estriado para promover o aprendizado.

Em conjunto esses estudos sugerem que na fase inicial da DP os pacientes não apresentam déficits motores porque uma população de neurônios dopaminérgicos remanescentes consegue manter os níveis basais de DA no estriado. Esse estudo sugere também que os déficits cognitivos observados nesses pacientes resultam da incapacidade desses neurônios de atender a uma demanda por uma grande liberação de DA necessária para promover a aprendizagem.

ABSTRACT

Motor impairments of Parkinson's disease (PD) appear only after the loss of more than 70% of the striatal dopamine (DA). Rats that receive a unilateral infusion of the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) into the substantia nigra pars compacta (SNc) lose about 50-70% of the striatal DA and serve as a model of the early phase of this disease. Though these animals do not present gross motor impairments, they rotate towards the lesioned side when challenged with DAergic drugs, like amphetamine and apomorphine. One part of this study aimed to test whether it occurs because these drugs disrupt compensatory mechanisms that keep unchanged the extracellular level of DA in the striatum (DA_E). This hypothesis was tested by an *in vivo* microdialysis study in the release of DA in the striatum of MPTP rats. MPTP rats that received no pharmacological treatment presented no turning behavior and their basal DA_E did not differ. However, after apomorphine treatment, DA_E decreased in both sides, but becoming significantly lower in the lesioned side at the time the animals started ipsiversive turning behavior. After the amphetamine challenge, DA_E increased in both sides, becoming significantly higher in the non-lesioned side at the time the animals started ipsiversive turning behavior. These results are in agreement with the hypothesis that absence of gross motor impairments in this rat model of the early phase of PD depends on maintenance of the DA_E by compensatory mechanisms.

As in the patients in the early phase of PD, previous studies showed that MPTP rats present cognitive deficits. It is known that DA exerts an important role in the reward and in other motivated behaviors, but it is not clear if its function is to encode the hedonic value of a stimulus, to encode the saliency of a stimulus or to promote learning. The second part of this study aimed to test the hypotheses that DA is released in the striatum to promote learning, which implies that: (i) DA release in the striatum increases during learning; (ii) such increase occurs only when learning is possible; (iii) after learning, the same stimuli that promoted it will no longer cause increase in DA release; (iv) learning does not occur in animals with a lesion in the midbrain DA neurons or treated with DA receptor antagonists. These questions were addressed by an *in vivo* microdialysis study. MPTP and control rats were trained to associate a warning cue (tone) with an action useful to avoid a footshock. We could

observe that (i) the concentration of extracellular DA in the striatum increased during learning; ii) the tone and the footshock no longer caused the increase of extracellular DA in the striatum after a high level of learning was achieved; iii) such increase did not occur when the tone and footshock were presented in an unpredictable and inescapable manner; iv) the amount of DA released in the striatum predicted learning; v) learning did not occur in animals with a lesion in the midbrain DA neurons or treated with DA receptor antagonists.

In summary, these studies suggest that in the early phase of PD, patients do not present motor impairments due to a population of remanescant dopaminergic neurons that keep the DA basal level in the striatum. This study also suggests that the cognitive impairments observed in these patients are due to the incapacity of these neurons to release a high quantity of DA which is necessary to promote learning.

1. Introdução

A doença de Parkinson (DP) é uma das doenças neurológicas mais estudadas (Wu and Frucht 2005). É caracterizada principalmente por sinais motores que incluem tremor em repouso, bradicinesia, rigidez muscular, entre outros (Jankovic 2008), os quais resultam da degeneração dos neurônios dopaminérgicos da substância negra pars compacta (SNc) que projetam para o estriado (Hirsch, Graybiel et al. 1988). Contudo, esses sinais aparecem somente depois da perda de mais de 50% dos neurônios dopaminérgicos da SNc (Agid 1991; Mayo, Sainz et al. 2005). Antes mesmo desses sinais motores aparecerem, os pacientes apresentam déficits cognitivos que afetam principalmente as funções cognitivas (Grahn, Parkinson et al. 2009). Ratos que recebem uma infusão unilateral da neurotoxina 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) na SNc perdem de 50-70% da dopamina (DA) estriatal e servem como um modelo da fase inicial da DP (Da Cunha, Gevaerd et al. 2001). Embora esses animais não apresentem alterações motoras, eles apresentam um comportamento rotatório em direção ao lado lesado quando desafiados com drogas dopaminérgicas, como a apomorfina e a anfetamina. A causa do comportamento rotatório parece estar relacionada a um desequilíbrio na estimulação de neurônios dopaminérgicos estriatais localizados nos hemisférios direito e esquerdo do cérebro. Este desequilíbrio causa uma assimetria na promoção dos movimentos pelas vias estriado-tálamo-córtex motor, as quais são moduladas pela via nigroestriatal (Nicola, Surmeier et al. 2000). Como resultado, os animais rodam em direção ao lado com uma menor estimulação dopaminérgica estriatal (Robinson, Noordhoorn et al. 1994; Da Cunha, Wietzikoski et al. 2008).

É possível que, na fase inicial da DP, como no modelo do MPTP em ratos, a manutenção de um nível basal de DA extracelular no estriado seja necessária para manter os comportamentos motores normais, mas as funções cognitivas (e.g. aprendizagem) dependem de uma liberação fásica de DA que resulte em um grande aumento na concentração extracelular de DA (Goto, Otani et al. 2007; Schultz 2007). Isso pode explicar porque os ratos que foram lesados com MPTP apresentam um comportamento motor normal (Ferro, Bellissimo et al. 2005), mas apresentam um

déficit em aprender certas tarefas de memória (Da Cunha, Gevaerd et al. 2001; Miyoshi, Wietzikoski et al. 2002; Braga, Kouzmine et al. 2005).

Com isso, nossa hipótese para o primeiro estudo é que a ausência de alterações motoras, nesse modelo da fase inicial da DP, dependa da manutenção de níveis extracelulares basais de DA no estriado por mecanismos compensatórios, os quais podem ser alterados por eventos que exijam a sua alteração para níveis mais altos ou mais baixos. Essa hipótese será testada avaliando o comportamento rotatório de ratos com lesão unilateral na SNc induzida por MPTP e avaliando o nível extracelular de DA no estriado (DA_E) em amostras coletadas de ratos implantados com duas cânulas de microdiálise nos estriados direito e esquerdo, ao mesmo tempo em que eles são submetidos a um desafio farmacológico com apomorfina e anfetamina.

Assim como os pacientes na fase inicial da DP, estudos anteriores mostraram que os ratos MPTP apresentam déficits cognitivos (Da Cunha, Gevaerd et al. 2001). Sabe-se que a DA tem um papel importante na recompensa e em outros comportamentos motivados, mas é ainda controverso se a sua função é codificar o valor hedônico dos estímulos (Wise 2008), codificar a sua saliência (Berridge 2007), ou promover a aprendizagem (Schultz 2010). Com isso, a segunda parte deste estudo tem por objetivo testar a hipótese de que a DA é liberada no estriado para promover o aprendizado. Além do mais, o papel da DA no aprendizado de tarefas aversivas tem sido de grande interesse por causa de estudos que mostram que uma subpopulação de neurônios são ativados por estímulos aversivos (Brischoux, Chakraborty et al. 2009; Matsumoto and Hikosaka 2009). A hipótese do aprendizado será testada por um estudo de microdiálise *in vivo* em ratos treinados para associar uma dica preditiva (som) com uma ação capaz de evitar um choque nas patas.

2. Revisão de Literatura

2.1. Doença de Parkinson

Em 1817, James Parkinson descreveu pela primeira vez os sintomas da doença, então chamada Paralisia Agitante, que consistia na presença de movimentos tremulantes involuntários, diminuição da força muscular, alteração da

marcha, e inclinação do tronco para frente, sem alterações sensoriais e intelectuais (Singh, Pillay et al. 2007). No início do século XX, outros neurologistas também estudaram a doença de forma mais aprofundada e sistemática, e a batizaram como doença de Parkinson em homenagem a sua primeira descrição. James Parkinson se ateve aos sinais motores da doença, comentando que os pacientes não sofriam perda de capacidade intelectual. Contudo, posteriormente foram descritas alterações em determinados tipos de memória e o aparecimento de sintomas afetivos. Esses sinais e sintomas podem aparecer tanto com o desenvolvimento do quadro motor, como antes mesmo destes aparecerem (Menezes 2003).

A DP, então, pode ser definida como uma desordem neurodegenerativa progressiva e severa caracterizada principalmente por sinais motores como tremor em repouso, sendo esse o sinal mais evidente da doença (Yanagisawa 2006); bradicinesia, que consiste na lentidão dos movimentos voluntários e é responsável pelo início da incapacidade do paciente; e rigidez muscular, que pode ser definida como um aumento da resistência da articulação na execução de tais movimentos (Dauer and Przedborski 2003). Apesar das intensas pesquisas, a etiologia da DP ainda é desconhecida, mas postula-se que diversos fatores estejam relacionados à sua gênese, incluindo alterações genéticas, fatores ambientais, excitotoxicidade, neuroinflamação e estresse oxidativo (Przedborski and Ischiropoulos 2005; Abeliovich 2010). Questiona-se a possibilidade da DP ser diagnosticada antes do aparecimento dos sintomas motores, com isso, um estudo mostra a pesquisa que está sendo feita com um biomarcador para a DP na via nigroestriatal, o qual pode prever se o paciente progredirá com a doença enquanto ele ainda está na fase inicial dela. Esse biomarcador apresenta vantagens: pacientes podem estar cientes de que são propícios a desenvolver a doença; isso poderia ajudar os pesquisadores a desenvolverem tratamentos para diminuir ou até mesmo parar a progressão da doença; e permitir que o tratamento se iniciasse antes (Jones 2010).

Apesar de ser classicamente considerada uma doença do sistema motor, os pacientes com DP também apresentam outros sintomas como perda de olfato, distúrbios do sono, depressão, e declínio cognitivo, que podem aparecer nos estágios iniciais, antes mesmo do aparecimento dos sintomas motores da doença (Dubois and Pillon 1997; Carbon and Marie 2003; Yanagisawa 2006).

O quadro clínico da DP se manifesta geralmente entre 50 e 70 anos de idade (Hughes, Daniel et al. 1992). A doença se caracteriza por uma degeneração

de neurônios dopaminérgicos na SNc que partem para o estriado (Youdim and Riederer 1997; Flint 2001). Essa via dopaminérgica denominada de nigroestriatal é composta por um grupo de células que fica situado na SNc; os axônios destes neurônios percorrem ao longo do feixe prosencefálico medial (FPM) e terminam no estriado dorsal (Janhunen and Ahtee 2007). Estudos *post mortem* em cérebros de pacientes positivamente diagnosticados mostraram a perda de neurônios da SNc, localizada no mesencéfalo. A região possui esse nome porque possui coloração escura, o que visualmente a destaca, pois o neurotransmissor DA, presente nessa região, se auto-oxida facilmente gerando a melanina, pigmento de coloração escura (Menezes 2003). A DP é também caracterizada pela presença de inclusões esféricas citoplasmáticas denominadas corpos de Lewy (Forno 1996; Flint 2001), os quais constituem uma mistura heterogênea de proteínas e lipídios. O núcleo lipídico destas inclusões é cercado por elementos filamentosos os quais constituem uma variedade de proteínas, entre elas a ubiquitina e a α -sinucleína (Singh, Pillay et al. 2007).

A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum depois da doença de Alzheimer. A sua causa ainda não é muito bem elucidada (Lev, Melamed et al. 2003), mas anormalidades nos genes que codificam a α -sinucleína, e intoxicações crônicas também têm sido demonstradas (Singh, Pillay et al. 2007). O tratamento é basicamente sintomático (Lev, Melamed et al. 2003), onde a levodopa ainda acaba sendo muito utilizada (Abbott 2010; Grayson 2010) e também os agonistas dopaminérgicos e inibidores da metabolização de DA. Por esses tratamentos causarem uma série de efeitos indesejáveis para o paciente, muitos pesquisadores estão em busca por uma droga ideal para o tratamento da DP (Williams 2010). Terapia celular, terapia gênica e estimulação cerebral parecem ser as terapias futuras para a DP (Smith 2010).

2.2. Dopamina e Vias Dopaminérgicas

Como a DA, catecolamina sintetizada a partir da tirosina, está diretamente envolvida com a DP, abaixo está a reação que mostra a sua síntese (Figura 1).

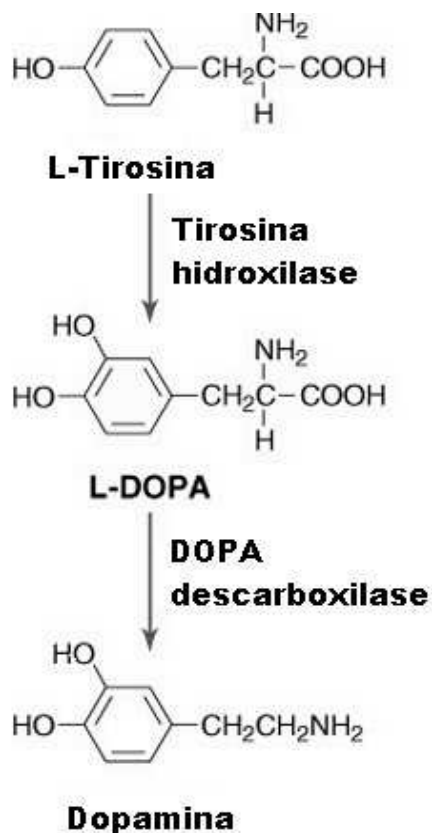


Figura 1: via de síntese da dopamina a partir do aminoácido tirosina. Fonte: (Siegel, Albers et al. 2006)

Esta maquinaria enzimática é encontrada em neurônios que podem ser divididos em quatro vias principais: nigroestriatal, mesocortical, mesolímbico e tuberoinfundibular. A via nigroestriatal é a maior e concentra cerca de 80% da DA encefálica. A SNc, junto com a área tegmental ventral (VTA), no mesencéfalo, são as principais populações de neurônios dopaminérgicos do encéfalo. A degradação da DA é mediada pelas enzimas mono-aminoxidase (MAO) e catecol-o-metil-transferase (COMT), produzindo vários metabólitos, entre eles o ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA) (Kandel 2000; Siegel, Albers et al. 2006). Os receptores dopaminérgicos pertencem às famílias D1 (englobando os tipos D1 e D5) e D2 (D2, D3 e D4). Todos estes receptores são metabotrópicos (atuam via proteína G), sendo que os D1 ativam a cascata de síntese do AMPc, enquanto os D2 inibem a adenil ciclase (Siegel, Albers et al.

2006). Em pacientes parkinsonianos, ocorre uma perda de DA e de seus metabólitos, HVA e DOPAC, e do transportador de dopamina (DAT) no estriado e na SNc (Beal 2001). Os sintomas motores surgem quando ocorre uma diminuição entre 70 a 80% da DA estriatal e perda de mais de 50% de neurônios dopaminérgicos da SNc (McGeer, Itagaki et al. 1989; Fearnley and Lees 1991).

2.3. Neuroanatomia dos Núcleos da Base

Os núcleos da base podem ser considerados como um sistema de seleção de ações apropriadas a demandas ambientais (Redgrave, Gurney et al. 2008). Eles são compostos por um conjunto de estruturas subcorticais que se localizam na base do cérebro e tronco encefálico e possuem conexões distintas com o córtex, com o tálamo e outros núcleos do tronco encefálico. Fazem parte dos núcleos da base: o estriado, que nos primatas é formado pelo núcleo caudado e o putamen (em roedores esse conjunto forma o estriado dorsal ou neoestriado), o núcleo accumbens (core e shell) e o tubérculo olfatório (em conjunto, formam o estriado ventral nos roedores); o globo pálido externo (GPe) e interno (GPi) (nos roedores, o globo pálido interno corresponde ao núcleo entopeduncular), a substância negra compacta e reticulada (SNr) e o núcleo subtalâmico (STN, do inglês *subthalamic nucleus*) (Parent and Hazrati 1995) (Figura 2).

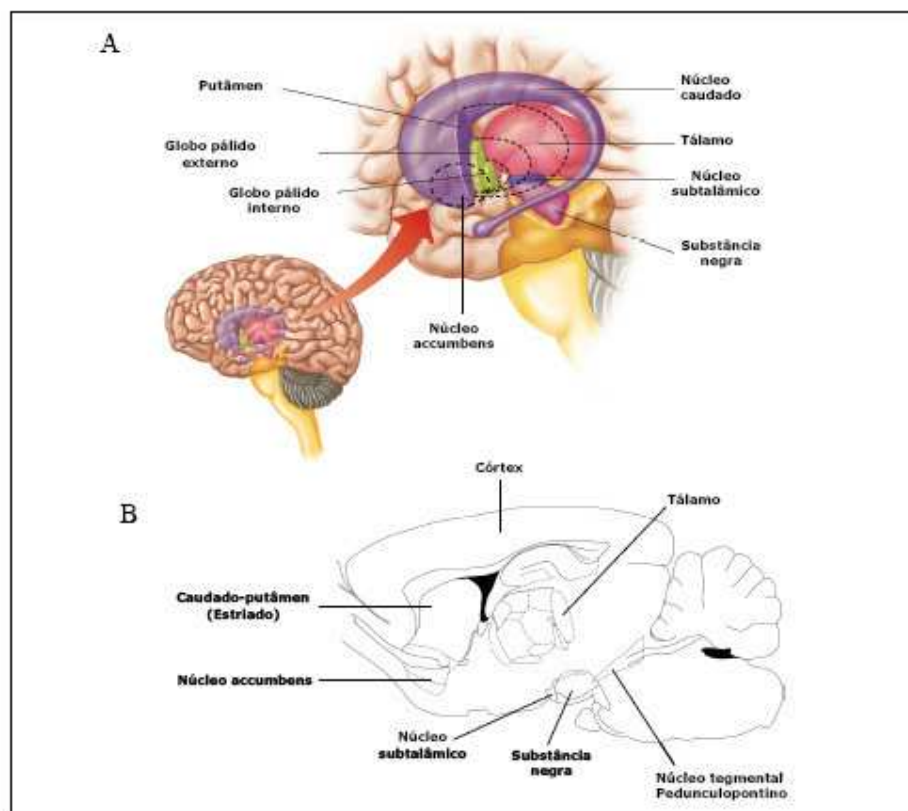


Figura 2: Neuroanatomia dos núcleos da base. Representação esquemática (A) tridimensional em humanos e (B) em ratos, modificado de (Redgrave, Gurney et al. 2008).

2.4. Modulação Dopaminérgica dos Núcleos da Base

A via nigroestriatal é responsável pela modulação dos núcleos da base, grupo de estruturas subcortais que modula os impulsos córtico-espinhais para o início de ações motoras, bem como a atividade de outras áreas do córtex frontal envolvidas em processos cognitivos e emocionais. (Obeso, Rodriguez-Oroz et al. 2000; Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC et al. 2010). O córtex e o tálamo enviam projeções glutamatérgicas ao estriado, que é o principal núcleo de entrada de informações para os núcleos da base. O estriado envia projeções GABAérgicas a outros núcleos, como o globo pálido e a SNr. Esses núcleos modulam núcleos do tálamo, que por sua vez envia projeções glutamatérgicas estimulatórias de volta ao córtex. É através desse processo que os núcleos da base escolhem quais

programas motores devem ser ativados para a execução de uma ação que atende a um objetivo definido pelo córtex pré-frontal. Através de um processo de aprendizagem esse sistema aprende a fazer escolhas de forma automática, em situações onde um estímulo ambiental determina uma resposta motora, transformando comportamentos direcionados a um objetivo em um hábito (Da Cunha, Wietzikoski et al. 2009 b).

Os núcleos da base ativam neurônios do córtex frontal removendo uma inibição tônica de seus núcleos de saída (GPi e SNr) sobre o tálamo. Isso ocorre pela ativação de uma via GABAérgica que faz a comunicação direta do estriado com esses núcleos. Uma outra via, também formada por neurônios GABAérgicos, que faz uma comunicação indireta do estriado com esses núcleos de saída (via GPe) atua na finalização de ações motoras e na inibição de comportamentos inadequados aos objetivos estipulados pelo córtex pré-frontal. Recentemente foi descrita uma via super-direta que aumenta a inibição do GPi/SNr sobre os neurônios tálamo-corticais por uma comunicação direta do tálamo com o NST que, por sua vez, estimula o GPi/SNr. Existem evidências de que a ativação dessa via aumenta em alguns milissegundos o tempo de tomada de decisão, resultando em escolhas mais acertadas e diminuindo o comportamento impulsivo (Frank 2006).

A DA modula os núcleos da base através de seu efeito nos receptores D1 e D2. Os receptores D1 estão presentes principalmente nos neurônios da via direta, enquanto os D2 são localizados em neurônios da via indireta. Na via direta os receptores D1 atuam como um filtro que aumenta a razão sinal/ruído: eles despolarizam os neurônios estriatais que estão recebendo um “sinal forte” dos neurônios corticais e aumentam a hiperpolarização daqueles que já se encontravam hiperpolarizados (Hernandez-Lopez, Bargas et al. 1997).

Isso facilita os processos atencionais que facilitam as respostas apropriadas a estímulos ambientais que sinalizam a necessidade de uma resposta motora específica, explicando o efeito dos inibidores de recaptção de DA no tratamento dos déficits de atenção e hiperatividade. Os receptores D2 sempre levam à inibição da via indireta, diminuindo o limiar de excitabilidade necessária para a deflagração de uma ação motora (Obeso, Rodriguez-Oroz et al. 2000; Gerfen 2004; Siegel, Albers et al. 2006) (Figura 3).

Em resumo, a DA estimula a via direta e inibe a via indireta. Desta forma ela funciona como um modulador dos núcleos da base, pois quando liberada no estriado

facilita a escolha das ações motoras apropriadas. Isso explica a bradicinesia e a rigidez muscular do paciente parkinsoniano, já que a morte dos neurônios nigroestriatais causa a depleção dopaminérgica no estriado, o que causa a dificuldade de iniciar ações motoras. Isso explica também a bradifrenia característica da demência sub-cortical associada à DP: na falta de DA, os núcleos da base tardam em escolher os pensamentos adequados como solução para uma demanda de processamento que deve retornar ao córtex pré-frontal. Há um trabalho recente que estabelece um papel importante para os núcleos da base na regulação do comportamento motor e indica que a modulação da via direta pode representar uma estratégia terapêutica efetiva para a melhora dos déficits motores presentes na DP (Kravitz, Freeze et al. 2010).

Por outro lado, o excesso de DA ou a supersensibilização de receptores dopaminérgicos no estriado causa aumento dos movimentos, fazendo com que esses sejam executados de forma precipitada, como no caso de discinesias, causada pelo tratamento com agonistas dopaminérgicos, ou da Doença de Huntington. O excesso de DA contribui para a tomada de decisões precipitadas (impulsivas) e agitação psicomotora características das psicoses e que respondem a medicação com antagonistas dopaminérgicos.

No início da DP, a morte de alguns neurônios não causa diferença significativa na transmissão do sinal. Como a doença é progressiva, o aumento da perda de neurônios da SNc causa diminuição importante na concentração de DA no estriado. Em resposta, os neurônios estriatais sintetizam e expõem mais receptores na membrana plasmática, aumentando a eficiência da sinapse e mascarando os efeitos da depleção. Na fase mais avançada da doença, essa regulação positiva de receptores não é suficiente para manter a conexão em níveis normais, causando o déficit motor (Obeso, Rodriguez-Oroz et al. 2000). . Essa hipótese foi reforçada por um estudo recente de nosso grupo que comparou os modelos do MPTP com um modelo da fase tardia da DP, o modelo da 6-OHDA (Da Cunha, Wietzikoski et al. 2008).

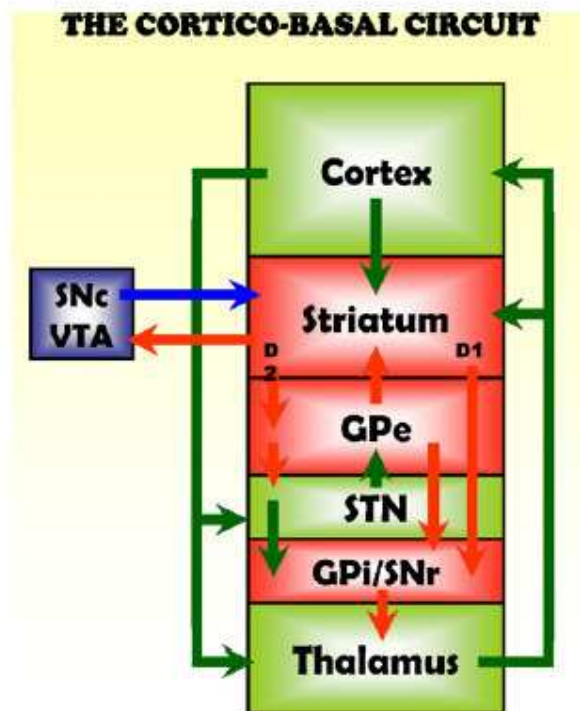


Figura 3: Diagrama das principais conexões dos núcleos da base. Sinapses glutamatérgicas estão indicadas pelas setas verdes; sinapses gabaérgicas pelas setas vermelhas e sinapse dopaminérgica pela seta azul. Fonte: (Da Cunha, Wietzikoski et al. 2009 b).

2.5. Modelos Animais da Doença de Parkinson

A DP é uma doença humana, e não se manifesta espontaneamente em animais de laboratório, é observada através da administração de agentes neurotóxicos que interrompam ou destruam seletivamente o sistema catecolaminérgico, tais como a 6-hidroxidopamina (6-OHDA) e o MPTP (Gerlach and Riederer 1996; Kahle, Haass et al. 2002) e agentes químicos, como a rotenona, que quando administrada sistemicamente podem induzir aspectos específicos da DP (Betarbet, Sherer et al. 2002; Halbach, Schober et al. 2004). Com isso, desde os primeiros estudos neuroquímicos *post mortem* em pacientes com DP, muitos modelos animais foram desenvolvidos com o objetivo de reproduzir diferentes aspectos anatômicos e sintomáticos da doença (Beal 2001), mas ainda não há um modelo ideal (Beal 2010). Contudo, os modelos animais descritos na literatura são voltados principalmente para a fase tardia, buscando tratamentos que revertam os

sinais motores. Poucos modelos visam estudar os fenômenos das fases iniciais, antes do aparecimento desses sinais (Da Cunha, Gevaerd et al. 2001; Ferro, Bellissimo et al. 2005).

A possibilidade de se realizar a infusão intracerebral de toxinas, com auxílio de aparelhos estereotáxicos, permitiu o desenvolvimento de modelos animais mais específicos em relação ao local e ao tipo de lesão. Toxinas que não atravessam a barreira hematoencefálica por serem pouco lipossolúveis, como a 6-OHDA, podem ser infundidas diretamente em vários pontos da via nigroestriatal, como a SNc, a VTA, o FPM e o estriado. A administração desta toxina em ratos mostrou-se um potente depletor de neurônios dopaminérgicos na SNc e de DA e metabólitos no estriado. Ainda, a cirurgia estereotáxica permitiu a demonstração de que a infusão de MPTP diretamente na SNc de ratos produz lesão significativa de neurônios, porém de forma mais moderada do que a 6-OHDA (Harik, Schmidley et al. 1987; Giovanni, Sonsalla et al. 1994 b; Da Cunha, Gevaerd et al. 2001; Ferro, Bellissimo et al. 2005).

Os modelos por lesão neurotóxica de células são muito utilizados por serem facilmente reproduzíveis e de custo menor em relação aos modelos genéticos, por exemplo. O uso do MPTP na indução do parkinsonismo experimental em animais começou quando se descobriu que esta neurotoxina produzia em humanos as mesmas alterações bioquímicas, histológicas e patológicas encontradas na DP. Esta descoberta acidental ocorreu em 1982, após o uso ilícito, por jovens, de uma substância derivada da heroína, o 1-metil-4-fenilpropionoxypiperidina (MPPP), um potente agente analgésico estruturalmente relacionado com a meperidina, o qual continha MPTP, um produto formado durante a síntese do MPPP. Após a auto-administração, os jovens apresentaram sintomas clássicos de parkinsonismo, tais como tremor, rigidez e discinesia (Langston, Ballard et al. 1983)

Após isso, muitos estudos se iniciaram com o MPTP. Por exemplo, Langston *et al* (1984) confirmaram a neurotoxicidade seletiva do MPTP por células da SNc após administração intraperitoneal (i.p.) desta substância em macacos. Heikkila et al (1984) demonstraram que o MPTP apresentava ação neurotóxica em neurônios dopaminérgicos nigroestriatais de camundongos após administração i.p.

1-Metil-4-fenilpiridina (MPP⁺, figura 4), produto do metabolismo oxidativo do MPTP pela monoamino-oxidase B (MAO-B), é uma potente neurotoxina que causa destruição das fibras dopaminérgicas em cultura de células produtoras de DA, com

conseqüente depleção dos níveis deste neurotransmissor (Mytilineou, Cohen et al. 1985). O mesmo trabalho também demonstrou que o MPP⁺ possui maior toxicidade que o MPTP e que este efeito tóxico, em ambas as drogas, é dose dependente. O MPTP é altamente lipofílico atravessando com facilidade a barreira hematoencefálica. A MAO-B, enzima envolvida na degradação das catecolaminas, converte o MPTP em MPP⁺ na glia, sua forma ativa e neurotóxica. O MPP⁺ é captado por terminais dopaminérgicos pelo transportador de dopamina. Concentra-se nas mitocôndrias onde irá inibir a ação da NADH CoQ1 redutase, enzima específica do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial. Isto resulta em diminuição da produção de ATP, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, diminuição da atividade antioxidante com conseqüente dano oxidativo e morte celular. A inibição da MAO-B resulta em bloqueio do efeito neurotóxico do MPTP por impedir sua conversão em MPP⁺ resultando em uma prevenção da neurotoxicidade (Nicklas, Youngster et al. 1987). No mesmo trabalho, os autores concluíram que a provável ação tóxica do MPP⁺ era devido à inibição da respiração mitocondrial.

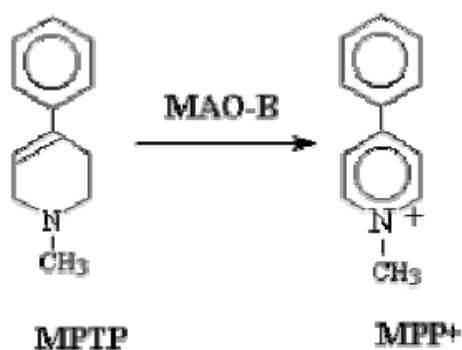


Figura 4: estrutura química do MPTP e de seu metabólito MPP⁺.

Segundo Heikkila et al, (1984) os principais déficits bioquímicos, comportamentais e neuropatológicos observados em animais experimentais tratados com MPTP são comparáveis aos apresentados por pacientes parkinsonianos. O MPTP produz alterações bioquímicas, histoquímicas e morfológicas típicas da apoptose em culturas de células neuroniais (Lev, Melamed et al. 2003). Irwin et al. (1985) demonstraram que, após a administração sistêmica de MPTP em macacos, a concentração de MPP⁺ na substância negra apresentou-se mais elevada que em outras áreas cerebrais, resultado sugestivo de uma seletiva toxicidade nigral.

Heikkila et al. (1985) demonstraram a toxicidade do MPP+ através da administração intranigral em ratos. Ogawa et al. (1987) observaram que após administração i.p. de MPTP em camundongos, os neurônios dopaminérgicos da VTA não haviam sido lesados, somente os da substância negra. Embora a 6-OHDA e o MPP+ sejam mais freqüentemente usados na indução da lesão da via nigroestriatal em modelos da DP em ratos, os mesmos apresentam toxicidade também para neurônios noradrenérgicos e serotoninérgicos, resultando em uma lesão não seletiva (Miyoshi, Wietzikoski et al. 2002). Boyce *et al.*, (1984) demonstraram que a administração i.p. de MPTP em ratos não resulta em uma ação neurotóxica assim como não ocorrem alterações bioquímicas relacionadas aos níveis de DA e seus metabólitos estriatais. Trabalhos demonstram que a infusão intranigral de MPTP é mais seletiva e efetiva na lesão de células dopaminérgicas resultando em uma diminuição significativa dos níveis de DA no estriado de ratos (Da Cunha, Gevaerd et al. 2001; Miyoshi, Wietzikoski et al. 2002; Da Cunha, Wietzikoski et al. 2003; Reksidler, Lima et al. 2009). Como já mencionado anteriormente, ratos são menos sensíveis ao MPTP não sendo efetiva a administração sistêmica, sendo necessário, portanto a infusão intracerebral do MPTP (Giovanni, Sieber et al. 1994 a; Giovanni, Sonsalla et al. 1994 b).

Mais recentemente, o Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Sistema Nervoso Central da Universidade Federal do Paraná publicou resultados mostrando que ratos que receberam infusão intranigral de MPTP desenvolveram lesões da SNc mais moderadas em relação a animais lesados com toxinas mais potentes, como a 6-OHDA (Da Cunha, Angelucci et al. 2002; Ferro, Bellissimo et al. 2005). Seguido da infusão de MPTP, os ratos apresentam hipocinesia, a qual desaparece depois de alguns dias (Lima, Reksidler et al. 2006) e , 3 semanas depois, eles não apresentam nenhum prejuízo motor (Ferro, Bellissimo et al. 2005), mas apresentam déficits cognitivos (Da Cunha, Angelucci et al. 2002; Miyoshi, Wietzikoski et al. 2002; Da Cunha, Wietzikoski et al. 2003; Bellissimo, Kouzmine et al. 2004; Kumar, Kaundal et al. 2009). Devido a estas peculiaridades, os ratos MPTP têm sido utilizados como um modelo da fase inicial da DP (Da Cunha, Angelucci et al. 2002; Perry, Hipolide et al. 2005; Reksidler, Lima et al. 2008; Tadaiesky, Dombrowski et al. 2008; Kumar, Kaundal et al. 2009).

Já a 6-OHDA é uma das neurotoxinas mais comuns utilizadas experimentalmente em modelos de degeneração da SNc, tanto *in vitro* como

também *in vivo* (Blum, Torch et al. 2001). É incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica, sendo necessária a administração diretamente na estrutura cerebral que se deseja lesar. A injeção bilateral de 6-OHDA na SNc ou em outras regiões cerebrais provoca uma elevada mortalidade neuronal, principalmente de neurônios catecolaminérgicos. Esta droga apresenta similaridade estrutural com as catecolaminas e tem alta afinidade pelo sistema de transporte das mesmas, mostrando assim a sua seletividade por neurônios catecolaminérgicos (Ungerstedt and Arbuthnott 1970; Gerlach and Riederer 1996; Blum, Torch et al. 2001; Betarbet, Sherer et al. 2002). A 6-OHDA é usualmente injetada unilateralmente, enquanto que o hemisfério intacto funciona como um controle interno, constituindo um modelo de hemiparkinsonismo, que é caracterizado por um comportamento motor assimétrico após a administração de drogas dopaminérgicas, devido a um desequilíbrio entre o lado lesado e não-lesado (Da Cunha, Wietzikoski et al. 2008). A injeção unilateral de 6-OHDA na SNc ou no FPM provoca a morte de todos os neurônios dopaminérgicos no mesencéfalo do lado aplicado e a diminuição de dopamina no lado correspondente do estriado, gerando um modelo válido de uma fase adiantada da DP com pronunciadas alterações motoras. Esses animais apresentam comportamento rotatório contralateral em relação à lesão quando desafiados com agonistas D1/D2 da dopamina, tais como a apomorfina, cujo comportamento pode ser explicado pela hiperexpressão dos receptores dopaminérgicos na porção lesada do estriado. Drogas que induzem a liberação de dopamina, tais como a anfetamina, causam rotações ipsilaterais à lesão (Da Cunha, Wietzikoski et al. 2008). Essa toxina é efetiva em camundongos, ratos, gatos e primatas (Schwartzing and Huston 1996).

Esse modelo de comportamento rotatório em ratos desafiados com drogas dopaminérgicas, após lesão unilateral da SNc induzida pela infusão intracerebral de 6-OHDA, foi proposto como modelo da DP por Ungerstedt (1968). Desde então, este tem sido um dos modelos mais populares para o estudo de drogas potencialmente úteis para tratar essa doença (Gerlach and Riederer 1996; Schwartzing and Huston 1996; Yuan, Sarre et al. 2005). Este modelo rotatório é uma ferramenta muito utilizada para testar drogas agonistas e antagonistas dopaminérgicos e ainda para estudos de problemas motores que mimetizam os sintomas da DP (Gerlach and Riederer 1996). Nesse modelo de rotação, a administração de apomorfina é o teste padrão da literatura para verificar a estimulação de receptores dopaminérgicos. A causa do comportamento rotatório parece estar relacionada ao desequilíbrio entre as

sinapses dopaminérgicas nigroestriatas entre os lados direito e esquerdo do cérebro. Este desequilíbrio prejudica os impulsos para iniciar os movimentos promovidos pela conexão estriado-tálamo-córtex motor, os quais são modulados pela via nigroestriatal (Nicola, Surmeier et al. 2000). Um ponto crítico para definir o aparecimento e a direção das rotações parece ser o local de infusão da toxina. O FPM é apontado como o ponto onde a lesão das fibras causa maior número de rotações contralaterais após o desafio com apomorfina (Ungerstedt 1971). A supersensibilidade dos receptores dopaminérgicos no estriado também é sugerida como fator determinante no aparecimento de rotações contralaterais (Thal, Mishra et al. 1979). Outros autores ainda sugerem o envolvimento de outros sistemas de neurotransmissores além da dopamina (Hirschhorn, Hittner et al. 1983; Lane, Cheetham et al. 2005).

Da Cunha et al (2008) mostram um estudo onde ratos com lesão unilateral na SNc induzida por MPTP respondem à apomorfina e anfetamina com rotações ipsilaterais. Este desequilíbrio na neurotransmissão dopaminérgica é determinado pela magnitude da depleção de DA e pela regulação de receptores dopaminérgicos. Quando desafiados com apomorfina, os animais com uma pequena lesão/depleção unilateral (causada pelo MPTP) apresentam um comportamento rotatório ipsiversivo, devido a uma fraca estimulação do lado lesado (causada pela perda de DA); enquanto os animais com uma perda quase total dos neurônios dopaminérgicos (causada pela 6-OHDA) apresentam um comportamento rotatório contraversivo, devido à supersensibilização dos receptores dopaminérgicos. Isto corrobora a idéia de que os animais rodam para o lado onde há uma menor estimulação dos receptores dopaminérgicos.

2.6. Os núcleos da base formam um entre vários Sistemas de Memória

Durante muito tempo debateu-se, intensamente, a possibilidade de a memória ser uma função unitária ou decomposta em diferentes sistemas. A partir de estudos de quadros degenerativos cerebrais graves, em que há grande comprometimento da memória declarativa (como na doença de Alzheimer), observou-se que outros tipos de memória ainda são conservados (Izquierdo 2002). Portanto, a idéia de que podem existir várias formas ou tipos de memória foi

estabelecida (Eichenbaum 2001; Poldrack and Packard 2003; Squire, Stark et al. 2004; Squire 2004 a).

Várias propostas existem para classificar a memória e estão baseadas em sistemas que dependem ou independem de estruturas encefálicas determinadas. Dentro das consideradas memórias de longa duração encontram-se dois grandes grupos (i) memórias declarativas ou explícitas, que podem ser relatadas e evocadas de forma consciente, como fatos, eventos e conceitos; e (ii) memórias não-declarativas ou implícitas, aquelas que podem ser evocadas de forma automática ou inconsciente, sendo muitas vezes expressas como um procedimento motor desempenhado para atingir um objetivo ou por hábito, as habilidades percepto-motoras e cognitivas. Em todos esses casos elas podem ser demonstradas apenas através de seu desempenho, e não por um relato verbal (Cohen, Pasik et al. 1984; Salmon and Butters 1995; Izquierdo 2002; Squire 2004 a).

Quanto à memória não-declarativa, ela divide-se em diversas categorias, envolvendo as habilidades e memórias de procedimento, tais como as ações aprendidas por condicionamento instrumental ou operante (voltadas para um objetivo e os hábitos estímulo-resposta) e as associações aprendidas por condicionamento clássico ou Pavloviano. Todos esses tipos de memória são mediados por estruturas cerebrais distintas (Squire 1992).

Os animais tomam decisões que resultam em conseqüências reforçadoras e evitam ações com conseqüências aversivas. Este tipo de aprendizagem é, portanto, chamado de **instrumental ou operante** (Domjan and Burkhard 1982; Eichenbaum 2008). Ela permite que o indivíduo escolha uma ação motora que lhe permita atuar sobre seu ambiente de forma a produzir uma conseqüência. A escolha destas ações está baseada na presença de determinados estímulos ambientais que sinaliza qual é a resposta motora ou ação apropriada. Por esta razão, as memórias resultantes do aprendizado instrumental são chamadas de memórias estímulo-resposta (S-R, do inglês *stimulus-response*) (White and McDonald 2002). Em situações onde as conseqüências (O, do inglês *outcome*) de uma resposta a um estímulo não mudam, a repetição deste pareamento S-R-O leva a uma automação da resposta, de forma que o indivíduo a escolhe e executa de forma automática. Este tipo de memória é chamado de hábito S-R. Em função da forma automática com que estas respostas são escolhidas e executadas, as memórias para a escolha destes procedimentos e

da sua execução são também chamadas de memória implícita ou não-declarativa (Squire 2004 a).

Muitos psicólogos contemporâneos discriminam os comportamentos resultantes do aprendizado instrumental em ações direcionadas a um objetivo ou R-O e hábitos S-R (Yin and Knowlton 2006; Horvitz 2009). O comportamento R-O é controlado por sua consequência. Os estímulos que, quando apresentados de forma contingente a uma resposta, aumentam sua frequência são chamados de reforçadores positivos. Aqueles que diminuem a frequência da resposta são chamados de punidores. Nas situações de reforço negativo, a remoção de um estímulo punidor ou aversivo na contingência de uma resposta resulta no aumento de sua frequência (Domjan and Burkhard 1982; Eichenbaum 2008). Já nos hábitos S-R, o comportamento é controlado pelo estímulo neutro que o precede, sendo mais resistente à extinção por desvalorização do reforço, tal como em situações de saciedade e reforço alimentar (Yin and Knowlton 2006). Porém o reforço e punição têm um papel determinante na aprendizagem tanto do comportamento R-O como dos hábitos S-R. Por esta razão autores como Norman White e Mark Packard consideram todas as memórias resultantes do comportamento instrumental de hábitos S-R, na mesma concepção dos primeiros teóricos do aprendizado instrumental (Packard and McGaugh 1992; Salmon and Butters 1995; White and McDonald 2002).

Em muitas situações, os animais podem antecipar a iminência da apresentação de um estímulo reforçador ou aversivo (US, do inglês *unconditioned stimulus*) associando-o a outro estímulo neutro que o precede (CS, do inglês *conditioned stimulus*). Este tipo de aprendizagem é chamado de condicionamento **clássico ou Pavloviano**, em homenagem ao pesquisador russo que o descobriu (PAVLOV 1927; Schultz 2006). A memória resultante do condicionamento clássico também é considerada como implícita ou não-declarativa, tendo em vista que seu aprendizado não é necessariamente um processo consciente (Squire 2004 a). Os US apresentados tanto no condicionamento clássico como no instrumental geram também uma resposta emocional em função da recompensa ou punição.

Com isso, um equipamento de grande importância para se estudar o comportamento de animais, o qual também foi utilizado neste trabalho, é a esQUIVA ativa de 2-vias, a qual é um modelo animal muito usado para estudar comportamentos motivados que envolvem os condicionamentos clássico e

instrumental. Na esquivada ativa de duas vias, o animal emite uma resposta de esquivada (resposta condicionada) ou antecipa a resposta de fuga (resposta incondicionada) sob a apresentação de um CS, o qual é tipicamente um sinal auditivo ou visual. Este estímulo é sempre pareado a um US, usualmente um choque nas patas. Quando a resposta ao CS não é emitida no tempo estipulado, o US é então aplicado. Quando a resposta ao CS é emitida, tanto o CS quanto o US são finalizados. Então, o animal aprende a antecipar a fuga do choque por condicionamento clássico e a se esquivar dele por condicionamento instrumental motivado por reforço negativo (Wadenberg and Hicks 1999).

2.7. Liberação tônica e fásica de dopamina

Os neurônios dopaminérgicos mesencefálicos liberam DA no estriado de forma tônica ou fásica (Goto, Otani et al. 2007). Uma pequena quantidade de DA é liberada de forma tônica espontânea e continuamente por estes neurônios, estabelecendo um conteúdo basal de DA extrasináptica necessário para a escolha dos programas motores que já estão programados para serem deflagrados frente a determinados estímulos. A falta deste nível basal de DA é a causa da dificuldade de iniciar ações em pacientes portadores da DP (Olanow and Tatton 1999).

Alguns dos déficits cognitivos que os pacientes com DP apresentam são prejuízos em funções executivas, memória de trabalho e procedural (Grahn, Parkinson et al. 2009). Isto não é de se surpreender, haja vista os núcleos da base, no qual o estriado faz parte, exercem um papel fundamental na seleção de ações e também no aprendizado de associações R-O e de hábitos S-R (Yin and Knowlton 2006; Balleine, Liljeholm et al. 2009; Cohen and Frank 2009; White 2009; Da Cunha, Wietzikoski et al. 2009 a; Da Cunha, Wietzikoski et al. 2009 b). Importante para tais associações está a liberação fásica de DA no estriado, a qual reforça a atividade sináptica corticoestriatal. Essa liberação fásica de DA no estriado é crítica para o aprendizado de associações na tarefa da esquivada ativa de duas vias (Gevaerd, Miyoshi et al. 2001; Gevaerd, Takahashi et al. 2001; Da Cunha, Angelucci et al. 2002).

A liberação fásica de DA no estriado é uma condição importante para que ocorram os fenômenos de plasticidade sináptica necessários para fortalecer as sinapses córtico-estriatais ativas (Beninger 1983; Di Filippo, Picconi et al. 2009).

Neurônios dopaminérgicos mesencefálicos da SNc e da VTA disparam de forma fásica na presença de estímulos desconhecidos e salientes, tais como estímulos que funcionam como reforçadores ou punidores de primeira (US) ou segunda ordem (CS). (Beninger 1983; Berridge 2007; Di Filippo, Picconi et al. 2009).

Existem evidências de que a ativação fásica dos neurônios dopaminérgicos seja mediada pelo colículo superior (Comoli, Coizet et al. 2003). Fibras glutamatérgicas de outras regiões subcorticais, tais como o tegmento pontino, podem também contribuir para a resposta fásica dos neurônios da VTA e SNc (Omelchenko and Sesack 2007). A SNc e VTA também recebem projeções do córtex pré-frontal, amígdala e núcleos da rafe, mas é improvável que estas estruturas possam desencadear a resposta fásica dos neurônios dopaminérgicos, uma vez que elas respondem a estímulos salientes com uma latência maior (Oades and Halliday 1987; Bacon and Totterdell 2000; Georges and Aston-Jones 2002; Paxinos 2004). É mais provável que estas estruturas contribuam para sustentar o padrão de disparo dos neurônios dopaminérgicos quando o estímulo desencadeador é reforçador. Estímulos aversivos são processados pela habênula lateral que inibe a resposta fásica dos neurônios dopaminérgicos segundo alguns autores (Gao, Jeaugey et al. 1990; Ji and Shepard 2007). Os níveis baixos de DA favorecem a indução de depressão de longa duração (LTD, do inglês *long-term depression*) e de potenciação de longa duração (LTP, do inglês *long-term potentiation*) nas sinapses córtico-estriatais dos neurônios (Di Filippo, Picconi et al. 2009). Esta LTD pode diminuir a probabilidade de que esta ação seja apresentada no futuro, quando o sujeito se defrontar com estes mesmos estímulos (Schultz 2007).

Portanto, a resposta fásica dos neurônios dopaminérgicos pode ser considerada como um sinal de que as sinapses córtico-estriatais dos neurônios que representam o estímulo e a ação devem ser reforçadas. Esta resposta é deflagrada pelo estímulo saliente que indica que existe algo relevante e novo para ser aprendido. Se a resposta fásica dos neurônios dopaminérgicos for prolongada por uma consequência reforçadora, a informação sobre a consequência também será associada à ação escolhida. Quando o estímulo sinalizar uma consequência já conhecida, a resposta fásica dos neurônios dopaminérgicos não ocorre e a memória da associação S-R não é alterada. Quando a consequência for aversiva, os neurônios dopaminérgicos serão inibidos e esta memória será enfraquecida (Redgrave, Gurney et al. 2008).

Porém, as alterações na liberação de DA frente a estímulos aversivos são controversas. Sabe-se que estímulos aversivos também desencadeiam uma resposta fásica da DA (Young 2004; Matsumoto and Hikosaka 2009; Morris, Schmidt et al. 2010), mas estudos de microdiálise *in vivo* e de registro de célula unitária em animais acordados divergem sobre a natureza inibitória ou excitatória dessa resposta (Nicola 2007; Horvitz 2009). Há até pouco tempo, acreditava-se que as alterações na liberação fásica de DA sinalizassem apenas reforço. Porém, estudos mais recentes mostram que a aplicação de um estímulo aversivo (como o choque nas patas, por exemplo) resulta em uma inibição da liberação de DA, seguida de sua liberação de forma exacerbada após a interrupção do estímulo (Ungless 2004; Redgrave, Gurney et al. 2008).

Com base em toda essa teoria, sugerimos o fato de que os ratos MPTP apresentam um comportamento motor normal e que eles desenvolvem mecanismos compensatórios para a perda de neurônios dopaminérgicos, como a manutenção da liberação tônica de DA no estriado (Dombrowski, Carvalho et al. 2010). Por outro lado, os ratos MPTP apresentam um déficit no aprendizado (Da Cunha, Gevaerd et al. 2001; Da Cunha, Angelucci et al. 2002), o que sugere que a liberação fásica de DA desses animais está anormal, corroborando a idéia do MPTP ser um modelo que mimetize a fase inicial da DP. Salientamos também a importância da liberação fásica de DA quando há oportunidade de aprendizado em animais expostos na esquiiva ativa de 2-vias.

2.8. A técnica de microdiálise *in vivo* no estudo da liberação de neurotransmissores em animais acordados

A microdiálise é uma técnica que fornece informações confiáveis sobre a concentração de uma ampla variedade de substâncias presentes em diferentes regiões cerebrais. É uma ferramenta útil para caracterizar a dinâmica de neurotransmissores no cérebro durante manipulações farmacológicas. Ela analisa o nível basal de neurotransmissores no fluido extracelular numa escala de tempo em minutos e os resultados revelam mudanças que ocorrem em resposta a um desafio farmacológico (Budygin, Kilpatrick et al. 2000). Essa técnica coleta substâncias de espaços intersticiais do cérebro para uma posterior análise desses compostos. O princípio básico é o posicionamento de uma membrana permeável na região

cerebral de interesse que permite a livre difusão de água, solutos e outras substâncias por ela (Figura 5) (Benveniste and Hüttemeier 1990; Jolly and Vezina 1996).

Com isso o objetivo principal deste trabalho é avaliar a liberação de dopamina no estriado utilizando a técnica de microdiálise em ratos submetidos aos testes de rotação e esquila ativa de 2-vias no modelo da DP em animais que receberam unilateralmente MPTP na SNC.

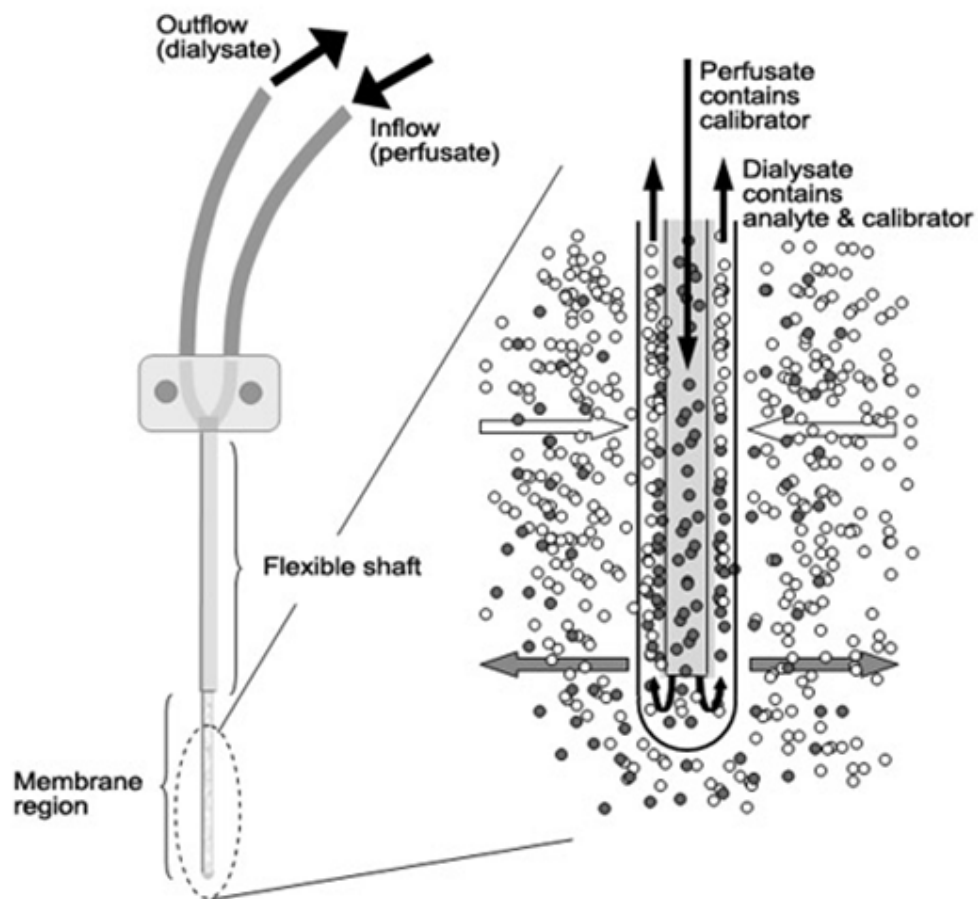


Figura 5: técnica de microdiálise. Fonte: (Benveniste and Hüttemeier 1990).

3. Hipóteses e Predições

3.1. Nós propomos que a ausência de alterações motoras na fase inicial da DP depende da manutenção dos níveis basais da DA extracelular estriatal (DA_E) por mecanismos compensatórios, os quais podem ser rompidos por eventos que exijam alterações dessa DA para níveis mais altos ou mais baixos. Se esta hipótese for verdadeira, esperamos observar níveis basais de DA_E inalterados em animais com lesão unilateral da SNc por MPTP (um modelo da fase inicial da DP) e a ausência de comportamento rotatório (alteração motora presente em modelos da fase tardia da DP); esperamos também que drogas que alteram a taxa de liberação de DA causem mudanças desiguais nos níveis de DA_E nos lados lesado e não-lesado causando concomitantemente um comportamento rotatório.

3.2. Nós propomos também que uma grande quantidade de DA é liberada no estriado para promover o aprendizado. Se esta hipótese for verdadeira, em uma situação de aprendizagem, tal como durante o treino na tarefa de esquiva ativa de 2 vias, esperamos que: o DA_E aumente durante o aprendizado; que os estímulos apresentados durante o condicionamento (som e choque) não mais causem o aumento do DA_E depois que um alto nível de aprendizado for alcançado; que esse aumento não ocorra quando o som e o choque forem apresentados de uma maneira imprevisível, não pareada e inescapável; que o grau de aprendizado possa ser estimado pela quantidade de DA liberada no estriado; que o aprendizado não ocorra em animais com uma lesão nos neurônios DA do mesencéfalo ou em animais tratados com antagonistas dopaminérgicos.

4. Objetivos

4.1. Verificar se o comportamento rotatório ipsiversivo de ratos desafiados com drogas dopaminérgicas ocorre por causa de um rompimento dos mecanismos compensatórios os quais mantêm os níveis extracelulares de DA no estriado inalterados.

4.2. Verificar se a liberação de DA no estriado aumenta para promover o aprendizado de como prever a iminência de um choque contingente a apresentação de um estímulo condicionado e de como evitá-lo.

5. Materiais, Métodos e Resultados

Todo o material utilizado, a metodologia e as técnicas empregadas, bem como os resultados e a discussão específica de cada um dos dois estudos que compõem esta tese estão descritos nos manuscritos apresentados nos anexos 1 e 2.

6. Discussão Geral

Os dois estudos dessa tese mostram que a DA tem um papel crítico no processo de escolha e/ou ativação de ações motoras, bem como na aprendizagem de como fazer escolhas que resultam em conseqüências gratificantes.

Quando o sistema dopaminérgico nigroestriatal falha, como na DP, aparecem déficits tanto na escolha e iniciação de ações motoras, como no aprendizado que leva a sua iniciação no momento certo. A terapia dopaminérgica é eficaz no tratamento dos sinais motores da DP, mas o tratamento é basicamente sintomático e não melhora a maioria dos déficits cognitivos dessa doença (Lev, Melamed et al. 2003). Ainda hoje, a levodopa, um precursor da DA, é o medicamento mais eficaz e o mais utilizado (Abbott 2010; Grayson 2010), sendo também utilizados agonistas dopaminérgicos e inibidores da metabolização da DA. Com o decorrer do tempo, a eficácia da levodopa declina gradualmente e o paciente apresenta movimentos involuntários chamados de discinesias (Abbott 2010). Além disso, a terapia dopaminérgica não é tão eficaz para o tratamento dos sintomas cognitivos da DP, tais como prejuízos em funções executivas, memórias de trabalho e procedural (Grahn, Parkinson et al. 2009). Nosso trabalho sugere que esses déficits cognitivos resultam da incapacidade dos neurônios nigroestriatais remanescentes em atender a uma demanda por uma grande liberação de DA. Como a levodopa repõe os níveis tônicos de DA, ela não teria como melhorar sintomas que dependem de uma liberação fásica desse neurotransmissor. Tendo em vista as

limitações desses tratamentos, muitos pesquisadores estão em busca de novos medicamentos para o tratamento da DP (Williams 2010).

No presente estudo, observamos que ratos MPTP que não receberam nenhum tratamento farmacológico, não apresentaram comportamento rotatório e seu nível basal não se alterou. Contudo, depois do tratamento com a apomorfina, o nível de DA extracelular no estriado diminuiu em ambos os lados do animal MPTP, sendo essa diminuição ainda mais acentuada no lado lesado apenas durante o tempo em que os animais apresentaram o comportamento rotatório ipsiversivo. Depois do tratamento com a anfetamina, o nível de DA extracelular estriatal aumentou em ambos os hemisférios, se tornando significativamente maior no lado não-lesado, isso também coincidindo com o tempo em que os animais começaram o comportamento rotatório ipsiversivo. Estes resultados estão de acordo com a hipótese de que a ausência de alterações motoras em ratos que mimetizam o modelo da fase inicial da DP depende da manutenção dos níveis basais de DA no estriado.

O modelo do MPTP tem sido utilizado para o estudo dos déficits cognitivos da DP que resultam da perda de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais (Kumar, Kaundal et al. 2009). No presente trabalho, usamos esse modelo para estudar a hipótese de que esses déficits resultam da incapacidade dos neurônios remanescentes em liberar DA de forma fásica quando ela é necessária para a aquisição de memórias de procedimentos.

Sabe-se que os animais tomam decisões que resultam em conseqüências gratificantes e evitam ações com conseqüências aversivas. Este tipo de aprendizado permite que o indivíduo aprenda a escolher ações que lhe permita atuar sobre seu ambiente de forma a produzir conseqüências que estejam de acordo com o seu objetivo, ou seja, conseqüências gratificantes, bem como evitar conseqüências aversivas. A escolha destas ações é desencadeada por determinados estímulos ambientais que sinaliza qual é a ação apropriada para que seu objetivo seja atingido (Eichenbaum 2008). O presente trabalho mostrou que a liberação de uma grande quantidade de DA no estriado é fundamental para esse processo.

No caso da esquiva ativa de 2-vias ocorrem dois tipos de aprendizagem que levam à formação de memórias de procedimentos: o condicionamento clássico Pavloviano e o condicionamento operante. Pelo condicionamento clássico, o animal aprende a associar o choque (US) com o soar da campainha (CS) que o precede. Nesse tipo de aprendizagem, a resposta motora do animal não faz parte do traço de

memória formado – o animal aprende a prever a iminência do choque quando soa a campainha, independente de qualquer resposta que ele possa emitir. Pelo condicionamento operante, o animal aprende que esses estímulos podem ser interrompidos ou mesmo evitados (US) pela resposta de cruzar para o outro lado da caixa de esquiva durante a apresentação do CS (Domjan and Burkhard 1982). Nesse caso, dois traços de memória podem ser formados: a associação da resposta com a sua consequência (R-O, do inglês *response-outcome*) e a associação do estímulo com a resposta (S-R, do inglês *stimulus-response*). Como a consequência é a apresentação ou a esquiva do US, seria mais apropriado falar em um traço mnemônico associando R-US. A evocação dessa memória resulta em um comportamento em que o animal escolhe emitir essa resposta para atingir o objetivo de evitar o choque. Na literatura, a evocação dessas memórias são denominadas de ações direcionadas a um objetivo (Yin and Knowlton 2006; Balleine, Liljeholm et al. 2009). Quando esse comportamento se torna automático, passando a ser deflagrado não mais com o objetivo de causar ou evitar uma dada consequência, mas sim pela apresentação do CS, passa a ser referido então como hábito S-R (Yin and Knowlton 2006).

Portanto, acredita-se que, ao menos no início da aprendizagem, ao cruzar para o outro lado da caixa, o animal “espera” evitar o choque. Na esquiva ativa de 2-vias é provável que a DA seja liberada quando o animal escuta a campainha e espera receber o choque na seqüência. Porém, quando ele aprende a fazer uma ação que resulta em evitar o choque, ele deixa de liberar DA, pois a campainha passa a sinalizar que ele não vai receber o choque (se apresentar a resposta). Portanto, segundo a teoria do papel da DA como sinalizadora de um erro de predição (uma discrepância entre a consequência (apetitiva/aversiva) obtida e a esperada), a ativação fásica dos neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo é máxima quando o choque é liberado de forma inescapável, ou seja, quando o animal não espera receber uma punição e a recebe. Por outro lado, tal ativação é baixa em condições de certeza, quando o animal já aprendeu que a probabilidade de ocorrência do choque é máxima após a apresentação do som: o animal espera receber o choque e recebe (Schultz 2010). Essa teoria foi proposta para estímulos apetitivos, mas é possível que se aplique também a estímulos aversivos. Em relação à esquiva ativa ainda, dizemos que esse fenômeno provavelmente ocorre levando em conta os estudos com a liberação de DA durante a aprendizagem de outras

tarefas, algumas de natureza apetitiva (Fiorillo, Tobler et al. 2003), outras de natureza aversiva (Matsumoto and Hikosaka 2009). Nosso achado de que a liberação de DA no estriado diminui com o aprendizado é coerente com a teoria do erro de predição: à medida que o animal aprende a fazer uma ação para evitar o choque ele não espera receber o choque e não o recebe. Porém, essa teoria não consegue explicar nossos dados com os animais não treinados que receberam choques imprevisíveis (que não esperavam receber) e inescapáveis e não alteraram os níveis estriatais de DA. O que nossos dados sugerem é que a liberação de DA depende mais da oportunidade de aprendizagem do que da expectativa em relação ao que foi aprendido.

Assim como pacientes com a DP (Grahn, Parkinson et al. 2009), nesse estudo, os ratos lesados com MPTP na SNc tiveram dificuldade em escolher e/ou iniciar as ações apropriadas, assim como ratos que receberam antagonistas dopaminérgicos. Tal efeito pode ser resultado de uma deficiência no tônus de DA para estimular receptores dopaminérgicos estriatais do tipo D1 da via direta, responsável pela desinibição de uma ação específica previamente reforçada (Da Cunha, Wietzikoski et al. 2009 b).

Além da dificuldade de iniciar respostas aprendidas, prejuízos de aprendizagem também têm sido observados em camundongos e macacos modelos da DP, assim como em pacientes com essa doença (Kimura 1995; Grahn, Parkinson et al. 2009). Tais prejuízos também estão de acordo com o papel sugerido pela liberação fásica de dopamina em reforçar a aprendizagem (Da Cunha, Wietzikoski et al. 2009 b). Tal como discutido acima, há evidências de que a atividade fásica dos neurônios dopaminérgicos sinalize uma recompensa (Schultz 2010) ou um estímulo aversivo (Horvitz 2009; Matsumoto and Hikosaka 2009) não esperado. A ativação dos receptores dopaminérgicos reforça as sinapses córtico-estriatais entre neurônios pré- e pós-sinápticos da via direta, que são ativados ao mesmo tempo (potenciação de longa duração, LTP do inglês *long-term potentiation*), de forma que a reativação de tais neurônios seja facilitada frente à repetição do mesmo estímulo que desencadeou a recompensa. Por outro lado, quando uma memória leva a um erro (erro de predição), um novo aprendizado deve ocorrer. Nesse caso, a liberação de DA no estriado é reduzida e as sinapses entre os neurônios da via direta que a codificavam são enfraquecidas (depressão de longa duração, LTD do inglês *long-term depression*). Ao mesmo tempo, esses fenômenos ocorrem de maneira oposta

nas sinapses córtico-estriatais da via indireta, ou seja, LTD durante a aprendizagem e LTP durante a extinção da memória (Calabresi, Picconi et al. 2007; Wickens 2009). Este mecanismo aumenta a probabilidade de que um estímulo pareado a uma recompensa ou punição possa desencadear a ação realizada para se obter a recompensa ou se esquivar da punição (Da Cunha, Wietzikoski et al. 2009 b).

Podemos sugerir, portanto, um mecanismo similar para a aprendizagem da esQUIVA: o desencadeamento da execução de uma ação que interrompa um estímulo aversivo ou seu sinal de alerta deve aumentar com o treino em virtude de uma liberação fásica de DA até que, após o aprendizado, essa liberação não seja mais necessária. Foi o que observamos nesse estudo.

O estriado está envolvido com o processo de aprendizagem. Sabe-se que dois sistemas de memória são reconhecidos: o sistema de memória declarativa, que está sob o controle do hipocampo (Alonso, Vianna et al. 2002; Amaral, Luft et al. 2007); e os sistemas de memória não-declarativas, que incluem o condicionamento clássico Pavloviano, e as memórias de procedimentos (habilidades, respostas direcionadas a um objetivo e os hábitos S-R) estando esses últimos sob o controle do estriado e suas conexões. Nesse trabalho, estudamos o sistema de memória de procedimentos, onde os animais reforçam conexões entre os neurônios que representam dicas preditivas (som, CS) e respostas comportamentais que possam evitar a apresentação de um estímulo incondicionado (choque nas patas). Como resultado, eles aprendem a executar uma ação de respostas motoras ao CS, as quais, quando automatizadas, se tornam o que se pode chamar de hábitos. Essas respostas podem ser chamadas de respostas condicionadas de esQUIVA (CAR, do inglês *conditioned avoidance response*). Sabe-se também que as conexões de percepção do CS e a expressão da resposta condicionada mudam da primeira associação em relação àquelas que acontecem quando a tarefa está aprendida (Cammarota, Bevilaqua et al. 2005; Izquierdo, Bevilaqua et al. 2006; Eichenbaum 2008; Da Cunha, Wietzikoski et al. 2009 b). Além da importância da DA na aquisição das memórias de procedimentos, ela também participa do processo de consolidação de memórias declarativas. Atuando em receptores tipo D1 no hipocampo, a DA estabiliza a atividade elétrica das células de lugar hipocampais (Tran AH, Uwano T et al. 2008), propiciando uma maior persistência dessas memórias (Rossato, LR et al. 2009).

Em conjunto esses estudos sugerem a participação da DA promovendo a aquisição e a evocação de memórias que levam a escolhas das ações certas para responder aos estímulos que sinalizam a consequência das escolhas.

7. Conclusão

Nossos estudos permitem verificar a importância da DA tanto na ausência de alterações motoras na fase inicial da DP quanto na aprendizagem condicionada de esquiva. É possível que na fase inicial da DP, como o proposto modelo de MPTP em ratos, não há prejuízos motores devido a mecanismos fisiológicos que compensam pela perda parcial de terminais dopaminérgicos no estriado, normalizando o DA_E . Há também fortes evidências de que, pelo menos durante o treino na esquiva ativa de 2-vias, a DA é liberada no estriado, não para codificar o valor hedônico ou a saliência de um estímulo, mas para promover o aprendizado de como prever a iminência da apresentação do US e de como evitá-lo.

8. Referências Bibliográficas

- Abbott, A. (2010). "Levodopa: the story so far" Nature **466**: S6-S7.
- Abeliovich, A. (2010). "Parkinson's disease: Mitochondrial damage control" Nature **463**: 744-745.
- Agid, Y. (1991). "Parkinson's disease: pathophysiology." Lancet **337**: 1321-1324.
- Alonso, M., M. R. M. Vianna, et al. (2002). "BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation." Hippocampus **12**(4): 551-560.
- Amaral, O. B., T. Luft, et al. (2007). "Temporary inactivation of the dorsal hippocampus induces a transient impairment in retrieval of aversive memory." Behavioural Brain Research **180**(2): 113-118.
- Bacon, G. S. and S. Totterdell (2000). "A comparative analysis of the neuroanatomy of serotonin input onto dopamine neurons in the rat substantia nigra and ventral tegmental area." European Journal of Neuroscience **12**: 240-240.
- Balleine, B. W., M. Liljeholm, et al. (2009). "The integrative function of the basal ganglia in instrumental conditioning." Behavioural Brain Research **199**(1): 43-52.
- Beal, M. F. (2001). "Experimental models of Parkinson's disease." Nature Reviews Neuroscience **2**(5): 325-332.
- Beal, M. F. (2010). "Parkinson's disease: a model dilemma" Nature **466**: S8-S10.
- Bellissimo, M. I., I. Kouzmine, et al. (2004). "Is the unilateral lesion of the left substantia nigra pars compacta sufficient to induce working memory impairment in rats?" Neurobiology of Learning and Memory **82**(2): 150-158.
- Beninger, R. J. (1983). "The role of dopamine in locomotor activity and learning." Brain Res **287**(2): 173-96.
- Benveniste, H. and P. C. Hüttemeier (1990). "Microdialysis--Theory and application." Progress in Neurobiology **35**(3): 195-215.
- Berridge, K. C. (2007). "The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience." Psychopharmacology **131**: 391-431.
- Betarbet, R., T. B. Sherer, et al. (2002). "Animal models of Parkinson's disease." Bioessays **24**(4): 308-318.
- Blum, D., S. Torch, et al. (2001). "Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease." Progress in Neurobiology **65**(2): 135-172.

- Boyce, S., E. Kelly, et al. (1984). "Repeated administration of N-methyl-4-phenyl 1,2,5,6-tetrahydropyridine to rats is not toxic to striatal dopamine neurones." Biochemical Pharmacology **33**(11): 1747-1752.
- Braga, R., I. Kouzmine, et al. (2005). "Lesion of the substantia nigra, pars compacta impairs delayed alternation in a Y-maze in rats." Experimental Neurology **192**(1): 134-141.
- Brischoux, F., S. Chakraborty, et al. (2009). "Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**: 4893-4899.
- Budygin, E. A., M. R. Kilpatrick, et al. (2000). "Correlation between behavior and extracellular dopamine levels in rat striatum: comparison of microdialysis and fast-scan cyclic voltammetry." Neuroscience Letters **281**(1): 9-12.
- Calabresi, P., B. Picconi, et al. (2007). "Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity." Trends in Neurosciences **30**(5): 211-9.
- Cammarota, M., L. R. M. Bevilaqua, et al. (2005). "Learning twice is different from learning once and from learning more." Neuroscience **132**(2): 273-279.
- Carbon, M. and R. M. Marie (2003). "Functional imaging of cognition in Parkinson's disease." Current Opinion in Neurology **16**(4): 475-480.
- Cohen, G., P. Pasik, et al. (1984). "Pargyline and Deprenyl Prevent the Neurotoxicity of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine (Mptp) in Monkeys." European Journal of Pharmacology **106**(1): 209-210.
- Cohen, M. X. and M. J. Frank (2009). "Neurocomputational models of basal ganglia function in learning, memory and choice." Behavioural Brain Research **199**(1): 141-156.
- Comoli, E., V. Coizet, et al. (2003). "A direct projection from superior colliculus to substantia nigra for detecting salient visual events." Nature Neuroscience **6**(9): 974-980.
- Da Cunha, C., M. E. M. Angelucci, et al. (2002). "The lesion of the rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons as a model for Parkinson's disease memory disabilities." Cellular and Molecular Neurobiology **22**(3): 227-237.
- Da Cunha, C., M. S. Gevaerd, et al. (2001). "Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia." Behavioural Brain Research **124**(1): 9-18.
- Da Cunha, C., E. C. Wietzikoski, et al. (2009 a). Non-motor function of the midbrain dopaminergic neurons In Di Giovanni, G., Di Matteo, V., Esposito, E. (eds) Birth, Life and Death of Dopaminergic Neurons in the Substantia Nigra, Springer-Verlag/Wien, New York. **73**: 1-19.

- Da Cunha, C., E. C. Wietzikoski, et al. (2009 b). "Learning processing in the basal ganglia: A mosaic of broken mirrors." Behavioural Brain Research **199**(1): 157-170.
- Da Cunha, C., E. C. Wietzikoski, et al. (2008). "Hemiparkinsonian rats rotate toward the side with the weaker dopaminergic neurotransmission." Behavioural Brain Research **189**(2): 364-372.
- Da Cunha, C., S. Wietzikoski, et al. (2003). "Evidence for the substantia nigra pars compacta as an essential component of a memory system independent of the hippocampal memory system." Neurobiology of Learning and Memory **79**(3): 236-242.
- Dauer, W. and S. Przedborski (2003). "Parkinson's disease: Mechanisms and models." Neuron **39**(6): 889-909.
- Di Filippo, M., B. Picconi, et al. (2009). "Short-term and long-term plasticity at corticostriatal synapses: Implications for learning and memory." Behavioural Brain Research **199**: 108-118.
- Dombrowski, P. A., M. C. Carvalho, et al. (2010). "Microdialysis study of striatal dopamine in MPTP-hemilesioned rats challenged with apomorphine and amphetamine." Behavioural Brain Research **215**(1): 63-70.
- Domjan, M. and B. Burkhard (1982). The principles of learning and behavior. California, Brooks/Cole Publishing Company.
- Dubois, B. and B. Pillon (1997). "Cognitive deficits in Parkinson's disease." J Neurol **244**(1): 2-8.
- Eichenbaum, H. (2001). "The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes." Behavioural Brain Research **127**(1-2): 199-207.
- Eichenbaum, H. (2008). Learning & Memory. New York London, Norton & Company.
- Fearnley, J. M. and A. J. Lees (1991). "Aging and Parkinson's-Disease - Substantia-Nigra Regional Selectivity." Brain **114**: 2283-2301.
- Ferro, M. M., M. I. Bellissimo, et al. (2005). "Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: Histological, neurochemical, motor and memory alterations." Journal of Neuroscience Methods **148**(1): 78-87.
- Fiorillo, C. D., P. N. Tobler, et al. (2003). "Discrete coding of reward probability and uncertainty by dopamine neurons." Science **299**(5614): 1898-1902.
- Flint, M. B. (2001). "Experimental models of Parkinson's disease." Nature reviews **2**: 325-332.

- Forno, L. S. (1996). "Neuropathology of Parkinson's disease." Journal of Neuropathology and Experimental Neurology **55**(3): 259-272.
- Frank, M. J. (2006). "Hold your horses: A dynamic computational role for the subthalamic nucleus in decision making." Neural Networks **19**(8): 1120-1136.
- Gao, D. M., L. Jeaugey, et al. (1990). "Intensity-Dependent Nociceptive Responses from Presumed Dopaminergic-Neurons of the Substantia-Nigra, Pars Compacta in the Rat and Their Modification by Lateral Habenula Inputs." Brain Research **529**(1-2): 315-319.
- Georges, F. and G. Aston-Jones (2002). "Activation of ventral tegmental area cells by the bed nucleus of the stria terminalis: A novel excitatory amino acid input to midbrain dopamine neurons." Journal of Neuroscience **22**(12): 5173-5187.
- Gerfen, C. R. (2004). In: Paxinos, G. The rat nervous system. Australia, Academic press.
- Gerlach, M. and P. Riederer (1996). "Animal models of Parkinson's disease: An empirical comparison with the phenomenology of the disease in man." Journal of Neural Transmission **103**(8-9): 987-1041.
- Gevaerd, M. S., E. Miyoshi, et al. (2001). "L-dopa restores striatal dopamine level but fails m to reverse MPTP-induced memory deficits in rats." International Journal of Neuropsychopharmacology **4**(4): 361-370.
- Gevaerd, M. S., R. N. Takahashi, et al. (2001). "Caffeine reverses the memory disruption induced by intra-nigral MPTP-injection in rats." Brain Research Bulletin **55**(1): 101-106.
- Giovanni, A., B. A. Sieber, et al. (1994 a). "Studies on Species Sensitivity to the Dopaminergic Neurotoxin 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine .1. Systemic Administration." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **270**(3): 1000-1007.
- Giovanni, A., P. K. Sonsalla, et al. (1994 b). "Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine .2. Central administration of 1-methyl-4-phenylpyridinium." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **270**(3): 1008-1014.
- Goto, Y., S. Otani, et al. (2007). "The Yin and Yang of dopamine release: a new perspective." Neuropharmacology **53**: 583-587.
- Grahn, J. A., J. A. Parkinson, et al. (2009). "The role of the basal ganglia in learning and memory: neuropsychological studies." Behavioural Brain Research **199**: 53-60.
- Grayson, M. (2010). "Parkinson's disease " Nature Biotechnology **466**: S1.

- Halbach, O. v. B. u., A. Schober, et al. (2004). "Genes, proteins, and neurotoxins involved in Parkinson's disease." Progress in Neurobiology **73**(3): 151-177.
- Harik, S. I., J. W. Schmidley, et al. (1987). "On the mechanisms underlying 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity: the effect of perinigral infusion of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, its metabolite and their analogs in rat. ." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **241**: 669-676.
- Heikkila, R. E., F. S. Cabbat, et al. (1984). "Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine on neostriatal dopamine in mice." Neuropharmacology **23**(6): 711-713.
- Heikkila, R. E., W. J. Nicklas, et al. (1985). "Dopaminergic toxicity after the stereotaxic administration of the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) to rats." Neuroscience Letters **59**(1): 135-140.
- Hernandez-Lopez, S., J. Bargas, et al. (1997). "D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca²⁺ conductance." Journal Neuroscience **17**: 3334-42.
- Hirsch, E., A. M. Graybiel, et al. (1988). "Melanized Dopaminergic-Neurons Are Differentially Susceptible to Degeneration in Parkinsons-Disease." Nature **334**(6180): 345-348.
- Hirschhorn, I. D., D. Hittner, et al. (1983). "Evidence for a Role of Endogenous Opioids in the Nigrostriatal System - Influence of Naloxone and Morphine on Nigrostriatal Dopaminergic Super-Sensitivity." Brain Research **270**(1): 109-117.
- Horvitz, J. C. (2009). "Stimulus-response and response-outcome learning mechanisms in the striatum." Behavioural Brain Research **199**(1): 129-140.
- Hughes, A. J., S. E. Daniel, et al. (1992). "Accuracy of Clinical-Diagnosis of Idiopathic Parkinsons-Disease - a Clinicopathological Study of 100 Cases." Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry **55**(3): 181-184.
- Irwin, I. and J. William Langston (1985). "II. Selective accumulation of MPP+ in the substantia nigra: A key to neurotoxicity?" Life Sciences **36**(3): 207-212.
- Izquierdo, I. (2002). Memória. Artmed, Porto Alegre.
- Izquierdo, I., L. R. M. Bevilaqua, et al. (2006). "The connection between the hippocampal and the striatal memory systems of the brain: a review of recent findings." Neurotoxicity Research **10**(2): 113-121.
- Janhunen, S. and L. Ahtee (2007). "Differential nicotinic regulation of the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways: Implications for drug development." Neuroscience & Biobehavioral Reviews **31**(3): 287-314.

- Jankovic, J. (2008). "Parkinson's disease: clinical features and diagnosis." Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry **79**(4): 368-376.
- Ji, H. F. and P. D. Shepard (2007). "Lateral habenula stimulation inhibits rat midbrain dopamine neurons through a GABA(A) receptor-mediated mechanism." Journal of Neuroscience **27**(26): 6923-6930.
- Jolly, D. and P. Vezina (1996). "In vivo microdialysis in the rat: low cost and low labor construction of a small diameter, removable, concentric-style microdialysis probe system." Journal of Neuroscience Methods **68**(2): 259-267.
- Jones, R. (2010). "Biomarkers: casting the net wide" Nature **466**: S11-S12.
- Kahle, P. J., C. Haass, et al. (2002). "Structure/function of alpha-synuclein in health and disease: rational development of animal models for Parkinson's and related diseases." Journal of Neurochemistry **82**(3): 449-457.
- Kandel, E. R. (2000). Principles of neural science. London, Appleton & Lange.
- Kimura, M. (1995). "Role of basal ganglia in behavioral learning." Neuroscience Research **22**(4): 353-358.
- Kravitz, A. V., B. S. Freeze, et al. (2010). "Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry " Nature **466**: 622-626.
- Kumar, P., R. K. Kaundal, et al. (2009). "Beneficial effects of pioglitazone on cognitive impairment in MPTP model of Parkinson's disease." Behavioural Brain Research **197**(2): 398-403.
- Lane, E. L., S. Cheetham, et al. (2005). "Dopamine uptake inhibitor-induced rotation in 6-hydroxydopamine-lesioned rats involves both D-1 and D-2 receptors but is modulated through 5-hydroxytryptamine and noradrenaline receptors." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **312**(3): 1124-1131.
- Langston, J. W., P. Ballard, et al. (1983). "Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis." Science **219**(4587): 979-980.
- Langston, J. W., L. S. Forno, et al. (1984). "Selective Nigral Toxicity after Systemic Administration of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,5,6-Tetrahydropyridine (Mptp) in the Squirrel-Monkey." Brain Research **292**(2): 390-394.
- Lev, N., E. Melamed, et al. (2003). "Apoptosis and Parkinson's disease." Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry **27**(2): 245-250.
- Lima, M. D. S., A. B. Reksidler, et al. (2006). "Different parkinsonism models produce a time-dependent induction of COX-2 in the substantia nigra of rats." Brain Research **1101**: 117-125.

- Matsumoto, M. and O. Hikosaka (2009). "Two types of dopamine neuron distinctly convey positive and negative motivational signals." Nature **459**: 838-842.
- Mayo, J. C., R. M. Sainz, et al. (2005). "Melatonin and Parkinson's disease." Endocrine **27**(2): 169-178.
- McGeer, P. L., S. Itagaki, et al. (1989). "Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process." Annals of Neurology **24**: 574-576.
- Menezes, M. S. T., H.A.G. (2003). "Doença de Parkinson."
- Miyoshi, E., S. Wietzikoski, et al. (2002). "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**(1): 41-7.
- Morris, G., R. Schmidt, et al. (2010). "Striatal action-learning based on dopamine concentration." Experimental Brain Research **200**(3-4): 307-317.
- Mytilineou, C., G. Cohen, et al. (1985). "1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) is toxic to mesencephalic dopamine neurons in culture." Neuroscience Letters **57**(1): 19-24.
- Nicklas, W. J., S. K. Youngster, et al. (1987). "Mptp, Mpp+ and Mitochondrial-Function." Life Sciences **40**(8): 721-729.
- Nicola, S. M. (2007). "The nucleus accumbens as part of a basal ganglia action selection circuit." Psychopharmacology **191**(3): 521-550.
- Nicola, S. M., D. T. Surmeier, et al. (2000). "Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens." Annual Review of Neuroscience **23**: 185-215.
- Oades, R. D. and G. M. Halliday (1987). "Ventral tegmental (A10) system - Neurobiology. 1. Anatomy and connectivity." Brain Research Reviews **12**(2): 117-165.
- Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, et al. (2010). "Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle." Nature Medicine **6**: 653-661.
- Obeso, J. A., M. C. Rodriguez-Oroz, et al. (2000). "Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease." Trends in Neurosciences **23**(10): S8-S19.
- Ogawa, N., K. Mizukawa, et al. (1987). "Mptp-Induced Parkinsonian Model in Mice - Biochemistry, Pharmacology and Behavior." European Neurology **26**: 16-&.
- Olanow, C. W. and W. G. Tatton (1999). "Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease." Annual Review of Neuroscience **22**: 123-144.

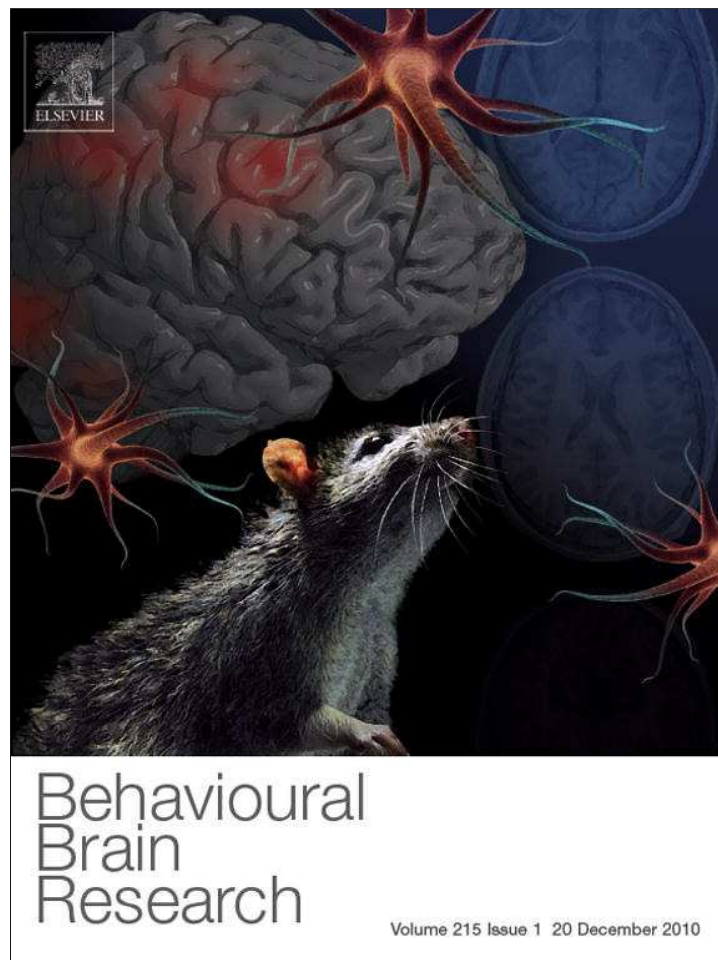
- Omelchenko, N. and S. R. Sesack (2007). "Glutamate synaptic inputs to ventral tegmental area neurons in the rat derive primarily from subcortical sources." Neuroscience **146**(3): 1259-1274.
- Packard, M. G. and J. L. McGaugh (1992). "Double Dissociation of Fornix and Caudate-Nucleus Lesions on Acquisition of 2 Water Maze Tasks - Further Evidence for Multiple Memory-Systems." Behavioral Neuroscience **106**(3): 439-446.
- Parent, A. and L. N. Hazrati (1995). "Functional-anatomy of the basal ganglia .1. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop." Brain Research Reviews **20**(1): 91-127.
- Pavlov, P. I. (1927). Conditioned Reflexes. London, Oxford Univ Press.
- Paxinos, G. (2004). The Rat Nervous System. London, Elsevier Academic Press.
- Perry, J. C., D. C. Hipolide, et al. (2005). "Intra-nigral MPTP lesion in rats: Behavioral and autoradiography studies." Experimental Neurology **195**(2): 322-329.
- Poldrack, R. A. and M. G. Packard (2003). "Competition among multiple memory systems: converging evidence from animal and human brain studies." Neuropsychologia **41**(3): 245-251.
- Przedborski, S. and H. Ischiropoulos (2005). "Reactive oxygen and nitrogen species: Weapons of neuronal destruction in models of Parkinson's disease." Antioxidants & Redox Signaling **7**(5-6): 685-693.
- Redgrave, P., K. Gurney, et al. (2008). "What is reinforced by phasic dopamine signals?" Brain Research Reviews **58**(2): 322-39.
- Reksidler, A. B., M. M. S. Lima, et al. (2008). "Repeated intranigral MPTP administration: A new protocol of prolonged locomotor impairment mimicking Parkinson's disease." Journal of Neuroscience Methods **167**(2): 268-277.
- Reksidler, A. B., M. M. S. Lima, et al. (2009). Distinct effects of intranigral L-DOPA infusion in the MPTP rat model of Parkinson s disease In Di Giovanni, G., Di Matteo, V., Esposito, E. (eds) Birth, Life and Death of Dopaminergic Neurons in the Substantia Nigra, Springer-Verlag/Wien, New York. **73**: 120-130.
- Robinson, T. E., M. Noordhoorn, et al. (1994). "Relationship between asymmetries in striatal dopamine release and the direction of amphetamine-induced rotation during the first week following a unilateral 6-OHDA lesion of the substantia nigra." Synapse **17**(1): 16-25.
- Rossato, J., B. LR, et al. (2009). "Dopamine controls persistence of long-term memory storage" Science **325**(5943): 1017-20
- Salmon, D. P. and N. Butters (1995). "Neurobiology of skill and habit learning." Current Opinion in Neurobiology **5**(2): 184-190.

- Schultz, W. (2006). "Behavioral theories and the neurophysiology of reward." Annual Review of Psychology **57**: 87-115.
- Schultz, W. (2007). "Behavioral dopamine signals." Trends in Neurosciences **30**(5): 203-210.
- Schultz, W. (2010). "Dopamine signals for reward value and risk: basic and recent data." Behavioral and Brain Functions **6**(24): 1-9.
- Schwartz, R. K. W. and J. P. Huston (1996). "The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments." Progress in Neurobiology **50**(2-3): 275-331.
- Siegel, G., R. W. Albers, et al. (2006). Basic Neurochemistry. London, Elsevier.
- Singh, N., V. Pillay, et al. (2007). "Advances in the treatment of Parkinson's disease." Progress in Neurobiology **81**(1): 29-44.
- Smith, K. (2010). "Treatment frontiers" Nature **466**: S15-S18.
- Squire, L. R. (1992). "Memory and the Hippocampus - A Synthesis from findings with Rats, Monkeys, and Humans" Psychological Review **99**(2): 195-231.
- Squire, L. R. (2004 a). "Memory systems of the brain: A brief history and current perspective." Neurobiology of Learning and Memory **82**(3): 171-177.
- Squire, L. R., C. E. Stark, et al. (2004). "The medialtemporal lobe." Annual Review of Neuroscience **27**: 279-306.
- Tadaiesky, M. T., P. A. Dombrowski, et al. (2008). "Emotional, Cognitive and Neurochemical Alterations in a Premotor Stage Model of Parkinson's Disease." Neuroscience **156**(4): 830-840.
- Thal, L., R. K. Mishra, et al. (1979). "Dopamine antagonist binding increases in 2 behaviorally distinct striatal denervation syndromes." Brain Research **170**(2): 381-386.
- Tran AH, Uwano T, et al. (2008). "Dopamine D1 receptor modulates hippocampal representation plasticity to spatial novelty " Journal Neuroscience **28**(50): 13390-400
- Ungerstedt, U. (1968). "6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons." European Journal of Pharmacology **5**(1): 107-110.
- Ungerstedt, U. (1971). "Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxydopamine induced degeneration of nigro-striatal dopamine system." Acta Physiologica Scandinavica: 69-&.

- Ungerstedt, U. and G. W. Arbuthnott (1970). "Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system." Brain Research **24**: 485-493.
- Ungless, M. A. (2004). "Dopamine: the salient issue." Trends in Neurosciences **27**(12): 702-706.
- Wadenberg, M. L. G. and P. B. Hicks (1999). "The conditioned avoidance response test re-evaluated: is it a sensitive test for the detection of potentially atypical antipsychotics?" Neuroscience and Biobehavioral Reviews **23**(6): 851-862.
- White, N. M. (2009). "Some highlights of research on the effects of caudate nucleus lesions over the past 200 years." Behavioural Brain Research **199**: 3-23.
- White, N. M. and R. J. McDonald (2002). "Multiple parallel memory systems in the brain of the rat." Neurobiol Learn Mem **77**(2): 125-84.
- Wickens, J. R. (2009). "Synaptic plasticity in the basal ganglia." Behavioural Brain Research **199**(1): 119-128.
- Williams, R. (2010). "Slowing the decline" Nature **466**: S13-S14.
- Wise, R. A. (2008). "Dopamine and reward: the anhedonia hypothesis 30 years on." Neurotoxicity Research **14**(2-3): 169-183.
- Wu, S. S. and S. J. Frucht (2005). "Treatment of Parkinson's disease - What's on the horizon?" CNS Drugs **19**(9): 723-743.
- Yanagisawa, N. (2006). "Natural history of Parkinson's disease: From dopamine to multiple system involvement." Parkinsonism & Related Disorders **12**: S40-S46.
- Yin, H. H. and B. J. Knowlton (2006). "The role of the basal ganglia in habit formation." Nature Reviews Neuroscience **7**(6): 464-476.
- Youdim, M. B. H. and P. Riederer (1997). "Understanding Parkinson's Disease." Scientific American **276**: 52-59.
- Young, A. M. J. (2004). "Increased extracellular dopamine in nucleus accumbens in response to unconditioned and conditioned aversive stimuli: studies using 1 min microdialysis in rats." Journal of Neuroscience Methods **138**(1-2): 57-63.
- Yuan, H., S. Sarre, et al. (2005). "Histological, behavioural and neurochemical evaluation of medial forebrain bundle and striatal 6-OHDA lesions as rat models of Parkinson's disease." Journal of Neuroscience Methods **144**(1): 35-45.

Anexo 1: artigo científico publicado na revista Behavioural Brain Research (páginas 53 a 61 seguintes).

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbr

Research report

Microdialysis study of striatal dopamine in MPTP-hemilesioned rats challenged with apomorphine and amphetamine

Patricia Andreia Dombrowski^a, Milene Cristina Carvalho^{b,c}, Edmar Miyoshi^a, Diego Correia^a, Mariza Bortolanza^a, Lucélia Mendes dos Santos^a, Evellyn Claudia Wietzikoski^a, Moritz Thede Eckart^d, Rainer K.W. Schwarting^d, Marcus Lira Brandão^{b,c}, Claudio Da Cunha^{a,*}

^a Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Sistema Nervoso Central, Departamento de Farmacologia, UFPR, C.P. 19.031, 81531-980 Curitiba, PR, Brazil

^b Instituto de Neurociências e Comportamento-INEC, Campus USP, 14040-901 Ribeirão Preto, SP, Brazil

^c Laboratório de Psicobiologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), 14040-901 Ribeirão Preto, SP, Brazil

^d Experimental and Physiological Psychology, Philipps-University of Marburg, Gutenbergstr. 18, 35032 Marburg, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 May 2010

Accepted 22 June 2010

Available online 1 July 2010

Keywords:

Rotation

Turning behaviour

Parkinson's disease

Substantia nigra pars compacta

Striatum

MPTP

Apomorphine

Amphetamine

ABSTRACT

Motor impairments of Parkinson's disease (PD) appear only after the loss of more than 70% of the DAergic neurons of the substantia nigra pars compacta (SNc). An earlier phase of this disease can be modeled in rats that received a unilateral infusion of the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) into the SNc. Though these animals do not present gross motor impairments, they rotate towards the lesioned side when challenged with DAergic drugs, like amphetamine and apomorphine. The present study aimed to test whether these effects occur because the drugs disrupt compensatory mechanisms that keep extracellular levels of dopamine in the striatum (DA_E) unchanged. This hypothesis was tested by an *in vivo* microdialysis study in awake rats with two probes implanted in the right and left striatum. Undrugged rats did not present turning behaviour and their basal DA_E did not differ between the lesioned and sham-lesioned sides. However, after apomorphine treatment, DA_E decreased in both sides, but to a larger extent in the lesioned side at the time the animals started ipsiversive turning behaviour. After amphetamine challenge, DA_E increased in both sides, becoming significantly higher in the non-lesioned side at the time the animals started ipsiversive turning behaviour. These results are in agreement with the hypothesis that absence of gross motor impairments in this rat model of early phase PD depends on maintenance of extracellular DA by mechanisms that may be disrupted by events demanding its alteration to higher or lower levels.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is one of the most studied neurological diseases [63]. Major PD disabilities, including resting tremor, bradykinesia, rigidity and loss of postural reflexes [25], mainly result from the degeneration of DAergic neurons of the substantia nigra pars compacta (SNc) that project to the striatum [22]. However, these signs appear only after about 70–85% loss of these DAergic SNc neurons [2,38].

Nowadays many animal models of PD are available [23], and the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and 6-hydroxydopamine (6-OHDA) models are among the most popular of them [14,50,54]. The infusion of 6-OHDA into the medial fore-brain bundle of rats causes an almost total loss of DAergic SNc neurons and has been taken as a model of the late phase of PD

[17,53,54,60]. The systemic administration of MPTP in monkeys and in the C57BL/6J mice strains also causes progressive loss of DAergic SNc neurons that have been used as models of the different phases of PD [23,26,36,45,55].

The DAergic neurotoxicity of MPTP became evident after the finding that people who accidentally self-administered it presented motor and cognitive signs that closely resembled those observed in PD patients [16,33,34]. However, MPTP does not cause an expressive loss of DAergic neurons when it is systemically administered in rats. A possible explanation for this phenomenon may be the higher activity of monoamine-oxidase in the blood–brain-barrier of the rat brain, an enzyme that converts MPTP into 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) not only in SNc but everywhere in the brain [28]. More recent studies of differential resistance to MPTP observed in several mice strains have suggested alternative mechanisms for the MPTP resistance in rodents, such as differential expression of alpha-synuclein and interleukin-1 beta converting enzyme [15,29,42]. In spite of this resistance, MPTP causes a selective loss of 50–70% of DAergic neurons when infused directly

* Corresponding author. Tel.: +55 41 3361 1717; fax: +55 41 3266 2042.

E-mail addresses: dacunha@ufpr.br, dacunha62@uol.com.br (C. Da Cunha).

and in high concentration into the rat SNc [14,18,21]. Following such MPTP infusions, the rats present hypokinesia that disappears after a few days [37] and, 3 weeks later, they present no gross motor impairment [18], but marked cognitive impairments [3,11,12,31,39]. Due to these peculiarities, MPTP rats have been used as a model of the early phase of PD [11,31,44,59].

Rats with unilateral lesions of the SNc induced by 6-OHDA present turning behaviour when challenged with DA receptor agonist drugs, like apomorphine and amphetamine [14,54,62]. Apomorphine is a direct agonist of D2- and D1-like DA receptors (D1Rs and D2Rs) and induces contraversive turns, i.e., turns directed to the non-lesioned side. Amphetamine causes the release of DA, thus acting as an indirect agonist on DA receptors and induces ipsiversive turns in 6-OHDA rats, i.e., turns towards the lesioned side. In contrast, rats with a unilateral MPTP lesion respond to both apomorphine and amphetamine challenges with ipsiversive turns. This turning behaviour is attributable to an asymmetrical modulation of the corticostriatal synapses by the nigrostriatal neurons and these animals seem to turn towards the side with the weaker striatal DAergic neurotransmission [14,48]. This DAergic imbalance is determined by the magnitude of DA depletion and by up- or down-regulation of DA receptors [44,61]. When challenged with apomorphine, animals with a small unilateral DA lesion present ipsiversive turning behaviour due to a weaker stimulation of the lesioned side (caused by the loss of DA), whereas animals with an almost total unilateral loss of midbrain DAergic neurons present contraversive turning behaviour due to DA receptor supersensitivity [14].

It is possible that, in the early phase of PD, as modeled by the MPTP rat model, extracellular DA concentration in the striatum (DA_E) remains just above a minimal threshold, which is needed for normal motor behaviours, whereas DAergic demands on phasic increase or depression of DA_E are defective [20,51]. The fact that MPTP rats present normal motor behaviour also suggests that they develop mechanisms to compensate for the loss of DAergic neurons, like maintenance of tonic DA release in the striatum.

In view of this, we hypothesize that the absence of gross motor impairments in this rat model of early phase PD depends on maintenance of basal DA_E by mechanisms that can be disrupted by events demanding its alteration to higher or lower levels. Therefore, we make the following predictions for MPTP-hemilesioned rats: (i) unaltered basal DA_E during the absence of turning behaviour; (ii) unequal DA_E changes in the lesioned and non-lesioned sides in response to drugs that alter DA release; (iii) turning behaviour starting when DA_E in the lesioned and non-lesioned sides become asymmetric; (iv) turning behaviour towards the side with lower DA_E . The last prediction is based on the premise that turning behaviour arises from higher motor activity on the side contralateral to the striatum with higher activation of DA receptors [14].

These predictions were tested by the study of turning behaviour and DA_E in samples collected from rats with two microdialysis probes implanted in the right and left striatum of MPTP-hemilesioned and non-lesioned rats, at the time they were challenged with apomorphine or amphetamine.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Adult male Wistar rats from our own breeding stock, weighing 250–290 g at the beginning of the experiments were used. The animals were maintained in a temperature-controlled room ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) on a 12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m.), with food and water available *ad libitum*. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering. The experimental procedures were in compliance with the guidelines with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and the Brazilian Society for Neuroscience and Behaviour, and they were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Federal University of Parana State (protocol number 353).

2.2. Surgeries

Twenty minutes before surgery, the animals received atropine sulfate (0.4 mg/kg, i.p., Sigma–Aldrich, Saint Louis, USA) and penicillin G-procaine (20,000 U in 0.1 ml, i.m., Bristol-Myers Squibb, New York, USA), and were anaesthetised with equithesin (3 ml/kg, i.p.; 1% sodium thiopental, 4.25% chloral hydrate, 2.13% magnesium sulfate, 42.8% propyleneglycol and 3.7% ethanol in water). The rats received three injections of acetaldehyde (120 mg/kg, Sigma–Aldrich, i.p., 10 min before and 30 and 60 min after the beginning of surgery). MPTP HCl (2 μg , Sigma–Aldrich) in saline (0.9% NaCl) was infused into the SNc through a 30-gauge stainless steel needle at a rate of 0.25 $\mu\text{l}/\text{min}$. Using the bregma as a reference point, the SNc coordinates were: anteroposterior (AP): -5.0 mm ; mediolateral (ML): $\pm 2.1\text{ mm}$ from the midline; dorsoventral (DV): -7.7 mm from the skull [43]. Sham-operated animals were submitted to the same procedure, but saline was infused into the left or right SNc.

Sixteen days after this surgery, a given rat was anaesthetised again as described above and a microdialysis guide cannula (15 mm length) was implanted into the striatum using the following coordinates from bregma: AP: $+1.2\text{ mm}$; ML: $\pm 4.3\text{ mm}$; DV: -2.8 mm from the skull; angle, 25° [43]. The guide cannula was firmly anchored to the skull with miniature screws and dental cement. At the end of the surgery, each guide cannula was sealed with a stainless steel wire. After 5 days of recovery, the microdialysis experiment was carried out.

The surgical procedures were checked at the end of the experiment. The analysis of the tissue content of DA was carried out in the brains of 5 sham and 11 MPTP animals killed by decapitation. Their right and left striata were dissected on ice and stored at -70°C . The other rats were killed with an overdose of pentobarbital, transcardially perfused with saline, followed by 4% paraformalin, and their brains were processed for the histological analysis of microdialysis probe placement.

2.3. Behavioural procedures and microdialysis

Turning behaviour was video-recorded with the rats individually placed in a round container, and the number of 360° turns towards the lesioned side (ipsiversive) and the turns towards the opposite side (contraversive) was subsequently scored. One week after lesion placement, the animals were challenged with an s.c. injection of 0.5 mg/kg apomorphine HCl (Sigma–Aldrich) and their turning behaviour was scored for 1 h. The animals that presented less than 50 ipsiversive turns were discarded [14]. Turning behaviour was scored again during the microdialysis experiment carried out 3 weeks after the lesion surgery. The animals were placed into the same round container; the microdialysis probes were inserted through the guide cannulae and perfused for 2 h to stabilize DA_E . After 4 baseline samples had been collected (i.e., 1 h later), each animal was challenged with 0.5 mg/kg apomorphine and 2 h later with 2 mg/kg of DL-amphetamine sulfate (in saline, i.p., Sigma–Aldrich). The doses of apomorphine and amphetamine used to induce turning behaviour were chosen based on a previous study from our laboratory with MPTP rats [14].

The microdialysis probes were of concentric design, as described elsewhere [27,40]. The membrane had an outer diameter of $300\text{ }\mu\text{m}$ and permeability of 6 kDa (Cuprophane; Akzo, Wuppertal, Germany) with active membrane lengths of 4 mm. The microdialysis probe was perfused with Ringer's solution (in mM: NaCl, 145.0; KCl, 2.7; CaCl_2 , 1.2; MgCl_2 , 1.0, pH = 7.4) at a constant flow rate of 1.2 $\mu\text{l}/\text{min}$ (microinjection pump, Insight Equipment, Ribeirão Preto, Brazil).

Microdialysis samples were collected every 15 min. Following the 2-h equilibrium period, 4 baseline samples were collected followed by 9 samples after the administration of apomorphine, and 5 samples after the administration of amphetamine. All microdialysis samples were collected into polyethylene tubes containing 15 μl of 0.1 M perchloric acid solution (Merck, Darmstadt, Germany), 50 ng/ml dihydroxybenzylamine (DHBA; Sigma–Aldrich) as an internal standard, and 0.06% sodium metabisulfite (Sigma–Aldrich). The samples were stored at -70°C until high performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ED) analysis.

2.4. Determination of DA and metabolites by HPLC-ED

Two different protocols were used for sample analysis. The HPLC-ED protocol used for the microdialysis samples consisted of a Synergi Fusion-RP C-18 reverse-phase column ($150\text{ mm} \times 2\text{ mm}$, $4\text{ }\mu\text{m}$ particle size; Phenomenex, Torrance, USA) fitted with a $4\text{ mm} \times 3.0\text{ mm}$ pre-column (SecurityGuard Cartridges Fusion-RP; Phenomenex). The dual coulometric electrochemical detector (ESA Coulochem III Electrochemical Detector, Chelmsford, USA) consists of two cells successively connected; both contain a porous graphite working electrode together with associated reference and counter electrodes. This detector is equipped with a guard cell (ESA 5020) electrode set at $+350\text{ mV}$ and the working electrodes (5014B microdialysis cell, ESA) set at $E1 = +100$ and $E2 = +450\text{ mV}$ versus a solid state palladium reference electrode. A LC-20AT pump (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a manual injector (Rheodyne 7725, Cotati, USA) with a $20\text{ }\mu\text{l}$ loop was used. The column was maintained inside a temperature-controlled oven (25°C , Shimadzu). The mobile phase, used at a flow rate of 0.2 ml/min, had the following composition: 20 g citric acid monohydrated, 200 mg octane-1-sulfonic acid sodium salt, 40 mg ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 900 ml HPLC-grade water, 10% methanol and pH 4.

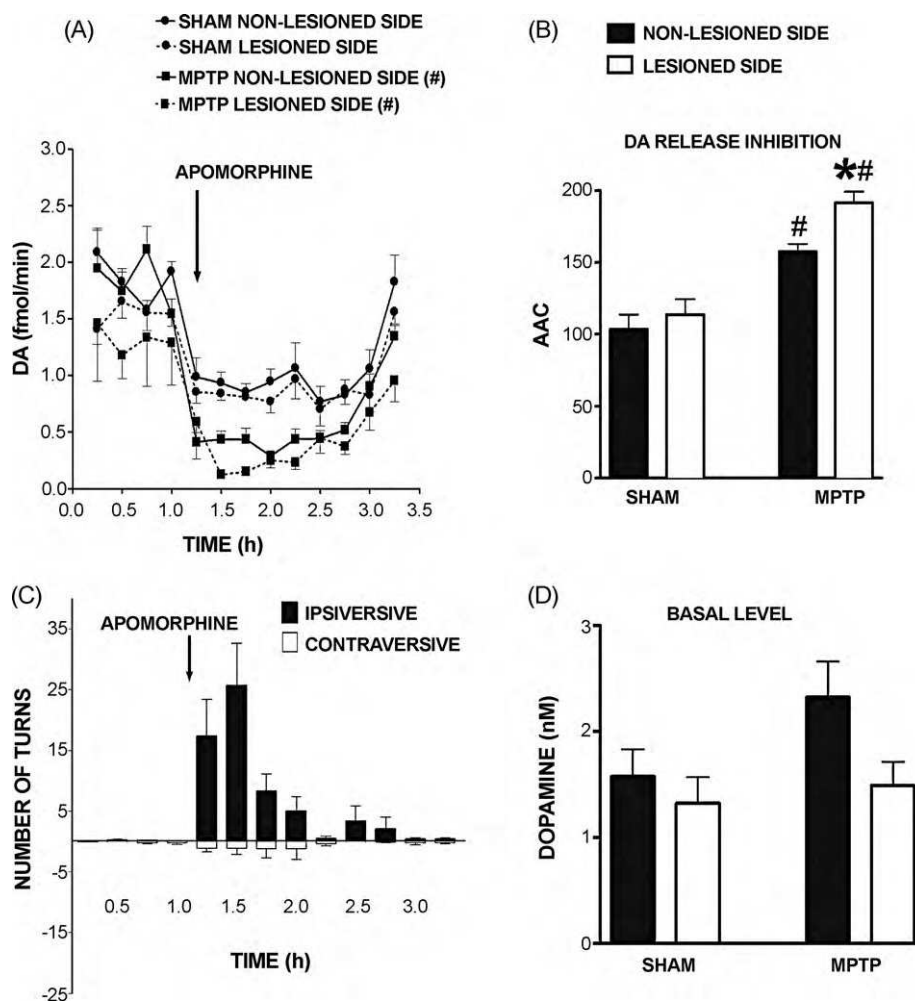


Fig. 1. Effects of the s.c. injection of 0.5 mg/kg apomorphine in MPTP-hemilesioned rats on the extracellular levels of striatal DA and turning behaviour. The arrow indicates the timing of the apomorphine injection. Data are expressed as mean \pm SEM of DA (panel A), area above the curve (AAC) (panel B), number of turns (panel C), and the basal concentration of DA (panel D). MPTP ($n = 11$); sham ($n = 8$). * $P < 0.05$, compared to the non-lesioned side; # $P < 0.05$, compared to the corresponding side of sham rats; ANOVA followed by the Newman–Keuls test.

Another protocol was used to analyse the striatum tissue samples post-mortem. The samples were homogenised with an ultrasonic cell disrupter (Sonic, Newtown, USA) in 0.1 M perchloric acid containing 0.02% sodium metabisulfite and the same internal standard. After centrifugation at $10,000 \times g$ for 30 min, 4°C , 20 μl of the supernatant was injected into the chromatograph. The same HPLC-ED equipment was used, but with a Synergi Fusion-RP C-18 reverse-phase column (150 mm \times 4.60 mm, 4 μm particle size; Phenomenex) and the working electrodes (5011A analytical cell, ESA) set at $E_1 = +100$ and $E_2 = +450$ mV versus a solid state palladium reference electrode. The mobile phase, used at a flow rate of 1 ml/min, had the same composition cited above. The peak areas of the external standards were used to quantify the concentration of DA, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA) in the samples.

2.5. Histological control of lesion and microdialysis probe placement

The brains were post-fixed in a 4% formalin solution (containing 20% sucrose) and were then sliced with a vibratome (Leica, Wetzlar, Germany) in series of 40 μm coronal sections of the region of the striatum and midbrain, and mounted on gelatin-coated slides. The striatal series was stained with thionin and the adjacent slices of this series were immunostained for tyrosine hydroxylase (TH). The series of the mid-brain was stained only for TH, using a monoclonal anti-TH antibody raised in mice (Incstar Corp., Stillwater, USA), followed by appropriate Vector Laboratories ABC Elite kit (Burlingame, USA). Localization of the microdialysis probes was evaluated by microscopic examination and compared with the atlas of Paxinos and Watson [43].

2.6. Data analysis

Data of the microdialysis temporal curves are expressed as mean \pm SEM of DA (fmol/min). The increase in DA release was calculated as the area under the curve

(AUC, Fig. 2B). The decrease in DA release was expressed as the area above the curve (AAC, Fig. 1B). The data were analysed by two or three-way ANOVA followed by the Newman–Keuls post hoc test. Differences among groups were considered significant if $P < 0.05$. All analyses were accomplished by employing GraphPad Prism (4.0) (software, Inc. San Diego, USA).

3. Results

3.1. Turning behaviour

The MPTP rats presented ipsiversive turning behaviour for nearly 1 h after receiving 0.5 mg/kg apomorphine (Fig. 1C). They also presented both ipsiversive and contraversive turning behaviour for more than 1 h after receiving 2 mg/kg amphetamine (Fig. 2C); again, the majority of turns were ipsiversive. Turning behaviour was not observed after saline (data not shown). Sham rats presented ipsiversive and contraversive turning behaviour in response to both drugs, but without a bias in direction (data not shown).

3.2. Effects of apomorphine on DA release

The changes of the extracellular levels of striatal DA (DA_E) in response to a challenge with apomorphine are shown in Fig. 1. A two-way ANOVA showed that basal DA_E (Fig. 1D) pre-

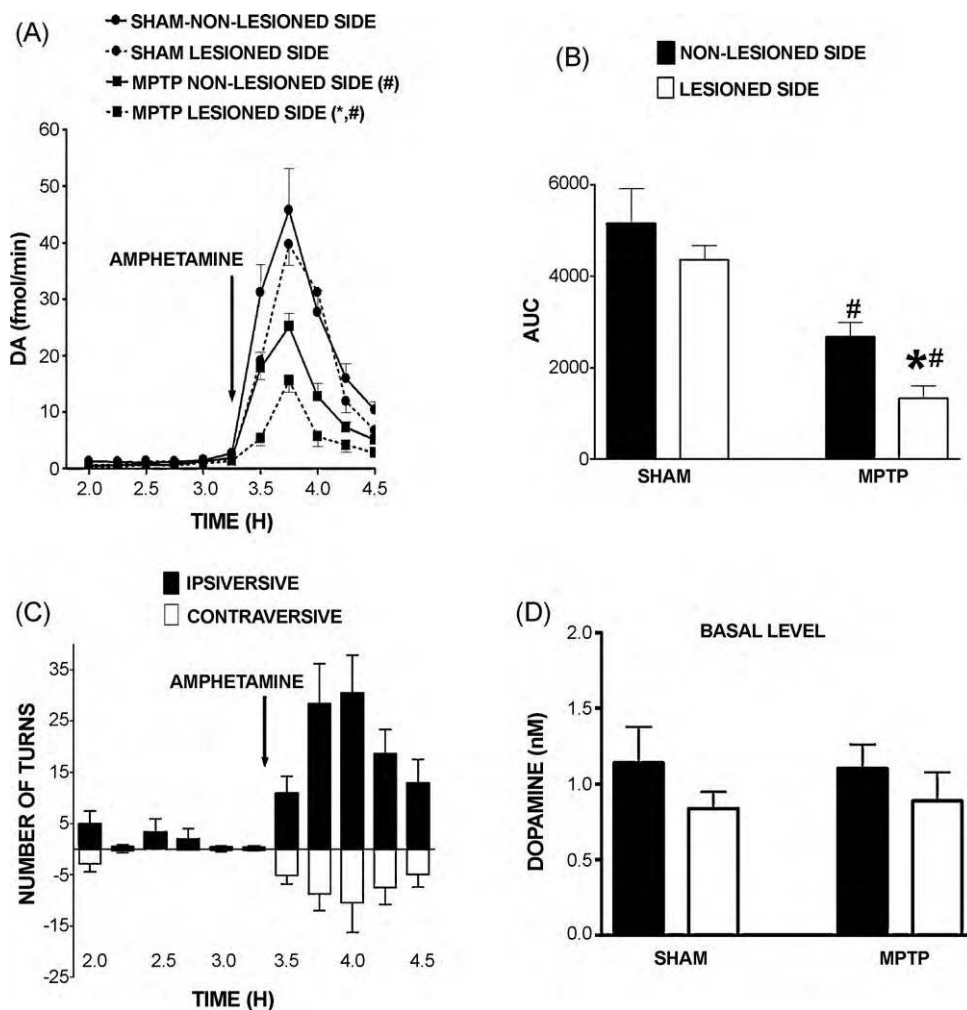


Fig. 2. Effects of the i.p. injection of 2.0 mg/kg amphetamine in MPTP-hemilesioned rats on the extracellular levels of striatal DA and turning behaviour. The arrow indicates the timing of the amphetamine injection. Data are expressed as mean \pm SEM of DA (panel A), area under the curve (AUC) (panel B), number of turns (panel C), and the basal concentration of DA (panel D). MPTP ($n = 11$); sham ($n = 8$). * $P < 0.05$, compared to the non-lesioned side; # $P < 0.05$, compared to the corresponding side of sham rats; ANOVA followed by the Newman–Keuls test.

sented non-significant treatment ($F(1,33) = 2.72, P = 0.11$) and side ($F(1,33) = 3.84, P = 0.06$) effects, and a non-significant interaction between these factors ($F(1,33) = 1.10, P = 0.30$). The basal DA_E was calculated as the mean DA concentration in the 3 samples collected immediately before the apomorphine injection. This mean value was considered as 100%.

After drug treatment, and at the same time that the animals responded with ipsiversive turns (Fig. 1C), there was a significant decrease in the level of DA which was lower in the MPTP rats (Fig. 1A). A three-way ANOVA showed significant treatment ($F(1,32) = 26.62, P < 0.05$) and time ($F(7,224) = 25.93, P < 0.05$) effects, non-significant side effect ($F(1,32) = 3.07, P = 0.08$) and no significant interaction among these factors ($P > 0.27$). Note that after apomorphine injection, even the non-lesioned side of the MPTP rats presented significantly lower DA_E compared to that of sham rats.

The same findings can be seen in the analysis of the AAC (Fig. 1B). A two-way ANOVA showed significant treatment ($F(1,34) = 60.86, P < 0.05$) and side ($F(1,34) = 6.90, P < 0.05$) effects. On the other hand, the analysis did not show significant interaction between these factors ($F(1,34) = 1.97, P > 0.05$). Newman–Keuls post hoc comparisons among the groups can be seen in the legend of Fig. 1.

Basal DOPAC_E did not differ among groups. A two-way ANOVA showed no significant treatment ($F(1,33) = 0.37, P > 0.05$), side ($F(1,33) = 0.48, P > 0.05$) and interaction effects ($F(1,33) = 1.21,$

$P > 0.05$) (data not shown). After apomorphine treatment, there was a trend in the time factor ($F(7,210) = 2.00, P = 0.05$), as revealed by three-way ANOVA. Besides, this analysis also showed a significant difference in the treatment factor ($F(1,30) = 23.49, P < 0.05$). However, no significant difference in the side factor ($F(1,30) = 0.90, P > 0.05$) was observed (data not shown).

3.3. Effects of amphetamine on DA release

The changes in DA_E in response to a challenge with amphetamine are shown in Fig. 2. The basal DA_E is presented in Fig. 2D, and there was no significant difference between treatment ($F(1,33) = 0.001, P > 0.05$), side ($F(1,33) = 1.92, P > 0.05$) and interaction between these factors ($F(1,33) = 0.059, P > 0.05$). This basal DA_E was calculated as the mean DA concentration of the 3 samples collected immediately before amphetamine injection, and at the same time that the animals responded with ipsiversive turns (Fig. 2C), a significant increase in DA_E was observed which was lower in MPTP as compared to sham rats (Fig. 2A). A three-way ANOVA showed significant treatment ($F(1,26) = 25.15, P < 0.05$), side ($F(1,26) = 7.16, P < 0.05$) and time ($F(5,130) = 118.36, P < 0.05$) effects. This analysis also showed significant interactions between the treatment versus time factors ($F(5,130) = 15.38, P < 0.05$), and side versus time factors ($F(5,130) = 4.82, P < 0.05$). No significant effect was observed between treatment versus side factors ($F(1,26) = 0.04, P > 0.05$), or

among the three factors ($F(5,130)=0.70, P>0.05$). Similarly to what happened after apomorphine injection, after the amphetamine injection even the non-lesioned side of MPTP rats presented significantly lower DA_E as compared to sham rats.

The same findings were obtained by the analysis of the AUC (Fig. 2B). A two-way ANOVA showed a significant treatment ($F(1,34)=42.70, P<0.05$) and side ($F(1,34)=6.50, P<0.05$) effects, but no significant interaction between these factors ($F(1,34)=0.43, P>0.05$). Newman–Keuls post hoc comparisons among the groups can be seen in Fig. 2.

Although the ANOVA showed a significant side effect for basal $DOPAC_E$ ($F(1,34)=4.74, P<0.05$), the post hoc analysis did not show a significant difference between the two sides of the MPTP rats. The ANOVA showed neither significant treatment effects ($F(1,34)=0.15, P>0.05$), nor an interaction between these factors ($F(1,34)=0.69, P>0.05$) (data not shown). After drug treatment, a three-way ANOVA showed a significant time effect ($F(5,115)=6.59, P<0.05$), and a trend for a treatment effect ($F(1,23)=3.40, P=0.07$). However, no significant side effect ($F(1,23)=1.38, P>0.05$) or an interaction among these factors ($P>0.05$) was found (data not shown).

3.4. Striatal post-mortem tissue levels of DA, DOPAC, HVA, and TH-immunostaining

The striatal *post-mortem* analysis showed that MPTP rats had lower tissue contents of DA, DOPAC and HVA in the lesioned side. A two-way ANOVA of DA data showed significant effects of treatment ($F(1,28)=8.31, P<0.05$) and side ($F(1,28)=12.04, P<0.05$), as well as in the interaction between these factors ($F(1,28)=15.27, P<0.05$) (Fig. 3A). The same analysis of DOPAC data showed significant treatment ($F(1,28)=5.22, P<0.05$) and side effects ($F(1,28)=7.49, P<0.05$), as well as in the interaction between these factors ($F(1,28)=14.85, P<0.05$) (Fig. 3B). The same analysis of HVA data showed significant side effects ($F(1,28)=8.91, P<0.05$) and an interaction between the factors ($F(1,28)=13.03, P<0.05$), but no significant treatment effect ($F(1,28)=1.37, P>0.05$) (Fig. 3C). Newman–Keuls post hoc comparisons among the groups can be seen in the legend of Fig. 3.

The lesion with MPTP caused a partial loss of TH-immunostained neurons in the rat midbrain, affecting mostly the SNc and largely sparing the VTA area, as illustrated in Fig. 4. The pattern of loss of the TH-immunostained terminals is also shown in Fig. 4. There, a gradient can be seen, with the loss being more intense in the most lateral and caudal portions of the neostriatum. As shown in Fig. 5, the microdialysis probe was placed obliquely in the neostriatum, with its tip reaching the nucleus accumbens and the upper part in the dorsolateral striatum.

4. Discussion

In the present study we observed no significant alteration in the basal levels of DA_E of undrugged MPTP-hemilesioned rats (Fig. 1D). Furthermore, these rats did not present spontaneous turning behaviour or any other gross motor alteration. However, when treated with apomorphine or amphetamine, their DA_E was altered and they started to rotate (Figs. 1 and 2). Therefore, we can conclude that normal motor functions, here absence of turning behaviour, depend on maintenance of basal neostriatal DA_E .

The present results suggest that the lack of gross motor alterations observed in undrugged MPTP rats [11], which may model patients in the early phase of PD, may be due to compensatory alterations in the release of DA in the remaining DAergic neurons [8,9]. Although MPTP rats lost nearly 50% DA, as measured in post-mortem, they maintained their basal DA_E (Fig. 3). Previous studies also reported a loss of 50–70% DAergic neurons in MPTP rats

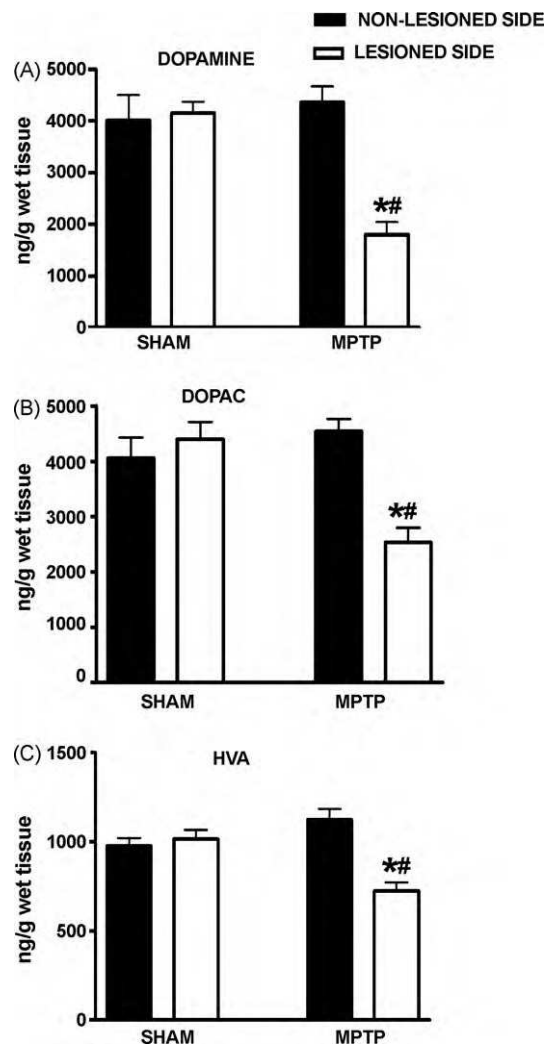


Fig. 3. Striatal levels of DA (A), DOPAC (B) and HVA (C) in MPTP-hemilesioned rats ($n=11$) and sham rats ($n=5$). * $P<0.05$ compared to the non-lesioned side, # $P<0.05$ compared to sham. ANOVA followed by Newman–Keuls test.

[13,18,19,59]. The present study is also in agreement with previous microdialysis [10,48] and voltammetry [4] studies in rats with partial lesions of midbrain DAergic neurons induced by 6-OHDA. These studies have found that rats bearing a unilateral lesion of up to 95% of the midbrain DA neurons (measured by the post-mortem content of DA in striatal tissue) maintained their normal basal DA_E , and one study by Robinson and Whishaw [46] even reported normal DA_E in animals depleted of 99% DA. In most other studies, a marked drop in basal DA_E was observed only in rats with tissue DA depletion greater than 95% [10,24,46,47]. In a recent microdialysis study with MPTP treated monkeys, DA_E was lower in animals with motor impairments and motor recovery was associated with DA_E increase [7].

Various mechanisms may account for the compensatory effect that maintains basal DA_E in animals with partial loss of the SNc DAergic neurons to the level of sham-lesioned animals, including sprouting of the DA terminals in the lesioned side, as reported in monkeys [58] and mice [5] treated with MPTP. In the present study, the density of DA terminals in striatum of the lesioned side did not return to the same level of the non-lesioned side, as shown in Fig. 4.

Another possible mechanism to maintain basal DA_E is the diffusion of DA from the remaining terminals leading to passive stabilization of extrasynaptic transmission in the steady state [4]. This implicates an increase in DA release in the remaining termi-



Fig. 4. Brightfield photomicrographs of tyrosine hydroxylase immunostained. Sections illustrating the loss of the DA terminals in the striatum and the appearance of the substantia nigra pars compacta of an MPTP-hemilesioned rat. CPu, caudate putamen; NAc, nucleus accumbens; SNC, substantia nigra pars compacta; VTA, ventral tegmental area; IAL, interaural line.

nals. The release of DA is under the inhibitory control of the D2Rs [49]. Therefore, our finding that the D2Rs agonist apomorphine [35] lowered DA_E more in MPTP than in sham rats (Fig. 1A and B) suggests that alterations in these receptors may be involved in the compensatory mechanism that keeps the basal DA_E in MPTP rats. This inhibitory effect of apomorphine on the release of DA was also reported by previous studies [32,41] and is attributed to an action on presynaptic D2Rs [1,56,57]. The importance of this class of DA receptors was also stressed in a study by Konitsiotis and Kafetzopoulos [30] showing that blockade of striatal D2Rs increased turning behaviour of rats treated with apomorphine.

Such mechanism may contribute to prevent the appearance of motor disabilities in the early phase of PD [9]. A study by Bezard et

al. [6] reported that in monkeys treated with an MPTP regimen that produced a progressive degeneration of the SNC, parkinsonian signs appeared only after a loss of nearly 45% of tyrosine hydroxylase-immunopositive neurons of the SNC and 80% of its DA terminals. During the pre-symptomatic phase they found a decrease in striatal D2Rs, possibly located mostly on presynaptic terminals. Coincidentally, the decrease in D2Rs density occurred just when DA homeostasis was broken.

In the present study, it is curious to note that, compared to sham rats, even the non-lesioned striatum of the MPTP rats released less DA after apomorphine administration (Fig. 1B). It is unlikely that this was due to a loss of DAergic terminals in the striatum contralateral to the lesioned SNC side, since it would have affected

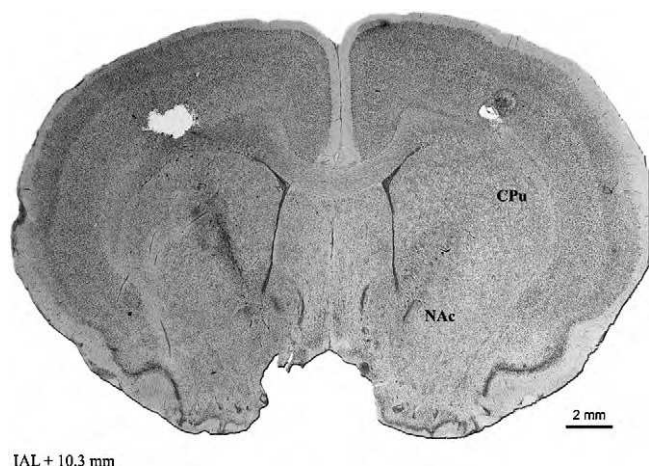


Fig. 5. Brightfield photomicrography of a thionin-stained section illustrating the location of a microdialysis probe in the rat striatum. CPu, caudate putamen; NAc, nucleus accumbens; IAL, interaural line.

DA tissue levels and TH-immunostaining, which did not occur (Figs. 3A and 4).

After challenge with apomorphine (Fig. 1C), MPTP rats rotated only during the period when an asymmetry in DA_E was observed (Fig. 1A). After the beginning of the microdialysis experiment, this asymmetry was higher in the samples collected between 1.5 and 2 h (Fig. 1A), and the animals made more turns between 1.25 and 1.75 h (Fig. 1C). Considering the lag between DA release and the time that it appeared in the samples, it is probable that the animals rotated because extracellular DA was lower in the lesioned side. Apomorphine also activates postsynaptic DA receptors, but to the same extent in the lesion and non-lesioned side. Extracellular DA returned to basal levels nearly 2 h after apomorphine injection (Fig. 1A), but 30 min after apomorphine injection, turning behaviour had declined considerably. After this time, DA_E in the lesioned side of MPTP rats was lower compared to sham, but not compared to the non-lesioned side of MPTP rats.

Asymmetric DA_E of the lesioned side, compared to the non-lesioned side, was also observed when the animals presented ipsiversive turning behaviour in response to the amphetamine challenge. This asymmetry was observed between 3.5 and 4.75 h (Fig. 2A) after the beginning of the experiment, and coincident with the time the animals made more turns (Fig. 2C).

Taken together, the data of the amphetamine and apomorphine experiments suggest that the alteration in basal DA_E is a necessary, but not sufficient, condition to induce turning behaviour. Such turning behaviour seems to depend more on asymmetric DAergic transmission between the two neostriata. In both cases, the animals rotated towards the side with the lower DA_E , a finding in agreement with a previous study [14]. This finding is in line with the hypothesis that rats rotate towards the side with weaker DA neurotransmission. This hypothesis was also supported by a study by Robinson et al. [48]. They showed that, 4 days after surgery, rats with a large unilateral lesion of the SNc, induced by 6-OHDA, presented contraversive turns in response to an amphetamine challenge. However, 8 days after 6-OHDA, these rats responded with ipsiversive turns to the same challenge. Their microdialysis finding showed that, 4 days after surgery, the lesioned neostriata released DA in response to the amphetamine injection, just like the non-lesioned side. They considered that this caused a higher stimulation of DA receptors in the lesioned side because they were supersensitive. Therefore, the rats rotated towards the side with weaker DA neurotransmission. In the present study, contraversive turns in response to amphetamine did not occur because the MPTP lesion did not cause a DA depletion in an extent needed to induce DA

receptor supersensitivity [14,44,61]. On the 8th day of Robinson's experiment, the authors could not observe any release of DA in the lesion side, and the rats rotated towards this side – again, they rotated towards the side with weaker DA neurotransmission.

Therefore, it is possible that, in the early phase of PD, as modeled by the MPTP rat model, motor impairments are spared due to physiological mechanisms that compensate for the partial loss of DAergic terminals in the neostriatum and maintain basal DA_E . However, these mechanisms probably cannot account for a higher demand of DA release, as occurs when an MPTP rat is challenged with amphetamine. In addition, the lesioned side cannot respond in the same way of the non-lesioned to demands to decrease the basal DA_E , as after the apomorphine treatment. Such demands occur under physiological conditions when one faces an unexpected rewarding or aversive event [52] and might affect non-motor functions in the early phase of PD.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the CNPq and CAPES. The authors would like to thank Mrs. Silvia N. Cordazzo, Ms. Jamile Moreira Cugler and Lucas Albrechet-Souza for their technical assistance.

References

- [1] Adell A, Artigas F. The somatodendritic release of dopamine in the ventral tegmental area and its regulation by afferent transmitter systems. *Neurosci Biobehav Rev* 2004;28:415–31.
- [2] Agid Y. Parkinson's disease: pathophysiology. *Lancet* 1991;337:1321–4.
- [3] Bellissimo MI, Kouzmine I, Ferro MM, De Oliveira LH, Canteras NS, Da Cunha C. Is the unilateral lesion of the left substantia nigra pars compacta sufficient to induce working memory impairment in rats? *Neurobiol Learn Mem* 2004;82:150–8.
- [4] Bergstrom BP, Garris PA. "Passive stabilization" Of striatal extracellular dopamine across the lesion spectrum encompassing the presymptomatic phase of Parkinson's disease: a voltammetric study in the 6-OHDA-lesioned rat. *J Neurochem* 2003;87:1224–36.
- [5] Bezdard E, Dovero S, Imbert C, Boraud T, Gross Ce. Spontaneous long-term compensatory dopaminergic sprouting in MPTP-treated mice. *Synapse* 2000;38:363–8.
- [6] Bezdard E, Dovero S, Prunier C, Ravenscroft P, Chalou S, Guilloteau D, et al. Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 2001;21:6853–61.
- [7] Boulet S, Mounayar S, Poupard A, Bertrand A, Jan C, Pessiglione M, et al. Behavioural recovery in MPTP-treated monkeys: neurochemical mechanisms studied by intra-striatal microdialysis. *J Neurosci* 2008;28:9575–84.
- [8] Braak H, Ghebremedhin E, Rub U, Bratzke H, Del Tredici K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res* 2004;318:121–34.
- [9] Brotchie J, Fitzer-Attas C. Mechanisms compensating for dopamine loss in early Parkinson disease. *Neurology* 2009;72:S32–8.
- [10] Castaneda E, Whishaw IG, Robinson TE. Changes in striatal dopamine neurotransmission assessed with microdialysis following recovery from a bilateral 6-OHDA lesion – variation as a function of lesion size. *J Neurosci* 1990;10:1847–54.
- [11] Da Cunha C, Angelucci MEM, Canteras NS, Wonnacott S, Takahashi RN. The lesion of the rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons as a model for Parkinson's disease memory disabilities. *Cell Mol Neurobiol* 2002;22:227–37.
- [12] Da Cunha C, Wietzikoski S, Wietzikoski EC, Miyoshi E, Ferro MM, Anselmo-Franci JA, et al. Evidence for the substantia nigra pars compacta as an essential component of a memory system independent of the hippocampal memory system. *Neurobiol Learn Mem* 2003;79:236–42.
- [13] Da Cunha C, Gevaerd MS, Vital MBF, Miyoshi E, Andreatini R, Silveira R, et al. Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. *Behav Brain Res* 2001;124:9–18.
- [14] Da Cunha C, Wietzikoski EC, Ferro MM, Martinez GR, Vital MBF, Hipolide D, et al. Hemiparkinsonian rats rotate toward the side with the weaker dopaminergic neurotransmission. *Behav Brain Res* 2008;189:364–72.
- [15] Dauer W, Kholodilov N, Vila M, Trillat AC, Goodchild R, Larsen KE, et al. Resistance of alpha-synuclein null mice to the parkinsonian neurotoxin MPTP. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:14524–9.
- [16] Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, Reichert CM, et al. Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res* 1979;1:249–54.

- [17] Deumens R, Blokland A, Prickaerts J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol* 2002;175:303–17.
- [18] Ferro MM, Bellissimo MI, Anselmo-Franci JA, Angellucci MEM, Canteras NS, Da Cunha C. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations. *J Neurosci Methods* 2005;148:78–87.
- [19] Gevaerd MS, Miyoshi E, Silveira R, Canteras NS, Takahashi RN, Da Cunha C. L-DOPA restores striatal dopamine level but fails to reverse MPTP-induced memory deficits in rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 2001;4:361–70.
- [20] Goto Y, Otani S, Grace AA. The yin and yang of dopamine release: a new perspective. *Neuropharmacology* 2007;53:583–7.
- [21] Harik SI, Schmidley JW, Iacofano LA, Blue P, Arora PK, Sayre LM. On the mechanisms underlying 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity: the effect of perinatal infusion of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, its metabolite and their analogs in rat. *J Pharmacol Exp Therap* 1987;241:669–76.
- [22] Hirsch E, Graybiel AM, Agid YA. Melanized dopaminergic-neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's-disease. *Nature* 1988;334:345–8.
- [23] Hirsch EC. Animal models in neurodegenerative diseases. *J Neural Transm Suppl* 2003;9:131–7.
- [24] Hoffman AF, Van Horne CG, Eken S, Hoffer BJ, Gerhardt GA. In vivo microdialysis studies on somatodendritic dopamine release in the rat substantia nigra: effects of unilateral 6-OHDA lesions and GDNF. *Exp Neurol* 1997;147:130–41.
- [25] Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008;79:368–76.
- [26] Jenner P. The contribution of the MPTP-treated primate model to the development of new treatment strategies for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2003;9:131–7.
- [27] Jolly D, Vezina P. In vivo microdialysis in the rat: low cost and low labor construction of a small diameter, removable, concentric-style microdialysis probe system. *J Neurosci Methods* 1996;68:259–67.
- [28] Kalaria RN, Mitchell MJ, Harik SI. Correlation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity with blood-brain-barrier monoamine-oxidase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:3521–5.
- [29] Klevenyi P, Andreassen O, Ferrante RJ, Schleicher JR, Friedlander RM, Beal MF. Transgenic mice expressing a dominant negative mutant interleukin-1 beta converting enzyme show resistance to MPTP neurotoxicity. *Neuroreport* 1999;10:635–8.
- [30] Konitsiotis S, Kafetzopoulos E. Topography of dopamine d-1 and d-2 receptor-mediated rotation after intrastriatal injections of dopamine-related drugs in normosensitive rats. *Eur J Pharmacol* 1990;179:201–5.
- [31] Kumar P, Kaundal RK, More S, Sharma SS. Beneficial effects of pioglitazone on cognitive impairment in MPTP model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 2009;197:398–403.
- [32] Kurata K, Shibata R. Biphasic effect of locally applied apomorphine and 2,3,4,5-tetrahydro-7,8-dihydroxy-1-phenyl-1h-3-benzazepine on the release of striatal dopamine investigated by means of brain dialysis. *Neurosci Lett* 1990;117:264–8.
- [33] Langston JW. The etiology of parkinson's disease with emphasis on the MPTP story. *Neurology* 1996;47:S153–60.
- [34] Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 1983;219:979–80.
- [35] Lees AJ. Dopamine agonists in parkinson's disease – a look at apomorphine. *Fundam Clin Pharmacol* 1993;7:121–8.
- [36] Leng A, Mura A, Hengerer B, Feldon J, Ferger B. Effects of blocking the dopamine biosynthesis and of neurotoxic dopamine depletion with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on voluntary wheel running in mice. *Behav Brain Res* 2004;154:375–83.
- [37] Lima MDS, Reksidler AB, Zanata SM, Machado HB, Tufik S, Vital M. Different parkinsonism models produce a time-dependent induction of cox-2 in the substantia nigra of rats. *Brain Res* 2006;1101:117–25.
- [38] Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, Antolin I, Rodriguez C, Reiter RJ. Melatonin and Parkinson's disease. *Endocrine* 2005;27:169–78.
- [39] Miyoshi E, Wietzikoski S, Camplesse M, Silveira R, Takahashi RN, 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 Res Bull* 2002;58:41–7.
- [40] Olive MF, Mehmert KK, Hodge CW. Microdialysis in the mouse nucleus accumbens: a method for detection of monoamine and amino acid neurotransmitters with simultaneous assessment of locomotor activity. *Brain Res Protocols* 2000;5:16–24.
- [41] Ozaki N, Nakahara D, Miura H, Kasahara Y, Nagatsu T. Effects of apomorphine on in vivo release of dopamine and its metabolites in the prefrontal cortex and the striatum, studied by a microdialysis method. *J Neurochem* 1989;53:1861–4.
- [42] Pattarini R, Rong Y, Qu C, Morgan JL. Distinct mechanisms of MPTP resistance revealed by transcriptome mapping in mouse striatum. *Mov Disord* 2008;23:102.
- [43] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego, CA, USA: Academic Press, Ltd.; 2005, 160 p.
- [44] Perry JC, Hipolide DC, Tufik S, Martins RD, Da Cunha C, Andreatini R, et al. Intra-nigral MPTP lesion in rats: behavioural and autoradiography studies. *Exp Neurol* 2005;195:322–9.
- [45] Przedborski S, Jackson-Lewis V, Naini AB, Jakowec M, Petzinger G, Miller R, et al. The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. *J Neurochem* 2001;76:1265–74.
- [46] Robinson TE, Whishaw IG. Normalization of extracellular dopamine in striatum following recovery from a partial unilateral 6-OHDA lesion of the substantia nigra: a microdialysis study in freely moving rats. *Brain Res* 1988;450:209–24.
- [47] Robinson TE, Castaneda E, Whishaw IG. Compensatory changes in striatal dopamine neurons following recovery from injury induced by 6-OHDA or methamphetamine: a review of evidence from microdialysis studies. *Can J Psychol* 1990;44:253–75.
- [48] Robinson TE, Noordhoorn M, Chan EM, Mocsary Z, Camp Dm, Whishaw IG. Relationship between asymmetries in striatal dopamine release and the direction of amphetamine-induced rotation during the first week following a unilateral 6-OHDA lesion of the substantia nigra. *Synapse* 1994;17:16–25.
- [49] Schmitz Y, Benoit-Marand M, Gonon F, Sulzer D. Presynaptic regulation of dopaminergic neurotransmission. *J Neurochem* 2003;87:273–89.
- [50] Schober A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res* 2004;318:215–24.
- [51] Schultz W. Multiple dopamine functions at different time courses. *Annu Rev Neurosci* 2007;30:259–88.
- [52] Schultz W. Behavioural dopamine signals. *Trends Neurosci* 2007;30:203–10.
- [53] Schwarting RKW, Huston JP. Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of mesostriatal dopamine neurons and their physiological sequelae. *Prog Neurobiol* 1996;49:215–66.
- [54] Schwarting RKW, Huston JP. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioural brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog Neurobiol* 1996;50:275–331.
- [55] Sedelis M, Schwarting RKW, Huston JP. Behavioural phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 2001;125:109–225.
- [56] See RE, Sorg BA, Chapman MA, Kalivas PW. In vivo assessment of release and metabolism of dopamine in the ventrolateral striatum of awake rats following administration of dopamine D1 and D2 receptor agonists and antagonists. *Neuropharmacology* 1991;30:1269–74.
- [57] Skirboll LR, Grace AA, Bunney BS. Dopamine aut synaptic and postsynaptic receptors – electro-physiological evidence for differential sensitivity to dopamine agonists. *Science* 1979;206:80–2.
- [58] Song DD, Haber SN. Striatal responses to partial dopaminergic lesion: evidence for compensatory sprouting. *J Neurosci* 2000;20:5102–14.
- [59] Tadaiesky MT, Dombrowski PA, Figueiredo CP, Cargnin-Ferreira E, Da Cunha C, Takahashi RN. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 2008;156:830–40.
- [60] Truong L, Allbutt H, Kassiou M, Henderson JM. Developing a preclinical model of parkinson's disease: a study of behaviour in rats with graded 6-OHDA lesions. *Behav Brain Res* 2006;169:1–9.
- [61] Ungerstedt U. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxydopamine induced degeneration of nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand* 1971;69–93.
- [62] Ungerstedt U, Arbuthnott GW. Quantitative recording of rotational behaviour in rats after 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* 1970;24:485–93.
- [63] Wu SS, Frucht SJ. Treatment of Parkinson's disease – what's on the horizon? *CNS drugs* 2005;19:723–43.

Anexo 2: artigo científico submetido à publicação na revista Nature Neuroscience.

Evidence that dopamine is released in the striatum to promote learning

Patricia A. Dombrowski^a, Suelen L. Boschen^a, Mariza Bortolanza^a, , Etieli Wendler^a,
Rainer K.W. Schwarting^b, Marcus Lira Brandão^{c,d}, Philip Winn^e, Cláudio Da Cunha^a

^aLaboratório de Fisiologia e Farmacologia do Sistema Nervoso Central,
Departamento de Farmacologia, UFPR, C.P. 19.031, 81.531-980 Curitiba PR,
Brazil.

^bExperimental and Physiological Psychology, Philipps-University of Marburg,
Gutenbergstr. 18, 35032 Marburg, Germany.

^cInstituto de Neurociências e Comportamento-INEC, Campus USP, 14040-901
Ribeirão Preto, SP, Brazil

^dLaboratório de Psicobiologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto, Universidade de São Paulo (USP), 14040-901 Ribeirão Preto, SP, Brazil;

^eStrathclyde Institute of Pharmacy and Biomedical Science, University of Strathclyde,
161 Cathedral Street, Glasgow G4 0RE, Scotland

Correspondence to: Claudio Da Cunha, Universidade Federal do Paraná,
dacunha@ufpr.br

Abbreviations:

AP, anteroposterior

AUC , area under the curve

BL, block

CAR, conditioned avoidance response

CPu, caudate putamen

CS, conditioned stimulus

DA, dopamine

DHBA, dihydroxybenzylamine

DS, dorsal striatum

DV, dorsoventral

HPLC-ED, high performance liquid chromatography with electrochemical detection

IB, inter-block

ML, mediolateral

MPTP , 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

NAc, nucleus accumbens

SNc, substantia nigra pars compacta

TH, tyrosine hydroxylase

US, unconditioned stimulus

VTA, ventral tegmental area

Abstract

Three hypotheses compete for a role of the phasic release of dopamine (DA) in the striatum: (i) to encode the hedonic valence of a stimulus; (ii) to encode the saliency of a stimulus; (iii) to promote learning. The present study aims to test the later hypothesis, which implies that: (i) DA release in the striatum increases in order to promote learning; (ii) such increase occurs only when learning is possible; (iii) after learning, the same stimuli that promoted DA release will no longer do this. These questions were addressed by an *in vivo* microdialysis study in rats trained to perform an action to avoid a footshock that otherwise followed a warning cue (tone). We observed that (i) the concentration of extracellular DA in the striatum increased during learning; (ii) the amount of DA released in the striatum predicted learning; (iii) the tone and the footshock did not cause the increase of extracellular DA in the striatum after a high level of learning was achieved or when they were presented in an unpredictable and inescapable manner; (iv) learning did not occur in animals with a lesion in the midbrain DA neurons or treated with DA receptor antagonists. These results strongly suggest that DA was released in the striatum of these rats not to encode the hedonic valence or saliency of the stimuli, but to promote learning.

Key words: learning, dopamine, striatum, 2-way active avoidance task, microdialysis, substantia nigra pars compacta, MPTP.

Introduction

Nowadays three hypotheses compete to explain the role of the midbrain dopamine (DA) neurons¹. They propose that they fire: (i) to encode the hedonic valence of a stimulus²; (ii) to encode the saliency of a stimulus³; (iii) to promote learning⁴. The present study aims to test the validity of the later hypothesis for a particular kind of learning: conditioned avoidance. Such study is important because it may explain certain cognitive and behavioural deficits observed in diseases in which midbrain DA neurons are defective, like in schizophrenia¹ and attention/hyperactivity disorder⁵ or missing, like in Parkinson disease⁶. In addition, the role of striatal DA in aversively motivated learning has been attracting great interest of the neuroscience community because of two recent studies reporting that while the majority of the midbrain DA neurons fire in response to unpredictable appetitive stimuli^{7, 8}, a subpopulation of these neurons are activated by aversive stimuli^{9, 10}.

The hypothesis that DA is released in the striatum to promote learning of a conditioned avoidance response (CAR) implies that: (i) DA release in the striatum increases in order to promote CAR learning; (ii) such increase occurs only when learning is possible; (iii) learning halts the release of DA in response to the stimuli that cause such learning. In the present study, we tested the learning hypothesis in rats trained to learn an action to avoid a footshock that otherwise followed a warning cue (tone). Based on the assumptions above, we expected that: (i) the concentration of extracellular DA in the striatum will increase during learning; ii) the tone and the footshock will no longer cause the increase of extracellular DA after a high level of learning is achieved; iii) such increase would not occur if the tone and footshock were presented in an unpredictable (non-contingent) and inescapable manner (no action

was effective to escape from the footshock or avoid it); iv) the amount of DA released in the striatum would predict learning; v) learning would not occur in animals with a lesion in the midbrain DA neurons or treated with DA receptor antagonists.

Material and Methods

Animals

Adult male Wistar rats from our own breeding stock, weighing 250-290 g at the beginning of the experiments were used. The animals were maintained in a temperature-controlled room ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) on a 12-h light /dark cycle (lights on at 7:00 a.m.), with food and water available *ad libitum*. All experimental procedures were in compliance with the guidelines with the UK Animals (Scientific Procedures) Act 1986, European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and the Brazilian Society for Neuroscience and Behaviour and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Federal University of Parana State (protocol number 353).

Surgical procedures

Twenty eight rats were divided into 2 groups that were submitted to a unilateral lesion of the SNc (14 rats) or sham-operated (14 rats). Two weeks later, the same animals were submitted to a second surgery for microdialysis guide cannula placement, as described in Dombrowski *et al.*¹¹. In brief, the animals were anesthetized with equithesin (3 ml/kg, i.p.; 1% sodium thiopental, 4.25% chloral hydrate, 2.13% magnesium sulfate, 42.8% propyleneglycol and 3.7% ethanol in

water) and received unilateral infusion of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine HCl (MPTP, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA; 200 µg in 2 µl saline) into the SNc, through a 30-gauge stainless steel needle at a rate of 0.25 µl/min in the following coordinates, based on the Atlas of Paxinos and Watson¹²: anteroposterior (AP): -5.0 mm from bregma; mediolateral (ML): -2.1 mm from the midline +2.1 mm from the midline; dorsoventral (DV): -7.7 mm from the skull. Sham-operated animals received saline instead of MPTP. The guide cannula (15 mm length) was unilaterally and obliquely inserted into the striatum, with a 25° angle with the sagittal plane in the following coordinates: AP: +1.2 mm; ML: ± 4.3 mm; DV: -2.8 mm from the skull. The position of the microdialysis probe in the striatum is illustrated in Fig. 1.

Behavioural procedures

One week after the lesion surgery, the rat turning behaviour was scored as described in Bortolanza et al.¹³. The MPTP rats that did not present more than 50 ipsiversive turns in 1h after a challenge with 0.5 mg/kg apomorphine (s.c.) were discarded, based on a previous study showing this as a criterion to select the rats with more than 50% loss of the SNc DA neurons¹⁴.

Two weeks later the animals were trained in the 2-way active avoidance task. The apparatus used was an automated 23x50x23 cm shuttle-box (Insight Instruments, Ribeirao Preto, Brazil) with the front made of Plexiglas and the floor made of parallel 5 mm caliber stainless-steel bars spaced 15 mm apart. The box was divided into 2 compartments of the same size by a 2-cm- high bar which the animal could jump easily. The sham animals were trained until they learn the task in at most

five trial blocks carried out on the same day, with an interval of 20 minutes between them. The MPTP animals were given only 3 trial blocks in order to prevent the animal suffering, since none of them learned the task. In each block, 40 sound cues (CS: 1.5 kHz, 60 dB, maximum duration of 20 s) were paired with a subsequent 0.5 mA footshock (US: maximum duration of 10 s, starting 10 s after the CS onset) until the rat crossed to the other compartment of the box. A 10-30 s random interval occurred between trials. The numbers of active avoidances and latency to respond to the stimuli were recorded automatically by the apparatus. It was considered that the animal learned the task when it scored 7 avoidances in the first 10 of the 40 pairings of a block.

Other groups of non-trained sham and MPTP rats were placed in the shuttle box and exposed to the same number and duration of stimuli used to train the rats (see above), but these stimuli were presented in a random sequence, being not-paired, unpredictable, and inescapable, as illustrated in Fig. 2. The experiment was designed so that each trained rat had the corresponding non-trained rat. However, problems during the microdialysis procedure let some rats to be discarded (see the number of rats per group below).

Other 2 groups of non-operated rats were trained in a 40 pairings blocks of the 2-way active avoidance 20 min after receiving an i.p. administration of saline (NaCl 0.9%), the D1-like DA receptor antagonist, SCH23390 (0.1 mg/kg) or the D2-like DA receptor antagonist, sulpiride (50 mg/kg).

In vivo microdialysis

The microdialysis probes were of the concentric design, as described elsewhere^{15, 16}. The membrane had an outer diameter of 300 μm and permeability of 6 kDa (Cuprophan; Akzo, Wuppertal, Germany) with active membrane length of 4 mm. The microdialysis probe was perfused with Ringer's solution (in mM: NaCl, 145.0; KCl, 2.7; CaCl_2 , 1.2; MgCl_2 , 1.0, pH = 7.4) at a constant flow rate of 1.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ (Microinjection pump, Insight Equipment, Ribeirão Preto, Brazil).

Microdialysis samples were collected every 5 min during the training and non-training procedures. After the rat was placed in the shuttle box and the microdialysis probe inserted into the guide cannula followed a 2-h equilibrium period and the samples were collected: 4 before the first block (baseline samples), others during the training or non-training procedures, and 3 more samples after the last block of stimuli. Each block lasted 20 min, during which 3 samples were collected, and other 2 samples were collected during the 20-min intervals. Sample was collected into polyethylene tubes containing 17 μl of 0.1 M perchloric acid solution (Merck, Darmstadt, Germany), 0.06% sodium metabisulfite (Sigma-Aldrich), and 850 pg of dihydroxybenzylamine (DHBA; Sigma-Aldrich) as an internal standard and stored at -70°C until analysis.

Determination of DA by HPLC-ED

Two different protocols of high performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ED) analysis were used. Microdialysis samples were analysed with a chromatograph equipped with a Synergi Fusion-RP C-18

reverse-phase column (150 x 2 mm, 4 μ m particle size; Phenomenex, Torrance, USA) fitted with a 4 x 3.0 mm pre-column (SecurityGuard Cartridges Fusion-RP; Phenomenex), a dual coulometric electrochemical detector (ESA Coulochem III Electrochemical Detector, Chelmsford, USA) with a guard cell (ESA 5020) with the electrode set at +350 mV and the working electrodes (5014B microdialysis cell, ESA) set at E1=+100 and E2=+450 mV versus a solid state palladium reference electrode. In the protocol used to analyse the content of DA in the post-mortem striatum tissue, the samples were homogenized with an ultrasonic cell disrupter (Sonics, Newtown, USA) in 0.1 M perchloric acid containing 0.02% sodium metabisulfite and the same internal standard and, after centrifugation, 20 μ l of the supernatant was injected into the same HPLC-ED equipment, but with a Synergi Fusion-RP C-18 reverse-phase column (150 x 4.60 mm, 4 μ m particle size; Phenomenex), and working electrodes (5011A analytical cell, ESA) set at E1=+100 and E2=+450 mV. The mobile phase had the following composition: 20 g citric acid monohydrated, 200 mg octane-1-sulfonic acid sodium salt, 40 mg ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 900 ml HPLC-grade water, 10% methanol and pH 4. More details of these protocols can be seen in Dombrowski et al. ¹¹.

Analysis of the lesions and cannulae placements

At the end of the experiment, the effectiveness of the lesion procedure and location of the guide cannulae and microdialysis probe were checked by analysing the tissue content of DA in the striatum of 8 sham and 8 MPTP rats, and by the histological analysis of the brains of the other 6 sham and other 6 MPTP rats. The neurochemical and histological analysis were carried out as described previously ¹¹. In brief, after

the behavioural experiments, part of the animals was killed by decapitation, their right and left striata were dissected on ice, and stored at -70°C for the determination of DA content, as described above. The other rats were killed with an overdose of pentobarbital, transcardially perfused with saline, followed by 4% paraformaldehyde, and their brains were removed, sliced in series of $40\ \mu\text{m}$ coronal sections of the region of the striatum and midbrain, and mounted on gelatin-coated slides. The striatal series was stained with thionin and the adjacent slices of this series were immunostained for tyrosine hydroxylase (TH). The midbrain series was immunostained only for TH using a monoclonal anti-TH antibody raised in mice (Incstar Corp., Stillwater, USA), followed by appropriate Vector Laboratories ABC Elite kit (Burlingame, USA), as described previously¹³. Localization of the microdialysis probes was evaluated by microscopic examination and compared with the Atlas of Paxinos and Watson¹².

Data analysis

A total of 87 rats were used in the beginning of the experiment. Data of the following animals were not considered: 12 that died during or after the surgery; 10 that died before the end of the experiment or were discarded due to problems during the microdialysis procedure; 6 were discarded because they made less than 50 turns/h when challenged with apomorphine; 2 because of wrong positioning of the guide cannulae. None of the remained rats were discarded due to inappropriate SNc lesioning. Data of the following rats that were tested under microdialysis and considered for statistical analysis: 9 sham trained, 5 sham non-trained, 9 MPTP trained, and 5 MPTP non-trained rats. Data of the pharmacological studies included

other 3 groups with the following number of animals: 10 saline, 8 SCH23390, and 11 sulpiride rats.

Data of the temporal variation of DA levels were normalized by the baseline, calculated by average level of DA in the three samples collected before the first block of stimuli started, and considered as 100%. The amount of DA released in a block was considered to be a peak when its value was higher than 200%. The amount of DA released in each peak was calculated as the area under the curve (AUC). Neurochemical and behavioural data were analyzed by ANOVA followed by the Newman-Keuls post-hoc test or by the Pearson correlation test. Differences among the groups were considered significant if $p < 0.05$. All analyses were accomplished by employing the GraphPad Prism software (version 4.0, San Diego, USA).

Results

The MPTP treatment caused a partial loss of the TH-immunoreactive neurons in the SNc and a significant reduction of nearly 65% of the content of DA in the striatum, as shown in Fig. 3 and Table 1. Fig. 4 shows how this partial lesion, 2-way active avoidance training, non-training, and learning affect the release of DA. A four-way ANOVA showed significant effects for the factors lesion vs. sham ($F(1,41) = 7.54$, $p < 0.01$), block vs. inter-block interval ($F(1, 41) = 5.48$, $p < 0.05$), and trained vs. non-trained rats ($F(1,41) = 9.64$, $p < 0.01$). This analysis also showed a non-significant repeated measure factor ($F(2,82) = 0.43$, $p = 0.64$). Except for the repeated factor, interactions among the other factors were significant ($F(1,41) > 5.40$; $p < 0.05$). Post-hoc Newman-Keuls test showed that the levels of DA of the sham trained group in the first 2 blocks were significantly different from all the other groups. In

addition, the AUC of the sham trained group in the third block was significantly lower, compared to the first and second blocks. In summary, these data showed that: (i) DA release peaked during the training blocks and returned to the basal level in the inter-block intervals; (ii) though the non-trained rats were submitted to the same stimuli, they did not present these peaks; (iii) partial lesion of the SNc prevented such peaking, both under the training and non-training procedures; (iv) the area of the peaks decreased with training.

Though quite illustrative, this analysis, based on averaged data did not capture important differences among rats that occurred along learning process.

Representative data of individual animals, as illustrated in Figs. 5-7, show that the number of the DA peaks are correlated with the number of blocks needed to learn the 2-way active avoidance task, and that the size of these peaks are correlated with the number of avoidance in the first block. Fig. 5A shows data of a sham rat that presented 4 peaks of DA and needed 5 blocks to learn the task; Fig 5C shows data of another sham rat that presented 2 DA peaks and needed 3 blocks to learn. The other panels of this figure show data of non-trained and MPTP rats that presented neither DA peaks nor learning. Data shown in Fig. 6 illustrate the correlation between the amount of the DA released and learning. As shown in Fig. 7, these correlations were strong ($r > 0.7$) and significant (Pearson test, $P < 0.05$).

Not always a correlation reflects causation between two variables. Therefore the data shown above suggest that DA is released when (and only when) learning can occur, but does not prove that the DA release causes learning. However, the finding that lesion of DA neurons not only prevented the DA peaks, but also impaired learning, more strongly suggests that learning depends on DA release in the striatum (see Fig. 8A and 8B). A two-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test showed

that the sham rats, but not MPTP rats, increased the number of avoidance along the blocks ($F(2, 22) = 3.07$, $p = 0.06$) and that the avoidance scores of the MPTP rats were significantly lower compared to the sham rats in all blocks ($F(1, 11) = 6.18$, $p < 0.05$). A non-significant interaction between these factors was found ($F(2, 22) = 2.24$, $p = 0.13$). The same analysis showed that the latency to respond to the stimuli decreased in the sham ($F(2, 22) = 4.72$, $p < 0.05$), but not in the MPTP animals that, compared to the sham animals, spent longer times to respond in blocks 2 and 3 ($F(1, 11) = 11.31$, $p < 0.01$). The interaction among these factors was not significant ($F(2, 22) = 1.78$, $p = 0.19$).

The hypothesis that striatal DA promotes learning was further tested in non-lesioned rats treated with D1 and D2-like DA receptor antagonists, as shown in Fig. 8C and 8D. A one-way ANOVA showed significantly lower number of avoidances in the rats that received 0.1 mg/kg SCH23390 or 50 mg/kg sulpiride, compared to animals that received saline before the 2-way active avoidance training ($F(2,26) = 37.48$, $p < 0.001$). The same analysis showed that the latency to respond to the stimuli was higher in the animals that received the antagonists compared to animals that received saline ($F(2,26) = 16.60$, $p < 0.01$).

Discussion

The present results fulfil all predictions based on the hypothesis that DA is released in the striatum to promote learning, at least for aversively motivated tasks. Before the rats achieved a high level of performance in the 2-way active avoidance, the extracellular concentration of DA in the striatum increased during the tone-footshock pairing blocks and returned to the basal level in the inter-block intervals.

This finding is in accordance with most microdialysis studies in rats submitted to aversive stimuli¹⁷⁻²⁰. However, in the last trial blocks, after the rats have learned the task, this DA increase no longer occurred, what suggests that this was not the exposition to the stimuli *per se*, but the opportunity of learning that caused this DA response.

Another hypothesis that competes for the role of a phasic release of DA proposes that it encodes the rewarding value of stimuli² or that, in order to provide a teaching signal for learning, the phasic release of DA increases in response to unexpected appetitive stimuli and decreases in response to aversive stimuli⁸. However, this is not what we found in the present study. Here the extracellular levels of DA increased during the training blocks in which rats learned to avoid an aversive stimulus. A proposed explanation for the discrepancy between microdialysis studies and the electrophysiology studies showing decrease in the firing rate of midbrain DA neurons⁸ was that the brief inhibition of DA release observed during the presentation of an aversive stimulus is usually followed by a slower increase. This brief decrease would be difficult to detect in samples collected in a minute range scale during a microdialysis studies, prevailing the effect of the slower, but long-lasting, increase that followed the offset of the aversive stimuli²¹. This is as if DA release increased because of the relief caused by the footshock offset (perceived as a reward), in line with the hedonic hypothesis. The present data do not support this explanation. If that was the case, an increased release of DA should have occurred in the non-trained rats that received the same number and duration of footshock than the trained rats, but in a manner that prevented learning. This suggests that learning opportunity, more than exposition to unexpected aversive stimuli, caused such increase. The recent finding of a subpopulation of midbrain DA neurons responding

to aversive stimuli with an increase in the release of DA ^{7, 10, 22} provides a more plausible source for the DA released by these rats during learning in the 2-way active avoidance.

Another hypothesis for the role of the phasic release of DA in the striatum proposes that it encodes the saliency of a stimulus ³. If this was the case, higher release of DA would have occurred when the footshock was presented in an unpredictable manner, like in the non-training scheme. However, when we presented the shock in such way, no increase was observed in the extracellular DA level. This suggests that during the training in the 2-way active avoidance it was not the saliency of the shock, but the opportunity to learn how to predict and avoid it, that caused the release of DA.

The above mentioned evidence that increased DA release in the striatum *is caused* by the opportunity of learning, though impressive, does not necessarily mean that DA release *causes* learning. However, this study provides further evidence for this by showing that the amount of DA being released in the striatum predicted the degree of learning: we found a significant correlation between the size of the DA peak in the first trial block and the number of avoidance the rats did in the second trial block. We also showed that learning did not occur in the rats that did not present DA peaks due to a partial loss of midbrain DA neurons, and in those treated with DA receptor antagonists, in agreement with previous studies showing learning impairment in midbrain DA neurons lesioned animals ^{23, 24}, in Parkinson's disease ²⁵, and in subjects treated with DA receptor antagonists ²⁶⁻²⁸. These results are also in agreement with studies showing improved learning in animals treated with DA receptor agonists ^{26, 29} and with the studies showing that DA promotes synaptic plasticity in the striatum ^{30, 31}.

In summary, the present study presents strong evidence that, at least during the training in the 2-way active avoidance, DA is released in the striatum, not to encode the hedonic value or the saliency stimuli, but to promote the learning of how to predict the imminence of the US presentation and how to avoid it.

Acknowledgements

The authors thank the financial support from CNPq, Fundação Araucária, and CAPES and the technical assistance of Jamile Moreira Cugler, Flávia Esteves, Sílvia N. Cordazzo, and Lindacir Nascimento.

References

1. Goto, Y., Grace, A.A., Anissa, A. & Olivier, G. The Dopamine System and the Pathophysiology of Schizophrenia: A Basic Science Perspective. in *International Review of Neurobiology* 41-68 (Academic Press, 2007).
2. Wise, R.A. Dopamine and reward: the anhedonia hypothesis 30 years on. *Neurotox. Res.* **14**, 169-183 (2008).
3. Berridge, K.C. The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology* **131**, 391–431 (2007).
4. Schultz, W. Dopamine signals for reward value and risk: basic and recent data. *Behav. Brain Funct.* **6**, 9 (2010).
5. Leo, D., *et al.* Altered midbrain dopaminergic neurotransmission during development in an animal model of ADHD. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **27**, 661-669 (2003).
6. Grahn, J.A., Parkinson, J.A. & Owen, A.M. The role of the basal ganglia in learning and memory: neuropsychological studies. *Behavioural Brain Research* **199**, 53-60 (2009).

7. Morris, G., Schmidt, R. & Bergman, H. Striatal action-learning based on dopamine concentration. *Exp. Brain Res.* **200**, 307-317 (2010).
8. Schultz, W. Behavioral dopamine signals. *Trends Neurosci.* **30**, 203-210 (2007).
9. Brischoux, F., Chakraborty, S., Brierley, D.I. & Ungless, M.A. Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 4893-4899 (2009).
10. Matsumoto, M. & Hikosaka, O. Two types of dopamine neuron distinctly convey positive and negative motivational signals. *Nature* **459**, 838-842 (2009).
11. Dombrowski, P.A., *et al.* Microdialysis study of striatal dopamine in MPTP-hemilesioned rats challenged with apomorphine and amphetamine. *Behavioural Brain Research* **215**, 63-70 (2010).
12. Paxinos, G. & Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (Academic Press, Ltd., San Diego, CA, USA, 2005).
13. Bortolanza, M., *et al.* Functional disconnection of the substantia nigra pars compacta from the pedunculo-pontine nucleus impairs learning of a conditioned avoidance task. *Neurobiology of Learning and Memory* **94**, 229-239 (2010).
14. Da Cunha, C., *et al.* Hemiparkinsonian rats rotate toward the side with the weaker dopaminergic neurotransmission. *Behavioural Brain Research* **189**, 364-372 (2008).
15. Olive, M.F., Mehmert, K.K. & Hodge, C.W. Microdialysis in the mouse nucleus accumbens: a method for detection of monoamine and amino acid neurotransmitters with simultaneous assessment of locomotor activity. *Brain Research Protocols* **5**, 16-24 (2000).
16. Jolly, D. & Vezina, P. In vivo microdialysis in the rat: Low cost and low labor construction of a small diameter, removable, concentric-style microdialysis probe system. *Journal of Neuroscience Methods* **68**, 259-267 (1996).
17. Kalivas, P.W. & Duffy, P. Selective activation of dopamine transmission in the shell of the nucleus accumbens by stress. *Brain Research* **675**, 325-328 (1995).
18. Young, A.M.J. Increased extracellular dopamine in nucleus accumbens in response to unconditioned and conditioned aversive stimuli: studies using 1 min microdialysis in rats. *Journal of Neuroscience Methods* **138**, 57-63 (2004).
19. Horvitz, J.C. Mesolimbocortical and nigrostriatal dopamine responses to salient non-reward events. *Neuroscience* **96**, 651-656 (2000).

20. Murphy, C.A., Pezze, M.A., Feldon, J. & Heidbreder, C. Differential involvement of dopamine in the shell and core of the nucleus accumbens in the expression of latent inhibition to an aversively conditioned stimulus. *Neuroscience* **97**, 469-477 (2000).
21. Ungless, M.A. Dopamine: the salient issue. *Trends Neurosci.* **27**, 702-706 (2004).
22. Joshua, M., Adler, A., Mitelman, R., E., V. & Bergman, H. Midbrain Dopaminergic Neurons and Striatal Cholinergic Interneurons Encode the Difference between Reward and Aversive Events at Different Epochs of Probabilistic Classical Conditioning Trials. *The Journal of Neuroscience* **28**, 11673-11684 (2008).
23. Da Cunha, C., Angelucci, M.E.M., Canteras, N.S., Wonnacott, S. & Takahashi, R.N. The lesion of the rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons as a model for Parkinson's disease memory disabilities. *Cellular and Molecular Neurobiology* **22**, 227-237 (2002).
24. Da Cunha, C., *et al.* 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).
25. Taylor, A.E. & Saintcy, J.A. The Neuropsychology of Parkinsons-Disease. *Brain Cogn.* **28**, 281-296 (1995).
26. Stuchlik, A. & Vales, K. Effect of dopamine D1 receptor antagonist SCH23390 and D1 agonist A77636 on active allothetic place avoidance, a spatial cognition task. *Behavioural Brain Research* **172**, 250-255 (2006).
27. Legault, G., Smith, C.T. & Beninger, R.J. Post-training intra-striatal scopolamine or flupenthixol impairs radial maze learning in rats. *Behavioural Brain Research* **170**, 148-155 (2006).
28. Reilly, J.L., Harris, M.S.H., Khine, T.T., Keshavan, M.S. & Sweeney, J.A. Antipsychotic Drugs Exacerbate Impairment on a Working Memory Task in First-Episode Schizophrenia. *Biol. Psychiatry* **62**, 818-821 (2007).
29. Amico, F., Spowart-Manning, L., Anwyl, R. & Rowan, M.J. Performance- and task-dependent effects of the dopamine D1/D5 receptor agonist SKF 38393 on learning and memory in the rat. *European Journal of Pharmacology* **577**, 71-77 (2007).
30. Wickens, J.R., Shindou, T. & Ochi-Shindou, M. Synaptic plasticity in the striatum: modulation by dopamine. *J. Physiol. Sci.* **59**, 48-48 (2009).

31. Surmeier, D.J., Plotkin, J. & Shen, W.X. Dopamine and synaptic plasticity in dorsal striatal circuits controlling action selection. *Curr. Opin. Neurobiol.* **19**, 621-628 (2009).

Figures and legends:

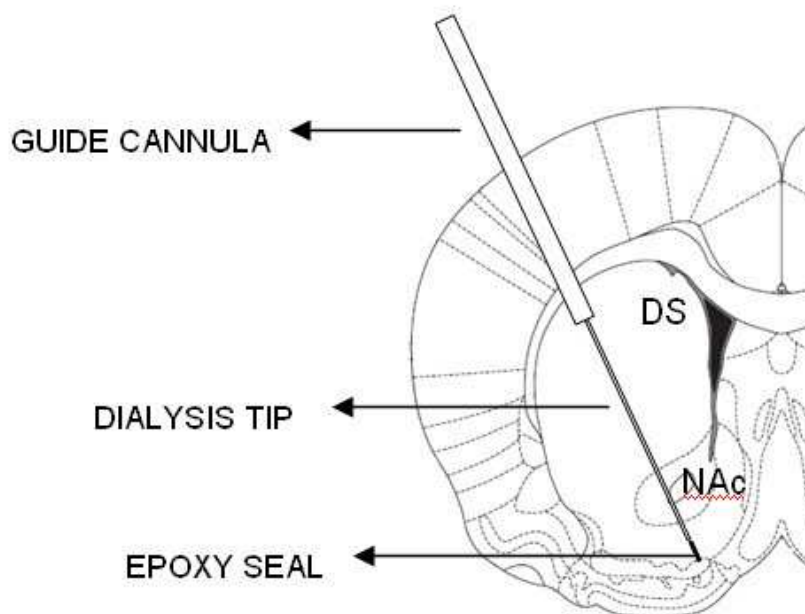
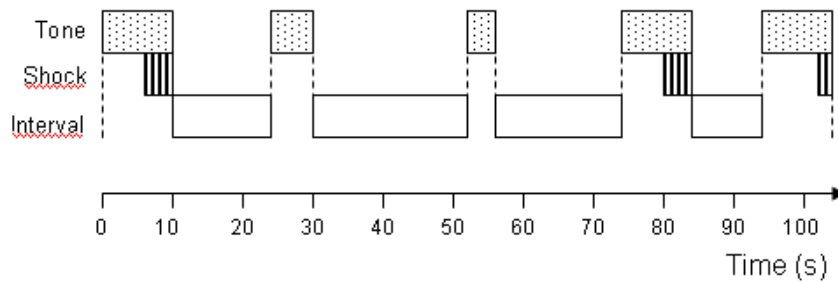


Figure 1: Diagram with a drawing of the Paxinos and Watson Atlas (2005) showing a coronal section of the rat brain (+ 1.2 mm from bregma) in the location that dialysis probe was inserted. DS, dorsal striatum; NAc, nucleus accumbens.

TRAINING SCHEME



NON-TRAINING SCHEME

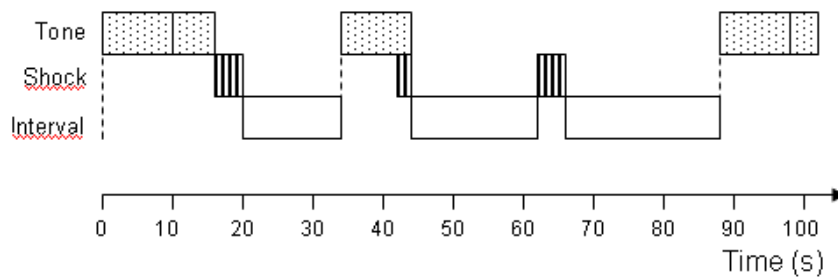


Figure 2: Illustration of the scheme for presenting the stimuli to a trained (top) and a non-trained (bottom) rat. The example shows only the first 5 of the 40 pairs of stimuli. Trained rats were exposed to pairs of conditioned (tone) and unconditioned (footshock) stimuli presented after intervals with duration ranging randomly from 10-30 s. The tones were presented for at most 20 s and the shock in the last 10 s of the tone presentation. Both stimuli were halted when the animal crossed to the other side of the box. The rats avoided the shock when they crossed in less than 10 s after the tone onset. Non-trained rats were exposed to the same number and duration of the stimuli that were given to a trained rat, but in a sequence that was random, being unpredictable, and inescapable.

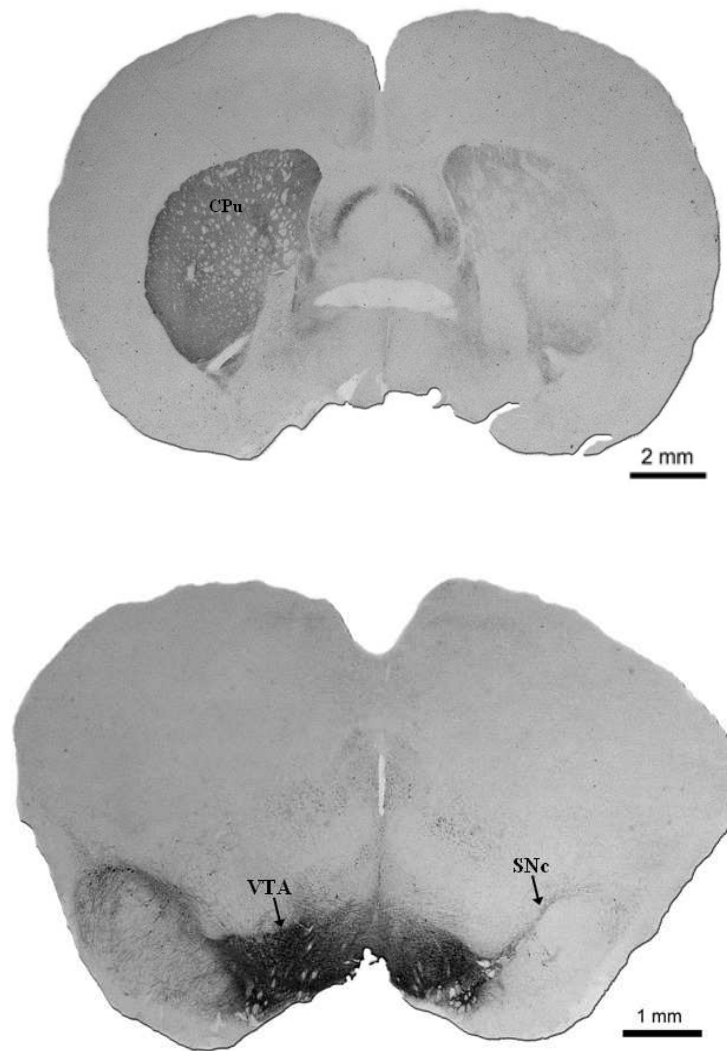


Figure 3: Brightfield photomicrographs of a tyrosine hydroxylase (TH)-immunostained section illustrating the appearance of a MPTP lesion in the SNc and in the striatum. SNc, substantia nigra pars compacta; VTA, ventral tegmental area, CPu, caudate nucleus

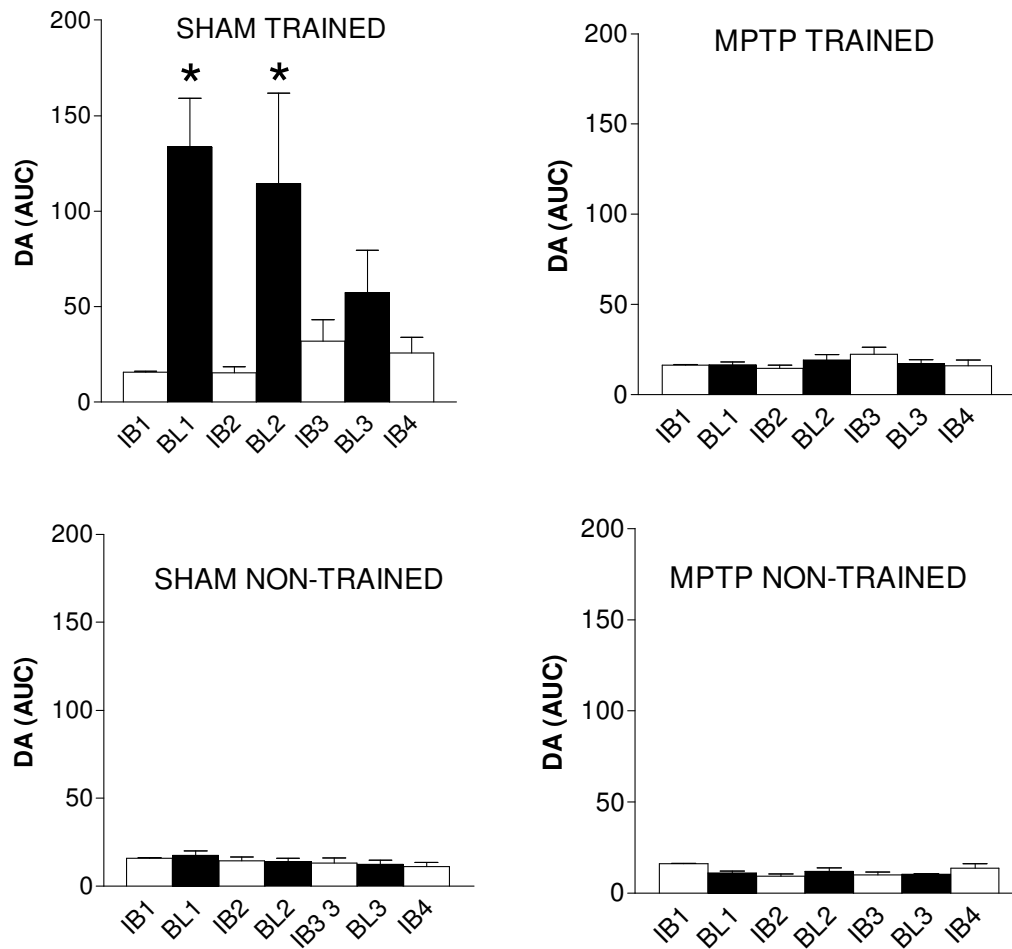


Figure 4: The bars represent the mean \pm S.E.M. area under the curves (AUC) of the temporal variation of extracellular levels of DA (see Fig. 4), when sham and MPTP-lesioned rats were trained or non-trained (see Fig. 2) in the 2-way active avoidance task. They were given a sequence of 40-pairs of stimuli blocks (BL) separated by 20-min inter-block intervals (IB). * $P < 0.05$ compared to the other block and inter-blocks of the same and other groups; four-way ANOVA followed by Newman-Keuls test.

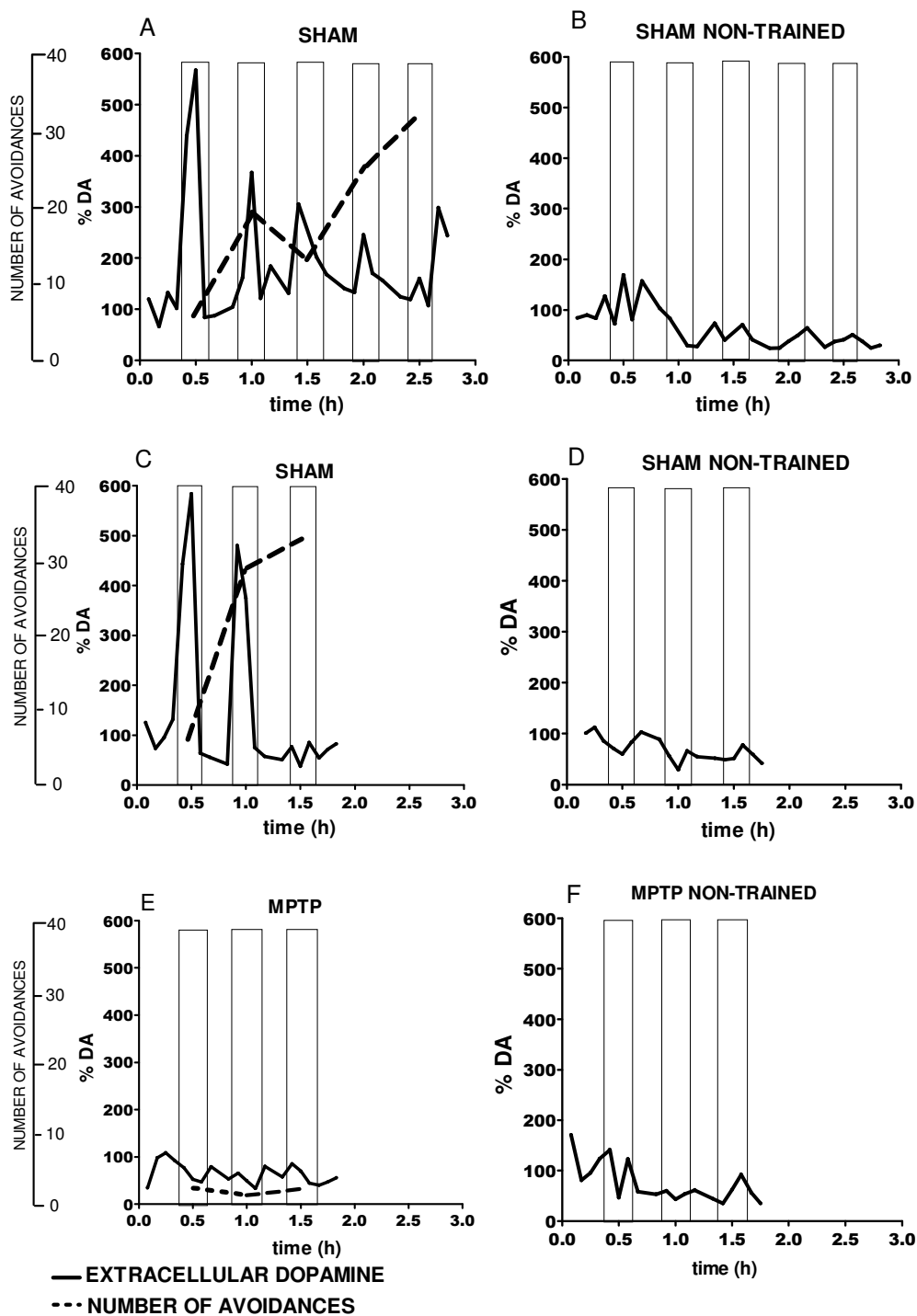


Figure 5: Solid lines represent the extracellular levels of DA of individual rats in response to the training or non-training procedures in the 2-way active avoidance task (see Fig. 2). Dashed lines represent the number of avoidances in each 40-pairs block (dashed rectangles).

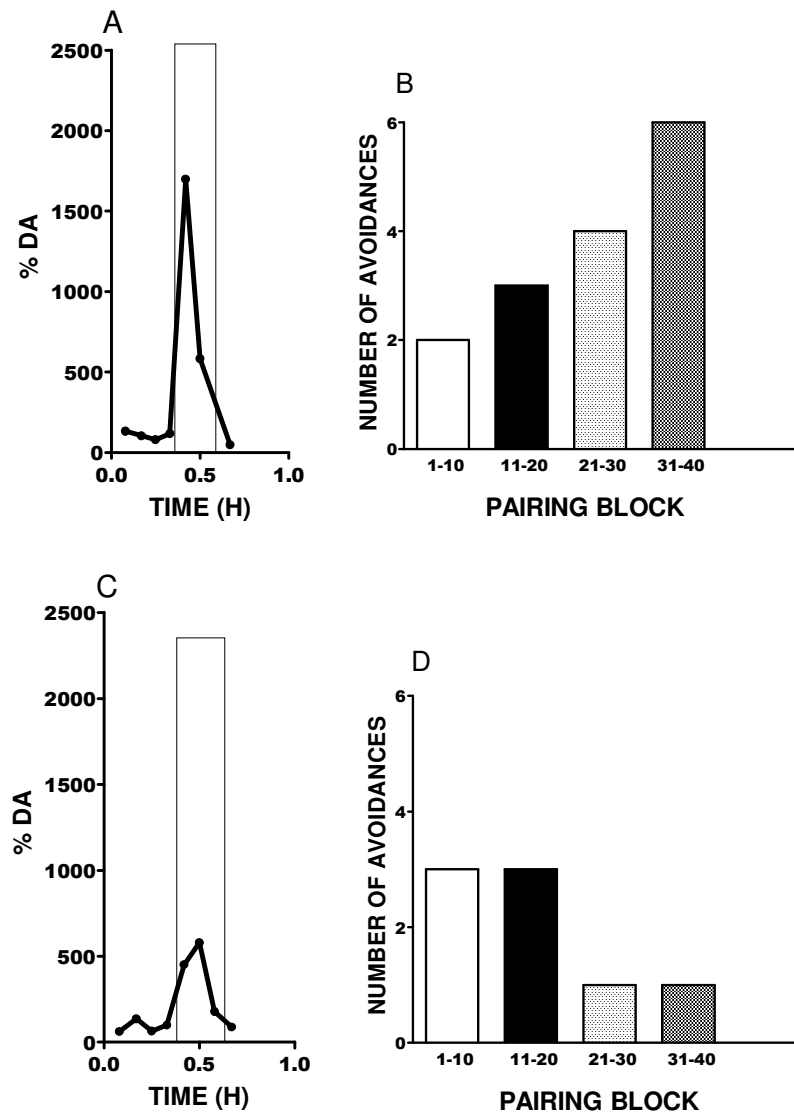


Figure 6: Panels A and C illustrate different sizes of DA peaks of individual sham-trained rats in response to the first 40-pairs block of training in the 2-way active avoidance task. Bars in panels B and D represent the number of avoidances done by the same rat in blocks of 10 pairings.

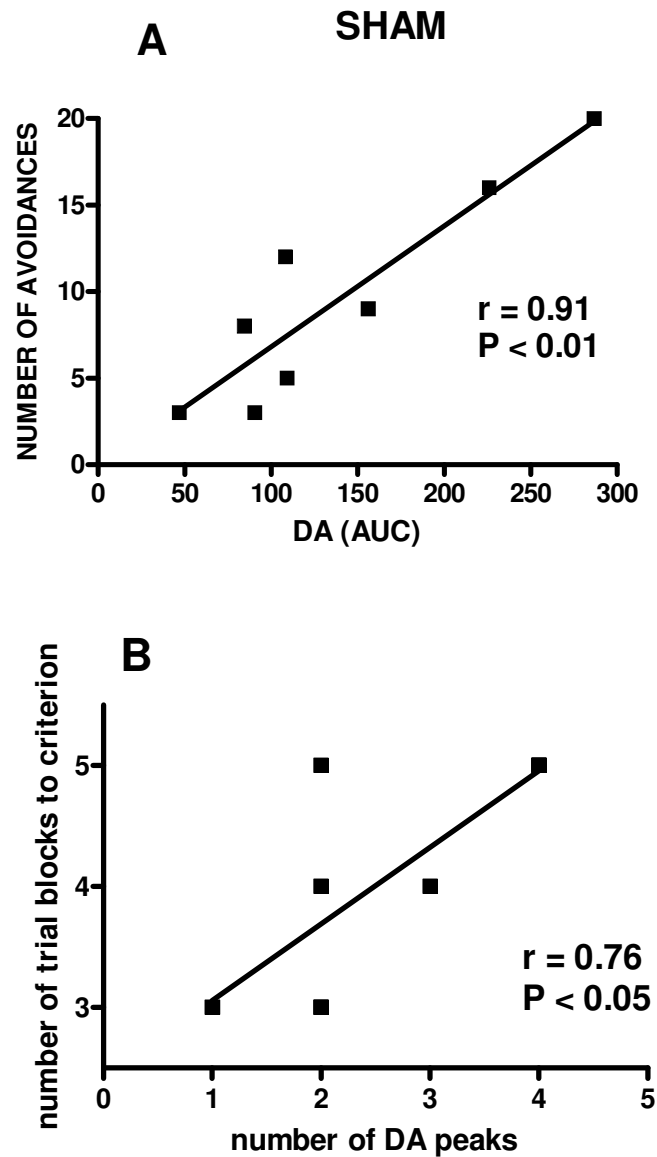


Figure 7: The size and number of DA peaks predicted learning of sham rats trained in the 2-way active avoidance task. Panel A shows a positive and significant Pearson correlation between the size of the peak in block 1 (expressed as the area under the curve, AUC) and the number of times the rats avoided the shock in the subsequent block. Panel B shows a positive and significant correlation between the number of DA peaks and the number of blocks needed to learn the task.

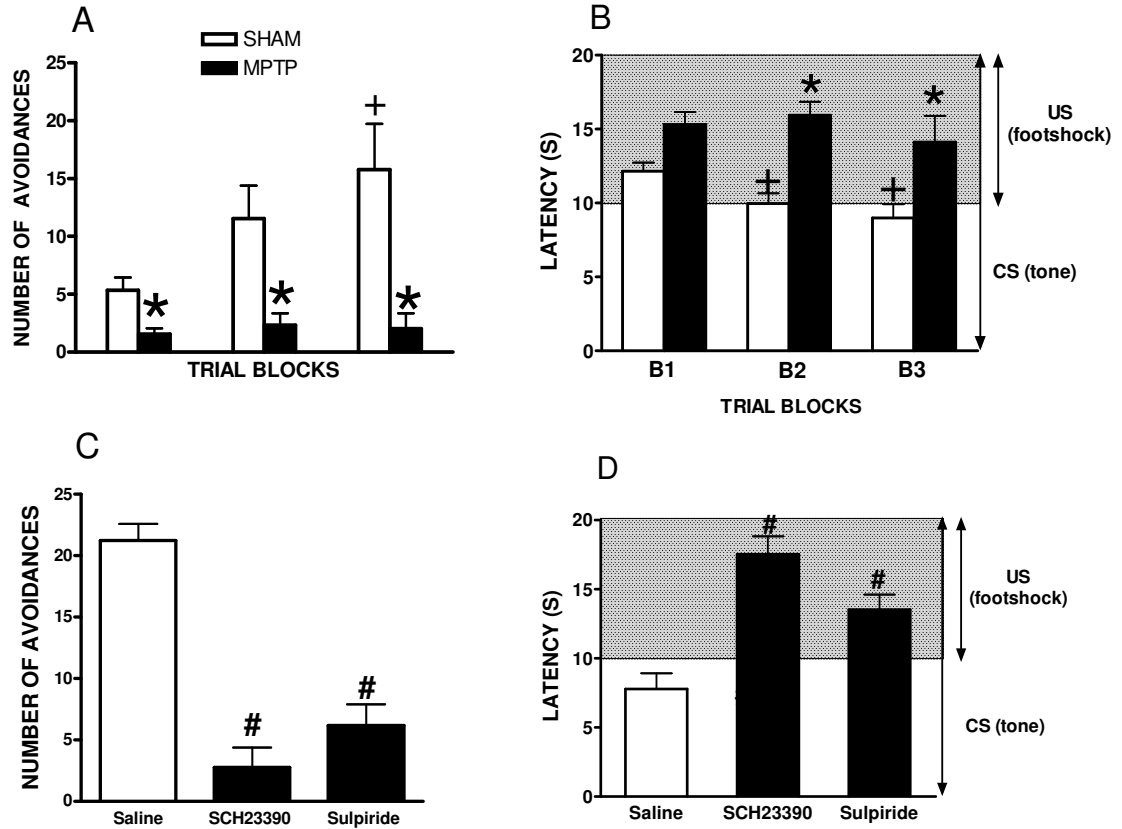


Figure 8: The striatal dopamine depletion by the unilateral administration of MPTP into the rat SNc (200 μ g in 2 μ L saline, 3 weeks before training) and the i.p. administration of the D1-like DA receptor antagonist SCH23390 (0.1 mg/kg, 20 min before training) or the D2-like DA receptor antagonist sulpiride (50 mg/kg, 20 min before training) impaired learning of the 2-way active avoidance task. Bars express mean \pm S.E.M. number of avoidance or latency to respond to the stimuli. * $P < 0.05$, compared to the sham group in the same block; + $p < 0.05$ compared to the same group in block 1; # $P < 0.001$ compared to saline group; Newman-Keuls after ANOVA.

DOPAMINE (ng/g)	MEAN	STANDARD ERROR
SHAM NON-LESIONED SIDE	9636	581
SHAM LESIONED SIDE	8283	403
MPTP NON-LESIONED SIDE	9755	640
MPTP LESIONED SIDE	3373 * #	748

Table 1: Effect of the intra-nigral infusion of MPTP on the post-mortem tissue levels of DA in the rat striatum. * $p < 0.001$ compared to MPTP non-lesioned side; # $p < 0.001$ compared to the sham group, Newman-Keuls test, after two-way ANOVA (lesion factor: $F(1,28) = 15.60$ $p < 0.001$; side factor: $F(1,28) = 40.66$, $p < 0.001$); interaction $F(1,28) = 17.18$, $p < 0.001$).