

MARCIO HENRIQUE DE CARVALHO SILVA

**EFEITO DA LESÃO DA SUBSTÂNCIA NEGRA, PARTE COMPACTA, SOBRE O
APRENDIZADO DE DUAS VERSÕES DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS
EM RATOS**

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

**Curitiba
2004**

MARCIO HENRIQUE DE CARVALHO SILVA

**EFEITO DA LESÃO DA SUBSTÂNCIA NEGRA, PARTE COMPACTA, SOBRE O
APRENDIZADO DE DUAS VERSÕES DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS
EM RATOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Da Cunha.
Co-orientadora: Prof.^a. Dra. Miriam Elizabeth Mendes Angelucci.

**Curitiba
2004**

A Deus, pela minha vida e por estar sempre presente me abençoando, protegendo e iluminando.

Aos meus pais, Aldo e Luzia, pela dedicação, amor, carinho, educação, e investimento. Por superarem todas as dificuldades e pelo apoio incondicional que sempre me deram em todos os meus objetivos e realizações. E por fazer de mim o homem que sou hoje.

À minha esposa, Solange, por seu afeto e compreensão nas horas difíceis, pela paciência, pelo estímulo incansável e por me mostrar o verdadeiro amor.

Aos meus irmãos, Lúcio e Adriana, pela amizade, amor, incentivo e torcerem por mim sempre.

Aos meus amigos por acreditarem em mim. E porque direta ou indiretamente são os responsáveis pelos momentos de alegria e descontração que fazem a vida valer a pena.

“Se procuro entre as minhas
lembranças as que me deixaram um gosto durável,
se faço o balanço das horas que valeram a pena,
certamente só encontro aquelas que nenhuma
fortuna do mundo poderia ter comprado.”

(Antoine de Saint-Exupéry).

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Cláudio e Miriam, pela confiança, dedicação e investimento na elaboração e execução desse trabalho, pela paciência e sabedoria demonstradas durante esse processo, e pela oportunidade de iniciar uma carreira científica.

Ao professor Dr. Newton Canteras, pela colaboração na análise histológica da lesão.

Ao professor Dr. Brás H. de oliveira, pela disponibilidade do laboratório e do aparelho de HPLC. E à professora Dra. Maria Ines Bellissimo pela instrução e apoio técnico no HPLC.

Ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFPR, pela oportunidade.

Aos professores do Departamento de Farmacologia da UFPR, pelo auxílio e instrução, pelas críticas e sugestões sempre construtivas.

Aos meus amigos Marcelo M. Ferro, Samantha Wietzikoski e Ivana I. Kouzmine, pelo total apoio e imensa cooperação em meus experimentos.

Aos meus colegas do Programa de Mestrado, Evellyn, Tony, Daniel, Francine, João, Marcelão e Ângela, Kênia, Lilian, Tadeu, Rosicler, Kita, Viviane, Guilherme, Adriana, Jeff e Michelle que através do companheirismo e descontração fizeram que esses dois anos fossem os mais prazerosos e alegres possíveis.

A todos os funcionários, estagiários e técnicos dos departamentos de Farmacologia e Fisiologia, em especial a Lindacir, Nair e Silvia.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XI
1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Doença de Parkinson.....	1
1.2. Núcleos da Base.....	3
1.3. Memória.....	7
1.4. Modelos Animais no Estudo da Doença de Parkinson.....	14
1.5. O Modelo de Lesão da Snc de Ratos por MPTP.....	16
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. Objetivo Geral.....	19
2.2. Objetivos Específicos:.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1. Animais.....	20
3.2. Cirurgia.....	20
3.3. Testes Comportamentais.....	22
3.4. Determinação dos Níveis de DA.....	27
3.5.Histologia.....	27
3.6. Análises estatísticas.....	28
4. RESULTADOS.....	28
5. DISCUSSÃO.....	34
6. CONCLUSÃO.....	40
6. REFERÊNCIAS.....	41

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Modelo simplificado das vias direta e indireta dos núcleos da base.	5
FIGURA 2	Rato fixado ao estereotáxico de Kopf	21
FIGURA 3	Labirinto aquático de Morris da UFPR	23
FIGURA 4	Rato em cima da plataforma de acrílico no labirinto aquático	24
FIGURA 5	Esquema representativo dos 4 pontos de partida (N,S,E,W)	26
FIGURA 6	Foto de uma lâmina com um corte do mesencéfalo	29
FIGURA 7	Efeito da lesão da substância negra, pars compacta (SNc), sobre o aprendizado (Latência)	31
FIGURA 8	Efeito da lesão da substância negra, pars compacta (SNc), sobre o aprendizado (Nado Livre)	32
FIGURA 9	Efeito da lesão da SNc na velocidade de natação dos ratos	33
TABELA 1	Dosagem de DA e seus metabólitos	30

LISTA DE ABREVIATURAS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
6-OHDA	6-hidroxi-dopamina
ACN	Acetonitrila
ATP	Adenosina tri-fosfato
CaCl_2	Cloreto de cálcio
cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DOPAC	Ácido 3,4-di-hidroxi-fenilacético
DP	Doença de Parkinson
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
g	Grama
GABA	Ácido gama- amino butírico
GPe	Globo pálido externo
GPi	Globo pálido interno
H_2O	Água
H_2O tipo I	Água pura
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HVA	Ácido homovanílico
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Quilograma
LCR	Líquido céfalo - raquidiano artificial
m	Metro

MAO	Monoamino oxidase
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NO	Óxido nítrico
OH ⁻	Radical hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito
pH	Potencial hidrogênio-iônico
Qsp	Quantidade suficiente para
S	Segundos
SN	Substância negra
SNc	Substância negra parte compacta
SNr	Substância negra parte reticulada
STN	Núcleo sub-talâmico
THF	Tetraidrofurano
UFPR	Universidade Federal do Paraná
VL	Núcleo ventro-lateral do tálamo
VTA	Área Tegmental Ventral

RESUMO

Sabe-se há tempos que existem vários sistemas cerebrais de aprendizado e memória em mamíferos. Entre eles, os melhor caracterizados são os sistemas dependentes da formação hipocampal e do neocórtex que, em humanos, armazenam memórias episódicas e procedurais, respectivamente. Neste trabalho estudamos o efeito da lesão de uma estrutura que aferente o estriado, a substância negra, parte compacta (SNc) de ratos, sobre duas variações da tarefa de aprendizagem e memória – o labirinto aquático de Morris. Ratos Wistar machos adultos com lesões bilaterais na SNc induzidas por MPTP e conseqüente depleção de DA no estriado foram treinados nesta tarefa. Estes animais são um modelo da fase inicial da doença de Parkinson (DP). Na versão estímulo-resposta (S-R) desta tarefa os animais partiram sempre do mesmo ponto do labirinto aquático para encontrar uma plataforma submersa que foi mantida sempre no mesmo lugar em todos os 8 dias de treino. No 9º os ratos nadaram livremente no labirinto sem a plataforma. Na versão espacial da tarefa os animais partiram de diferentes pontos do labirinto de forma a não poderem associar de forma rígida a posição de dicas visuais específicas com a localização da plataforma. Os ratos com lesão na SNc apresentaram um déficit apenas na versão S-R da tarefa. Estes resultados sugerem que a SNc e o estriado participam do armazenamento de um tipo especial de memória não-flexível, onde um grupo de estímulos visuais é associado a uma resposta motora de se aproximar da plataforma de forma rígida. Este resultado está de acordo com as propriedades esperadas para uma memória procedural, dependente da integridade da via nigro-estriatal, lesada na DP.

ABSTRACT

It is already known that there are many memory systems in mammals. Among them, the systems dependent on the integrity of the hippocampal formation and of the neostriatum, respectively, are known to store episodic and procedural memories in humans. In the present investigation we studied the effect of the lesion of a structure that modulates the striatum, the substantia nigra, compact part (SNc), on two versions of the Morris water maze task. Adult male Wistar rats with bilateral lesions of the SNc and consequent depletion of striatal dopamine, thus mimicking the initial phase of Parkinson's disease (PD) were trained in this task. In the stimulus-response (S-R) version, the animals were released from the same starting point in the maze to find a hidden platform during 8 training days and in a subsequent probe trial, without the platform. In the spatial version, the animals were released from different starting points so that they could not associate the position of single cues with the position of the platform in a rigid way. The SNc bilaterally-lesioned rats presented a deficit in the S-R, but not in the spatial version of this task. This result suggests that the SNc and the striatum play a role in a kind of non-flexible memory in which a cue is associated in a rigid way with a motor response to approach to the platform. This result is in agreement with the properties expected for a procedural memory, dependent upon the integrity of the nigrostriatal pathway and affected in PD.

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson (DP) ou síndrome parkinsoniana idiopática é uma doença crônica e progressiva (FLINT, 2001; MENESES e TEIVE, 1996). Juntamente com a doença de Alzheimer é uma das mais comuns desordens neurodegenerativas relacionadas à idade em humanos (FLINT, 2001; MENESES e TEIVE, 1996), e constitui-se em um dos distúrbios do movimento mais encontrados na população idosa, entre os 50 e 70 anos de idade (FLINT, 2001; MENESES e TEIVE, 1996),

Descrita pela primeira vez em 1817 no “*An Essay on the Shaking Palsy*” de James Parkinson, como uma *paralisia agitante* (McAULEY, 2003), foi posteriormente denominada Doença de Parkinson por Jean Marie Charcot em homenagem ao homem que primeiramente descreveu essa enfermidade (DUVOISIN et al., 1991).

A principal alteração morfológica encontrada na maioria das autópsias realizadas em pacientes com diagnóstico de DP, foi uma degeneração dos neurônios da Substância Negra parte compacta (SNc) (FLINT, 2001).

Sabe-se hoje que os sintomas da DP são devidos à perda específica de neurônios dopaminérgicos na SNc (grupo celular A9) que se projetam para o estriado (núcleos caudado e putâmen), (BLANDINI et al., 2000; STANDAERT e YOUNG, 1996).

Uma segunda característica patológica da DP é o aparecimento de inclusões intracelulares denominadas corpos de *Lewy*, que acumulam-se em neurônios que sofrem degeneração, especialmente os neurônios dopaminérgicos. Os corpos de *Lewy* caracterizam-se por pequenas inclusões esféricas intracitoplasmáticas, de natureza protéica, que possuem uma camada densa granular cercada por um halo de filamentos (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003; FLINT, 2001), e podem ser observados em 85% a 100% das autópsias realizadas

em portadores de DP, embora já tenham sido encontrados em algumas autópsias realizadas em idosos não portadores da doença (FLINT, 2001; GIBB, 1989).

Os sintomas motores clássicos da doença são: tremor de repouso, bradicinesia, acinesia e rigidez muscular do tipo plástica. Porém, os pacientes podem ainda apresentar outros sintomas como distúrbios do equilíbrio e da marcha, micrografia, perda da expressividade facial (face de máscara) e hipocinesia (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003; BLUM et al., 2001).

Mais recentemente, estudos têm mostrado que os prejuízos observados nos pacientes com a doença de Parkinson incluem não somente distúrbios motores, mas também disfunções cognitivas (DUBOIS e PILLON, 1997), como demência, alterações do sono e deficiências severas de memória, pensamento abstrato, linguagem e outros processos (DEUMENS, BLOKLAND, e PRICKAERTS, 2002).

Nas descrições clássicas da doença de Parkinson não foram observadas alterações específicas nas habilidades cognitivas nos estágios iniciais da doença (COOPER et al., 1996). Embora hoje sabe-se que a disfunção cognitiva existe e está presente na maioria dos pacientes de DP (CUMMINGS, 1992). Estes prejuízos cognitivos, incluindo prejuízos de memória (tanto explícita quanto implícita), podem ser observados no início da doença, ou mesmo antes do aparecimento dos sintomas motores clássicos (DUBOIS e PILLON, 1997; Da CUNHA et al., 2001).

A detecção precoce da DP dificilmente ocorre, pois a etiologia ainda não é completamente conhecida, e o diagnóstico clínico é feito através da análise de sinais e sintomas que são detectáveis somente após uma depleção de aproximadamente 80% da dopamina (DA) estriatal e quando a perda neuronal dopaminérgica da SNc já está entre 50 – 70%, ocasionando sintomas motores mais grosseiros (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003; DEUMENS, BLOKLAND, e PRICKAERTS, 2002; BLUM et al., 2001).

O tratamento da DP atualmente resume-se a duas abordagens terapêuticas: uma sintomática e uma neuroprotetora. A sintomática visa controlar as manifestações clínicas da doença, baseando-se na restauração do equilíbrio dos níveis de neurotransmissores no estriado. Já a terapia neuroprotetora visa

preservar e proteger os neurônios dopaminérgicos nigrais que ainda restam (FERRO, 2003).

Sabe-se já há algum tempo que os circuitos dos núcleos da base estão envolvidos com o controle dos movimentos, contudo diversas evidências mostram que eles estão envolvidos também nos processos cognitivos (Da CUNHA et al., 2002; MIDDLETON e STRICK, 2000). Desta forma, há uma correlação entre a disfunção do sistema nigro-estriatal e o aparecimento dos danos cognitivos (Da CUNHA et al., 2002).

Dentre as várias causas do prejuízo cognitivo na DP, podemos citar a disfunção dos circuitos córtico-basais, os quais conectam o córtex pré-frontal dorso-lateral e os núcleos da base, como sendo a principal responsável pela deficiência dos parkinsonianos na aquisição de novas memórias procedurais, inclusive na formação de hábitos, e na memória operacional (KANDEL, 2003; Da CUNHA et al., 2002; GRAYBIEL, 1998).

1.2 NÚCLEOS DA BASE

Os núcleos da base não constituem um único “órgão”, mas sim um conjunto de vários núcleos subcorticais interconectados, de várias partes do sistema nervoso, com projeções principais para o lobo frontal do córtex cerebral via tálamo, com um papel importante no controle motor (LENT, 2001; KANDEL et al., 2003). São os principais componentes do grande circuito subcortical, recebendo aferências de todo o córtex cerebral, enviando eferências de volta para o córtex através do tálamo (LENT, 2001; KANDEL et al., 2003).

Os quatro principais núcleos dos núcleos da base são: o estriado, o globo pálido, a substância negra (SN) e o núcleo subtalâmico (LENT, 2001; KANDEL et al., 2003). Estão entre as estruturas mais antigas e que sofreram menos alterações em cérebros de mamíferos. Isto, por si só, sugere que esses núcleos desempenham funções fundamentais no comportamento de vertebrados. O corpo estriado, que recebe esse nome devido às fibras da cápsula interna que o

atravessam, é constituído de três importantes subdivisões: o núcleo caudado, o putâmen e o estriado ventral (que inclui o núcleo acumbens). É a porta de entrada dos núcleos da base, e é do estriado que partem axônios que projetam para o globo pálido e para a substância negra (LENT, 2001; KANDEL et al., 2003). O globo pálido que se situa ventralmente ao estriado dividi-se em globo pálido interno (GPi) e globo pálido externo (GPe), possui células neuronais morfológicamente semelhantes às da substância negra, parte reticulata (SNr) e, juntamente com esta, envia as principais projeções de saída dos núcleos da base, em direção ao tálamo, representando o estágio final do processamento da informação que os núcleos da base realizam (LENT, 2001; KANDEL et al., 2003). Esses dois núcleos de saída dos núcleos da base, o GPi e a SNr, inibem tonicamente seus núcleos-alvo no tálamo (KANDEL et al., 2003). O tálamo, por sua vez, projeta neurônios de volta para o córtex frontal (MIDDLETON e STRICK, 2000, GRAYBIEL, 1998).

A substância negra subdivide-se em parte reticulada (SNr) e parte compacta (SNc). A SNr recebe as projeções do GPi e está funcionalmente relacionada a este. A SNc é um núcleo distinto localizado dorsalmente à SNr. Suas células são dopaminérgicas e possuem um pigmento escuro denominado neuromelanina que, com a idade, acumula-se nos corpos celulares dos neurônios dopaminérgicos ocasionando uma coloração escura, daí o nome dado a essa estrutura (LENT, 2001; KANDEL et al., 2003). A DA, liberada dos terminais nervosos localizados na SNc, modula a atividade das células estriatais e, portanto, modula todo o circuito (MIDDLETON e STRICK, 2000, GRAYBIEL, 1998).

Os núcleos da base, através do estriado, recebem aferências excitatórias glutamatérgicas de todas as regiões do córtex e dos núcleos intratálâmicos além de outras aferências distintas como dopaminérgicas e serotoninérgicas. Já suas eferências são basicamente inibitórias, GABAérgicas (LENT, 2001; KANDEL et al., 2003).

Atualmente propõe-se que existam duas vias de saída paralelas principais dos núcleos da base, uma via direta e uma indireta (Figura 1). A via direta causaria supressão da inibição tônica dos neurônios tálamo-corticais, enquanto uma ativação da via indireta aumentaria transitoriamente a inibição destes. Como

neurônios tálamo-corticais glutamatérgicos facilitam a estimulação de movimentos, o resultado da ativação da via direta é aumentar os movimentos, enquanto o da via indireta é reduzi-los. Ambos os sistemas são modulados pelas aferências dopaminérgicas da SNc que estimula a via direta pela ativação de receptores D1 e inibe a via indireta onde predominam receptores D2 (KANDEL et al., 2003; OBESO, 2000; RICHARDSON et al., 1997).

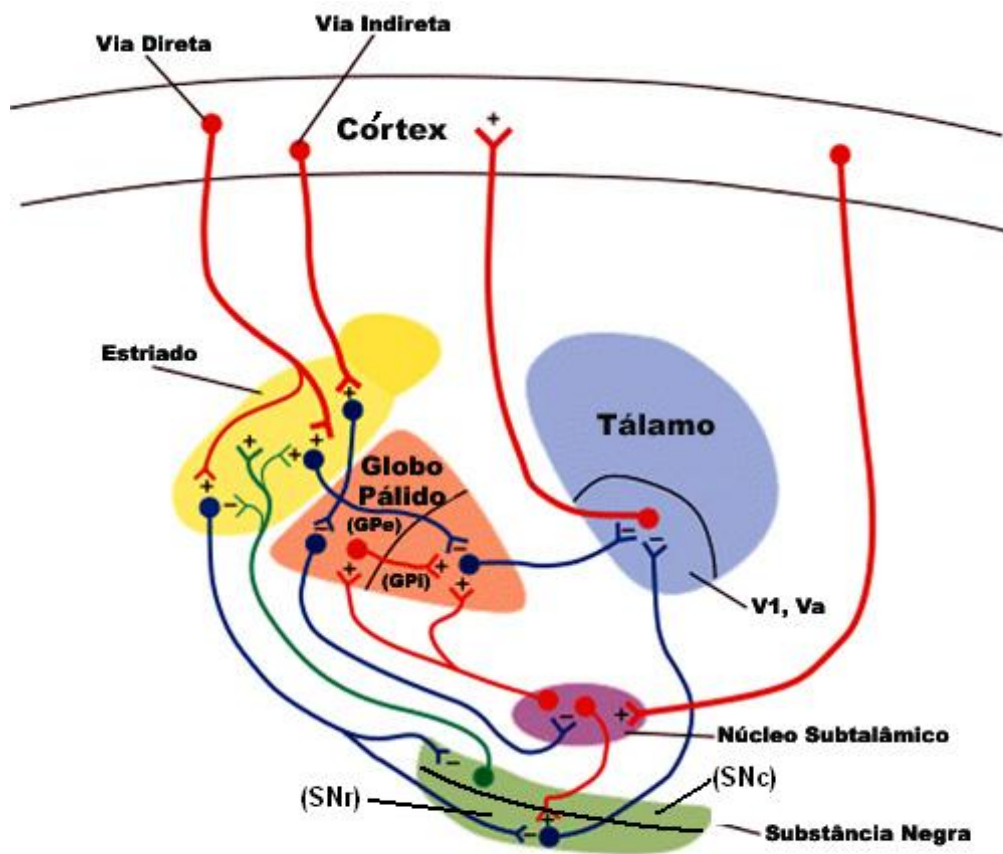


FIGURA 1: Modelo simplificado das vias direta e indireta dos núcleos da base. As vias excitatórias (glutamato) estão representadas em vermelho, enquanto as inibitórias em azul (GABA). As aferências ao estriado provenientes da SNc, em verde, são dopaminérgicas. A DA pode exercer função excitatória quando se liga a receptores D1 (via direta) e função inibitória quando se liga a receptores D2 (via indireta).

A visão tradicional de que os núcleos da base eram simples e unicamente envolvidos com o controle do movimento começou a mudar há alguns anos (MIDDLETON e STRICK, 2000). Uma revisão de estudos anatômicos, clínicos, fisiológicos e patológicos permitiu que diversos pesquisadores propusessem que os núcleos da base estariam envolvidos também em operações não motoras (MIDDLETON e STRICK, 2000b). Participando de múltiplos circuitos ou “loops” paralelos com o córtex cerebral, inclusive com áreas cognitivas, e fazendo uma recodificação da informação derivada do córtex através do estriado (transformações córtico-estriatais), o que por sua vez explicaria como os núcleos da base poderiam estar modulando também os processos cognitivos e comportamentais (MIDDLETON e STRICK, 2000; GRAYBIEL, 1998).

Mishkin e Petri (1984) foram os primeiros a propor que os núcleos da base e suas conexões são responsáveis pela formação das memórias do que se chama de “hábitos”. Acredita-se que hábitos são adquiridos a partir de comportamentos inconscientes, baseados em memórias, que gradual e lentamente se convertem em hábitos cegos, tal como dirigir um carro (Mishkin e Petri, 1984). As principais características dos hábitos incluem o armazenamento de uma associação entre um estímulo e uma resposta de forma: 1-incremental, aprendida lentamente; 2-relativamente estável ao longo do tempo, exceto em condições de extinção; 3-transferida com dificuldade entre o sistemas efetores e outros contextos comportamentais, ou seja, rígida ou cega; 4- inacessível aos mecanismos da consciência (LENT, 2001; KANDEL et al., 2003).

A separação entre memórias declarativas e procedurais, sendo os hábitos uma forma particular dessa última, tem como suporte uma separação anatômico-funcional. Segundo a hipótese de Mishkin, memórias declarativas (hoje melhor definidas como episódicas) dependem do sistema medial temporal, especialmente do hipocampo, do diencéfalo, e das estruturas neocorticais associadas a eles, enquanto que os hábitos dependeriam principalmente da interação do neocórtex com o corpo estriado. Sabe-se que a memória procedural encontra-se prejudicada em pacientes parkinsonianos, enquanto a memória declarativa está melhor preservada, salvo nos casos de demência (DUBOIS & PILLON, 1997).

1.3. MEMÓRIA

“Podemos afirmar que somos aquilo que recordamos, literalmente” (IZQUIERDO, 2002). Cada pessoa é única e distinta devido ao acervo de suas memórias, sua coleção de lembranças. Esse conjunto de memórias de cada um determina aquilo que se denomina personalidade. “Nós somos quem somos, em grande parte, devido ao que aprendemos e ao que lembramos” (KANDEL et al., 2003). Nossas memórias são feitas e armazenadas em redes neurais. Existem diferentes redes neurais para diferentes tipos de memória, redes estas localizadas em estruturas neurais distintas e com neurônios que utilizam mecanismos celulares distintos. O funcionamento destas redes é modulado pelas emoções, pelo nível de consciência e pelo estado de ânimo (LENT, 2001; IZQUIERDO, 2002; KANDEL et al., 2003).

Aprendizagem é o processo de aquisição de novas informações específicas e de conhecimentos gerais sobre o mundo que vão ser retidas na memória (LENT, 2001). Memória é capacidade de armazenamento e arquivamento seletivo de informações, que poderão ser evocadas posteriormente, consciente ou inconscientemente. Os processos de memória podem ser divididos em retenção, consolidação, evocação e esquecimento (LENT, 2001; IZQUIERDO, 2002; KANDEL et al., 2003).

A aquisição refere-se a alterações em circuitos neurais existentes, conseqüentes ao contato com uma nova situação ou evento de aprendizagem. Possui uma capacidade de informação bastante limitada e, sem reforço, persiste por um período de apenas minutos (KANDEL, et al. 2003). Como os eventos são geralmente múltiplos e complexos, os sistemas de memória só permitem a aquisição de alguns aspectos mais relevantes para a cognição (LENT, 2001).

Após a aquisição, as informações selecionadas podem ser armazenadas por algum tempo. Esse é o processo de retenção, durante o qual os eventos selecionados ficam disponíveis para serem lembrados. O tempo de retenção é limitado pelo esquecimento, e ambos são definidos, entre outros aspectos, pelo tipo de utilização que se faz de cada evento memorizado. A retenção pode ocorrer por

tempos variáveis, desde a retenção por tempos curtos à retenção de longa duração (LENT, 2001).

A retenção nem sempre é permanente, um evento após ter sido retido, pode ser consolidado para posterior evocação, como pode também ser esquecido após algum tempo. O esquecimento provavelmente desempenha papel muito importante na prevenção de sobrecarga nos sistemas cerebrais dedicados à memorização e tem ainda a virtude de permitir a filtragem dos aspectos mais relevantes ou importantes de cada evento (LENT, 2001).

A consolidação é o processamento dessas informações, que faz com que elas fiquem armazenadas por períodos maiores, podendo para isso haver mudanças plásticas nas conexões sinápticas responsáveis pelo armazenamento, estimulando a síntese de proteínas. A evocação corresponde ao ato de lembrar ou acessar memórias quando se faz necessário (IZQUIERDO, 2002; LENT, 2001; ZIGMOND et al., 1999; FUSTER, 1997).

Os mecanismos neurais da memória não são completamente conhecidos. Considera-se que as informações transitórias e duradouras são armazenadas em diversas áreas corticais de acordo com a sua função: memórias motoras próximas do córtex motor, memórias visuais próximas do córtex visual, e assim por diante. Além disso, o processo de consolidação é fortemente influenciado por sistemas moduladores, especialmente aqueles envolvidos com o processamento emocional, como o complexo amigdalóide do lobo temporal (LENT, 2001). Existem evidências de que a SNc exerça também um efeito modulatório sobre memórias procedurais, sinalizando principalmente a contingência de reforço.

Estudos distintos têm demonstrado ao longo do tempo que existem vários processos de memória e que estes envolvem diferentes sistemas neurais e regiões cerebrais. Há muitas classificações das memórias: de acordo com a sua função, natureza, o tempo que duram e com o seu conteúdo. Classificações que às vezes se sobrepõem de acordo com o critério utilizado pelo autor (KANDEL et al., 2003; IZQUIERDO, 2002; LENT, 2001; ZIGMOND et al., 1999; FUSTER, 1997).

Um tipo de memória, muito breve e fugaz, é a chamada memória de trabalho ou memória operacional, que serve para “gerenciar a realidade”. É comparável à

memória RAM dos computadores. A memória de trabalho serve para manter viva na mente durante alguns segundos a informação que está sendo processada e sua atividade está relacionada ao funcionamento do lobo frontal (LENT, 2001, IZQUIERDO, 2002). Após a entrada das informações, ocorre a primeira seleção do que poderá ser armazenado durante um tempo um pouco maior, suficiente para orientar o pensamento e o comportamento (LENT, 2001). A memória de trabalho irá então determinar o contexto em que os diversos fatos, acontecimentos ou outros tipos de informação ocorrem, e se vale a pena ou não fazer uma nova memória disso ou se esse tipo de informação já consta nos arquivos armazenados (IZQUIERDO, 2002).

A memória de trabalho é processada principalmente pelo córtex pré-frontal. Em todas as espécies, o córtex pré-frontal atua em conjunto com o córtex entorrinal, parietal superior e cíngulo anterior, e com o hipocampo e os núcleos da base (FAW, 2003). Esse trabalho conjunto é realizado através de suas diversas conexões. Mas a formação da memória de trabalho é acompanhada de poucas alterações bioquímicas. Seu processamento parece depender fundamentalmente da atividade elétrica dos neurônios do córtex pré-frontal que, no entanto, liberam neurotransmissores nos neurônios pós-sinápticos, comunicando assim, a estes, traduções bioquímicas da informação processada (IZQUIERDO, 2002). Independente de quais são seus caminhos, a memória de trabalho fornece ao indivíduo o mínimo necessário para a realização das operações do dia-a-dia: compreensão dos fatos, raciocínio, resolução de problemas, e gerenciamento do comportamento. Pode-se dizer que é o sistema que gerencia quais informações serão armazenadas por curtos ou longos prazos quando o sujeito está vivenciando uma experiência (IZQUIERDO, 2002; LENT, 2001; KOLB e WHINSHAW, 2002).

O córtex pré-frontal e a memória de trabalho também estão envolvidos com os processos de aquisição e evocação da memória de longa duração. Mover uma informação disponível na memória de trabalho para o seu local de armazenamento faz parte do processo de aquisição de uma memória de longa duração. Trazer uma informação de volta do seu local de armazenamento para a *consciência* é chamada de evocação (FAW, 2003).

Dentre os tipos importantes da memória de longa duração, uma distinção pode ser feita entre memórias declarativas e não-declarativas (KANDEL et al., 2003; IZQUIERDO, 2002; ZIGMOND et al., 1999). A memória declarativa refere-se à memória que o sujeito pode relatar verbalmente. Uma outra classificação próxima a esta divide as memórias de longa duração em memórias implícitas e explícitas. As memórias explícitas são aquelas que podem ser evocadas conscientemente. As implícitas são as que influenciam o comportamento do indivíduo sem que ele se dê conta de que aprendeu algo que agora o orienta naquela situação. Algumas memórias implícitas e não-declarativas são demonstradas através de um procedimento motor p. ex., andar de bicicleta, nadar, etc. Estas memórias são chamadas de procedurais. O armazenamento de memórias declarativas requer a ativação do hipocampo e áreas adjacentes do lobo temporal (KANDEL et al., 2003; IZQUIERDO, 2002; LENT, 2001). Por outro lado, acredita-se que a formação de memórias procedurais depende da integridade do estriado (KANDEL et al., 2003; Da CUNHA et al., 2003).

O psicólogo Endel Tulving foi o primeiro a desenvolver a idéia de que as memórias podem ser divididas em memórias *semânticas* e *episódicas*. A memória *episódica* como o próprio nome diz é uma memória para episódios e eventos que marcaram o passado do indivíduo. Ela envolve o reconhecimento factual de cenas e objetos familiares, de pessoas e lugares, bem marcados no tempo e no espaço. A memória *semântica* refere-se ao significado desses fatos e ao conhecimento geral do mundo. É uma memória para conceitos, como o conhecimento do tipo que se aprende na escola e nos livros. (KANDEL et al., 2003; TULVING, 1990; TULVING, 1972).

Os mecanismos da formação da memória de longa duração começaram a ser desvendados nos últimos 15 anos como consequência da descoberta de um processo eletrofisiológico em 1973, chamado de potencialização de longa duração (Long-Term Potenciation – LTP) que consiste no aumento persistente da eficácia de uma sinapse após uma breve estimulação repetitiva (tetânica) do neurônio pré-sináptico. Nos anos seguintes foi descrito o fenômeno da depressão de longa duração (Long-Term-Depression – LTD), que constitui uma depressão (inibição)

persistente da eficácia uma determinada sinapse como consequência da estimulação de uma via aferente com uma frequência muito baixa (KANDEL et al., 2003; IZQUIERDO, 2002). No entanto sabe-se hoje que estes não são os únicos mecanismos eletrofisiológicos envolvidos e que outros mecanismos moleculares e algumas formas de plasticidade neuronal e sináptica sejam responsáveis também pela aprendizagem e memória, levando a alterações estruturais no cérebro (KANDEL et al., 2003).

Há tempos, diversos pesquisadores têm buscado comprovar a idéia de que são vários os tipos de aprendizado e memória em mamíferos e que eles são mediados por vários sistemas neurais independentes (PACKARD, HIRSH e WHITE, 1989; McDONALD e WHITE, 1993; EICHEMBAUN, 2000; WHITE e McDONALD, 2002). Segundo esta visão, estes sistemas teriam seus centros de comando, processamento, organização, distribuição e armazenamento, relacionados a diferentes regiões e estruturas cerebrais (MISHKIN e PETRI, 1984; WHITE e McDONALD, 2002). Assim, classificou-se e definiu-se entre outros, alguns dos mais conhecidos e estudados sistemas de memória em mamíferos, como o sistema hipocampal e o sistema estriatal (KESNER E DiMATTIA, 1987; PACKARD E McGAUGH, 1992; EICHEMBAUN, 2000; WHITE & McDONALD, 2002; PACKARD e KNOWLTON, 2002; Da CUNHA et al, 2003).

Tal como mencionado acima, o chamado sistema hipocampal é responsável pela formação e evocação de memórias *episódicas* em humanos (McDONALD e WHITE, 1994; EICHEMBAUN, 2000). Em animais, este sistema está responsável principalmente pela aquisição de memórias espaciais (O'KEEFE e NADEL, 1978; PACKARD e McGAUGH, 1996; EICHEMBAUN, 2000). Esse sistema tem como estrutura central o hipocampo porém envolve conexões bidirecionais entre este e o neocórtex (EICHEMBAUN, 2000). O sistema estriatal, que inclui estruturas dos núcleos da base tais como o estriado dorsal e a SNc é responsável pela formação de *memórias procedurais*, englobando habilidades motoras, associações do tipo estímulo resposta (S-R) e hábitos (PACKARD e McGAUGH, 1992; PACKARD e KNOWLTON, 2002; Da CUNHA et al, 2003). A amígdala basolateral atua mais como um modulador de memórias formadas durante situações emocionais, que

como um outro sistema de memória. Nestas circunstâncias ela facilita a consolidação de memórias mediadas tanto pelo hipocampo como pelo estriado. (McDONALD e WHITE, 1993; PACKARD e THEATER, 1998; EICHEMBAUN, 2000; PACKARD e CAHILL, 2001).

São várias as evidências sugerindo que em animais o aprendizado espacial e o aprendizado tipo S-R são influenciados por diferentes estruturas do cérebro, e que o desempenho em testes de memória específicos para cada um desses aprendizados são afetados pela integridade do hipocampo e do estriado dorsal e SNc, respectivamente (Da CUNHA et al., 2003; WHITE e McDONALD, 2002; PACKARD e McGAUGH, 1996). Dentre os modelos animais de memória espacial dependente do hipocampo mais estudados estão o labirinto radial de oito braços (CAMPOS e SAITO, 1999) e o labirinto aquático de Morris (MORRIS et al, 1982; ANGELUCCI et al, 2002). Dentre os modelos animais de memória S-R, dependentes do estriado dorsal e da SNc tem-se vários testes, como o teste da esquiwa ativa de duas vias onde um estímulo único é associado a uma única resposta como aproximar-se esquivar-se após a apresentação da dica (ANGELUCCI et al, 1999; Da CUNHA, et al. 2001) ou testes que se utilizam de um único estímulo ou dica (visual ou sonora) para medir uma determinada resposta como o labirinto aquático com dica visual (Da CUNHA, et al., 2002, MIYOSHI, et al., 2002), ou o labirinto radial de oito braços com dica visual onde o animal deve se aproximar da dica (PACKARD e McGAUGH, 1992).

Em ratos, a versão espacial do labirinto aquático é um modelo de memória dependente do hipocampo (MORRIS et al., 1982). Nesta tarefa, o animal precisa aprender a encontrar uma plataforma submersa fixa e invisível para ele, partindo de vários pontos do labirinto (MORRIS et al., 1982). Desta forma o animal aprende a triangular as distâncias entre as dicas visuais do ambiente e a posição da plataforma de uma forma flexível, como em um mapa cognitivo. Trabalhos anteriores mostram que mesmo um animal com lesão hipocampal pode aprender a encontrar a plataforma se ele parte sempre de um mesmo ponto do labirinto, pois desta forma ele não precisa usar propriedades dedutivas do seu mapa cognitivo para associar as dicas espaciais e, por triangulação deduzir a posição da

plataforma, independente de se liberado próximo ou distante de uma dica específica. O animal pode simplesmente aprender a se aproximar de um conjunto de dicas próximas à plataforma (EICHEMBAUN, 2000). Esta é uma tarefa que pode ser resolvida com um aprendizado do tipo S-R, semelhante à versão do labirinto aquático com dica visual, onde os animais precisam aprender a associar uma dica visual (uma bola fixada em cima da plataforma) com a resposta de se aproximar desta dica. Já foi demonstrado que o aprendizado do labirinto aquático com dica visual depende do estriado dorsal e da SNc, e não é afetado pela lesão do hipocampo (Da CUNHA et al, 2003, MIYOSHI et al, 2002). O labirinto aquático com plataforma submersa só funciona como um modelo de aprendizado espacial se o animal parte de vários pontos e pode traçar uma relação entre as dicas. Espera-se, portanto, que o aprendizado do labirinto aquático quando o animal parte de um único ponto e a plataforma permaneça fixa sempre na mesma localização, seja dependente da SNc e do estriado, estruturas cerebrais que medeiam o aprendizado S-R.

Eichenbaun em 1990, verificou em um labirinto aquático de Morris que, se um rato com lesão hipocampal parte sempre de um único ponto e a plataforma é fixada sempre no mesmo local, isto é, não variando a distância e a posição espacial das dicas no labirinto aquático, terá então o aprendizado da tarefa levemente prejudicado, obtendo tempos de latência pouco superiores para encontrar a plataforma em relação a um animal com o hipocampo não lesado, porém aprenderá a encontrar a plataforma mesmo assim, o que poderia ser encarado como um teste de aprendizado do tipo S-R. Já em um segundo teste, ratos lesados no hipocampo foram severamente prejudicados para encontrar a plataforma em relação aos ratos não-lesados, quando saíram de pontos de partida diferentes do qual foram treinados, demonstrando assim a importância do hipocampo no aprendizado espacial.

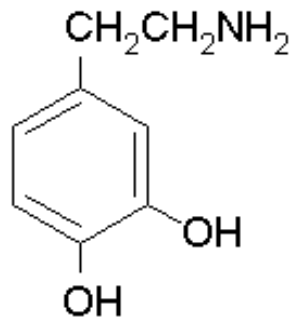
O objetivo deste estudo é testar se a lesão seletiva e parcial da SNc de ratos por MPTP causa um déficit de aprendizado S-R no labirinto aquático com plataforma submersa onde o animal parte sempre do mesmo ponto, e a plataforma é colocada sempre no mesmo local. Este estudo irá testar, desta forma, se a via

nigroestriatal desempenha um papel essencial neste tipo de aprendizado S-R. Como ratos com lesão na SNc são um modelo da doença de Parkinson (DP), estaremos por consequência avaliando se este tipo de aprendizado é afetado em um modelo animal da DP.

1.4. MODELOS ANIMAIS NO ESTUDO DA DOENÇA DE PARKINSON

A grande importância dos modelos animais na medicina experimental remete ao fato de permitirem o estudo dos mecanismos fisiológicos e da evolução de patologias. Uma vez compreendido o mecanismo fisiológico da patologia o modelo é também utilizado para a determinação de estratégias terapêuticas. A validade desses modelos parte da premissa de que estes reproduzam, com considerável fidelidade, o estado da doença quando essa acomete humanos (GERLACH E RIEDERER, 1996). Desenvolver um modelo que reproduza uma patologia em toda sua extensão é uma tarefa muito complexa e por vezes impossível, porém pode-se encontrar outra maneira de se estudar os efeitos de potenciais estratégias terapêuticas para determinadas patologias através do desenvolvimento de modelos que refletem o comportamento de agentes terapêuticos frente a determinadas características da patologia, simulando então características distintas e específicas e levando ao desenvolvimento de novos tratamentos farmacológicos. Tal modelo deve responder a critérios de validação já caracterizados, como: reprodutibilidade, validade preditiva e etológica, entre outras (GEYER e MARKOU, 1995, DEUMENS, BLOKLAND, E PRICKAERTS, 2002).

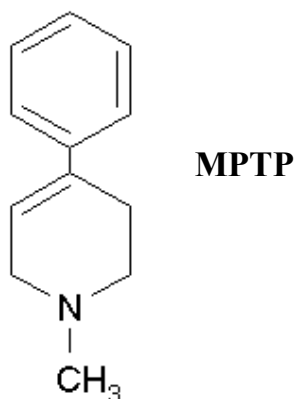
A tarefa de construir um modelo animal que reproduza as características tanto cognitivas quanto motoras, da DP, não é das mais fáceis, pois esta é uma patologia que parece não se desenvolver em outros animais além do homem (GERLACH e RIEDERER, 1996; WIETZIKOSKI, 2003).



Dopamina

Os sintomas da DP resultam principalmente da degeneração de neurônios *dopaminérgicos* da SNc que projetam para o estriado (BLANDINI et al., 2000; STANDAERT e YOUNG, 1996). Através da administração sistêmica ou intracerebral de substâncias neurotóxicas, como a 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), a metanfetamina, a rotenona, a reserpina ou o MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), pode-se reproduzir vários sintomas da doença em diferentes estados e em combinação com outras manifestações neurológicas que são chamadas de parkinsonismo (BEAL, 2001, Da CUNHA et al., 2002, MIYOSHI et al., 2002). A DP possui uma natureza progressiva, ou seja, a morte neuronal acontece de forma lenta e gradual, o que a diferencia da maioria dos modelos que utilizam neurotoxinas pois estes geralmente causam uma morte neuronal abrupta e aguda. Para se obter modelos mais fiéis a essa característica, os modelos em primatas são os mais indicados (BANKIEWICZ et al, 1999), porém os modelos com a administração destas toxinas em outras espécies animais podem ajudar a investigar determinadas características da doença de modo mais refinado (GEYER e MARKOU, 1995). Sendo assim, deve-se avaliar em qual estágio do desenvolvimento da DP no ser humano está o interesse em desenvolver o modelo. As lesões parciais, de modo geral, assemelham-se aos estágios iniciais, onde a estratégia terapêutica visa à correção, ao menos em parte, das funções afetadas, o que depende da existência de neurônios sobreviventes nas estruturas cerebrais afetadas (DEUMENS, BLOKLAND, E PRICKAERTS, 2002).

1.5 O MODELO DE LESÃO DA SNC DE RATOS POR MPTP



Desde a sua descoberta em 1983, a neurotoxina MPTP transformou-se em uma ferramenta muito útil para produzir modelos animais e celulares de parkinsonismo (SEDELIS, SCHWARTING E HUSTON, 2001). Sabe-se que o MPTP possui uma toxicidade neuronal seletiva para neurônios da SNC (LANGSTON et al, 1984; SEDELIS et al., 2001), e que a administração de MPTP pode reproduzir os sintomas motores da doença em vários animais tais como várias espécies de primatas, camundongos, ratos e cavalos (LANGSTON et al, 1984; NICKLAS et al, 1987; SEDELIS, SCHWARTING E HUSTON, 2001).

A administração intra-cerebral de MPTP na SNC de ratos leva a perdas específicas de DA no estriado e córtex pré-frontal (GERLACH e RIEDERER, 1996; FERRO, 2003). Porém, os testes de aprendizado e memória em animais caracterizam-se por serem interpretados através de respostas motoras, que são justamente as mais prejudicadas na DP (Da CUNHA et al, 2002).

Muitos dos sintomas cognitivos da DP, inclusive os prejuízos de memória, podem ocorrer ainda nos estágios iniciais da doença, antes mesmo do aparecimento dos primeiros prejuízos motores (DUBOIS e PILLON, 1997; Da CUNHA et al., 2002). Mas a DP só é clinicamente detectável quando a morte neuronal dopaminérgica ultrapassa 50-70%, e os níveis de DA no estriado já estão

em torno de 80% abaixo do normal, causando prejuízos motores mais grosseiros (BLUM et al., 2001; DEUMENS, BLOKLAND, E PRICKAERTS, 2002).

Os pesquisadores do Laboratório de Farmacologia do Sistema Nervoso Central desenvolveram e utilizam atualmente, uma técnica que leva a uma lesão parcial dos neurônios da SNc de ratos, baseada em uma potencial resistência destes animais a uma lesão total da SNc por MPTP (BANKIEWICZ et al, 1999). Esse modelo oferece as condições ideais para avaliar os prejuízos cognitivos sem as alterações motoras características da patologia, mimetizando assim os primeiros estágios da DP (MIYOSHI et al., 2002; Da CUNHA et al., 2002; FERRO, 2003).

Neste modelo, a infusão intracraniana bilateral de 0,5 μ moles (100 μ g) de MPTP no centro da SNc de ratos causa uma extensa área de perda celular nesta estrutura, (redução de 40-70% de neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase (TH)), bem como uma lesão de 20-40% que se estende à área tegmental ventral. (Da CUNHA et al., 2001; GEVAERD et al., 2001a).

A extensão da lesão em pequena intensidade para a área tegmental ventral, trás como consequência, uma redução significativa de aproximadamente 50% de DA no estriado dorsal e córtex pré-frontal, sem alterar os níveis de DA no estriado ventral (núcleo accumbens), hipocampo ou amígdala (GEVAERD et al., 2001a). Essa lesão causa uma depleção específica de DA e de seus metabólitos. Já a concentração de noradrenalina, serotonina e seus metabólitos não são significativamente afetados em nenhuma das estruturas citadas, comprovando então que esse tipo de lesão é específica para os neurônios dopaminérgicos que projetam do mesencéfalo para o estriado e córtex pré-frontal (GEVAERD et al., 2001b; Da CUNHA et al., 2002).

Vários testes demonstraram que 21 dias após a cirurgia os animais não apresentam prejuízos sensorio-motores, não se mostraram afáxicos ou adípsicos, e seu comportamento exploratório em um campo aberto, bem como seu tempo de permanência no teste de catatonía e em um rota-rod foi normal quando comparados aos animais controles (Da CUNHA et al., 2001; FERRO, 2003).

Da Cunha e colaboradores utilizaram esse modelo de alterações cognitivas da DP com sucesso para demonstrar que estes animais têm dificuldade de aprender a tarefa da esquivada ativa de duas vias, sugerindo um prejuízo de memória associativa na DP. (GEVAERD et al., 2001b, DA CUNHA et al., 2001).

Outros estudos do mesmo grupo demonstraram que esse modelo de lesão não afetou o aprendizado da versão espacial do labirinto aquático de Morris (MIYOSHI et al., 2002; DA CUNHA et al., 2003). E que os animais têm uma deficiência para aprender a versão com dica visual do labirinto aquático de Morris (MIYOSHI et al., 2002; DA CUNHA et al., 2003). Trabalhos do mesmo grupo ainda em processo de publicação mostram, que a lesão bilateral também prejudica o aprendizado da tarefa da alternância com reforço alimentar no labirinto em Y, e que a lesão unilateral da SNc esquerda, mas não a da SNc do lado direito, prejudica o aprendizado de ratos no labirinto aquático versão memória operacional, demonstrando que a SNc está relacionada e é importante para a memória operacional (BRAGA et al., 2004; BELLISSIMO et al., 2004).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar se a via nigroestriatal, afetada na DP, desempenha um papel importante nos aprendizados do tipo S-R e espacial.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Trabalhar com um modelo animal de DP onde ratos são tratados com MPTP e desenvolvem uma lesão parcial da SNc, seletiva para neurônios dopaminérgicos.
2. Estudar o aprendizado destes animais na versão espacial do labirinto aquático de Morris.
3. Estudar o aprendizado destes animais em uma versão do labirinto aquático onde os ratos partem sempre do mesmo ponto e a plataforma é colocada sempre no mesmo local.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados 65 ratos Wistar machos, pesando entre 280 e 330g na data da cirurgia, provenientes do biotério da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclo claro-escuro de doze horas (luz às 7:00), com água e comida à vontade. Foram mantidos 5 ratos por gaiola plexiglass (60 x 25 x 25cm), sendo que cada gaiola possuía pelo menos um animal de cada grupo experimental. Todos os experimentos foram conduzidos entre as 07:00 e as 13:00 hs.

3.2. Cirurgia

Os animais foram subdivididos nos grupos controle (sham-operados) e lesados na SNc. A neurotoxina escolhida para a lesão da SNc foi o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina (MPTP), baseada em vários estudos anteriores que demonstraram que a infusão intranigral de MPTP em ratos é extremamente eficaz tanto em causar lesão de parcial e seletiva de neurônios dopaminérgicos como, em consequência, por depletar DA no estriado (Da CUNHA et al., 2001; GEVAERD et al., 2001a), e que essa lesão parcial da SNc, pode afetar características cognitivas sem interferir no desempenho motor das tarefas de memória (Da CUNHA et al., 2002; MIYOSHI et al., 2002). Na data da cirurgia, os ratos receberam 0,1mL de benzilpenicilina procaína 10.000 UI i.m. para evitar infecção. Os animais foram anestesiados com tiopental sódico 40 mg/kg i.p., e receberam também sulfato de atropina (0,4mg/Kg i.p.) para suprimir a salivacção. Os animais foram fixados no aparelho estereotáxico (David Kopf) e lesados na SNc segundo as seguintes coordenadas (PAXINOS e WATSON, 1986): ântero-posterior: -5,0mm, látero lateral: $\pm 2,1\text{mm}$ e dorso-ventral: -7,7 mm. No grupo lesionado, 0,5 μmol de MPTP HCl (Sigma Chemical Co.) solubilizado em líquido céfalo-raquidiano artificial foi injetado bilateralmente a uma velocidade de 0,25 $\mu\text{l}/\text{min}$ com uma agulha de 30

gauge, ligada a uma microseringa e impulsionada por uma bomba injetora (Harvard Apparatus). Os ratos do grupo sham, foram submetidos ao mesmo procedimento, porém, líquido céfalo-raquidiano artificial (LCR) (NaCl - 8,66g, KCl- 0,205g, CaCl₂.2H₂O- 0,176g, MgCl₂.6H₂O- 0,173g, H₂O tipo I qsp. 1000mL, PH:7,4) foi bilateralmente infundido na SNc, nas mesmas condições descritas anteriormente. Os animais receberam ainda 3 injeções de acetaldeído 120 mg/kg (Sigma Chemical St. Louis, MO, USA) i.p. 10 min antes, 30 min e 60 min após o início da cirurgia para potenciar a neurotoxicidade do MPTP (CORSINI et al, 1986).



FIGURA 2: Rato Wistar, anestesiado, fixado ao aparelho estereotáxico.

Terminadas as cirurgias pulverizou-se cloranfenicol nas incisões antes dessas serem suturadas. Após a sutura, os ratos receberam 1 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio (Merck S.A.) para acelerar a excreção do

anestésico. Após a cirurgia, os animais foram colocados, em caixa individuais aquecidas para que se recuperassem da anestesia. Estes permaneceram isolados por 5 dias, enquanto sua ração foi substituída por uma dieta pastosa (preparada com a ração em pó misturada com água) e água a vontade. A razão desta dieta foi reduzir a intensa perda de peso que os animais normalmente sofrem após a cirurgia, reduzindo com isso a mortalidade, devido à dificuldade de mastigação (MIYOSHI et al., 2002). Após esse período, os animais sobreviventes foram reagrupados da mesma forma que estavam organizados anteriormente e foram submetidos aos testes comportamentais após 21 dias da cirurgia. Quatro animais morreram durante a cirurgia e 13 animais morreram após as cirurgias. Outros 3 animais que apresentaram alterações motoras que comprometiam a natação e outros 8 que não apresentaram uma lesão da SNc superior a 40%, evidenciada pela histologia e/ou análise da DA estriatal foram excluídos dos experimentos.

Após os testes comportamentais, os animais foram sacrificados por decapitação e tiveram seus estriados dorsais removidos para determinação dos níveis de DA como descrito posteriormente. A parte posterior do encéfalo do rato foi preservada em formol para subsequente análise histológica.

Apenas os dados dos animais lesados corretamente na SNc foram utilizados na análise estatística.

3.3. Testes Comportamentais

Grupos diferentes de animais foram submetidos a duas versões testes de memória no labirinto aquático de Morris. Esse labirinto consiste de uma piscina circular de cor preta de 1,68 m de diâmetro e 0,50 m de altura. A água foi mantida a $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e a piscina, mantida dentro de uma sala com temperatura controlada ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$).



FIGURA 3: Labirinto aquático de Morris da UFPR.

Foram estabelecidos 4 pontos de partida (N,S,E,W), a partir da borda da piscina. No centro do quadrante NE delimitados por estes pontos cardinais, havia um encaixe no fundo da piscina que permitia a fixação de uma plataforma, que uma vez colocada, permanecia a aproximadamente 2 cm abaixo do nível da água, invisível para o rato. A plataforma citada era de acrílico transparente e possuía uma área de 11 x 14 cm para que o animal se apoiasse e escapasse da água.

Nas paredes da sala ao redor da piscina haviam dicas visuais compostas de figuras geométricas e desenhos, que serviam como pontos de referência externa para a localização do animal na piscina (MORRIS et al., 1984).

Os ratos sham ou SNc-lesados foram treinados em duas versões da tarefa do labirinto aquático: uma versão S-R, onde os animais foram liberados sempre da posição S e, portanto, observavam as dicas visuais do ambiente sempre de

uma mesma perspectiva, e uma versão (espacial), onde os animais foram liberados de um dos 4 pontos de partida (N,S,L,W) em uma seqüência escolhida de forma aleatória. Nesta versão espacial, a distância das dicas visuais variava a cada posição inicial, obrigando o animal a se orientar pelas relações espaciais entre as dicas para encontrar a plataforma que permanecia fixa no mesmo lugar durante todo o experimento.



FIGURA 4: Rato em cima da plataforma de acrílico no labirinto aquático observando as dicas visuais do ambiente.

Os animais sobreviventes cujos dados foram utilizados para a análise estatística estavam divididos de forma aleatória entre os seguintes grupos: 1) Sham / versão S-R (N = 9); 2) SNc/S-R (N = 10); 3) Sham / versão espacial (N = 9); 4) SNc / espacial (N = 9).

Nas duas versões desta tarefa os animais foram treinados por oito dias com 5 tentativas para encontrar a plataforma por dia. Em cada tentativa, o animal era colocado na água, voltado para a parede da piscina, e liberado para nadar até a plataforma. Quando o animal não conseguia achar a plataforma em até 60 s, ele era conduzido gentilmente pelo experimentador até a mesma, permanecendo ali por 20 s. Nos intervalos entre as tentativas o animal era mantido por 30 s em uma caixa plástica, fora da piscina. As sessões foram filmadas para posterior determinação do tempo de latência da chegada à plataforma, a distância percorrida para achar a plataforma e a velocidade de natação, estimadas por um analisador de imagem (CEFET; Curitiba, Brasil). No nono dia de treino, os animais foram liberados da posição S e submetidos a sessões de nado livre na mesma piscina mas sem a plataforma. Neste último dia, foi estimado o tempo de permanência do animal em uma região circular de 25 cm de raio com o centro onde anteriormente estava a plataforma nos dias anteriores (NE), denominada região-alvo. Foi também avaliado o tempo de permanência do animal em uma região circular de 25 cm de raio com o centro localizada no quadrante oposto ao que estava anteriormente a plataforma, denominada região-oposta (SW), conforme esquema abaixo:

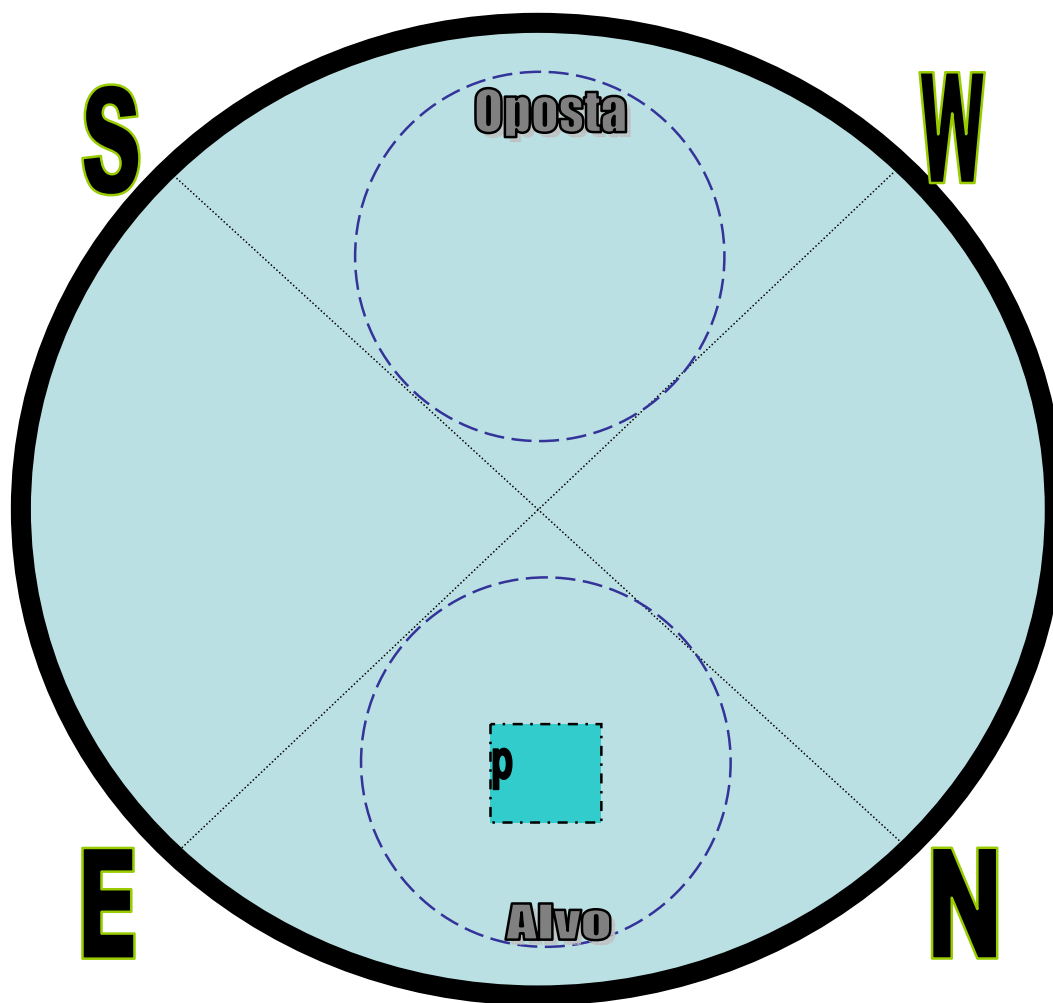


FIGURA 5: Esquema representativo dos 4 pontos de partida (N,S,E,W) a partir da borda da piscina, da posição fixa da plataforma de escape (p), e das regiões circulares Alvo e Oposta.

A memória foi demonstrada pelo decréscimo do tempo de latência entre as sessões, pela menor distância percorrida e pela permanência de um maior tempo nadando na região Alvo no nono dia.

3.4. Determinação dos níveis de DA

Os níveis estriatais de DA foram analisados por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) com detecção eletroquímica, como descrito por HALLMAN e JONSSON (1984). Uma coluna C18 de fase reversa (Shim-pack, CLC-ODS 150 x 4,6 mm, Shimadzu), um detetor amperométrico (Amtec, Decade) e uma estação de cromatografia líquida CLASS-VP 5032 (Shimadzu) foram utilizadas. Uma semana após o último teste comportamental os ratos foram decapitados, seus cérebros foram removidos do crânio e resfriados em água milique tipo I a 4°C, para inativação de enzimas de degradação. Os dois estriados foram removidos e armazenados a -70°C. Posteriormente o tecido foi pesado e, homogeneizado por ultra-som em 300 µL de ácido perclórico 0,1 M. Após centrifugação (12000 G, 10 min), 20µL do sobrenadante foi injetado no cromatógrafo. A fase móvel ajustada para fluxo de 0,9 mL/min, tinha da seguinte composição: Ácido cítrico, 31,4 g; NaCl, 584 mg; octilsulfato de sódio, 110 mg; EDTA (ácido etileno diamino tetracético), 186 mg; THF (tetraidrofurano), 5 mL; ACN (acetonitrila), 10 mL; pH 3,0 (ajustado com NaOH); água, q.s.p. 1000 mL. O potencial de oxidação foi fixado em 0,85 V usando um eletrodo de fibra de carbono contra um eletrodo de referência de Ag/AgCl. As áreas dos picos do padrão externo foram usadas para quantificar a massa das catecolaminas. Os valores obtidos foram expressos como ng/g de tecido.

3.5. HISTOLOGIA

Feita a decaptação do animal e dissecação, as amostras de mesencéfalo das amostras foram fixadas por emersão em formaldeído 4% por uma semana. Após esse tempo, as amostras foram então transferidas para solução sacarose 20% em formaldeído 4% e mantidas armazenadas a 4°C até o processamento.

Foram realizadas quatro séries de cortes coronais de 30 µm no sentido antero-posterior, com auxílio de criostato. Uma dessas séries foi fixada em lâmina

gelatinizada e corada por técnica de coloração de Nissl (tionina). Após a coloração, as lâminas foram desidratadas, cobertas com lamínula e analisados em microscópio para determinação dos pontos de infusão e do dano causado pelo MPTP ao tecido (BANCROFT e STEVENS, 1990).

As outras séries foram imunomarcadas para Tirosina Hidroxilase (TH) com um anticorpo monoclonal para TH coletado de ratos (diluição de 1:5000; Incstar). O complexo antígeno-anticorpo foi localizado utilizando uma variação do sistema Complexo Avidin-Biotin (ABC) com um kit comerciali (ABC Elite kit, da Vector laboratórios).

3.6. Análise estatística

Para as análises estatísticas utilizou-se o programa Stasoft Statistica. A análise dos níveis estriatais de DA foi feita através do teste t de Student. Os dados do labirinto aquático foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida por um teste *pos-hoc* de Newman-Keuls. Para todas as análises estatísticas foi considerado um nível de significância quando $p \leq 0,05$.

4. Resultados

Como pode ser visto na Figura 6, a infusão perinigral de MPTP produziu uma lesão extensa com severa redução de neurônios imunorreativos à TH e gliose. Cerca de 60-70% da área da SNc dos animais apresentou este quadro de lesão que se estendeu também por 20-40% da área tegmental ventral (VTA). A lesão produzida por MPTP nestes animais foi aproximadamente igual nas porções direita e esquerda da SNc no mesencéfalo.

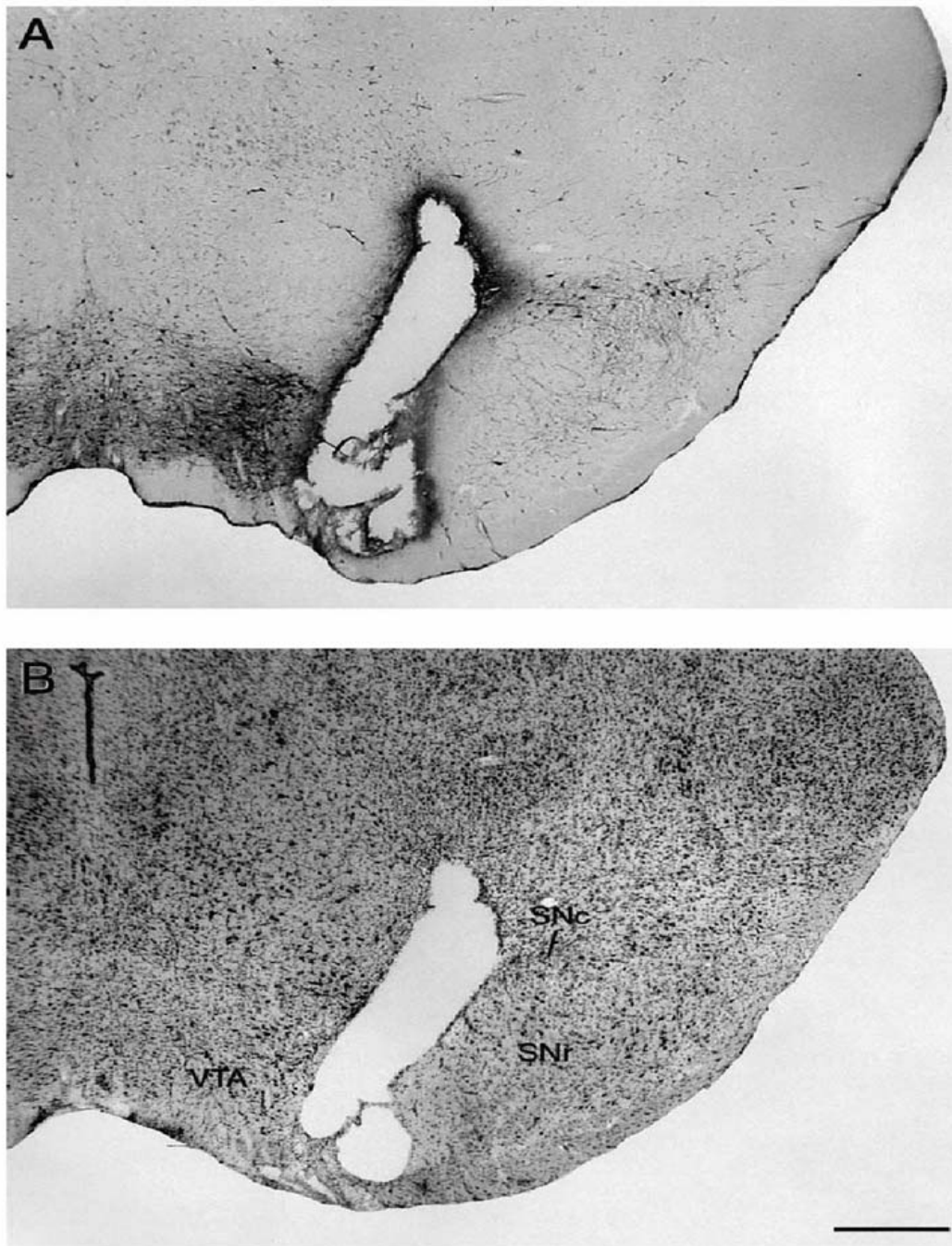


FIGURA 6: Foto de uma lâmina com um corte do mesencéfalo observado em microscopia ótica. (A) Imunohistoquímica para tirosina hidroxilase (B) coloração com tionina. A foto ilustra a aparência da SNc após a lesão com MPTP. Barra de escala = 500 μ m. SNc, substância negra, parte compacta; SNr, substância negra, parte reticulada; VTA, área tegmental ventral.

Uma análise com o teste t de Student mostrou que a lesão da SNc por MPTP causou uma redução estatisticamente significativa, em média de 40% nos níveis estriatais de DA = DA ($t=4.45$, $P < 0.001$); 30 % nos níveis de DOPAC = ácido 3,4-diidroxifenilacético ($t=4.45$, $P < 0.01$) e 26 % nos níveis de HVA = ácido homovanílico ($t=4.45$, $P < 0.05$). Como visto na tabela 1 abaixo:

GRUPOS	DA (ng/g tecido)	DOPAC (ng/g tecido)	HVA (ng/g tecido)
SHAM	5333 ± 319	1490 ± 129	298 ± 21
MPTP	3150 ± 371 *	1118 ± 80 *	219 ± 21 *

TABELA 1. Efeito da lesão bilateral da SNc nos níveis estriatais de DA (DA) e seus principais metabólitos DOPAC e HVA, medidos por HPLC. Os resultados representam as médias ± EPM (Sham n=18; SNc n=19) expressos em ng/g tecido. * $p \leq 0.05$, comparado ao grupo Sham (teste t de Student).

Como pode ser visto na Figura 7, os animais lesados com MPTP apresentaram um prejuízo para encontrar a plataforma na versão S-R do labirinto aquático, ou seja, quando partindo de uma única posição inicial (S), mas apresentaram um aprendizado semelhante ao dos os controles na versão espacial desta tarefa, ou seja, partindo de quatro posições iniciais diferentes (N,S,E,W) ($F(3,33)=8,67$, $p \leq 0,001$ ANOVA de duas vias, $p \leq 0,01$, teste de Newman-Keuls).

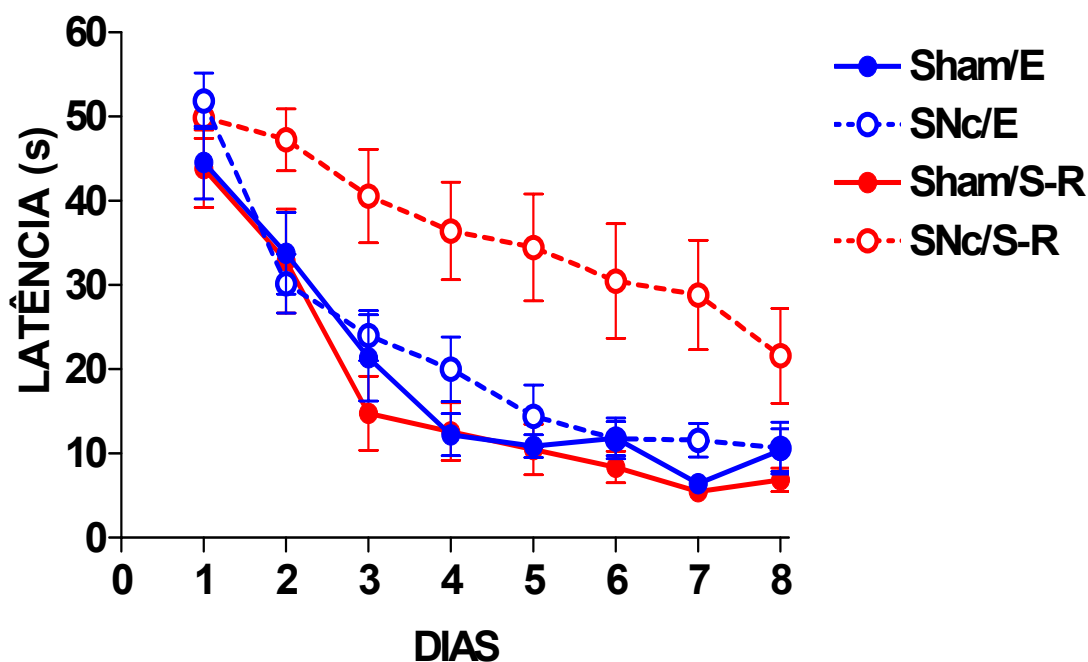


FIGURA 7. Efeito da lesão da substância negra, pars compacta (SNc), sobre o aprendizado de ratos nas versões estímulo-resposta (S-R) e espacial (E) do labirinto aquático. Os dados representam as médias \pm EPM de cinco tentativas por dia de treino das latências para encontrar a plataforma.

A Figura 8 mostra o tempo de exploração dos animais nas áreas alvo (onde se encontrava a plataforma no dia anterior) e oposta (no quadrante oposto) em um teste de nado livre sem a plataforma. Para os dados de nado livre com os animais liberados da posição S, uma ANOVA de duas vias mostrou efeitos significantes para o fator lesão da SNc ($F(3,60) = 6,32, p \leq 0,001$), para o fator área explorada ($F(1,60) = 27,45, p \leq 0,001$), mas não houve uma interação significativa entre estes fatores ($F(3,60) = 2,01, p = 0,12$). Os animais sham treinados nas versões espacial (saídas variáveis N,S,E,W) e S-R (saída S) permaneceram significativamente mais tempo na área alvo que na posição oposta ($p \leq 0.05$, teste de Newman-Keuls). Os animais SNc permaneceram mais tempo na área alvo que na oposta quando treinados na versão espacial ($p \leq 0.05$, teste de Newman-Keuls), demonstrando assim que aprenderam bem esta versão do labirinto aquático, apesar da lesão na SNc. Porém, a lesão da SNc prejudicou o aprendizado da versão S-R desta tarefa

pois estes animais não permaneceram mais tempo na área alvo em comparação à oposta quando nas sessões de treino partiram apenas da posição S ($p = 0,19$, teste de Duncan). Este prejuízo de aprendizagem foi também evidenciado pelo fato de que os animais SNc treinados na versão S-R permaneceram menos tempo na área alvo que o grupo sham ($p \leq 0,001$, teste de Newman-Keuls).

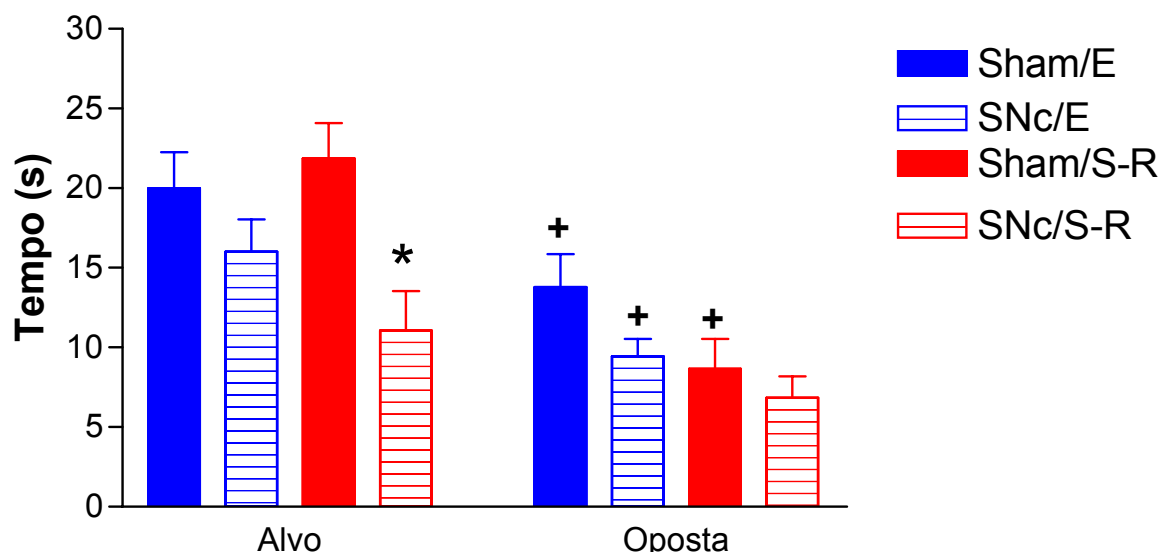


FIGURA 8: Efeito da lesão da substância negra, pars compacta (SNc), sobre o aprendizado de ratos nas versões estímulo-resposta (S-R) e espacial (E) do labirinto aquático. As barras representam as médias \pm EPM do tempo que os animais permaneceram nadando na área onde estava anteriormente localizada a plataforma (alvo) ou na área do quadrante oposto. * $p \leq 0.05$, comparado ao grupo Sham/S-R; + $p \leq 0.05$ comparado ao tempo de permanência do mesmo grupo na área alvo (ANOVA de duas vias, seguida do teste de Newman-Keuls).

A figura 9 mostra que na primeira vez que os ratos foram expostos ao labirinto aquático, a velocidade de natação dos ratos com lesão na SNc não é diferente dos ratos sham. Uma ANOVA de uma via mostrou que o fator grupo não foi significativamente diferente em todas as sessões de natação ($F(1,20) = 0.11$, $p = 0.74$).

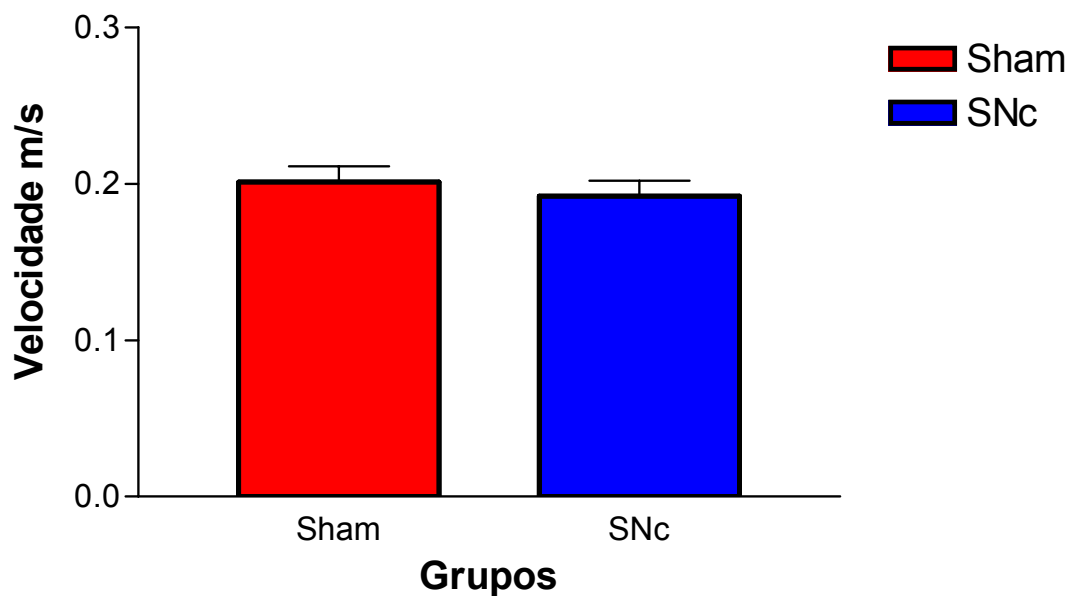


FIGURA 9. Efeito da lesão da substância negra, parte compacta (SNc), sobre a velocidade de natação dos ratos nas versões estímulo-resposta (S-R) e espacial (E) do labirinto aquático. As barras representam as médias \pm EPM da velocidade de natação dos animais na sua primeira sessão no labirinto aquático.

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, mostramos que ratos com lesão parcial da SNc induzida por MPTP apresentaram uma depleção de DA estriatal e um déficit em uma tarefa de memória S-R no labirinto aquático. Sabendo-se que o MPTP possui uma toxicidade neuronal seletiva para neurônios da parte compacta da substância negra (SNc) (LANGSTON et al, 1984; SEDELIS, SCHWARTING E HUSTON, 2001; FERRO, 2003), estudos anteriores demonstraram que a administração intracerebral perinigral de MPTP em ratos, leva a uma depleção parcial dos níveis estriatais de DA (HARIK, et al., 1987; Da CUNHA et al., 2002; MYOSHI, et al., 2002; FERRO, 2003), fato que corrobora os dados apresentados nesse trabalho sobre uma redução nos níveis de DA e de seus principais metabólitos (HVA E DOPAC) no estriado dos ratos lesados em relação aos ratos Sham (tabela 1), sem alteração nos níveis de outros neurotransmissores monoaminérgicos. Além disso, observou-se nesse experimento, que a lesão causada pelo MPTP espalha-se em pequena intensidade para a VTA, conseqüentemente levando a uma depleção significativa de DA no estriado dorsal e no córtex pré-frontal, sem alterar os níveis de dopamina no estriado ventral (núcleo accumbens), hipocampo ou amígdala de acordo também com outros trabalhos publicados anteriormente e que utilizaram a mesma técnica (GEVAERD et al., 2001a; MYOSHI, et al., 2002; FERRO, 2003). Essa depleção de DA é semelhante a depleção que ocorre em pacientes na fase inicial da DP (BEAL, 2001, Da CUNHA et al., 2002).

Nossos resultados concordam com outros trabalhos que sugerem que o modelo de lesão parcial bilateral da SNc de ratos por MPTP utilizado nesse experimento para depletar DA no estriado é um modelo que oferece as condições ideais para avaliar os comprometimentos das funções cognitivas relacionados à degeneração dos neurônios dopaminérgicos da SNc que projetam para o estriado dorsal sem que os animais apresentem prejuízos motores que atrapalhem a

avaliação e interpretação dos resultados dos testes cognitivos de memória, mimetizando assim os primeiros estágios da DP (MIYOSHI et al., 2002; Da CUNHA et al., 2002; FERRO, 2003).

Em alguns modelos animais, tratamentos crônicos com a administração sistêmica ou intracerebral de baixas doses de substâncias neurotóxicas produzem déficit cognitivo antes do aparecimento dos sinais motores (DEUMENS, BLOKLAND, E PRICKAERTS, 2002). Com o modelo utilizado no nosso experimento, obtivemos este quadro que se mostrou estável após uma administração aguda da neurotoxina, com lesão bilateral da SNc por MPTP, como pode ser observado pela ausência de diferença significativa na velocidade de natação entre os animais lesados e os animais sham (Figura 9) e também pela falta de diferenças significantes nas latências para encontrar a plataforma na versão espacial do labirinto aquático de Morris, que pode ser interpretado como se a lesão parcial da SNc não tenha causado prejuízo motor significativo pois não interferiu negativamente na performance na natação. Esses resultados do nosso experimento estão em total acordo com os resultados obtidos em experimentos anteriores que utilizaram o mesmo modelo animal com a administração intranigral de MPTP em ratos (GEVAERD et al., 2001a; MYOSHI, et al., 2002; FERRO, 2003)

O presente estudo foi realizado para testar se a SNc desempenha um papel importante no aprendizado de uma versão S-R do labirinto aquático onde o rato parte sempre de uma mesma posição inicial e a plataforma permanece fixa no mesmo local em todos os dias de testes. Os resultados obtidos mostram que os animais lesados na SNc aprendem a nadar na direção da plataforma de escape, ou seja, que eles aprendem que a plataforma está localizada em uma determinada região do labirinto, e a encontram com tempos de latência menores a cada dia de teste como ficou demonstrado na figura 7, porém ficou demonstrado também nessa figura que os animais lesados (SNc/SR) apesar de aprenderem a localização da plataforma, a encontram com tempos de latência sempre superiores aos dos animais não lesados (Sham/SR). Como a posição de partida é constante em todos os dias de teste os ratos são reforçados consistentemente para uma

determinada trajetória de natação atrás de um complexo particular de estímulos distais, essa condição permite a formação de uma simples associação entre um conjunto individual de dicas e o reforço negativo que consiste em encontrar a plataforma de fuga. Os animais lesados SNc/SR demonstram um déficit de aprendizado sob essas condições o que sugere uma participação importante da SNc no aprendizado S-R mas não no aprendizado espacial.

Esta interpretação é reforçada pelo resultado mostrado na figura 8, que representa o nono dia de testes onde os animais eram liberados para nadar no labirinto sem a plataforma (sessão de nado livre), pois neste teste verificou-se que os animais SNc/SR passaram bem menos tempo explorando a região alvo do que os animais Sham/SR, evidenciando mais uma vez um prejuízo na aprendizagem nestes animais em relação aos animais não lesados e demonstrando a relevância da integridade da SNc para a memorização da localização da plataforma neste teste.

Tais resultados estão de acordo com estudos feitos em pacientes com DP, bem como em animais com comprometimento em alguns componentes dos gânglios da base (estriado ou SNc) que apresentam déficits para aprender tarefas de memória tipo estímulo-resposta ou de hábito (DUBOIS e PILLON, 1997; MIDLETON e STRICK, 2000; MYOSHI, et al., 2002; RONCACCI, et al., 1996).

Porém o fato dos animais SNc/SR, mesmo com dificuldade, aprenderem a encontrar a plataforma sugere que esses animais poderiam estar utilizando uma estratégia diferente da empregada pelos animais não lesados para encontrar a plataforma. O fato de que ao nadar buscando a plataforma os ratos acabam por buscá-la a partir de um ponto diferente do que são liberados pode contribuir para que, mesmo nesta situação os animais acabem por desenvolver uma estratégia espacial para encontrá-la, tarefa na qual não apresentam deficiência, tal como demonstrado neste experimento. Esta interpretação está de pleno acordo com a teoria dos múltiplos e paralelos sistemas de memória, que discutem as diferentes funções do sistema hipocampal e do sistema estriatal, e de como esses dois sistemas através do recebimento da mesma informação poderiam processar de

maneira especializada a representação dos eventos que fluem através deles (WHITE e McDONALD, 2001; EICHENBAUN, 1990). Uma outra explicação possível para este aprendizado lento desta tarefa S-R por parte dos animais SNc seria a existência de uma espécie de interação, ou seja uma troca de informações, entre os sistemas hipocampal e nigroestriatal, onde um possa estar utilizando as informações armazenadas pelo outro de forma paralela e independente, mas que posteriormente ao armazenamento podem ser compartilhadas por ambos os sistemas (POLDRACK e PACKARD, 2003; WIETZIKOSKI, 2003). Tal interação entre os sistemas poderia levar tanto a uma compensação em caso de danos a uma ou outra estrutura, ou a uma competição entre diferentes sistemas, sendo que na tentativa de se explicar como isso ocorre, poucos experimentos tanto em animais quanto em humanos, sugerem que diferentes formas de memória podem compartilhar as mesmas bases neuroquímicas e neurofisiológicas e ou os mesmos mecanismos neurobiológicos (PACKARD e THEATER, 1996; POLDRACK e PACKARD, 2003; WIETZIKOSKI, 2003).

Ainda de acordo com esses resultados, temos que, nos animais submetidos à versão espacial do labirinto aquático de Morris, que foram liberados de cada um dos 4 pontos de partida (N,S,L,W) em uma seqüência escolhida de forma aleatória, de maneira que a distância das dicas visuais variava a cada posição inicial, obrigando o animal a se orientar pelas relações espaciais entre as dicas para encontrar a plataforma que permanecia fixa no mesmo lugar durante todo o experimento, tanto os lesados (SNc/E) quanto os não lesados (Sham/E) tiveram tempos de latência para encontrar a plataforma, diferentes significativamente dos SNc/SR, sendo sempre menores em relação aos obtidos por esses animais, e semelhantes aos obtidos pelos animais Sham/SR, indicando não haver prejuízo no aprendizado. Assim como no teste de nado livre, onde os animais treinados na versão espacial do labirinto aquático (Sham/E e SNc/E) passaram mais tempo explorando a região alvo do que a região oposta, evidenciando mais uma vez o fato de que o aprendizado nesta versão espacial do labirinto aquático não depende da integridade dos neurônios dopaminérgicos da SNc (Figura 6) ou dos níveis de DA no estriado (Tabela 1). Ou seja, que o efeito modulatório dopaminérgico sobre

a via nigroestriatal não desempenha papel fundamental na aquisição de memória espacial. Tal afirmação corrobora estudos anteriores que afirmaram que pacientes com DP (com degeneração dos neurônios dopaminérgicos da SNC) têm dificuldades na aquisição de novas memórias procedurais, inclusive na formação de hábitos, e na memória operacional, mas em geral não apresentam deficiências de aquisição de novas memórias explícitas ou episódicas (McAULEY, 2003; DUBOIS e PILLON, 1997; RONCACCI et al., 1996; GERLACH e RIEDERER, 1996), e estudos que mostram que o sistema de memória dependente do estriado seria o responsável pelas associações do tipo estímulo resposta (S-R) e aquisição hábitos (PACKARD e McGAUGH, 1992; PACKARD e KNOWLTON, 2002; Da CUNHA et al, 2003), Além disso, vários estudos que afirmam que o sistema hipocampal seria o responsável pela aquisição de memórias espaciais (O'KEEFE E NADEL, 1978; PACKARD E McGAUGH, 1996; EICHEMBAUN, 2000).

Nossos resultados são de certa forma complementares ao trabalho de Eichenbaun (1990) que sugeriu haver uma distinção na natureza da representação da memória em ratos com lesão na fimbria-fórnix da formação hipocampal que podem aprender a encontrar a plataforma se partem sempre de um mesmo ponto do labirinto e a plataforma é fixada sempre no mesmo local, exatamente como no teste que aplicamos de aprendizado do S-R no labirinto aquático. Neste estudo, Eichenbaun mostrou que quando estes animais com lesão na fimbria-fórnix, são submetidos à versão espacial do labirinto (com posições de partida variáveis), apresentam um déficit severo de aprendizado espacial (EICHEMBAUN, 1990).

Outros estudos anteriores já haviam demonstrado que o aprendizado do labirinto aquático com dica visual é dependente do estriado dorsal, e não é afetado pela lesão do hipocampo (PACKARD E McGAUGH, 1996; MIYOSHI et al, 2002; DA CUNHA et al, 2003). Temos portanto no presente trabalho uma forte evidência de que a dependência deste tipo de aprendizagem S-R da via nigro-estriatal não depende exatamente da presença de uma dica visual exatamente sobre a plataforma, mas do tipo de associação que o animal faz entre esta dica e a posição da plataforma – mais especificamente entre um estímulo ambiental que não precisa necessariamente ser proximal ao alvo e uma resposta motora ou,

alternativamente, entre este estímulo e o reforço (neste caso o reforço negativo representado pela plataforma). Note que quando o animal precisa triangular diversas dicas espaciais para deduzir a posição da plataforma ele precisa armazenar apenas as informações de natureza sensorial para posteriormente elaborar uma resposta motora apropriada ao objetivo de encontrar o alvo. No caso das tarefas S-R, estas informações parecem ser armazenadas junto com uma associação a uma resposta motora específica - nadar na direção de tal ou tal estímulo. Neste caso, se a percepção das pistas mudam porque o animal é colocado em uma posição diferente em relação à plataforma, ele já não pode mais usar a informação armazenada para encontrá-la. No caso do teste onde a plataforma é visível ou sinalizada por uma dica colocada em cima da própria plataforma, o animal pode ignorar as outras pistas externas e aprender a relação entre a posição da dica que sinaliza a posição da plataforma por si só com a resposta de se aproximar desta pista. O presente trabalho, portanto, mostra que quando a via nigrostriatal está envolvida neste tipo de aprendizagem a natureza da dica em si, ou seja, a sua relação com o alvo (proximal ou distal) não tem relevância sobre o que é armazenado pelo animal, mas sim uma relação única entre um conjunto de estímulos e uma resposta motora específica. Uma outra evidência de que a natureza do estímulo *per se* e a sua localização espacial em relação ao alvo não têm relevância no processamento destas memórias pelo sistema nigroestriatal é de que a esquiva de duas vias, onde a resposta motora de cruzar para lados alternados da caixa é sinalizada por um sinal sonoro, é drasticamente afetada pela lesão da SNc (Da CUNHA et al., 2001). Nesta tarefa, assim como na versão S-R do labirinto aquático, a relação entre um estímulo único e uma resposta motora específica não tem nada a haver com a natureza do estímulo (visual em uma tarefa e sonora em outro) ou com a sua localização espacial. Além da localização espacial da dica não importar, a localização espacial do alvo também não é relevante, pois na tarefa do labirinto aquático onde a posição da plataforma *per se* é sinalizada com um estímulo visual (*cued test*) a posição da plataforma muda de lugar a cada sessão.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos do presente trabalho nos permitem concluir que:

- A via dopaminérgica nigroestriatal, afetada na DP, é um componente essencial do sistema de memória que medeia o aprendizado do tipo S-R.
- A lesão parcial da SNc por MPTP prejudica o aprendizado em uma versão S-R do labirinto aquático de Morris.
- O aprendizado em uma versão espacial do labirinto aquático de Morris independe da integridade da via dopaminérgica nigroestriatal.
- O modelo utilizado, de lesão parcial bilateral da SNc de ratos por MPTP, oferece as condições ideais para avaliar os comprometimentos das funções cognitivas em um labirinto aquático de Morris sem que os animais apresentem prejuízos motores que atrapalhem a interpretação dos resultados dos testes de memória.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELUCCI M.E.M.; CESÁRIO, C.; HIROI, R.H.; ROSALEN, P.L.; Da CUNHA, C. Effects of caffeine on learning and memory in rats tested in the Morris water maze. **Brazilian Journ. Med. Biolog. Research**, 35. p1201-1208. 2002.

ANGELUCCI M.E.M.; VITAL, M.A.B.F.; CESÁRIO, C.; ZADUSKI, C.R.; ROSALEN, P.L.; Da CUNHA, C. The effect of caffeine in animal models of learning and memory. **European Journal of Pharmacology**, 373. p135-140. 1999.

BANCROFT, J. D.; STEVENS, A. **Theory and practice of histological technique**. Churchill Livingstone. New York. 1990.

BANKIEWICZ, K.; SANCHEZ-PERNAUTE, R.; OIWA, Y.; KOHUTNICKA, M.; CUMMINS, A.; EBERLING, J. Preclinical models of Parkinson's disease. **Currents Protocols in Neuroscience**, 94 p 1-32, 1999.

BEAL, F. Experimental models of Parkinson's disease. **Nature Reviews. Neuroscience**, 2, p 325 – 332, 2001.

BELLISSIMO, M.I.; KOUZMINE, I.; FERRO, M.M.; OLIBEIRA, B.H.; CANTERAS, N.S.; Da CUNHA, C. Is the unilateral lesion of the left substantia nigra pars compacta sufficient to induce working memory impairment in rats? **Neurobiology of Learning and Memory**. 2004. 09p. ARTICLE IN PRESS

BLANDINI, F.; NAPPI, G.; TASSORELLI, C.; MARTIGNONI, E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, 62, p 63-68, 2000.

BLUM, D.; TORCH, S.; LAMBENGM N.; NISSOU, M.; BENABID, A.; SADOUL, R.; VERNA, J.; Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: Contribution to apoptotic theory in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, 65, p 135 – 172, 2001.

BRAGA, R.; KOUZMINE, I.; CANTERAS, N.S.; Da CUNHA, C. Lesion of the substantia nigra, pars compacta impairs delayed alternation in a Y-maze in rats. IN PRESS

CAMPOS, A.; SAITO, M.I.P.; Aprendizagem e memória no labirinto radial de oito braços. por XAVIER, G.F. **Técnicas para o estudo do sistema nervoso**. São Paulo. Editora Plêiade, 1999. p 159-179

COOPER, J.R.; BLOOM, F.E.; ROTH, R.H. **The biochemical basis of neuropharmacology**. Seventh edition, Oxford University Press. London, UK. 1996.

CORSINI, G.U.; ZUDDAS, A.; BONUCELLI, U.; SCHINELLI, S.; KOPIN, I.J. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine (Mptp) neurotoxicity in mice is enhanced by ethanol or acetaldehyde. **Life Sciences**, 40. p827-832. 1986.

CUMMINGS, J.L. Depression and Parkinson's disease: a review. **The American Journal of Psychiatry**, 149, p.443-454, 1992.

Da CUNHA, C.; WIETZIKOSKI, S.; WIETZIKOSKI, E. C.; MIYOSHI, E.; FERRO, M. M.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; CANTERAS, N. S. Evidence for the substantia nigra pars compacta as an essential component of a memory system independent of the hippocampal memory system. **Neurobiology of Learning and Memory**, 79. p236-242. 2003.

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**, v22, N3, p 227-237, 2002.

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

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, 39, p889-909, 2003.

DEUMENS, R.; BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J. Modeling Parkinson's Disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Experimental Neurology**, 175, 9 303 – 317, 2002.

DUBOIS, B.; PILLON, B. Cognitive deficits in Parkinson's disease. **Journal of Neurology**, 244. p02-08. 1997.

DUVOISIN, R.C. **Parkinson's disease**. Third edition. New York: Raven Press, 1991.

EICHENBAUN, H. A cortical-hippocampal system for declarative memory. **Nature Reviews Neuroscience**, 1. p41-50. 2000.

EICHENBAUN, H.; STEWART, C.; MORRIS, R.G.M. Hippocampal representation in place Learning. **The Journal of Neuroscience**, 10(11). P3531-3542. 1990

FAW, B. Pre-frontal executive committee for perception, working memory, attention, long-term memory, motor control, and thinking: A tutorial review. **Consciousness and Cognition**, 12. p83-139. 2003.

FERRO, M.M. **Avaliação De Dois Modelos Animais De Doença De Parkinson: Ratos Com Lesão Da Substância Negra Compacta Induzida Pelo 1-Metil-4-Fenil-1,2,3,6-Tetrahidropiridina (Mptp) Ou Por 6-Hidroxi-dopamina (6- Ohda)**. Curitiba, 2003. 52 f. Tese (Mestrado Em Farmacologia) – Setor De Ciências Biológicas, Universidade Federal Do Paraná.

FLINT, M.B. Experimental models of Parkinson's disease. **Nature Reviews**, 2. p325-332. 2001

FUSTER, J.M. Network Memory. **Trends in Neurosciences**, v20, nº10, p 451 – 459,1997.

GERLACH, M.; RIEDERER, P. Animal models of parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. **Journal of Neural Transmission**, vol103, p 987 – 1041, 1996.

GEVAERD, M. S. MIYOSHI, E.; SILVEIRA, R.; CANTERAS, N. S. TAKAHASHI, R.N. Da CUNHA, C. L-Dopa restores striatal dopamine level but fails to reverse MPTP-induced memory deficits in rats. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, 4, p361-370, 2001a.

GEVAERD, M. S. TAKAHASHI, R.N. Da CUNHA, C. Caffeine reverses the memory disruption induced by intra-nigral MPTP-injection in rats. **Brain Research Bulletin**, vol 55, p101-106. 2001b.

GEYER, M. A.; MARKOU, A. Animal models of psychiatric disorders. Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress. Raven Press. New York, NY, 1995.

GIBB, W.R.G. Neuropathology in movement disorders. Journal of **Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, Supl., p55-67, 1989.

GRAYBIEL, A.M. The basal ganglia and chunking of action repertoires. **Neurobiology of learning and memory**, 70. p119-136. 1998.

HALLMAN, H.; JONSSON, G. Neurochemical studies on central dopamine neurons-regional characterization of dopamine turnover. **Medical Biology**, 62. p198-2096, 1984.

HARIK, S. I.; SCHIMIDLEY, J. W.; IACOFANO, L. A.; BLUE, P.; ARORA, P. K.; SAYRE, L. M. 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 the rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 241. p669-676, 1987.

IZQUIERDO, I. **Memória**. Porto Alegre, RS: ed Artmed, 2002.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. **Princípios da neurociência**. Barueri, BR: ed Manole, 2003. P 5 – 18 e 1227-1279.

KESNER, R.P.; DiMATTIA, B.V. Neurobiology of an attribute model of memory. **Progress in psychobiology and physiological psychology**, 12. p207-278. 1987.

KOLB, B.; WHINSHAW, I. Q. **Neurociência do Comportamento**. São Paulo, SP: Ed. Manole. 2002.

LANGSTON, J. W.; FORNO, L. S.; REBERT, C. S.; IRWIN, I. Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey. **Brain Research**, 292, p 390-394, 1984.

LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios**. São Paulo, SP: Ed. Atheneu. 2001. p587-617.

McAULEY, J.H. The physiological basis of clinical deficits in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, 69. p 27-48. 2003

McDONALD, R. J.; WHITE, N. M. Parallel information processing in the water maze: evidence for independent memory system involving dorsal striatum and hippocampus. **Behavioral and Neural Biology**, 61,p 260-270, 1994.

McDONALD, R.J.; WHITE N.M. A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. **Behavioral Neuroscience**, 107(1). P03-22. 1993.

MENESES, M.S.; TEIVE, H.A.G. **Doença de Parkinson. Aspectos Clínicos e Cirúrgicos**. Rio de Janeiro, RJ: Ed Guanabara koogan, 1996.

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

MIDDLETON, F. A.; STRICK, P. L. Basal ganglia output and cognition: Evidence from anatomical, behavioural and clinical studies. **Brain and Cognition**, 42. p183-200. 2000b

MISHKIN, M.; PETRI, H.L. Memories and habits: some implications for the analysis of learning and retention. *In: Squire L.R. & Butters N. (eds), Neuropsychology of memory.* New York: Guilford, p287-296. 1984.

MIYOSHI, E.; WIETZIKOSKI, S.; CAMPLESSEI, M.; SILVEIRA, R.; TAKAHASHI, R. N.; Da CUNHA, C. Impaired learning in a spatial working memory version and in a cued version of the water maze in rats with MPTP-induced mesencephalic dopaminergic lesions. **Brain Research Bulletin**, v58, N1, p 41-47, 2002.

MORRIS, R.G.M.; et al. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in rat. **Journal of Neuroscience Methods**, 11(1), p47-60, 1984.

MORRIS, R.G.M.; GARRUD P.; RAWLINS, J.N.P. & O'KEEFE, J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature**, 297. p681-683. 1982.

NICKLAS, W. J.; UOUNGSTER, S. K.; KINDT, V.; HEIKKILA, R. E. IV. MPTP, MPP⁺ and mitochondrial function. **Life Sciences**, 40. p721-729, 1987.

O'KEEFE, J.; NADEL, L. The hippocampus as a cognitive map. **Oxford: Oxford University Press.** 1978.

OBESO, J.A.; RODRIGUEZ-OROZ, M.C.; RODRIGUEZ, M.; LANCIEGO, J.L.; Patophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. **Trends in Neurosciences**, v23, n°10 [268] (supplement) p.s8 –s19, 2000.

PACKARD, M.G.; CAHILL L. Affective modulation of multiple memory systems. **Current Opinion in Neurobiology**, 11. p752-756. 2001.

PACKARD, M.G.; HIRSH R.; WHITE, N.M. Differential effects of fornix and caudate nucleus lesions on two radial maze tasks: evidence for multiple memory systems. **Journal of Neuroscience**, 9. p1465-1472. 1989.

PACKARD, M.G.; KNOWLTON, B.J. Learning and memory functions of the basal ganglia. **Annual Reviews of Neuroscience**, 25. p563-593. 2002.

PACKARD, M.G.; McGAUGH, J.L. Double dissociation of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: Further evidence for multiple memory systems. **Behavioral Neuroscience**, 106. p439-446. 1992.

PACKARD, M.G.; McGAUGH, J.L. Inactivation of the hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. **Neurobiology of Learning and Memory**, 65. p65-72. 1996.

PACKARD, M.G.; TEATHER, L. A. Amygdala modulation of multiple memory systems: hippocampus and caudate-putamen. **Neurobiology of Learning and Memory**, 69, p 163-203, 1998.

PACKARD, M.G.; TEATHER, L. A. Double dissociation of hippocampal and dorsal-striatal memory systems by posttraining intracerebral injections of 2-amino-5-phosphopentanoic acid. **Behavioral Neuroscience**, 111. p543-551. 1996.

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

POLDRACK, R.A.; PACKARD, M.G. Competition among multiple memory systems: converging evidence from animal and human brain studies. **Neuropsychologia**, 41. p245-251. 2003.

RICHARDSON, J. R. Adenosine A_{2A} receptor antagonists as new agents for the treatment of Parkinson's disease. **Trends in Neuroscience**, 18. p338 – 344 1997.

RONCACCI, S.; TROISI, E.; CARLESIMO, G. A.; NOCENTINI, U.; CALTAGIRONE, C. Implicit memory in Parkinson's patients: Evidence for deficient skill learning. **European Neurology**, 36. p154-159, 1996.

SEDELIS, M.; SCHARING, R. K. W.; HUSTON, J. P. Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Behavioral Brain Research**, 125. p109-122, 2001.

STANDAERT, D.G., YOUNG A.B. Tratamento dos distúrbios degenerativos do sistema nervoso central. *In*: HARDMAN, J.G., LIMBRID, L. (ed.) **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, cap. 22, p. 367-378. 1996.

TULVING, E. Episodic and semantic memory. **Organization of memory**. E. Tulving & W. Donaldson (Eds). New York Academic Press, 1972.

TULVING, E.; SCHACTER, D. L. Priming and human memory systems. **Science**, 247. p301-306. 1990.

WHITE, N.M.; McDONALD, R.J. Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. **Neurobiology of Learning and Memory**, 77. p125-184. 2002.

WIETZIKOSKI, S. **Estudo da Participação do Hipocampo e da Via Nigro-Estriatal na Memória Espacial e com Dica Visual em Ratos**. Curitiba, 2003. 41 f. Tese (Mestrado Em Farmacologia) – Setor De Ciências Biológicas, Universidade Federal Do Paraná.

ZIGMOND, M.J.; BLOOM, F.E.; LANDIS, S.C.; ROBERTS, J.L.; SQUIRE, L.R. **Fundamental Neuroscience**. London, UK: Ed. Academic Press, p1411 – 1486. 1999.