

MONIQUE DA SILVA GEVAERD

**UM MODELO DE AMNÉSIA ASSOCIADA À DOENÇA DE
PARKINSON: ESTUDOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS
EM RATOS LESADOS COM 1-METIL-4-FENIL-1,2,3,6-
TETRAHIDROPIRIDINA (MPTP)**

**Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de Doutor, pelo Curso de Pós-
Graduação em Farmacologia, do Centro de
Ciências Biológicas da Universidade Federal de
Santa Catarina.**

**Orientador: Prof. Dr. Reinaldo N. Takahashi
(UFSC)**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Cláudio Da Cunha
(UFPR)**

FLORIANÓPOLIS

2001

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi

CO-ORIENTADOR:

Prof. Dr. Cláudio Da Cunha

Os resultados comportamentais apresentados nesta tese foram realizados nos laboratórios do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), sob a orientação do prof. Dr. Reinaldo N. Takahashi (UFSC) e co-orientação do prof. Dr. Cláudio da Cunha (UFPR), durante o Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, nível Doutorado. As avaliações neuroquímicas e histológicas foram efetuadas nos laboratórios do Departamento de Psicobiologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da USP-RP e do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Biomédicas - I da USP-SP, sob a supervisão dos professores Drs. Rodolfo Silveira e Newton S. Canteras, respectivamente.

**“UM MODELO DE AMNÉSIA ASSOCIADA À DOENÇA DE PARKINSON:
ESTUDOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS EM RATOS
LESADOS COM 1-METIL-4-FENIL-1,2,3,6-TETRAHIDROPIRIDINA (MPTP).**

POR

MONIQUE DA SILVA GEVAERD

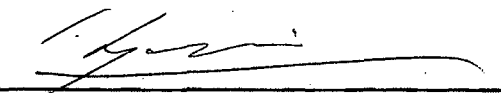
**Tese julgada e aprovada em sua forma
final, pelo Orientador e membros da
Banca Examinadora, composta pelos
Professores Doutores:**

Banca Examinadora:



Reinaldo Naoto Takahashi

FMC/UFSC-(Orientador)



Ivan Izquierdo

UFRGS



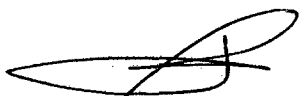
Roberto Andreatini

UFPR



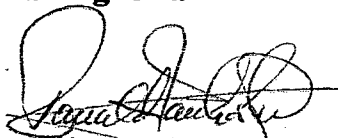
Antonio de Pádua Carobrez

FMC/UFSC



Thereza C. M. de Lima Nogueira

FMC/UFSC



**Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC**

Florianópolis, 06 de julho de 2001.

Ao Rogério pelo incentivo e compreensão;
À Mariana pela paciência para ser concebida;
Aos meus pais pela formação e estímulo;
Aos meus familiares e amigos pelo apoio;
Aos meus mestres pela orientação.

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre me guiou pelo caminho do sucesso e de realizações, mesmo que muitas vezes este caminho tenha parecido sinuoso.

Ao Rogério e à Mariana, por demonstrarem que o amor puro e verdadeiro existe e o quanto ele é importante em nossas vidas.

Aos meus pais, irmãos, sogros, cunhados, cunhadas, sobrinhas e amigos, minha gratidão eterna pelo carinho e incentivo que sempre me confortaram nestes anos de luta.

Aos meus orientadores e demais professores que contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada pela confiança em mim depositada, pelas oportunidades que me deram para a concretização deste trabalho, bem como pela atenção e amizade dispensadas desde o início das minhas atividades.

Aos amigos da Farmacologia que me acompanharam ao longo desta jornada, obrigada pelo companheirismo, pelo auxílio nos experimentos e nos cuidados com os animais, pelas trocas de informações nos cursos ou nos corredores, pelos problemas e pelos sorrisos compartilhados. Sentirei saudades destes anos juntos.

Aos funcionários que me auxiliaram, tanto na parte administrativa quanto na parte técnica, na realização de alguns experimentos ou no cuidado com os animais, muito obrigada.

A UDESC que permitiu o afastamento de minhas atividades didáticas para a execução deste trabalho, muito obrigada.

Enfim, a todas as pessoas que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao apoio financeiro concedido pelo CNPq.

**“Não se pode ensinar tudo a alguém.
Pode-se apenas ajudá-lo a encontrar por si mesmo”.**

(Galileu Galilei)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 SINTOMAS MOTORES DA DOENÇA DE PARKINSON.....	3
1.2 SINTOMAS NÃO-MOTORES DA DOENÇA DE PARKINSON.....	4
1.3 DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE PARKINSON.....	6
1.4 ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS DA DOENÇA DE PARKINSON.....	7
1.5 ETIOPATOGENIA DA DOENÇA DE PARKINSON.....	8
1.6 DESCRIÇÃO NEUROANATÔMICA DOS CIRCUITOS NEURAIS ENVOLVIDOS NA DOENÇA DE PARKINSON	11
1.7 INTERAÇÃO ENTRE OS SISTEMAS DOPAMINÉRGICO E ADENOSINÉRGICO NO ESTRIADO.....	19
1.8 CLASSIFICAÇÃO DOS DIFERENTES TIPOS DE MEMÓRIAS E DESCRIÇÃO DOS PREJUÍZOS COGNITIVOS OBSERVADOS NA DOENÇA DE PARKINSON.....	23
1.9 TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS USADOS NA DOENÇA DE PARKINSON	29
1.10 OUTROS TRATAMENTOS USADOS NA DOENÇA DE PARKINSON.....	37
1.11 LESÕES NIGROESTRIATAIS INDUZIDAS POR MPTP: UM MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON	38
2 OBJETIVOS	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1 ANIMAIS.....	42
3.2 DROGAS.....	42

3.3 EQUIPAMENTOS E PROCEDIMENTOS	43
3.3.1 Cirurgia Estereotáxica e Microinfusão de MPTP.....	43
3.3.2 Teste de Esquiva Ativa de Duas Vias	45
3.3.3 Análise Histológica.....	46
3.3.4 Determinação dos Níveis Cerebrais de Monoaminas. Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC).....	48
3.3.5 Representação Esquemática do Protocolo Experimental Utilizado.....	50
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
4 RESULTADOS.....	52
4.1 EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA MICROINFUSÃO DE 1 μ mol DE MPTP NA SNc DE RATOS SUBMETIDOS À TAREFA DE ESQUIVA ATIVA DE DUAS VIAS.....	52
4.1.1 Análise Histológica da Lesão Induzida pela Microinfusão de 1 μ mol de MPTP na SNc de Ratos.....	52
4.1.2 Análise Neuroquímica da Lesão Induzida pela Microinfusão de 1 μ mol de MPTP na SNc de Ratos.....	57
4.1.3 Efeitos Comportamentais Decorrentes da Lesão na SNc Induzida pelo MPTP em Ratos Submetidos à Tarefa de Esquiva Ativa de Duas Vias ...	58
4.2 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM L-DOPA EM RATOS COM LESÃO DA SNc INDUZIDA PELO MPTP E SUBMETIDOS À TAREFA DE ESQUIVA ATIVA DE DUAS VIAS.....	62
4.2.1 Análise Histológica da Lesão Induzida pela Microinfusão de 1 μ mol de MPTP na SNc de Ratos.....	63
4.2.2 Análise Neuroquímica do Tratamento com L-DOPA em Ratos com Lesão da SNc Induzida pelo MPTP.....	63
4.2.3 Efeitos do Tratamento com L-DOPA sobre os Déficits Cognitivos Induzidos pela Lesão com MPTP na SNc de Ratos Submetidos à Tarefa de Esquiva Ativa de Duas Vias	67

4.3 EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM DIFERENTES DOSES DE CAFEÍNA EM RATOS COM LESÃO DA SNc INDUZIDA PELO MPTP E SUBMETIDOS À TAREFA DE ESQUIVA ATIVA DE DUAS VIAS	72
4.3.1 Análise Histológica da Lesão Induzida pela Microinfusão de 1 μ mol de MPTP na SNc de Ratos.....	73
4.3.2 Efeitos do Tratamento com Diferentes Doses de Cafeína sobre os Déficits Cognitivos Induzidos pela Lesão com MPTP na SNc de Ratos Submetidos à Tarefa de Esquiva Ativa de Duas Vias	73
5 DISCUSSÃO.....	79
6 CONCLUSÕES.....	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
ANEXOS.....	127

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Percentual de lesão das células DAérgicas mesencefálicas induzida pela microinfusão de 1 μ mol de MPTP na SNc de ratos.....	54
Tabela 2: Média do número de células imunoreativas à TH nos grupamentos Daérgicos mesencefálicos dos animais controles e lesados com MPTP.....	54
Tabela 3: Efeito da administração de MPTP na SNc de ratos e do tratamento com L-DOPA sobre os níveis cerebrais de monoaminas e metabólitos.....	66
Figura 1: Representação esquemática do circuito córtico-estriato-pálido-talâmico-cortical.....	14
Figura 2: Representação esquemática do circuito córtico-estriato-pálido-talâmico-cortical na DP.....	17
Figura 3: Fotomicrografia ilustrativa das sessões cerebrais submetidas à análise histológica pelas técnicas de Nissl e de TH dos animais controle e MPTP	55
Figura 4: Fotomicrografia ilustrativa das sessões cerebrais submetidas à análise histológica pela técnicas de Nissl dos animais SHAM...	56
Figura 5: Efeito da administração de MPTP na SNc de ratos sobre os níveis estriatais de monoaminas e metabólitos.....	57
Figura 6: Efeito da administração de MPTP na SNc de ratos sobre o número de esquivas avaliado na tarefa de esquiva ativa de duas vias, nas sessões de treino e teste.....	59
Figura 7: Efeito da administração de MPTP na SNc de ratos sobre o comportamento locomotor avaliado pelo número de cruzamentos inter-provas, nas sessões de treino e teste da tarefa de esquiva ativa de duas vias.....	61

Figura 8: Efeito da administração de MPTP na SNc de ratos sobre o tempo de reação ao choque e ao som, na tarefa de esquiva ativa de duas vias	61
Figura 9: Efeito da administração de benserazida e L-DOPA em ratos controles ou lesados com MPTP, sobre o número de esquivas avaliados na tarefa de esquiva ativa de duas vias, nas sessões de treino e teste.....	69
Figura 10: Efeito da administração de benserazida e L-DOPA em ratos controles ou lesados com MPTP, sobre o comportamento locomotor avaliado pelo número de cruzamentos inter-provas, na sessão treino da tarefa de esquiva ativa de duas vias.....	70
Figura 11: Efeito da administração de benserazida e L-DOPA em ratos controles ou lesados com MPTP, sobre o tempo de reação ao choque e ao som, na tarefa de esquiva ativa de duas vias	71
Figura 12: Efeito da administração de diferentes doses de cafeína em ratos controles ou lesados com MPTP, sobre o número de esquivas avaliado na tarefa de esquiva ativa de duas vias, nas sessões de treino e teste.....	76
Figura 13: Efeito da administração de diferentes doses de cafeína em ratos controles ou lesados com MPTP, sobre o comportamento locomotor avaliado pelo número de cruzamentos inter-provas, na sessão treino da tarefa de esquiva ativa de duas vias	77
Figura 14: Efeito da administração de diferentes doses de cafeína em ratos controles ou lesados com MPTP, sobre o tempo de reação ao choque e ao som, na tarefa de esquiva ativa de duas vias.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HIAA	- Ácido 5-hidroxi-indolacético
5-HT	- Serotonina
6-OHDA	- 6-hidroxi-dopamina
AMI	- Amígdala
AMPc	- Monofosfato de Adenosina Cíclico
ATP	- Trifosfato de Adenosina
COMT	- Catecol-O-metil-transferase
CX	- Córtex
DA	- Dopamina
DAérgico	- Dopaminérgico
DOPAC	- Ácido 3,4-dihidroxi-fenilacético
DP	- Doença de Parkinson
EC	- Estímulo Condicionado
EI	- Estímulo Incondicionado
EST	- Estriado
GABA	- Ácido gama-aminobutírico
GB	- Gânglios da Base
GLU	- Glutamato
GP	- Globo Pálido
GPe	- Globo Pálido Externo
GPi	- Globo Pálido Interno
HIP	- Hipocampo
HPLC	- Cromatografia Líquida de Alta Pressão
HVA	- Ácido Homovalínico
i.p.	- Via Intraperitoneal
L-DOPA	- Levodopa
LTP	- Potenciação de Longa Duração "Long-Term Potentiation"
MAO	- Enzima Monoamina Oxidase

MPP ⁺	- Íon 1-metil-4-fenil-piperidínio
MPPP	- 1-metil-4-fenil-4-propionoxipiperidina
MPTP	- 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NA	- Noradrenalina
NAc	- Núcleo Accumbens
NMDA	- N-metil-D-aspartado
NST	- Núcleo Subtalâmico
SN	- Substância Negra
SNA	- Sistema Nervoso Autônomo
SNC	- Sistema Nervoso Central
SNC	- Substância Negra Compacta
SNr	- Substância Negra Reticulada
CM/tálamo	- Núcleo Centro-Medial do Tálamo
VL/tálamo	- Núcleo Ventro-Lateral do Tálamo
TH	- Tirosina Hidroxilase
VTA	- Área Tegmental Ventral

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é um distúrbio neurológico caracterizado principalmente pela degeneração de neurônios dopaminérgicos (DAérgicos) nigroestriatais e conseqüente redução dos níveis estriatais de dopamina (DA). Os sintomas observados na DP incluem alterações motoras e comprometimento das funções cognitivas. Fenômenos semelhantes podem ser observados em modelos animais da DP, utilizando uma neurotoxina seletiva para os neurônios DAérgicos, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), os quais têm contribuído para melhor compreensão da patofisiologia da DP. O tratamento com levodopa (L-DOPA), um precursor da DA, em associação com a benserazida, um inibidor da enzima dopa-decarboxilase periférica, constitui a terapia sintomática mais efetiva e mais usada na DP. Entretanto, após tratamento prolongado com L-DOPA, surgem limitações ao seu emprego. Estudos recentes têm demonstrado que o uso de antagonistas dos receptores da adenosina são úteis como terapia adjuvante da L-DOPA ou de agonistas DAérgicos, para aliviar os sintomas motores da DP. Neste contexto, o presente estudo avaliou os efeitos comportamentais e neuroquímicos da administração de MPTP na substância negra compacta (SNc) de ratos, submetidos ao teste de esquiva ativa de duas vias, propondo um modelo animal de amnésia associada à DP. Além disso, verificou se o tratamento com a associação de L-DOPA e benserazida, ou com cafeína, um antagonista adenosinérgico não seletivo, reverte o prejuízo cognitivo induzido pela lesão com MPTP. Os resultados histológicos demonstraram que a infusão de MPTP produziu uma perda neural expressiva na SNc. Além disso, através dos dados

neuroquímicos, verificou-se que o MPTP reduziu os níveis estriatais de DA e seus metabólitos, assemelhando-se às características neuroquímicas da DP. Os resultados comportamentais desta lesão revelaram prejuízo nos processos de aquisição e retenção, necessários para execução da tarefa de esquiva ativa de duas vias, sugerindo este procedimento experimental como um modelo animal para o estudo de déficits de aprendizagem e memória. Com relação aos efeitos da associação de L-DOPA e benserazida, verificou-se que este tratamento promoveu a reposição dos níveis estriatais de DA, mas não reverteu o déficit cognitivo dos ratos lesados com MPTP, e ainda prejudicou o desempenho dos animais controle neste teste. Por outro lado, a cafeína em baixas doses melhorou os escores de aprendizagem e memória envolvidos neste modelo, sugerindo que este tratamento pode ser útil para melhorar as deficiências cognitivas observadas nos estágios iniciais da DP. Estes dados demonstram a importância do sistema DAérgico nigroestriatal e sua interação com o sistema adenosinérgico, em processos de aprendizagem e memória, afetados em pacientes parkinsonianos. Ressaltam ainda a importância do desenvolvimento de modelos animais da DP para estudos farmacológicos, contribuindo na busca de novas estratégias de tratamentos para as manifestações clínicas observadas na DP.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder associated with the degeneration of dopaminergic nigrostriatal neurons and a consequent reduction of striatal dopamine (DA) levels. The clinical symptoms observed in PD patients include not only motor disabilities but also cognitive deficits. A comparable phenomenon can be observed in animal models of PD produced by the administration of selective neurotoxins, such as 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Thus, the finding that MPTP experimentally administered to animals can induce effects which closely resemble the deficits seen in PD has led to a better understanding of the pathophysiology of PD. The treatment with the DA precursor levodopa (L-DOPA), in combination with a peripheral dopa decarboxylase inhibitor (benserazide), is the most effective used drug therapy in PD. However, there are limitations to the prolonged L-DOPA treatment. Recently, it has been shown that the adenosine receptor antagonists could be used as an adjunctive therapeutic agent with L-DOPA or DA agonists for the treatment of PD motor symptoms. Taking these considerations into account, the present investigation assessed the behavioral and neurochemical effects of MPTP bilaterally infused into the substantia nigra, compact part, (SNc) of rats, proposing a rat model of PD for the study of the learning and memory deficits associated with this disorder, using the two-way active avoidance task. In addition, this study analysed if the treatment with benserazide/L-DOPA or caffeine, a non-selective adenosine receptor antagonist, can revert the cognitive impairment induced by MPTP. Intra-nigral administration of MPTP produced an extensive area of neuronal cell loss in the

1 - INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é um distúrbio neurológico progressivo e degenerativo, caracterizado principalmente por problemas motores. É observada predominantemente na população idosa, com início do quadro clínico ocorrendo geralmente entre os 50 e 70 anos de idade.

A primeira descrição mundial bem definida da DP foi feita em 1817 por um médico inglês, James Parkinson, ao publicar uma pequena monografia intitulada "An Essay on the Shaking Palsy" (Paralisia Agitante). Este foi um trabalho baseado na descrição de 6 casos ilustrativos da doença, onde o autor fez uma definição geral da enfermidade, determinou os sintomas patognomônicos, descreveu o diagnóstico diferencial e fez considerações a respeito da etiologia e também do tratamento da doença (Duvoisin, 1991).

Posteriormente, outros neurologistas publicaram novas observações sobre a doença, conhecida como Paralisia Agitante, contribuindo para um melhor conhecimento sobre a mesma. Dentre estes, destacou-se Jean Marie Charcot, um dos fundadores da neurologia moderna. Foi Charcot quem sugeriu que a enfermidade Paralisia Agitante deveria ser chamada DP em homenagem à descrição clássica feita por James Parkinson e, também, por considerar o termo Paralisia Agitante impróprio. Além disso, Charcot acrescentou outras informações à descrição do quadro clínico, no diagnóstico diferencial e no tratamento da doença (Duvoisin, 1991). Os resultados dos trabalhos de Charcot e outros neurologistas no final do século XIX fizeram com que a DP se tornasse bem conhecida, estimulando o estudo de possíveis alterações

patológicas no sistema nervoso central (SNC) responsáveis pela mesma (Duvoisin, 1991; Meneses e Teive, 1996).

A DP ocorre em todo o mundo, afetando pessoas de ambos os sexos, independente da raça ou classe social, embora alguns estudos epidemiológicos indiquem uma predominância em caucasianos do sexo masculino (Meneses e Teive, 1996; Miguel *et al.*, 1998). A incidência da DP é de aproximadamente 20 casos em 100.000 habitantes na população geral e sua prevalência aumenta com a idade, afetando 1% de indivíduos acima dos 60 anos e 2% acima de 70 anos (Moghal e Rajput, 1994). Contudo, alguns pacientes podem apresentar um início mais precoce da doença antes dos 40 anos ou até dos 21 anos de idade. Aproximadamente 15% dos pacientes com DP têm entre 40 e 50 anos de idade e 10% têm 40 anos ou menos (Meneses e Teive, 1996; Youdim e Riederer, 1997).

Tal como descrito inicialmente por Parkinson (1817), o desenvolvimento da doença é lento, mas progressivo. Assim, as primeiras manifestações da doença são quase imperceptíveis ao paciente, geralmente são pessoas próximas que notam alguma mudança sutil, inicialmente no comportamento e depois na postura ou no andar. Contudo, os sintomas se agravam lentamente com o passar do tempo, podendo incapacitar o paciente 5 ou 15 anos depois (Duvoisin, 1991; Youdim e Riederer, 1997).

1.1 – SINTOMAS MOTORES DA DOENÇA DE PARKINSON

A incapacidade produzida pela DP caracteriza-se pelo aparecimento de problemas motores como o tremor de repouso, bradicinesia, rigidez muscular, anomalias posturais e episódios de paradas motoras (Duvoisin, 1991; Meneses e Teive, 1996; Youdim e Riederer, 1997; Koller e Montgomery, 1997).

A expressão “tremor de repouso” refere-se às oscilações rítmicas de um segmento do corpo observadas em condições de repouso. O tremor diminui ou desaparece com o início de alguma ação, mas pode reaparecer quando o paciente mantém uma ação ou postura por um período mais prolongado. O tremor é o sintoma mais predominante e comum na DP. Sua maneira mais conhecida é o movimento rítmico dos dedos das mãos, como se estivesse contando dinheiro ou rolando pílulas (Duvoisin, 1991; Meneses e Teive, 1996; Youdim e Riederer, 1997; Koller e Montgomery, 1997).

A rigidez muscular manifesta-se como uma resistência muscular elevada ao movimento passivo de uma articulação. Classicamente ocorre uma liberação rítmica e intermitente de curta duração da rigidez muscular durante o movimento passivo, conhecido como rigidez de roda denteada, resultando numa fragmentação dos movimentos que, ao invés de se fazer de uma maneira contínua, faz-se de maneira entrecortada (Duvoisin, 1991; Meneses e Teive, 1996; Youdim e Riederer, 1997; Koller e Montgomery, 1997).

A bradicinesia pode ser traduzida por uma lentidão de início e execução dos movimentos, deficiência em mudar os padrões motores, amplitude de movimentos

diminuída e fadigabilidade. A marcha fica arrastada, com passos curtos e pouco balanço dos braços. As paradas motoras ou fenômeno de congelamento, decorrentes da dificuldade de iniciar a caminhada, podem aparecer repentinamente. O paciente parece estar preso ao chão. Os gestos são pobres e a escrita torna-se irregular e progressivamente menor, resultando em um padrão conhecido como micrografia. Há perda da expressão facial e o ato de piscar diminui. O volume da fala também diminui, deixando a fala monótona. Este sintoma da bradicinesia é considerado como o mais incapacitante da DP e está presente em praticamente todos os pacientes (Duvoisin, 1991; Meneses e Teive, 1996; Youdim e Riederer, 1997; Koller e Montgomery, 1997).

Outro sintoma clássico da DP é instabilidade postural, decorrente da perda de reflexos posturais. Os pacientes assumem uma postura característica com a cabeça e o tronco inclinados para a frente, com os braços e pernas levemente flexionados. As quedas tornam-se freqüentes e a incapacidade de ficar em pé sem auxílio pode ocorrer em estágios mais avançados da doença (Duvoisin, 1991; Meneses e Teive, 1996; Youdim e Riederer, 1997; Koller e Montgomery, 1997).

1.2 – SINTOMAS NÃO-MOTORES DA DOENÇA DE PARKINSON

Além dos problemas motores, os pacientes também apresentam alterações em outros sistemas, acarretando anormalidades autonômicas, afetivas e cognitivas (Duvoisin, 1991; Meneses e Teive, 1996; Youdim e Riederer, 1997; Miguel *et al.*, 1998).

As alterações do sistema nervoso autônomo (SNA) caracterizam-se pelo aparecimento de seborréia, hipersalivação, diminuição do peristaltismo intestinal, hipotensão ortostática, arritmias cardíacas, edema dos membros inferiores e incontinência urinária. Dentre estes, a hipotensão ortostática é o sintoma mais incapacitante, podendo ser agravado pelos medicamentos antiparkinsonianos (Youdim e Riederer, 1997; Miguel *et al.*, 1998).

Aproximadamente 40% dos pacientes da DP apresentam depressão em graus variados (Cummings, 1992; Tandberg *et al.*, 1996). De um modo geral, o paciente parkinsoniano apresenta uma diminuição da iniciativa e um desinteresse pelos acontecimentos diários, objetos pessoais ou seus familiares. Além disso, podem apresentar sintomas como melancolia, perda do apetite, fadiga, distúrbio no sono, perda da auto-estima e ansiedade. Estes sintomas depressivos são diferentes daqueles observados na depressão idiopática, pois não estão associados à culpa, à auto-censura ou ao sentimento de fracasso, sendo considerados específicos da DP (Starkstein *et al.*, 1990). Vale ressaltar que a ocorrência de depressão na DP nem sempre está relacionada com a gravidade dos sintomas motores da doença, podendo se manifestar antes mesmo do aparecimento das primeiras manifestações motoras (Duvoisin, 1991; Meneses e Teive, 1996; Miguel *et al.*, 1998).

O comprometimento das funções cognitivas ocorre em média entre 20 e 30% dos pacientes da DP, especialmente naqueles com doença muito prolongada e em grupos etários acima dos 70 anos (Pirozzolo *et al.*, 1993). Contudo, algumas mudanças cognitivas específicas podem aparecer nas primeiras fases da doença, precedendo os

sintomas motores. Este sintoma caracteriza-se pela redução na velocidade dos processos cognitivos, principalmente quando são exigidos processos de tomada de decisões complexas. O termo bradifrenia normalmente é usado para definir esta condição. Como este tema constitui a abordagem central do presente trabalho, maiores detalhes serão apresentados no item 1.8.

Os casos de demência são comumente observados em pacientes com DP avançada. Nos pacientes mais jovens, a ocorrência de sintomas demenciais não é comum. A relação entre a demência e as mudanças cognitivas precoces e geralmente leves não é inteiramente compreendida e ainda está para ser esclarecida se elas constituem um contínuo (Cummings, 1988; Duvoisin, 1991; Meneses e Teive, 1996; Miguel *et al.*, 1998).

1.3 – DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE PARKINSON

O diagnóstico da DP é feito com base nos sintomas motores (tremor de repouso, rigidez muscular, bradicinesia e alterações posturais). De acordo com os critérios mais aceitos, é necessário a manifestação de pelo menos dois destes sintomas para a definição diagnóstica (Ward e Gibb, 1990). Na prática clínica, as formas mais comuns da DP são a forma mista, na qual ocorre uma mescla de todos os sintomas com predomínio de um ou outro, e a forma acineto-rígida, na qual ocorre predomínio da bradicinesia associada à rigidez muscular, localizadas ou generalizadas (Duvoisin, 1991; Meneses e Teive, 1996; Miguel *et al.*, 1998).

Entretanto, existe muita semelhança entre o quadro clínico da DP e o de outras síndromes parkinsonianas, podendo levar a um diagnóstico errôneo de DP. Portanto, a investigação causal através da anamnese e testes complementares que podem diagnosticar outras doenças neurológicas, no tempo mais rápido possível, é importante para definir se um paciente particular tem a DP ou uma das demais enfermidades degenerativas com sintomas parkinsonianos (Duvoisin, 1991; Meneses e Teive, 1996; Miguel *et al.*, 1998). Contudo, em duas séries de bancos de cérebro de Parkinson, 24% dos pacientes, considerados em vida como doentes de Parkinson, foram classificados como tendo outro diagnóstico durante a autópsia, ocasião única em que o diagnóstico pode ser confirmado de forma definitiva pela presença dos corpos de Lewy e emaranhados neurofibrilares (“neurofibrillary tangles”) (Rajput *et al.*, 1991; Hughes *et al.*, 1992).

1.4 – ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS DA DOENÇA DE PARKINSON

A caracterização anatomopatológica da DP, descrita inicialmente por Tretiakoff em 1919, consiste na degeneração de neurônios dopaminérgicos (DAérgicos) da substância negra compacta (SNc), localizada no mesencéfalo ventral, que se projetam predominantemente para o estriado (Hirsch *et al.*, 1988). A interrupção da transmissão nigroestriatal e conseqüente redução dos níveis de dopamina (DA) no estriado são importantes para o aparecimento dos sintomas da DP (Forno e Alvord, 1971; Bernheimer *et al.*, 1973).

Análises *post-mortem* de cérebros de indivíduos saudáveis têm revelado uma perda celular na SNc em torno de 5% por década, em função do processo normal de envelhecimento. Já em pacientes parkinsonianos, o processo patológico amplifica a perda neural de forma abrupta, com um padrão de aproximadamente 45% por década. Estima-se que ocorra uma perda celular de aproximadamente 60% nos neurônios DAérgicos da SNc e uma redução de 70-80% nos níveis estriatais de DA, antes do aparecimento dos primeiros sintomas motores da DP. A severidade da perda neural está associada à gravidade dos sintomas clínicos da doença (Hornykiewicz, 1975; Riederer e Wuketich, 1976; McGeer *et al.*, 1989; Fearnley e Lees, 1991).

Os neurônios remanescentes apresentam inclusões intracitoplasmáticas eosinófilas, de origem proteica, denominadas corpos de Lewy, os quais foram inicialmente considerados como a principal característica patológica da doença. Entretanto, os corpos de Lewy foram encontrados também em indivíduos idosos saudáveis e em outras doenças degenerativas, sendo então considerados como marcadores patológicos de degeneração neural em áreas específicas do cérebro. Apesar disto, a presença dos corpos de Lewy na SNc, em associação com a degeneração das células nigroestriatais, são fundamentais para confirmar o diagnóstico da DP (Meneses e Teive, 1996; Langston, 1996).

1.5 – ETIOPATOGENIA DA DOENÇA DE PARKINSON

Os mecanismos envolvidos na degeneração dos neurônios DAérgicos nigroestriatais na DP ainda estão em estudo. Mas, a partir do desenvolvimento e

utilização de técnicas neuroquímicas e imunohistoquímicas mais sofisticadas, associadas ao impacto da biologia molecular, para o estudo dos processos de morte celular, as informações obtidas nos últimos 10 anos sobre as possíveis causas da DP revelam a existência de um processo ativo de toxicidade neural. A natureza deste processo não é completamente conhecida, mas acredita-se estar relacionada a um estado de estresse oxidativo desencadeado por um ou mais fatores, dentre os quais destacam-se: toxinas ambientais, produção de radicais livres, anomalias mitocondriais, predisposição genética e envelhecimento cerebral (Langston, 1996; Miguel *et al.*, 1998; Olanow *et al.*, 1998). É provável que a combinação destes fatores leve ao desenvolvimento da DP (Stern, 1997). Atualmente, a explicação mais atraente é que a doença seja decorrente da combinação de fatores genéticos e ambientais (Langston, 1996).

O fato da primeira descrição oficial da DP ter ocorrido em 1817, parece demonstrar que esta doença era incomum antes da Revolução Industrial, sugerindo que a sua causa pode estar relacionada a toxinas ambientais geradas pela industrialização. Alternativamente, o aumento do número de pacientes pode ser associado à melhora na qualidade de vida resultante da Revolução Industrial, a qual aumentou a expectativa de vida da população, permitindo que estas vivam o suficiente para desenvolver a DP. (Lang e Lozano, 1998). Estudos epidemiológicos demonstram uma incidência maior da DP em populações expostas à toxinas agroindustriais e à ingestão de água de poço (Semchuck *et al.*, 1992; Rybicki *et al.*, 1993; Ferraz *et al.*, 1996).

Posteriormente, a descoberta de que uma toxina análoga à heroína, o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), era capaz de induzir os sintomas da DP tanto em humanos quanto em primatas, reforçou a influência dos fatores ambientais na etiologia da DP (Langston *et al.*, 1983; Burns *et al.*, 1983). Entretanto, a exposição repetida ou prolongada a determinada toxina ambiental, provavelmente não seja suficiente para causar a DP, já que o índice de concordância para a doença em indivíduos que vivem em uma mesma área durante longos períodos é baixa. Por outro lado, um agente ambiental poderia influenciar decisivamente nos resultados de indivíduos geneticamente suscetíveis (Meneses e Teive, 1996; Miguel *et al.*, 1998).

De fato, existem muitas evidências de que fatores genéticos apresentam importância na etiologia da DP (Wood, 1997). Na avaliação de possíveis genes envolvidos na DP, foram identificados diferentes mutações no gene da α -sinucleína, localizado no cromossomo 4q, em pacientes com história familiar. A α -sinucleína é uma proteína solúvel mas que, em concentração elevada, pode agregar-se em fibras amilóides insolúveis, formando os corpos de Lewy, seguidos da expressão da proteína ubiquitina e acúmulo de neurofilamentos, levando à degeneração nigral. Este processo é acelerado com as forma mutantes da α -sinucleína (Spillantini *et al.*, 1997; Goedert *et al.*, 1998; Mezey *et al.*, 1998; Conway *et al.*, 1998). Já em pacientes com a DP esporádica, foi verificada uma mutação no gene da α -sinucleína, localizado no cromossomo 2p13 (Gasser *et al.*, 1998).

Estudos mais recentes observaram mutação no gene que codifica a “parkin”, localizado no cromossomo 6. Esta proteína é homóloga à família da ubiquitina, a qual

está envolvida na patogênese de várias doenças neurodegenerativas (Kitada *et al.*, 1998). Outros estudos também têm pesquisado os fatores genéticos que aumentam a suscetibilidade das pessoas aos efeitos nocivos de toxinas ambientais. Dentre estes, observou-se uma deficiência no metabolismo da debrisoquina, droga metabolizada pela 4-hidroxilase do sistema microsomal hepático do citocromo P-450 (CYP 2D6), em pacientes com a DP, os quais podem apresentar uma maior predisposição aos efeitos tóxicos de certos substratos do sistema enzimático CYP 2D6. Entretanto, existem evidências contra esta associação (Steiger *et al.*, 1991; Riedl *et al.*, 1998).

Levantamentos epidemiológicos verificaram uma taxa de concordância de 45% entre gêmeos monozigóticos e de 29% entre dizigóticos (Duvoisan, 1987; Burn *et al.*, 1992; Johnson *et al.*, 1990; Tanner *et al.*, 1997). Também foi verificado que 15 a 20% dos pacientes parkinsonianos apresentam uma história familiar. Entretanto, como a maior parte dos pacientes (75-80%) apresentam a forma esporádica da doença, o papel dos fatores genéticos é provavelmente mais complexo e dependente da ocorrência simultânea de outros mecanismos de lesão celular (Semchuk *et al.*, 1993; Bandmann, 1998).

1.6 – DESCRIÇÃO NEUROANATÔMICA DOS CIRCUITOS NEURAIS ENVOLVIDOS NA DOENÇA DE PARKINSON

Estudos neuroanatômicos e funcionais têm demonstrado que a SNc e o estriado são componentes dos gânglios da base (GB), que por sua vez são integrantes do circuito córtico-gânglio basal-talâmico-cortical, o qual está envolvido na integração de

informações sensoriomotoras, associativas e límbicas para a produção de respostas motoras (Alexander e Crutcher, 1990; Bergman *et al.*, 1998). Para melhor compreensão do funcionamento deste circuito, segue uma descrição breve de sua neuroanatomia funcional.

Os GB são um conjunto de núcleos subcorticais intimamente conectados, compostos pelo estriado (EST, incluindo o caudado e o putamen), globo pálido (GP, incluindo os segmentos interno e externo), substância negra (SN) e núcleo subtalâmico (NST). O conhecimento sobre a organização dos GB iniciou em 1970, com Kemp e Powel (1970), sendo descrito como um sistema reentrante, com influências corticais, que passam através dos GB e retornam ao córtex (CX) através de conexões talâmicas específicas (Bergman *et al.*, 1998; Miguel *et al.*, 1998).

Aferências topograficamente organizadas projetam-se do CX (motor, pré-motor, sensorial e de associação) e de estruturas límbicas para o estriado. O neurotransmissor destas projeções córtico-estriatais é o glutamato (GLU). A outra estrutura dos GB que recebe aferências corticais excitatórias diretas é NST, as quais originam-se do CX motor e pré-motor. Segundo Alexander e Crutcher (1990), o EST é a estrutura de aferências primárias dos GB, sendo considerado um componente integrativo importante nesta região. O EST conecta-se com as demais estruturas dos GB através de duas vias: a via direta e a via indireta.

A via direta consiste de projeções estriatais inibitórias (neurônios expressando ácido gama-aminobutírico-GABA, substância P e dinorfinas), diretas para a porção interna do GP (Gpi ou núcleo entopeduncular no rato -NEP) e parte reticulada da SN

(SNr), que são a principal porta de saída dos GB para o controle do córtex motor, via tálamo.

A via indireta consiste de projeções estriatais inibitórias (neurônios expressando GABA e encefalinas) para a porção externa do GP (GPe), de onde fibras também inibitórias (GABAérgicas) projetam-se principalmente para o NST, cujos neurônios excitatórios (glutamatérgicos) enviam projeções para o GPi/SNr. Trabalhos mais recentes mostram que o NST também envia fibras (glutamatérgicas) de volta para o GPe, funcionando como um mecanismo de retroalimentação negativo (Ryan e Clark, 1992). Tal como mencionado acima, o GPi/SNr representam as estruturas de saída dos GB, cujos neurônios (GABAérgicos) projetam-se para os núcleos ventrolateral (VL) e centromedial (CM) do tálamo, respectivamente.

Finalmente, o tálamo projeta-se para o CX e o EST (neurônios glutamatérgicos) fechando o circuito (Albin *et al.*, 1989; Parent e Hazrati, 1993). Para um melhor entendimento, ver esquema da Fig. 1.

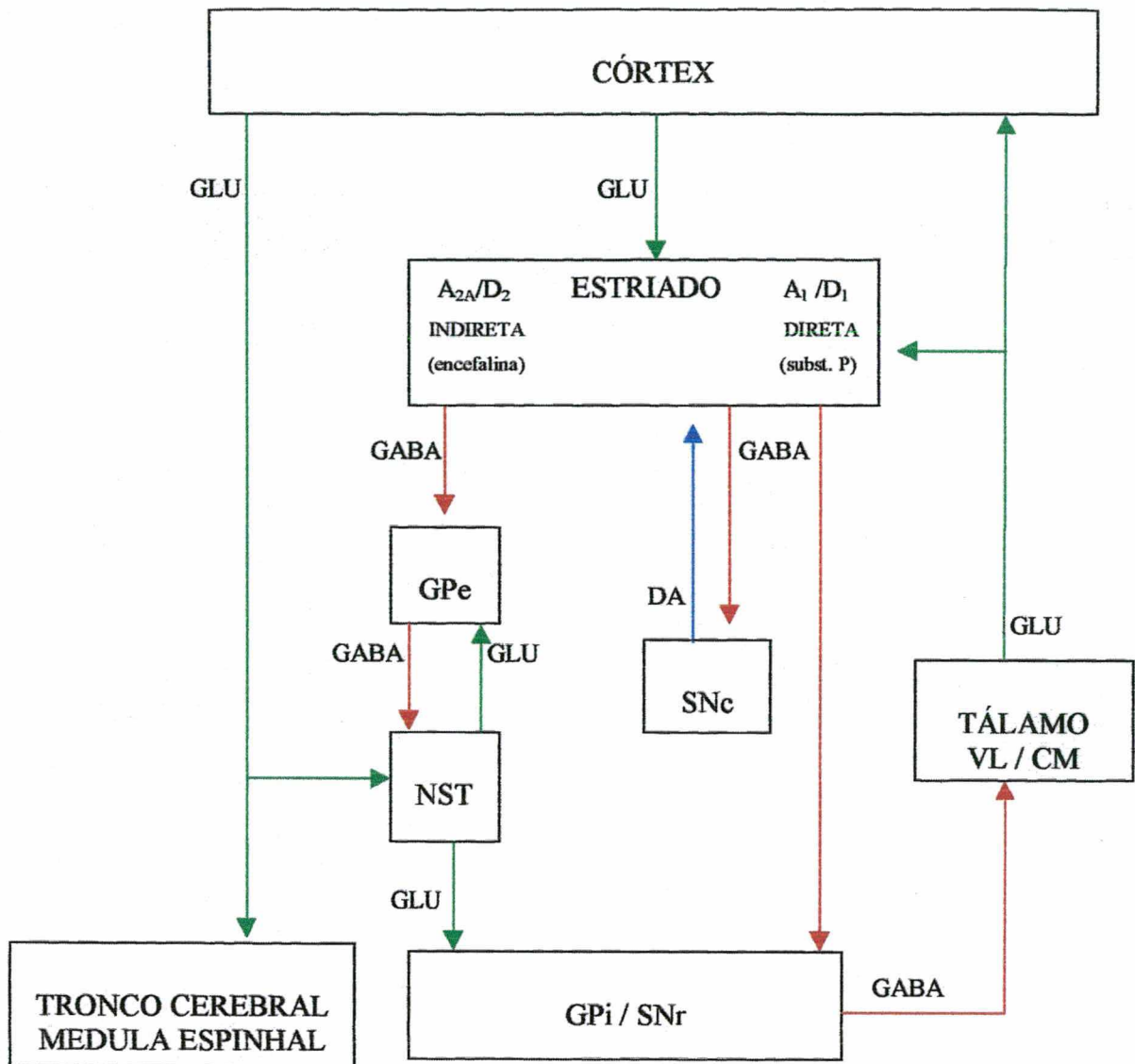


Figura 1: Representação esquemática do circuito córtico-gânglio basal-talâmico-cortical. Setas verdes representam conexões glutamatérgicas, setas vermelhas conexões GABAérgicas, seta azul conexão DAérgica. As siglas A₁ e A_{2A} referem-se aos subtipos de receptores para a adenosina. As siglas D₁ e D₂ referem-se aos subtipos de receptores para a dopamina. As demais siglas referem-se às estruturas que compõem os gânglios da base: GPe (globo pálido externo), GPi (globo pálido interno), SNe (substância negra compacta), SNr (substância negra reticulada), NST (núcleo subtalâmico), VL/CM (núcleos ventrolateral e centromedial do tálamo) e, também, aos neurotransmissores presentes neste circuito: DA (dopamina), GLU (glutamato), GABA (ácido gama-aminobutírico). (Adaptado de Bergman *et al.*, 1998).

Como pode ser deduzido, as vias direta e indireta apresentam efeitos opostos sobre os neurônios GABAérgicos do GPi/SNr que se projetam para o tálamo. Assim, a ativação da via direta leva à estimulação talâmica e conseqüente aumento da atividade excitatória tálamo-cortical, com a facilitação da iniciação cortical dos movimentos. Por outro lado, a ativação da via indireta causa inibição talâmica e subseqüente depressão tálamo-cortical (Fig. 1). Portanto, parece que o equilíbrio das atividades destas duas vias é essencial para a regulação normal dos movimentos (Stoof *et al.*, 1999).

Ainda com relação à neuroanatomia dos GB (Fig. 1), estudos demonstram a presença de projeções estriatais inibitórias (GABAérgicas) para a SNc (Stoof *et al.*, 1999), a qual retorna ao estriado através de projeções DAérgicas. A DA liberada das terminações dos neurônios localizados na SNc modula a atividade das células estriatais e conseqüentemente, todo o circuito córtico-gânglio basal-talâmico-cortical (Albin *et al.*, 1989; Bergman *et al.*, 1998). Dados recentes sobre a distribuição estriatal dos receptores DAérgicos sugerem que a DA pode apresentar efeitos opostos sobre as vias direta e indireta, através da ativação de dois tipos diferentes de receptores: D₁ e D₂. (Stoof e Kebabian, 1981; Gerfen, 1992).

As maiores concentrações dos receptores D₁ e D₂ são encontradas no estriado e na substância negra. Os receptores D₁ localizam-se principalmente nos neurônios do estriado que se projetam para o GPi, enquanto os receptores D₂ encontram-se mais nos neurônios estriatais que se projetam para o GPe. Na substância negra, os receptores D₁ são encontrados na SNc e SNr, enquanto os receptores D₂, principalmente na SNc (Palacios *et al.*, 1993).

Sabe-se que os receptores D₁, os quais são acoplados a uma proteína G estimulatória, ativam a enzima adenilato-ciclase e aumentam os níveis de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC), enquanto os receptores D₂ exercem uma influência inibitória sobre esta enzima reduzindo a produção de AMPC (Sibley e Mosma, 1992; Sunahara *et al.*, 1993). Assim, a ativação de receptores D₁ exerce efeito estimulatório sobre a via direta, enquanto a ativação de receptores D₂ exerce efeito inibitório sobre a via indireta (Gerfen *et al.*, 1995; Stoof *et al.*, 1999). Ver esquema da Fig. 1.

Neste sentido, a degeneração dos neurônios DAérgicos da SNc e conseqüente redução dos níveis estriatais de DA, como ocorre na DP, geram uma diminuição da ativação da via direta e ativação do complexo GPi/SNr. Isto resulta na inibição das projeções talâmicas, diminuindo a atividade da via tálamo-cortical. Por outro lado, a perda dos neurônios nigroestriatais diminui a inibição da via indireta. A conseqüência é um aumento da inibição do GPe e uma maior atividade do NST, aumentando o padrão de disparo dos neurônios do GPi/SNr. Isto também leva à inibição talâmica e redução da atividade tálamo-cortical, acarretando no desenvolvimento dos sintomas característicos da DP (De Long, 1990; Bergman *et al.*, 1998; Bonnet, 2000). Ver esquema Fig. 2.

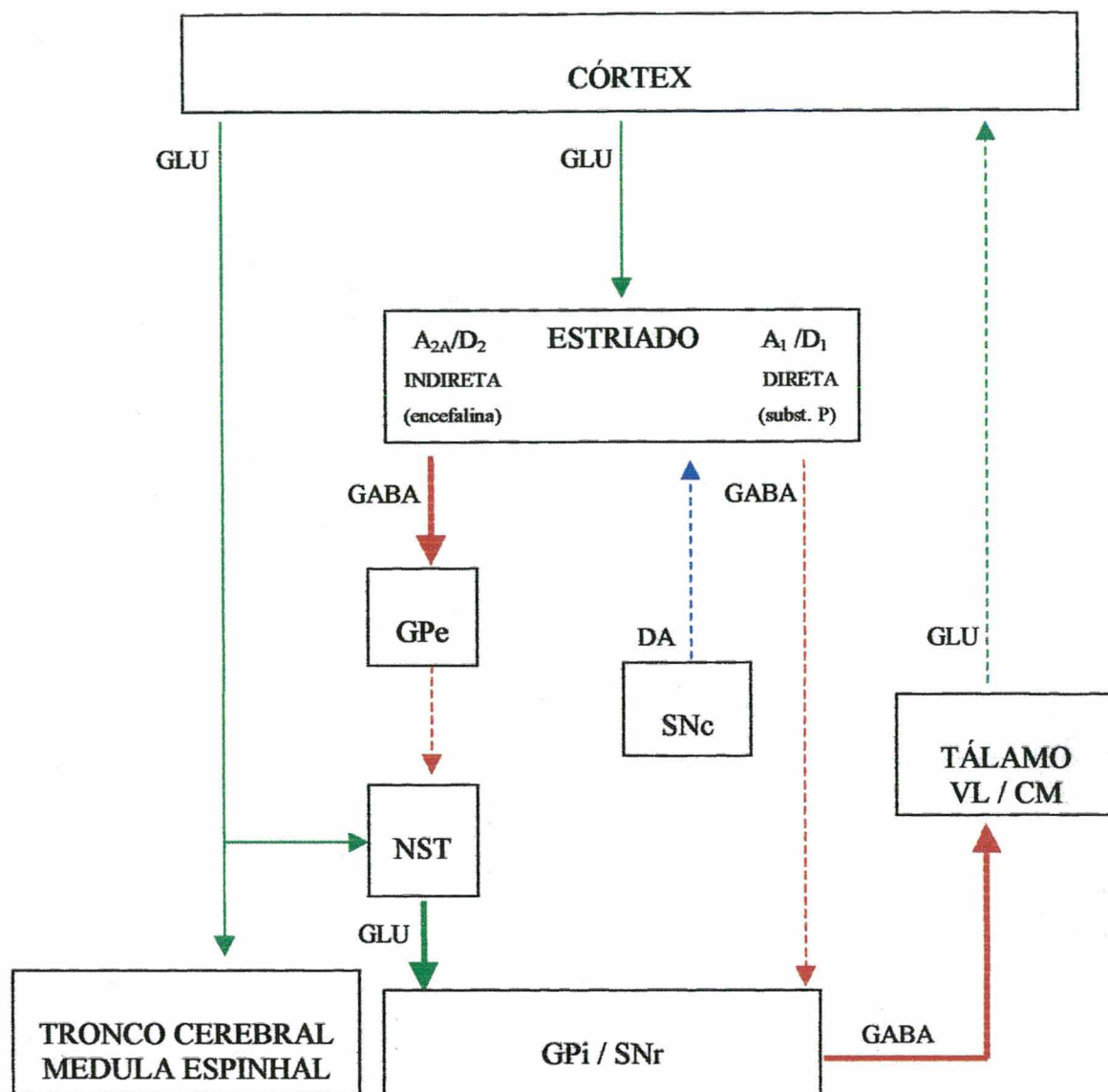


Figura 2: Representação esquemática do circuito córtico-gânglio basal-talâmico-cortical, na DP. Setas verdes representam conexões glutamatérgicas, setas vermelhas conexões GABAérgicas, seta azul conexão DAérgica. As siglas A₁ e A_{2A} referem-se aos subtipos de receptores para a adenosina. As siglas D₁ e D₂ referem-se aos subtipos de receptores para a dopamina. As demais siglas referem-se às estruturas que compõem os gânglios da base: GPe (globo pálido externo), GPi (globo pálido interno), SNc (substância negra compacta), SNr (substância negra reticulada), NST (núcleo subtalâmico), VL/CM (núcleos ventrolateral e centromedial do tálamo) e, também, aos neurotransmissores presentes neste circuito: DA (dopamina), GLU (glutamato), GABA (ácido gama-aminobutírico). (Adaptado de Bergman *et al.*, 1998).

Apesar dos avanços obtidos nesta área, o funcionamento do circuito que integra os GB ainda não é completamente conhecido, porém se encontra em fase de aprimoramento e/ou substituição, onde vários autores propõem modelos alternativos (Obeso *et al.*, 2000). Entretanto, este modelo inicial descrito acima serviu para que se pudessem entender as manifestações sistêmicas da DP.

Dados neuroanatômicos recentes têm revelado a presença de vários tipos de neurônios de projeção, com padrões distintos de colaterização axonal, nos principais núcleos dos GB (Parent *et al.*, 2000). Estes axônios colaterais permitem o contato sináptico entre as diversas estruturas dos GB, formando "circuitos internos" que modulam a excitabilidade de seus núcleos e servem para estabilizar o seu funcionamento (Obeso *et al.*, 2000). Evidências adicionais demonstram que, além do EST, o GPe, GPi, SNr e o NST também recebem projeções DAérgicas da SNc. Estas fibras são menos profusas do que a projeção nigroestriatal, mas apresentam importante influência sobre a regulação dos circuitos internos dos GB (Joel e Weiner, 2000; Obeso *et al.*, 2000).

Portanto, os GB não representam apenas um sistema unidirecional de transferência de informações, como previamente descrito. Deve-se considerá-los como um sistema complexo, mas altamente organizado, formado por uma série de projeções paralelas, somatotopicamente segregadas e ricas em axônios colaterais, responsáveis pela estabilidade do sistema (Obeso *et al.*, 2000).

Além disso, a presença de interneurônios estriatais colinérgicos e DAérgicos, bem como de peptídeos neuromoduladores (substância P, colicistocinina e encefalina),

confirmam a possibilidade de interações anatômicas e funcionais neste sistema, dificultando a total compreensão de seu funcionamento (Smith e Kieval, 2000). Vale ressaltar que estas interações podem ocorrer tanto pré quanto pós-sinapticamente, na membrana plasmática, envolvendo influência modulatória recíproca sobre os processos de reconhecimento e liberação de neurotransmissores, bem como a nível intracelular sobre as proteínas de fosforilação e, conseqüentemente sobre os mensageiros intracelulares. (Agnati *et al.*, 1980; 1993; Fuxe e Agnati, 1985).

Neste contexto, estudos que identifiquem o mecanismo molecular envolvido em interações tipo receptor-receptor, têm sido desenvolvidos com o objetivo de caracterizar a heterorregulação dos receptores DAérgicos nos GB. Evidências recentes demonstram a existência de interação de receptores DAérgicos com receptores para colecistocinina, neurotensina e adenosina, no estriado (Ferré *et al.*, 1992; Fuxe *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1995). Na seqüência, será dada ênfase à interação entre os sistemas DAérgico e adenosinérgico no EST, pois as demais interações mencionadas fogem do escopo deste trabalho.

1.7 - INTERAÇÃO ENTRE OS SISTEMAS DOPAMINÉRGICO E ADENOSINÉRGICO NO ESTRIADO

A adenosina, produzida em vários tecidos como um subproduto da degradação do trifosfato de adenosina (ATP), desempenha diferentes funções na modulação de atividades nos sistemas nervosos periférico e central (Fredholm, 1995; Daval *et al.*, 1996). Os efeitos da adenosina são mediados por receptores de membrana,

classificados com A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 . Todos são acoplados à proteína G e envolvidos na inibição ou estimulação da adenilato-ciclase (Collis e Hourani, 1993; Svenningsson *et al.*, 1999). Os receptores A_1 e A_3 têm ação inibitória sobre esta enzima (Linden *et al.*, 1991; Linden, 1994) e os receptores A_{2A} e A_{2B} estimulam a mesma (Daly *et al.*, 1983; Svenningsson *et al.*, 1999).

Os receptores A_1 e A_{2A} são altamente expressos no SNC, onde apresentam papel importante na modulação da liberação de vários neurotransmissores e neuromoduladores como a acetilcolina, DA, GLU, GABA ou vários neuropeptídeos (Ribeiro, 1999). Nos GB, os receptores A_{2A} concentram-se mais nos neurônios GABAérgicos estriatais que se projetam para o GPe (via indireta), enquanto os receptores A_1 , apesar de apresentarem uma distribuição mais difusa, encontram-se principalmente nos neurônios GABAérgicos do estriado que se projetam para o GPI/SNr (via direta) (Ferré *et al.*, 1997; Svenningsson *et al.*, 1999). Desta maneira, verifica-se a co-localização dos receptores D_1/A_1 e D_2/A_{2A} no estriado, os quais interagem de maneira antagônica, justificando os efeitos estimulantes de antagonistas dos receptores da adenosina (como a cafeína), bem como as ações depressoras dos agonistas da adenosina sobre comportamentos motores (Ferré *et al.*, 1992; 1997; Svenningsson *et al.*, 1999).

Estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem que o mecanismo desta interação direta entre os receptores D_1/A_1 e D_2/A_{2A} pode envolver a formação de heterodímeros, levando às alterações alostéricas que alteram a afinidade e o acoplamento com a proteína-G, modulando a eficácia de ativação do receptor. Assim, a estimulação dos receptores da

adenosina diminui a afinidade de ligação de agonistas DAérgicos com os receptores da DA. Ou seja, em geral, os agonistas da adenosina produzem efeitos similares aos antagonistas da DA, enquanto os efeitos dos antagonistas da adenosina assemelham-se àqueles induzidos por agonistas DAérgicos (Fuxe *et al.*, 1998).

Esta interação antagônica entre os receptores DA/adenosina tem sido comprovada experimentalmente com estudos neuroquímicos e comportamentais. Ferré e colaboradores (1993) demonstraram, através de um estudo de microdiálise em ratos, que a perfusão do agonista A_{2A} , CGS 21680, na região somato-dendrítica dos neurônios GABAérgicos estriatais, reverte o efeito do agonista D_2 , pergolide, de reduzir a liberação de GABA. Na continuidade deste experimento, a perfusão combinada de baixas doses do antagonista adenosinérgico teofilina e pergolide levou a um aumento do efeito do agonista D_2 a fim de reduzir os níveis extracelulares de GABA no GPe.

Usando a mesma metodologia, também foi possível demonstrar que a ativação dos receptores DAérgicos D_1 no estriado aumentam a neurotransmissão GABAérgica da via estriado-GPi/SNr em ratos, enquanto a ativação dos receptores estriatais A_1 não exerce, isoladamente, nenhum efeito sobre esta via. Entretanto, a ativação dos receptores A_1 antagonizam a liberação de GABA, mediada pelos receptores D_1 (Ferré *et al.*, 1996).

Evidências comportamentais também corroboram com a interação proposta entre os receptores DA/adenosina. Porém, neste caso, pelo fato dos receptores A_1 e A_{2A} se co-localizarem principalmente nas vias direta e indireta, respectivamente, as

quais apresentam efeitos opostos sobre a liberação de comportamentos motores, espera-se uma ação sistêmica sinérgica destas duas classes de receptores adenosinérgicos (Pinna *et al.*, 1996). Coerente com o esperado, foi demonstrado em roedores que baixas doses do agonista A_{2A} , CGS 21680, podem diminuir a estimulação da atividade motora induzida por agonistas D_2 , mas não influenciam no aumento da atividade motora induzida por agonistas D_1 (Ferré *et al.*, 1991; Ferré e Fuxe, 1992; Ferré *et al.*, 1997). Por outro lado, um antagonista do receptor A_{2A} pode aumentar a ativação motora produzida tanto pelos agonistas D_2 quanto por D_1 .

Também foi verificado que a administração sistêmica de um agonista do receptor A_1 , ciclopentiladenosina, reverte de forma seletiva os efeitos comportamentais produzidos pelo agonista DAérgico D_1 , SKF 38393, tais como a ativação motora em camundongos tratados com reserpina e a discinesia oral em coelhos (Ferré *et al.*, 1994). Popoli e colaboradores (1996) mostraram que o antagonista adenosinérgico A_1 , o 8-ciclopentil-1,3-dimetilxantina, aumentou significativamente o efeito motor induzido pelo agonista D_1 , o SKF 38393, em camundongos tratados com reserpina e em ratos com lesão unilateral da substância negra induzida pela 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA).

Estes resultados confirmam a co-localização dos receptores D_1/A_1 e D_2/A_{2A} no estriado e a existência de uma interação antagônica entre os mesmos, enfatizando a importância da neuromodulação DAérgica através da interação com o sistema da adenosina nos GB, para o tratamento de distúrbios motores como a DP (Mally e Stone, 1994; Richardson *et al.*, 1997).

Apesar da presente noção sobre a organização e o funcionamento dos GB, existem ainda certas questões clínicas e experimentais inexplicáveis neste modelo, o que representa um importante desafio para os neurocientistas. É provável que os mecanismos descritos até agora representem processos ainda mais complexos que envolvam a ativação de diferentes mensageiros intracelulares, ressaltando a necessidade de utilização de novas técnicas que permitam identificar melhor a natureza das interações sinápticas, bem como seu papel sobre o funcionamento do circuito dos GB.

1.8 – CLASSIFICAÇÃO DOS DIFERENTES TIPOS DE MEMÓRIAS E DESCRIÇÃO DOS PREJUÍZOS COGNITIVOS OBSERVADOS NA DOENÇA DE PARKINSON

Antes de descrever os déficits de memória observados na DP, convém incluir alguns conceitos básicos sobre os diferentes tipos de memórias. É claro que os conceitos aqui apresentados estão simplificados e ainda podem apresentar divergência entre alguns autores.

A maioria das espécies são capazes de se adaptar em função dos diferentes eventos que ocorrem durante suas vidas. Tais processos de adaptação modificam o sistema nervoso e, como resultado, os animais podem aprender e relembrar as experiências vividas (Squire, 1986). Assim, o processo de aquisição de novas informações obtidas através das experiências é chamado de aprendizagem e o processo

que envolve o armazenamento e a evocação destas informações é chamado de memória (McGaugh, 1988; Izquierdo, 1989; 1992).

As memórias podem ser classificadas por diferentes critérios. Uma classificação em uso define memórias de longa duração, de curta duração e memória de trabalho (McGaugh, 1966; 1968; Gold e McGaugh, 1975). Neste sentido, a formação da memória inicia-se com a aquisição de informações, que chegam ao cérebro através dos sistemas sensoriais, as quais são processadas e armazenadas por circuitos neurais que envolvem de forma crítica o córtex pré-frontal e parte do giro do cíngulo, em uma forma de memória lábil, de capacidade limitada, que perdura apenas enquanto estas informações estiverem em uso durante uma operação mental, podendo ser prejudicada pela apresentação de estímulos interferentes ou competitivos (Brown *et al.*, 1997). Esta memória denomina-se de memória de trabalho (do termo em inglês “working memory”) (Baddeley, 1986; Izquierdo e Medina, 1991) ou memória operacional e refere-se ao armazenamento temporário de informações necessárias para a realização de uma determinada tarefa, durante um breve período de tempo (Baddeley, 1986; Izquierdo, 1992).

Em paralelo formam-se memórias de curta duração, usando circuitos neurais que envolvem, entre outras estruturas cerebrais, o hipocampo e o córtex entorrinal. Nestes circuitos, diferentes processos celulares (e.g. alteração da liberação de neurotransmissores, fosforilação de neurorreceptores) resultam na formação destas memórias que variam na sua curta duração na escala de minutos a várias horas. Também em paralelo, estes mesmos circuitos neurais, bem como outros ativados

posteriormente (p. ex., córtex temporal de associação), podem formar memórias de longa duração através da alteração destes circuitos por processos de plasticidade neural. Esses processos envolvem a expressão de genes mediados pela ativação de vias bioquímicas que se iniciam pela ativação de segundos mensageiros (p. ex., a via da proteína quinase A-CREB ou a via das MAPKs). Podem também envolver a formação (“sprouting”) ou a destruição de sinapses induzidas pela expressão de proteínas de adesão (e.g. N-CAMs, outras) e proteínas do citoesqueleto. Entre os mecanismos propostos para os fenômenos de plasticidade neural que suportam a formação de memórias, estão a potenciação de longa duração (“long-term potentiation”, LTP) e a depressão de longa duração (“long term-depression”, LTD) (Bliss e Lomo, 1973; Bindman *et al.*, 1991; Bliss e CollinGridge, 1993; Izquierdo e McGaugh, 2000).

As memórias também podem ser classificadas de acordo com o seu conteúdo em: declarativa ou explícita e procedural ou implícita (Squire, 1992). As memórias declarativas ou explícitas são aquelas que no homem são acessíveis conscientemente, que podem ser relatadas verbalmente ou que são evocadas na forma de imagens. Incluem, por exemplo, a memória de um texto, de um evento, de um fato e de um rosto conhecido. Dependem da integridade de estruturas cerebrais específicas da parte medial temporal do cérebro que participam de forma crítica no seu processo de armazenamento e/ou evocação, tais como o hipocampo e o córtex entorrinal (Squire, 1986; Squire e Zola-Morgan, 1988; Izquierdo, 1992; Thompson e Kin, 1996).

Por outro lado, as memórias procedurais ou implícitas são aquelas adquiridas e evocadas de maneira automática, tais como hábitos e habilidades motoras. Referem-se

à recordação inconsciente de informações que se expressam somente através de desempenho de operações específicas necessárias a uma determinada tarefa. Existem muitas evidências de que as memórias implícitas dependem de forma crítica dos circuitos envolvendo os GB, o córtex pré-frontal e também dos circuitos cerebelares (Squire, 1986; Squire e Zola-Morgan, 1988; Packard *et al.*, 1989; Squire *et al.*, 1993).

Recentemente, Tulving e Markowitsh (1998) e Nyberg e Tulving (1997) propuseram uma nova classificação para as memórias, substituindo a memória declarativa por memórias episódica e semântica e, a memória implícita por memória de procedimento e de “priming”. A memória episódica, ou também denominada autobiográfica, refere-se às memórias de episódios ou experiências de vida. A memória semântica está relacionada com o conhecimento real, ou seja, com os conceitos e interpretações dos fatos. A memória de procedimento, ou de hábito, é aquela aprendida de maneira automática, enquanto que, a de “priming” necessita de dicas para sua evocação. Esta classificação foi feita com base em estudos de neuroimagem funcional, os quais evidenciaram a existência de múltiplos sistemas de memória em humanos.

Uma das maneiras de se aprender sobre a organização neural e as estruturas cerebrais envolvidas na formação dos diferentes tipos de memória tem sido através do estudo de pacientes com problemas de memória. Várias são as causas da amnésia, dentre as quais destacam-se: doença de Alzheimer, DP, dependência crônica do álcool ou psicoestimulantes, acidentes vasculares múltiplos no cérebro, traumatismo craniano, entre outras. Alguns pacientes com lesão cerebral ou outra patologia degenerativa apresentam déficits cognitivos específicos, sem afetar outras habilidades

intelectuais (Squire, 1987; Milner *et al.*, 1998). Além disso, o desenvolvimento de modelos animais de amnésia, associado aos estudos bioquímicos e de biologia molecular, têm contribuído para a identificação das estruturas cerebrais associadas aos problemas cognitivos, bem como para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos neste processo (Squire, 1986; Izquierdo e Medina, 1998). Alguns avanços também têm sido obtidos com o uso de animais transgênicos que apresentam expressão alterada ou não expressam receptores específicos ou subunidades enzimáticas em todo o animal ou em regiões cerebrais pré-determinadas (Grant e Silva, 1994; Wilson e Tonegawa, 1997).

Neste contexto, os estudos sobre a DP influenciaram bastante as pesquisas sobre as funções dos GB. As observações dos sintomas de tremor, rigidez e bradicinesia em pacientes parkinsonianos fez com que os GB fossem inicialmente considerados como estruturas envolvidas com os mecanismos motores, especialmente na iniciação dos movimentos (Marsden, 1982; Hiekkila *et al.*, 1989). Além disso, dados recentes descrevem a ocorrência de déficits cognitivos em pacientes com DP, o que reforça a teoria do envolvimento dos GB nestes processos (e.g. memórias de hábito e procedural) (Brown *et al.*, 1997). Estas evidências sugerem que os GB não estão envolvidos apenas com o controle dos movimentos, mas também no planejamento das ações e nos aspectos emocionais da resposta, funções estas que são afetadas na DP (Beiser e Houk, 1998; Middleton e Strick, 2000). Segundo Marsden e Obeso (1994), a atenção, a motivação e a emoção podem estar intimamente ligadas à ação, sugerindo

que a integração destes diferentes aspectos do comportamento representa uma característica essencial dos GB.

Assim, o envolvimento dos GB em processos cognitivos depende também da integridade das conexões subcortico-corticais, as quais são afetadas na DP, levando ao desenvolvimento de déficits específicos da doença (Taylor *et al.*, 1986; Middleton e Strick, 1996). Portanto, estes déficits parecem estar relacionados à patologia subcortical da doença, pois são verificados nos estágios iniciais, antes do aparecimento dos sintomas motores, quando as lesões são restritas à via DAérgica nigroestriatal (Dubois e Pillon, 1997; Brown *et al.*, 1997). Eles afetam principalmente funções visoespaciais e de integração sensorial, funções executivas e alguns tipos de memória, tais como as memórias de trabalho e procedural ou implícita citadas acima (Dubois e Pillon, 1997; Thomas-Ollivier *et al.*, 1999).

O comprometimento das funções executivas na DP refere-se ao comprometimento do processo mental necessário para a elaboração de um comportamento adaptativo em resposta a uma nova situação ambiental, que inclui o processamento de informações relevantes, geração de novos conceitos e habilidade para planejar uma solução para o problema, o que pode incluir as memórias de trabalho, de longa duração e as memórias implícitas (Dubois e Pillon, 1997). Todas afetam as funções executivas, bem como o processo de percepção, levando aos prejuízos cognitivos característicos da doença (Salmon e Butters, 1995; Dubois e Pillon, 1997; Thomas-Ollivier *et al.*, 1999). Assim, as tarefas que necessitam do armazenamento temporário de informações, tais como a fluência e flexibilidade do

raciocínio para a solução de um problema ou tomada de decisão, bem como o planejamento e regulação de respostas adaptativas, estão afetadas na DP (Freedman e Oscar-Berman, 1996; Brown *et al.*, 1997).

Os pacientes parkinsonianos também apresentam deficiências em outras funções executivas, como dificuldades no direcionamento e manutenção da atenção, em alguns testes que usam estímulos visuais e auditivos (Brown e Marsden, 1986; Freedman e Oscar-Berman, 1996; Brown *et al.*, 1997). Por outro lado, tem sido demonstrado que as memórias declarativas, normalmente associadas ao hipocampo, são preservadas na DP (Riekkinen, *et al.*, 1998).

1.9 – TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS USADOS NA DOENÇA DE PARKINSON

Como mencionado anteriormente, os sintomas da DP são decorrentes da degeneração da SNc e da redução de DA estriatal (Forno e Alvard, 1971; Bernheimer *et al.*, 1973). Neste sentido, o tratamento da DP visa estimular este sistema deficiente através da reposição de DA, usando precursores, ou através da utilização de drogas que mimetizem a ação da DA, atuando direta ou indiretamente sobre o sistema DAérgico nigroestriatal.

A grande conquista com relação ao tratamento sintomático da DP foi a introdução da levodopa (L-DOPA), um precursor da DA, em 1967, quando Cotzias e colaboradores demonstraram sua eficácia sobre as manifestações clínicas da doença (Cotzias *et al.*, 1967). A L-DOPA é transformada em DA pela ação da enzima dopa-descarboxilase, presente nos neurônios DAérgicos periféricos e centrais. Assim, parte

desta reação pode ocorrer sistemicamente antes que a droga alcance o SNC. A DA produzida não cruza a barreira hemato-encefálica, sendo responsável pelo desenvolvimento dos efeitos colaterais da L-DOPA como náuseas, vômitos e arritmias cardíacas. Além disso, a dissipação periférica da L-DOPA leva à necessidade de se usar doses mais elevadas da droga.

Estudos posteriores demonstraram que a co-administração de L-DOPA e inibidores periféricos da dopa-descarboxilase em pacientes parkinsonianos promove aumento na concentração cerebral de catecolaminas (Bartholini *et al.*, 1967), potencializa os efeitos anti-parkinsonianos da L-DOPA (Siegfried *et al.*, 1969; Tissot *et al.*, 1969) e reduz sua dose terapêutica, atenuando os efeitos colaterais produzidos pela mesma (Cotzias *et al.*, 1969; Yahr *et al.*, 1971; Calne *et al.*, 1971). Portanto, a combinação de L-DOPA com inibidores da dopa-descarboxilase, como a carbidopa ou a benserazida, constitui o tratamento farmacológico mais efetivo e o mais utilizado ainda hoje para aliviar os sintomas da DP (Hagan *et al.*, 1997; Dunnett e Björklund, 1999; Obeso *et al.*, 2000).

Apesar da eficácia da L-DOPA como uma droga antiparkinsoniana, o tratamento prolongado com a mesma está associado com o desenvolvimento de efeitos adversos na maioria dos pacientes (Fahn, 1992). Estes incluem flutuações motoras, conhecidas como o fenômeno “on-off” da L-DOPA, discinesias ou movimentos involuntários e problemas psiquiátricos como delírios e alucinações (Koller e Hubble, 1990; Cederbaum, 1990; Obeso *et al.*, 2000). O tempo médio para o aparecimento destes efeitos adversos da L-DOPA é de aproximadamente 3 anos para os pacientes

com início precoce da doença e de 4 - 6 anos para os pacientes que desenvolvem a doença mais tardiamente (Kostic *et al.*, 1991). De acordo com um estudo feito por Calne e colaboradores (1994), verificou-se que, após 5 anos de tratamento com benserazida/L-DOPA, a incidência das flutuações motoras foi de 59% dos pacientes estudados e da discinesia foi de 41%.

Acredita-se que estas complicações resultem de uma redução progressiva da capacidade dos neurônios nigroestriatais de sintetizar e armazenar DA, formada a partir de precursores exógenos, associada a uma hipersensibilidade dos receptores DAérgicos estriatais. Entretanto, o mecanismo neural responsável pelo desenvolvimento destas complicações ainda não é completamente conhecido e representa o principal desafio para o tratamento sintomático da DP (Marsden, 1982; Spencer e Wooten, 1984). Contudo, existem evidências de que o aparecimento destes efeitos possa estar relacionado com a dose e a duração do tratamento com L-DOPA, sugerindo que uma prorrogação no início do tratamento e uma redução na dose da L-DOPA pode retardar o aparecimento destes sintomas (Marsden e Parkes, 1977; Montastruc *et al.*, 1994).

Outro fator a ser considerado quanto ao tratamento prolongado com L-DOPA consiste no fato de que a sua degradação gera radicais livres, os quais podem promover estresse oxidativo e acelerar o processo de degeneração neural da DP. Entretanto, não existem evidências definitivas de que a L-DOPA seja prejudicial na DP (Olanow, 1990; Fahn, 1996). Por outro lado, com a progressão da doença, ocorre o desenvolvimento de novos fatores que não respondem à L-DOPA, como instabilidade

postural, quedas freqüentes, congelamento ou indiferença, disfunções autonômicas e demência (Koller e Hubble, 1990).

Estas complicações clínicas decorrentes do uso prolongado de L-DOPA incentivaram o desenvolvimento de outros tratamentos farmacológicos sintomáticos para a DP. Dentre estes, estão incluídos os agonistas dos receptores da DA (bromocriptina, lisuride, pergolide, apomorfina); os anticolinérgicos (biperideno, triexifenidil); os bloqueadores da recaptção da DA (amantadina, anti-depressivos tricíclicos) e os inibidores das enzimas de degradação da DA (L-deprenil ou selegilina, tolcapone, entacapone).

Os agonistas DAérgicos atuam diretamente nos receptores DAérgicos D₁ e D₂ no estriado e, ao contrário da L-DOPA, não dependem de conversão metabólica para gerar um produto ativo que exerça seus efeitos farmacodinâmicos. Conseqüentemente, suas ações independem da degeneração dos neurônios nigroestriatais. Além disso, esta classe de drogas apresenta um efeito mais duradouro que a L-DOPA e uma menor propensão de desenvolver efeitos adversos (Olanow, 1992; Piccoli e Riuggeri, 1995; Uitti e Ahlskog, 1996).

Existem também evidências de que os agonistas DAérgicos são neuroprotetores em função da sua capacidade de diminuir a necessidade de L-DOPA e, conseqüentemente, de diminuir a formação de metabólitos oxidativos potencialmente tóxicos. Outra possibilidade pode ser a diminuição da taxa de renovação (“turnover”) de DA e da formação de radicais livres através da estimulação direta dos auto-receptores D₂ dos neurônios DAérgicos (Carter e Muller, 1991; Piercey *et al.*, 1996).

Contudo, o tratamento com os agonistas DAérgicos também apresentam algumas desvantagens, dentre as quais destacam-se: eficácia antiparkinsoniana limitada, aparecimento de efeitos colaterais (náuseas, vômitos, hipotensão postural e manifestações psiquiátricas), prevenção incompleta dos efeitos adversos induzidos pela L-DOPA e também não cessa a progressão da doença (Rajaput, 1997; Olanow e William, 1998).

Os antagonistas da acetilcolina têm sido empregados há mais de um século, antes do início da utilização da L-DOPA. Entretanto, em função de sua baixa eficácia, passaram a ser associados com a L-DOPA ou a outros agentes, como a selegilina ou agonistas DAérgicos (Lang, 1984). Nos GB existe um equilíbrio entre a neurotransmissão DAérgica e colinérgica. Portanto, na DP a redução de DA resulta em um estado de relativa sensibilidade colinérgica. Assim, agonistas colinérgicos podem exacerbar os sintomas da DP, enquanto os antagonistas deste sistema produzem uma melhora. Acredita-se que estas drogas atuem nos receptores localizados nos interneurônios colinérgicos do EST (Duvoisin, 1967; Koller, 1986; Olanow e William, 1998).

Os anticolinérgicos são utilizados principalmente para a diminuição do tremor, e em menor proporção, para a redução da rigidez, mas não apresentam muita utilidade para tratar a acinesia ou a instabilidade postural. Normalmente são recomendados para pacientes mais novos que apresentam o tremor como sintoma predominante, desde que as funções cognitivas estejam preservadas. Já para os pacientes mais idosos sem

tremor ou que apresentam demência, esta terapia é raramente indicada (Lang, 1984; Koller, 1986; Olanow e William, 1998).

Os principais efeitos colaterais dos antagonistas colinérgicos, os quais são capazes de limitar o seu uso, incluem o prejuízo da memória, confusão mental e alucinações, freqüentemente observados em pacientes idosos (Meneses e Teive, 1996). A discinesia também tem sido observada com este tratamento (Hauser e Olanow, 1993). Além disso, os efeitos colaterais periféricos incluem constipação, retenção urinária, diminuição da acomodação visual, boca seca, náusea e taquicardia (Silver e Ruggieri, 1998).

A amantadina foi produzida inicialmente como um agente antiviral, mas posteriormente também passou a ser empregada para o tratamento da DP (Schwab *et al.*, 1969; Lang, 1984). Apesar das incertezas quanto ao seu mecanismo de ação, sabe-se que esta droga pode aumentar a liberação ou bloquear a recaptção de DA, bem como estimular os receptores DAérgicos. Pode ainda apresentar propriedades anticolinérgicas periféricas (Bailey e Stone, 1975; Kulisevsky e Tolosa, 1990). Recentemente, tem sido sugerido que a amantadina é um antagonista glutamatérgico dos receptores N-metil-D-aspartado (NMDA). Desta forma, a amantadina poderia reduzir a hiperatividade da projeção glutamatérgica do NST sobre o GPi e diminuir os sintomas motores da DP (Kornhuber *et al.*, 1994).

A amantadina parece ser mais efetiva que os anticolinérgicos para aliviar os sintomas de acinesia e rigidez, mas menos efetiva sobre os tremores (Parkes *et al.*, 1974). Sua indicação é recomendada nos estágios iniciais da doença. Também pode ser

associada à L-DOPA em pacientes que apresentem flutuação dos sintomas. Os principais efeitos colaterais são alucinações, distúrbios do sono, letargia, bem como náuseas e vômitos (Lang, 1984).

Com relação aos inibidores da degradação de DA, sabe-se que este neurotransmissor é degradado pela ação enzimática da monoamino-oxidase (MAO), sendo que a MAO-B é a principal isoforma desta enzima presente no EST, bem como pela enzima catecol-O-metil-transferase (COMT) (Riederer e Youdim, 1986; Roberts *et al.*, 1994).

A selegilina (L-deprenil) é um inibidor seletivo da MAO B no SNC, sem interferir com a metabolização periférica da DA. A inibição seletiva da MAO B resulta em elevação dos níveis de DA, sem interferir com a degradação da NA, a qual é realizada pela enzima MAO A (Riederer e Youdim, 1986). A selegilina também tem sido estudada em função de sua ação neuroprotetora de prevenir ou diminuir a progressão da DP. Portanto, não se sabe ao certo se os efeitos benéficos desta droga resultam do aumento da neurotransmissão DAérgica ou da diminuição de radicais livres (Tatton e Greenwood, 1991; Shulzer *et al.*, 1992). Contudo, esta propriedade neuroprotetora da selegilina ainda é controversa (Hagan *et al.*, 1997).

Apesar disto, tem sido demonstrado clinicamente que a selegilina produz uma certa melhora nos sintomas dos pacientes parkinsonianos (Shulzer *et al.*, 1992). Além disso, ela retarda o aparecimento das alterações motoras decorrentes do tratamento com L-DOPA nos estágios iniciais da doença, pois atua de maneira sinérgica quando em combinação com a L-DOPA, reduzindo a dose diária da mesma. Entretanto,

quando as doses desta combinação não são ajustadas adequadamente, os efeitos colaterais da L-DOPA podem ser potencializados (Elizan *et al.*, 1991).

Os inibidores da COMT, como o tolcapone e entacapone, também são usados em combinação com a L-DOPA para o tratamento da DP. Eles exercem seus efeitos terapêuticos através da inibição periférica do catabolismo da L-DOPA, pelo bloqueio da COMT. Conseqüentemente, ocorre um aumento na disponibilidade e na transferência de L-DOPA para o SNC (Routtinen e Rinne, 1996; Olanow e William, 1998). Logo, a administração combinada de inibidores da COMT e L-DOPA pode prolongar o efeito terapêutico da L-DOPA (Roberts, *et al.*, 1994; Kaakola *et al.*, 1994). Vale lembrar que ainda não se sabe se existem vantagens sobre o tratamento da DP com esta combinação por períodos mais prolongados (Bracco, 1996). Normalmente, esta classe de drogas é bem tolerada e facilmente administrada. O efeito adverso mais comum dos inibidores da COMT é a discinesia, a qual representa um reflexo do aumento da atividade DAérgica no SNC. Mas este é um problema que pode ser facilmente contornado com a redução da dose de L-DOPA (Olanow e William, 1998).

Em geral, todas estas substâncias representam estratégias alternativas para o tratamento dos sintomas da DP. Mas como pode ser visto, normalmente são usadas em combinação com a L-DOPA com o intuito de diminuir sua dose diária, prorrogar o desenvolvimento das complicações associadas ao tratamento crônico com L-DOPA e, conseqüentemente, prolongar a duração da resposta induzida pela mesma (Lees, 1990; Meneses e Teive, 1996).

Estudos mais recentes, baseados na interação entre os sistemas DAérgico e adenosinérgico descritos no item 1.7, têm evidenciado o uso de antagonistas dos receptores da adenosina também como terapia adjuvante da L-DOPA ou de agonistas DAérgicos, para aliviar os sintomas motores da DP. Estes dados propõem mais uma estratégia para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento sintomático desta doença (Fredholm *et al.*, 1983; Fuxe *et al.*, 1998; Casas *et al.*, 1999).

1.10 – OUTROS TRATAMENTOS USADOS NA DOENÇA DE PARKINSON

Em alguns casos em que os pacientes não respondem mais à farmacoterapia, o tratamento neurocirúrgico, como a talamotomia ou palidotomia, devem ser considerados (Tasker, 1990; Dunnett e Björklund, 1999). Outra técnica neurocirúrgica utilizada é a estimulação cerebral crônica, aplicada no tálamo, GP ou NST, com a vantagem de ser uma técnica reversível, caso ocorram manifestações adversas (Benabid *et al.*, 1993; Pollak *et al.*, 1997).

Para pacientes parkinsonianos gravemente deprimidos que não apresentam melhora com o tratamento farmacológico ou que não toleram os agentes anti-depressivos, devido aos seus efeitos colaterais, a eletroconvulsoterapia pode ser indicada (Faber e Trimble, 1991).

Outras estratégias de tratamento da DP incluem as terapias neuroprotetoras, as quais visam preservar os neurônios nigroestriatais remanescentes, através de meios farmacológicos (antioxidantes, fatores de crescimento neurais) ou substituir os

neurônios que sucumbiram ao processo degenerativo da doença, através de implantes com neurônios DAérgicos embrionários. Além disso, o uso da terapia gênica para a reposição dos níveis estriatais de DA, ou para o bloqueio do processo degenerativo ou ainda para a regeneração e recuperação funcional do sistema nigroestriatal afetado na DP, também representa uma estratégia neuroprotetora utilizada na DP. Entretanto, os progressos nesta área são imprecisos e requerem ainda mais estudos para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no processo degenerativo da DP (Dunnett e Björklund, 1999).

1.11 - LESÕES NIGROESTRIATAIS INDUZIDAS POR MPTP: UM MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON

Um importante avanço nas pesquisas da DP foi a introdução de modelos animais. Em 1976, um evento casual, além de dar uma nova luz sobre a possível etiologia da DP, também favoreceu o desenvolvimento de um modelo animal para o estudo da DP. Neste ano, na Califórnia, um grupo de jovens dependentes de drogas desenvolveu subitamente os sinais e sintomas da DP, alguns dias após o uso de uma heroína sintética, contendo na sua fórmula o contaminante 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). Quando o MPTP foi injetado em animais de laboratório, estes também desenvolveram alterações similares. Portanto, a descoberta de que o MPTP, quando auto-administrado acidentalmente por humanos ou quando injetado experimentalmente em animais, pode induzir efeitos semelhantes aos sintomas observados na DP, incentivou consideravelmente o estudo dos mecanismos envolvidos nos seus efeitos neurotóxicos e sua relação com a DP. Além disso, auxiliou na

compreensão da patofisiologia da doença, bem como na busca de novos tratamentos (Davis *et al.*, 1979; Langston *et al.*, 1983).

O MPTP é uma impureza formada a partir da síntese de 1-metil-4-fenil-4-propionoxipiperidina (MPPP), um potente analgésico derivado da meperidina. Apresenta efeito neurotóxico, destruindo seletivamente os neurônios DAérgicos da SNc, reduzindo a concentração de DA estriatal (Davis *et al.*, 1979; Langston *et al.*, 1983). O mecanismo da neurotoxicidade induzida pelo MPTP envolve sua conversão no íon 1-metil-4-fenil piperidínio (MPP^+) pela ação da enzima MAO-B, presente na glia. O MPP^+ é então captado pelo sistema de transporte da DA dos terminais DAérgicos nigroestriatais onde se acumula nas mitocôndrias. Como consequência, ocorre uma interrupção no processo de fosforilação oxidativa por inibição do complexo-I da cadeia respiratória, acarretando uma redução na produção de ATP, formação de radicais livres, alteração na homeostasia do cálcio, levando à morte celular (Langston *et al.*, 1984; Gerlach *et al.*, 1991).

Apesar de algumas diferenças entre a síndrome parkinsoniana induzida pelo MPTP e a DP idiopática em humanos, este modelo é considerado o mais apropriado para o estudo da DP (Gerlach *et al.*, 1991). O uso do MPTP como modelo animal da DP tem sido realizado principalmente com macacos, espécie na qual ocorre a reprodução de praticamente todas as alterações comportamentais, cognitivas, bioquímicas e histológicas clássicas da doença (Langston *et al.*, 1984; Bezard *et al.*, 1997). Por outro lado, o tratamento com MPTP em ratos e camundongos também tem demonstrado a perda de células DAérgicas na SNc e redução dos níveis estriatais de DA e seus metabólitos, apesar destes serem menos sensíveis à toxicidade do MPTP.

Entretanto, os roedores não reproduzem todos os sintomas característicos da doença, como os macacos (Heikkila e Sonsalla, 1987; Heikkila *et al.*, 1989).

A diferença na suscetibilidade aos efeitos neurotóxicos do MPTP entre as espécies animais não é totalmente compreendida. Contudo, alguns estudos afirmam que diferenças no metabolismo do MPTP (Johannssen *et al.*, 1985) e na retenção ou distribuição do seu metabólito, MPP⁺ (Langston, 1985), podem ser fatores que contribuam para a explicação da variabilidade entre as espécies. Existem também especulações a respeito da concentração cerebral de melanina (D'Amato *et al.*, 1986), da atividade da enzima MAO-B nos capilares cerebrais (Kalaria e Harik, 1987), de variações na diferenciação e localização da MAO (Riederer e Youdim, 1987), de diferenças na taxa de renovação da DA e da concentração de antioxidantes no estriado (Brücke e Riederer, 1986). Alguns destes fatores podem também contribuir para uma maior ou menor suscetibilidade aos efeitos neurotóxicos do MPTP, mas nenhum isoladamente constitui uma explicação adequada.

O fato dos roedores, mais especificamente os ratos, serem menos sensíveis à neurotoxicidade do MPTP, e não reproduzirem todos os sintomas da DP, não descarta a utilização desta espécie em modelos animais da DP. Neste sentido, Carlton (1978) descreveu que a utilização de um modelo animal, para melhor compreensão de uma determinada doença, não depende de uma reprodução completa de todos os seus sintomas em uma menor proporção, sugerindo assim, a possibilidade de se usar um modelo que enfatize pelo menos um dos sintomas em particular. Além disso, o fato da necessidade de um número significativo de animais para estudos farmacológicos faz com que os roedores sejam também uma espécie apropriada para ser usada como modelo animal da DP.

2 - OBJETIVOS

Diante das evidências sobre as alterações cognitivas da DP e sobre os efeitos neurotóxicos do MPTP em roedores, reproduzindo os aspectos histológicos e neuroquímicos da DP, bem como, diante da necessidade de um número elevado de animais em estudos farmacológicos, o objetivo inicial do presente estudo foi propor um modelo animal de amnésia associada à DP, usando para tal ratos lesados na SNc com MPTP e avaliados na tarefa de esquiva ativa de duas vias.

Em seguida, com base nas descrições de que a amnésia associada à DP é decorrente de uma disfunção do sistema DAérgico nigroestriatal e no conhecimento de que o tratamento farmacológico dos sintomas motores desta doença consiste principalmente na administração de L-DOPA, associada a um inibidor da dopa-descarboxilase, este estudo também fez uma avaliação dos efeitos comportamentais e neuroquímicos do tratamento com a associação de L-DOPA e benserazida em ratos lesados com MPTP e submetidos ao teste de esquiva ativa de duas vias.

Finalmente, considerando a interação antagônica entre os sistemas DAérgico e adenosinérgico no estriado como um possível alvo para o tratamento dos sintomas motores da DP, investigou-se a possibilidade de se reverter os prejuízos cognitivos da lesão induzida pelo MPTP com um antagonista dos receptores da adenosina. Para tal, o presente estudo avaliou os efeitos de diferentes doses de cafeína, antagonista adenosinérgico não-seletivo, em nosso modelo animal de amnésia na DP.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 250-300 g no início dos experimentos, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Os animais foram alojados em grupos compostos de 5 animais por gaiola, mantidos em condições controladas de umidade e temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12 horas (7:00 - 19:00 h), e com livre acesso à água e à comida. Todos os procedimentos cirúrgicos e avaliações comportamentais utilizados foram conduzidos cuidadosamente de acordo com as normas previstas para o uso de animais em estudos experimentais.

3.2 - DROGAS

MPTP (Sigma Chemical Co., USA), dissolvido em solução salina (NaCl 0.9%) na concentração de $1\mu\text{mol}/2.1\mu\text{l}$.

Benserazida (Sigma Chemical Co., USA), dissolvida em solução salina e administrada na dose de 50 mg/kg.

L-DOPA (Sigma Chemical Co., USA), dissolvida em uma solução de Alkamus 20% (Rhône-Poulenc, USA) e administrada na dose de 200mg/kg.

Cafeína (RBI, USA), dissolvida em solução salina e administrada nas doses de 0.1, 0.3 e 1.0 mg/kg.

As soluções controle utilizadas foram salina 0.9% ou Alkamus 20%.

O MPTP foi infundido bilateralmente na SNc através de cirurgia estereotáxica. As demais drogas foram administradas por via intraperitoneal (i.p.) em volumes fixos de 0.1 ml/100 g, exceto a L-DOPA cujo volume foi de 0.2 ml/100 g. As doses das drogas utilizadas foram escolhidas com base em dados da literatura (Harik *et al.*, 1987; Menzaghi *et al.*, 1997; Angelucci *et al.*, 1999)

3.3 - EQUIPAMENTOS E PROCEDIMENTOS

3.3.1 - Cirurgia Estereotáxica e Microinfusão de MPTP

Os animais submetidos à cirurgia estereotáxica foram inicialmente anestesiados com tiopental sódico (40 mg/kg, i.p.), seguido pela administração de sulfato de atropina (0.4 mg/kg, i.p) e penicilina G-procaína (20.000 U/ 0.05 ml, i.m.). Em seguida, os animais foram colocados em um estereotáxico (David Kopf, modelo 957L) e receberam a microinfusão bilateral de MPTP-HCl (RBI, 1 μ mol em 2.1 μ l de salina, 0.35 μ l/min) na SNc, usando as seguintes coordenadas: antero-posterior (AP) -5.0 mm a partir do bregma, médio-lateral (ML) \pm 2.1 mm a partir da linha média e dorso-ventral (DV) -7.7 mm a partir da calota craniana, segundo Paxinos e Watson (1986).

A microinfusão de MPTP foi realizada com o auxílio de uma agulha (30 gauge) conectada a um tubo de polietileno adaptado a uma micro-seringa de 10 μ l (Hamilton, USA) que, por sua vez, foi encaixada em uma bomba de infusão (Havard Apparatus, USA). Após o término da microinfusão de MPTP (6 min), a agulha foi mantida no local por mais 2 min para evitar refluxo. Retirada a agulha, o escalpo foi suturado. Os

animais controle falsamente operados (SHAM) foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, mas sem a microinfusão de MPTP.

Após a cirurgia, os animais foram colocados em gaiolas individuais com ambiente aquecido, para recuperação da anestesia e posteriormente encaminhados ao biotério para recuperação da cirurgia. Durante 5 dias consecutivos após a cirurgia, a dieta sólida (ração) de todos os animais (inclusive dos animais controle não operados) foi suprimida e eles receberam uma dieta líquida diária feita com leite em pó NAN-2 (40g) e açúcar (10g) dissolvidos em 200 ml de água. Em seguida, os animais voltaram a receber dieta sólida normal e foram re-agrupados (os mesmos 5 animais por gaiola), onde permaneceram por mais 16 dias no biotério, quando então foram submetidos aos experimentos comportamentais. Durante este período de recuperação, aproximadamente 40% dos animais do grupo MPTP e 5% dos animais do grupo SHAM morreram. Conseqüentemente, o número inicial de animais no grupo MPTP era sempre maior que nos grupos SHAM e controle.

Aproximadamente 30 dias após a cirurgia, cada animal foi sacrificado e seu cérebro removido. Uma parte dos cérebros de cada grupo foi usada para posterior análise histológica, com objetivo de definir a extensão da área lesada. Outra parte dos cérebros foi separada para dissecação de algumas estruturas cerebrais (córtex frontal, amígdala, estriado, núcleo accumbens e hipocampo) e posterior dosagem dos níveis de monoaminas e seus metabólitos. Foram considerados somente os dados dos animais que apresentaram confirmação da lesão através da histologia e/ou das dosagens neuroquímicas.

3.3.2 - Esquiva Ativa de Duas Vias

Para a realização dos experimentos comportamentais, foi efetuado o teste de esquiva ativa de duas vias, utilizando-se uma caixa automatizada (Gemini Avoidance System, San Diego Instruments, USA) revestida de acrílico de cor preta, com face frontal de acrílico transparente. A caixa de esquiva com 23 x 50 x 23 cm era dividida em 2 compartimentos iguais, os quais estavam separados por uma porta, que permaneceu aberta durante todo o experimento. As grades do assoalho eram formadas por uma série de barras de aço inoxidável, espaçadas de 15 em 15 mm. No teto havia uma campainha que emitia um som (estímulo condicionado - EC) de 1.5 kHz, 60 dB, durante 5 s, o qual foi subsequentemente pareado com choque nas patas (estímulo incondicionado - EI) de 0.5 mA, com duração máxima de 5 s ou até que o animal cruzasse para o compartimento oposto da caixa. O intervalo entre cada pareamento som/choque ou EC/EI foi aleatório, variando entre 10 e 50 s.

Neste procedimento de esquiva ativa de duas vias, o animal foi inicialmente treinado a mudar de compartimento na caixa (resposta condicionada ou, neste caso específico, comportamento de esquiva), para evitar uma punição, neste caso um choque nas patas (EI), o qual era liberado depois da apresentação de um EC. A resposta de cruzar de um compartimento a outro durante a liberação EC ou do EI interrompe ambos os estímulos, respectivamente.

Na sessão de treino, o animal era colocado na caixa de esquiva e após um período de habituação de 3 min, o animal era submetido a uma sessão de 30 pareamentos EC/EI. Após os primeiros 5 s de EC, era emitido o EI por até 5 s

(acompanhado do EC) ou até que o animal cruzasse para o outro lado da caixa. O número de esquivas ativas, a latência para cruzar para o compartimento oposto da caixa após o início do EC (latência de esquiva) ou após a apresentação do EI (latência de fuga) e o número de cruzamentos inter-provas (cruzamentos entre os 2 compartimentos nos intervalos de cada pareamento EC/EI), foram registrados automaticamente. Na sessão de teste, realizada 24 h depois do treino, o procedimento foi o mesmo, exceto que o tempo de habituação foi reduzido para 1 min.

O desempenho dos animais (número de esquivas) na sessão de treino foi tomado como medida de aquisição e o desempenho dos animais na sessão de teste, em comparação com o treino, foi tomado como medida de retenção. O número de cruzamentos inter-provas, o tempo de reação ao choque (considerado como a latência para fugir do mesmo nos 5 primeiros pareamentos na sessão de treino, exceto naqueles em que o animal fez uma esquiva ativa), bem como o tempo de reação ao estímulo sonoro (considerado como a latência média para desempenhar uma resposta de esquiva ativa na sessão de teste) foram usados para descartar a interferência de eventuais problemas sensorio-motores na execução desta tarefa comportamental.

3.3.3 - Análise Histológica

Para a realização da análise histológica da lesão induzida pela microinfusão de MPTP na SNc, os animais foram inicialmente anestesiados com uma superdosagem de tiopental (200 mg/kg, i.p.) e em seguida submetidos à perfusão intracardiaca com solução salina 0.9%, seguida de solução de formalina 10%. Posteriormente, os animais

foram decapitados para remoção dos cérebros, os quais foram fixados em solução de formalina 10% com sacarose 20%. Após fixação, os cérebros foram congelados e a seguir foram obtidos cortes frontais seriados, com 30 μm de espessura, utilizando-se um micrótomo de congelamento (Reicher-Young). Os cortes foram colhidos seqüencialmente em 5 compartimentos, de forma que a distância entre os cortes num mesmo compartimento era de 150 μm .

Uma destas séries de cortes foi submetida à coloração imunohistoquímica para tirosina hidroxilase (TH), usando um anticorpo monoclonal para TH proveniente de camundongos (1:5000, Incstar). O complexo antígeno/anti-corpo foi identificado usando um "kit" comercialmente disponível (ABC Elite Kit, Vector Laboratories). As lâminas foram então desidratadas e cobertas com DPX. Outra série de lâminas foi corada com tionina (coloração de Nissl) e serviu como referência para o estudo citoarquitetônico da região.

A área dos grupamentos DAérgicos mesencefálicos foi determinada a partir dos cortes corados pelo método da tionina, com uma câmara lúcida dirigida à tela plana no monitor Zenith (modelo 1492), usando-se o programa Auto-Cad (versão 12). Inicialmente, foi determinada a área total dos grupamentos DAérgicos nos animais controles, que foi comparada à área íntegra destes grupamentos nos animais tratados com MPTP.

Para ambos os grupos experimentais, as células imunoreativas à TH de cada grupamento DAérgico do mesencéfalo foram desenhadas e contadas, a partir de uma

série completa de cortes colhidos a um intervalo de 150 μm , usando-se um microscópio Nikon Optiphot-2 equipado com câmera lúcida.

3.3.4 - Determinação dos Níveis Cerebrais de Monoaminas

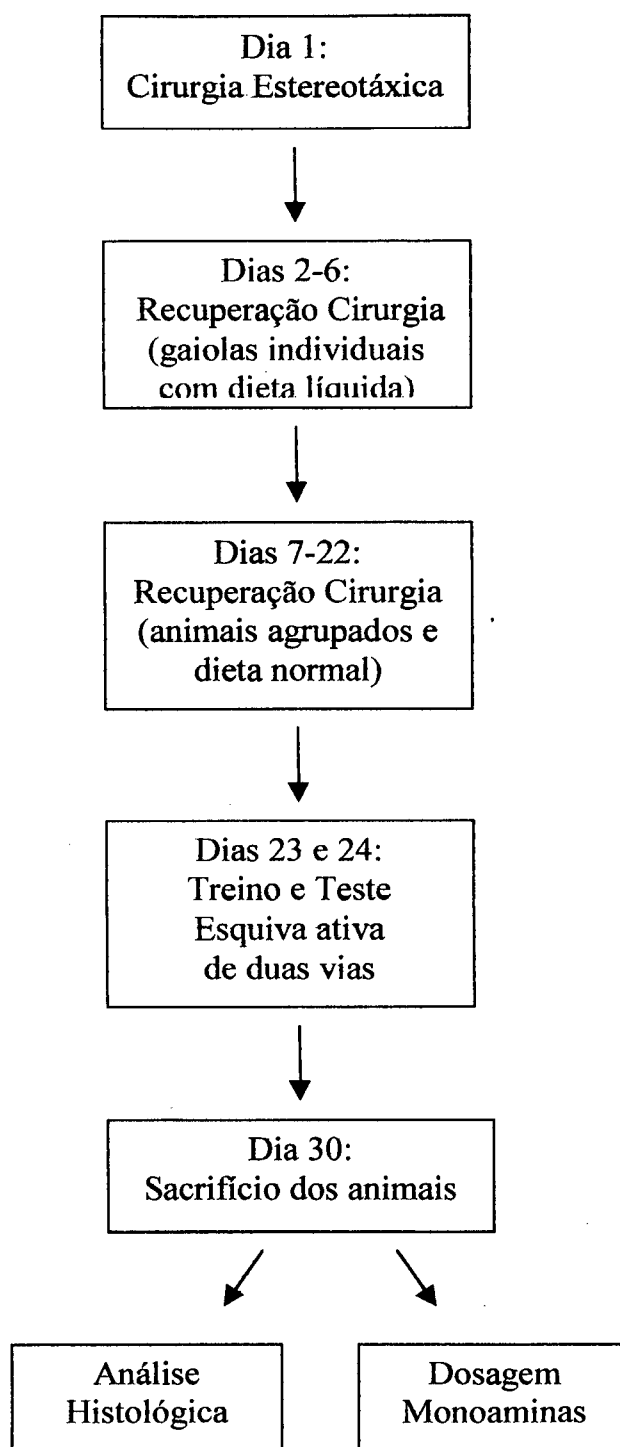
Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC)

Os níveis endógenos de dopamina (DA), noradrenalina (NA), serotonina (5-HT) e seus metabólitos ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA) e ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) foram dosados pela técnica de HPLC de fase reversa com detecção eletroquímica, descrita por Hallman e Jonsson (1984). Este sistema era composto por um aparelho de cromatografia líquida CLASS-LC10 (Shimadzu), com uma bomba de fluxo constante, uma coluna de fase reversa C18 (Shim-pack, CLC-ODS 150 x 1.6 mm, Shimadzu) e um detector eletroquímico (Shimadzu, L-ECD-6A). Foi utilizado um sistema isocrático (fluxo de 0.9 ml/min), com a fase móvel constituída de ácido cítrico (15.7g), água bi-destilada (471.5 ml), octil sulfato de sódio (78 mg), acetonitrila (20 ml) e tetrahydroflurano (10 ml). O pH foi ajustado para 3.0 com hidróxido de sódio (NaOH 12N). A sensibilidade do detector foi de 2 nA e seu potencial de oxidação foi mantido em +0.85 V no eletrodo de trabalho. Este sistema cromatográfico foi ainda acoplado a um programa de computador que fornecia os cromatogramas, possibilitando a identificação das amostras pela comparação dos seus tempos de retenção, com os tempos de retenção dos padrões.

Para este fim, os animais foram individualmente sacrificados por decapitação e seus cérebros removidos para dissecação das seguintes estruturas: estriado (EST), córtex frontal (CX), amígdala (AMI), hipocampo (HIP) e núcleo accumbens (NAc). Todos os procedimentos de dissecação foram conduzidos rapidamente em uma placa sobre gelo seco. As amostras cerebrais obtidas foram pesadas e em seguida armazenadas em freezer -70°C até a determinação dos níveis de monoaminas. Os demais procedimentos de manuseio e preparação das amostras foram conduzidos em banho de gelo-água (4°C). As amostras foram homogeneizadas em ácido perclórico 0.2M e centrifugadas (12000 g, 15 min), sendo o sobrenadante (20 μl) utilizado para análise.

O aparelho de HPLC foi inicialmente estabilizado com a fase móvel através do sistema cromatográfico por aproximadamente 2 h. Em seguida, foram injetados os padrões individuais para DA, NA, 5-HT, DOPAC, HVA e 5-HIAA. Na seqüência, foram injetadas as amostras cerebrais em estudo de maneira intercalada. A área sob a curva dos padrões foi usada para quantificar as amostras. Os valores obtidos foram expressos em ng/g de tecido úmido (Hallman e Jonsson, 1984).

3.3.5 - Representação Esquemática do Protocolo Experimental Utilizado



3.4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise histológica da lesão induzida pela microinfusão de MPTP foi feita comparando-se a extensão de células DAérgicas ou, o número de células imunoreativas à TH, entre os animais controle e lesados com MPTP, utilizando-se do teste “t” de Student. A correlação entre o percentual de lesão induzida pela microinfusão de MPTP e os escores de esQUIVA foi calculado por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. As diferenças nos níveis estriatais de monoaminas, após a lesão com MPTP, foram analisadas pelo teste “t” de Student (comparações entre duas amostras – controles e lesados). As diferenças entre níveis de monoaminas cerebrais após a lesão e o tratamento com L-DOPA foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) de 2 vias, seguida pelo teste de Duncan. Os resultados comportamentais foram analisados inicialmente através da ANOVA, adequada ao protocolo experimental, com exceção da análise dos escores de esQUIVA após tratamento com cafeína, a qual foi feita por uma análise de covariância (ANCOVA) de 3 vias, utilizando o número de cruzamentos inter-provas como covariável. Posteriormente, os grupos passaram a ser comparados entre si através do teste de Duncan.

Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (e.p.m.) e a probabilidade aceita como indicativa da existência de diferenças estatisticamente significativas foi $P \leq 0.05$.

4 - RESULTADOS

4.1- EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA MICROINFUSÃO DE 1 μ MOL DE MPTP NA SNC DE RATOS SUBMETIDOS À TAREFA DE ESQUIVA ATIVA DE DUAS VIAS

Neste experimento foram utilizados 40 animais, divididos em 3 grupos:

Grupo 1- controle (16 animais não operados);

Grupo 2- SHAM (16 animais falsamente operados);

Grupo 3- MPTP (8 animais lesados).

Aproximadamente 21 dias após a cirurgia, todos os animais foram submetidos ao teste de esQUIVA ativa de duas vias, conforme metodologia descrita anteriormente. Após 1 semana do teste comportamental, os animais foram sacrificados para o controle histológico da lesão. Dois grupos adicionais de 8 animais controle e 8 animais lesados com MPTP foram usados para dosagem dos níveis estriatais de monoaminas e metabólitos, aproximadamente 30 dias após a cirurgia.

4.1.1 - Análise Histológica da Lesão Induzida pela Microinfusão de 1 μ mol de MPTP na SNC de Ratos

Como já descrito, as análises histológicas da lesão induzida pelo MPTP na SNC foram realizadas através da coloração de Nissl e da técnica de imunohistoquímica para TH. Os resultados obtidos estão demonstrados nas Figuras 3 e 4, as quais ilustram um caso representativo de cada grupo de animais, e nas Tabelas 1 e 2.

A partir da comparação da área dos grupamentos DAérgicos entre os animais controle e lesados com MPTP, bem como da contagem do número de células DAérgicas mesencefálicas de ambos os grupos, verificou-se que o tratamento com MPTP produziu uma perda neuronal significativa na SNc e uma redução nas células imunoreativas à TH ($t = 2.30$, $P \leq 0.05$), afetando muito pouco a área tegmental ventral ($t = 1.69$, $P > 0.2$) (Fig. 3 e Tabelas 1 e 2). Matematicamente, estes parâmetros descritos indicam uma lesão da SNc que inclui $57 \pm 6\%$ do lado direito e $67 \pm 7\%$ do lado esquerdo do cérebro. A lesão induzida pela administração de MPTP também afetou, em menor extensão, a área tegmental ventral (VTA), com uma perda neuronal de $17 \pm 8\%$ do lado direito e $40 \pm 8\%$ do lado esquerdo do cérebro. Contudo, não houve diferença significativa no tamanho da lesão observada entre os lados direito e esquerdo (SNc: $t = -0.64$, $P > 0.2$; VTA: $t = -1.73$, $P = 0.1$, teste t de Student).

A Fig. 4 ilustra um caso representativo do grupo SHAM, corado pela técnica de Nissl, evidenciando a integridade das células DAérgicas mesencefálicas similar àquela observada nos animais controle.

Tabela 1: Percentual de lesão das células DAérgicas mesencefálicas, induzida pela microinfusão de 1 μ mol de MPTP na SNc de ratos.

	% LESÃO	CORRELAÇÃO ¹
SNc (direito)	57 \pm 6	- 0.53
SNc (esquerdo)	67 \pm 7	- 0.63
VTA (direito)	17 \pm 8	- 0.26
VTA (esquerdo)	40 \pm 8	-0.22

O percentual de lesão das células DAérgicas mesencefálicas foi obtido através da comparação da área total dos grupamentos DAérgicos entre os animais controle e lesados com MPTP. Os valores representam a média \pm e.p.m.. SNc = substância negra compacta; VTA = área tegmental ventral. ¹Correlação entre o percentual de lesão e os escores de esquivas na sessão de treino da tarefa de esquiva ativa de duas vias.

Tabela 2: Média do número de células imunoreativas à TH nos grupamentos DAérgicos mesencefálicos dos animais controle e lesados com MPTP.

	Controle	MPTP
SNc (A9)	4378.7 \pm 247.9	1875.9 \pm 1057.4 *
VTA (A10)	3692.4 \pm 154.2	2746.2 \pm 538.4

Os valores representam a média \pm e.p.m.. SNc = substância negra compacta; VTA = área tegmental ventral. * $P \leq 0.05$, comparado ao grupo controle, teste t de Student.

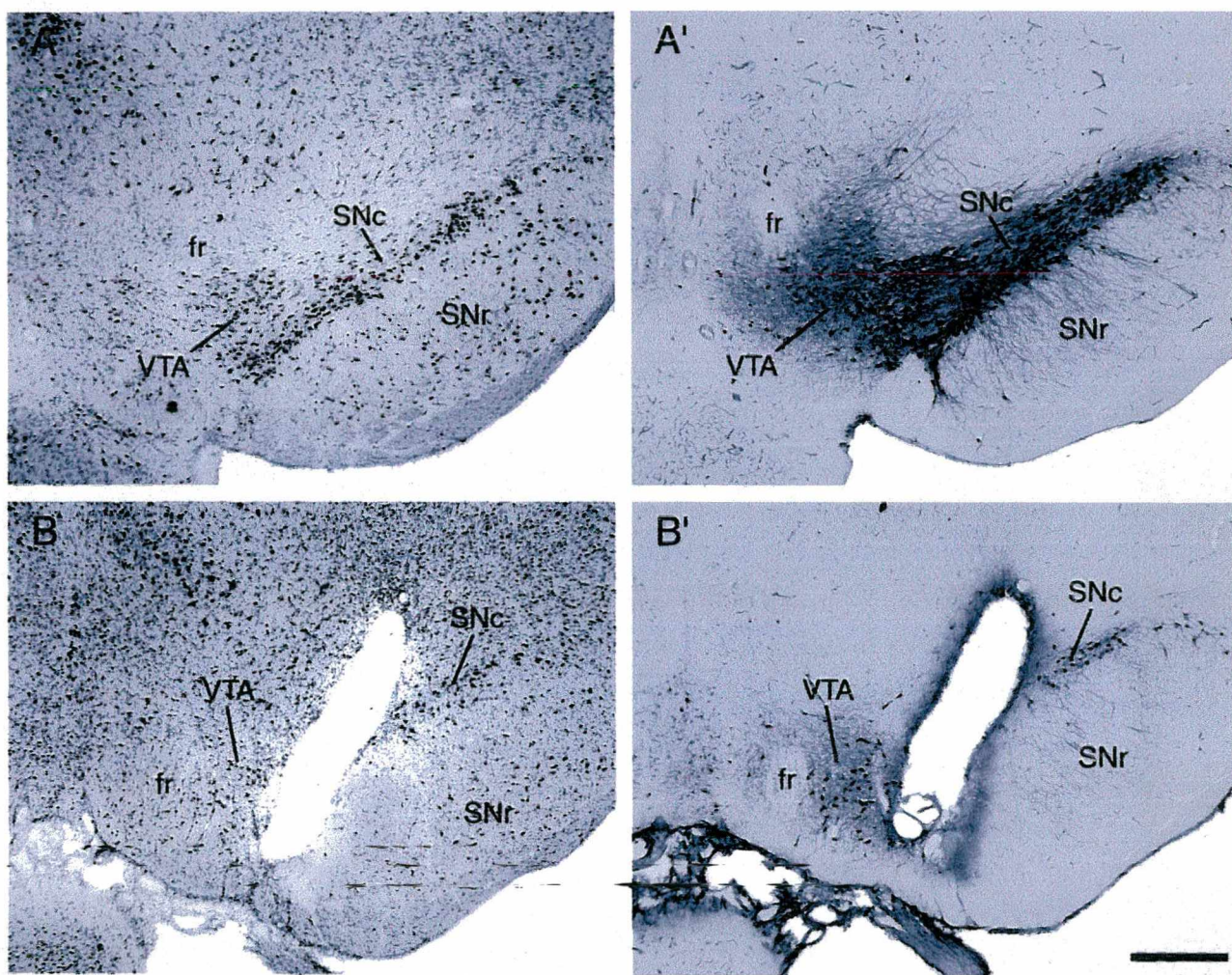


Figura 3: Fotomicrografia ilustrativa das sessões cerebrais submetidas à análise histológica pelas técnicas de Nissl (lado esquerdo) e de TH (lado direito) dos animais controle (A e A') e MPTP (B e B'). SNc = substância negra compacta; SNr = substância negra reticulada; VTA = área tegmental ventral.

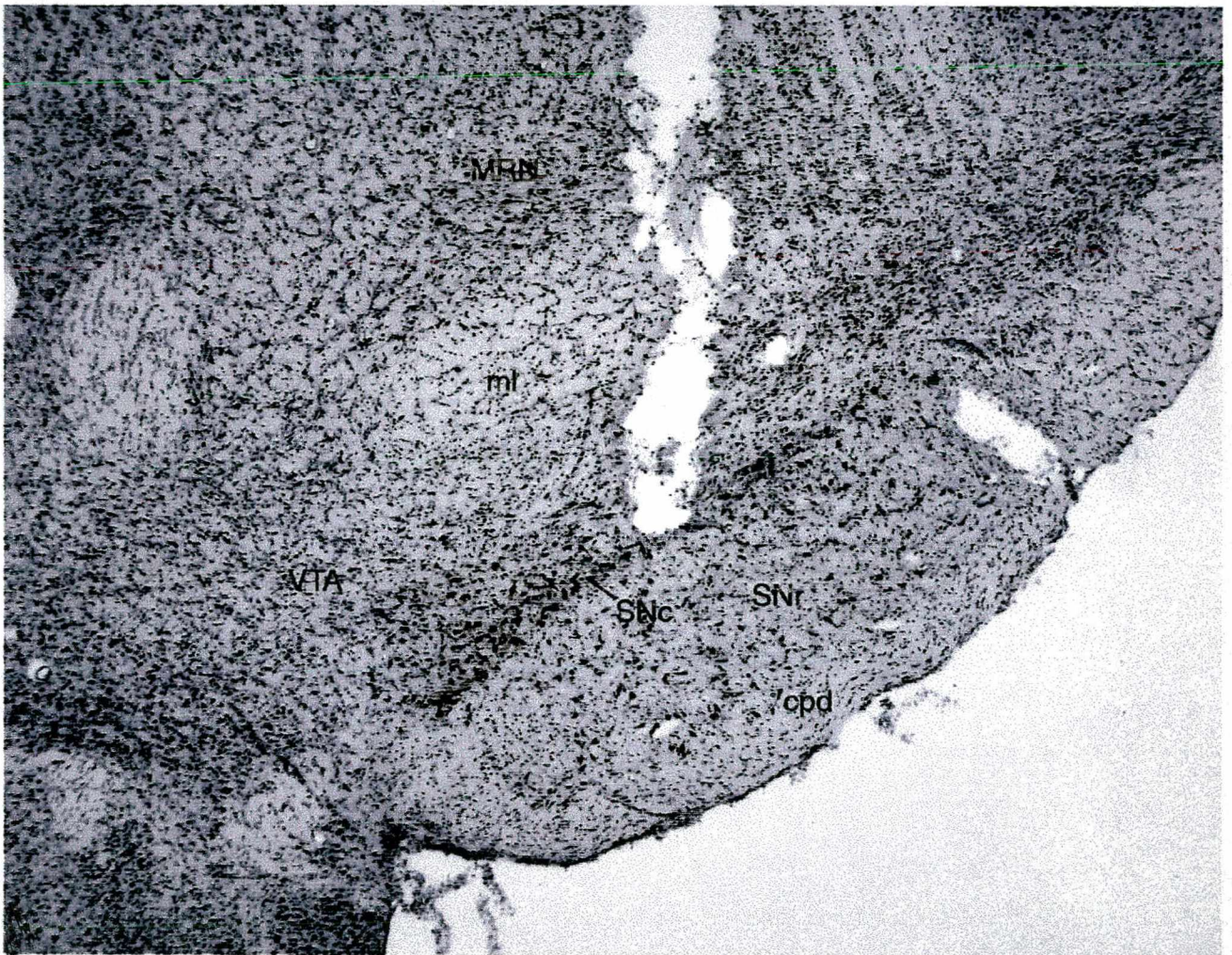
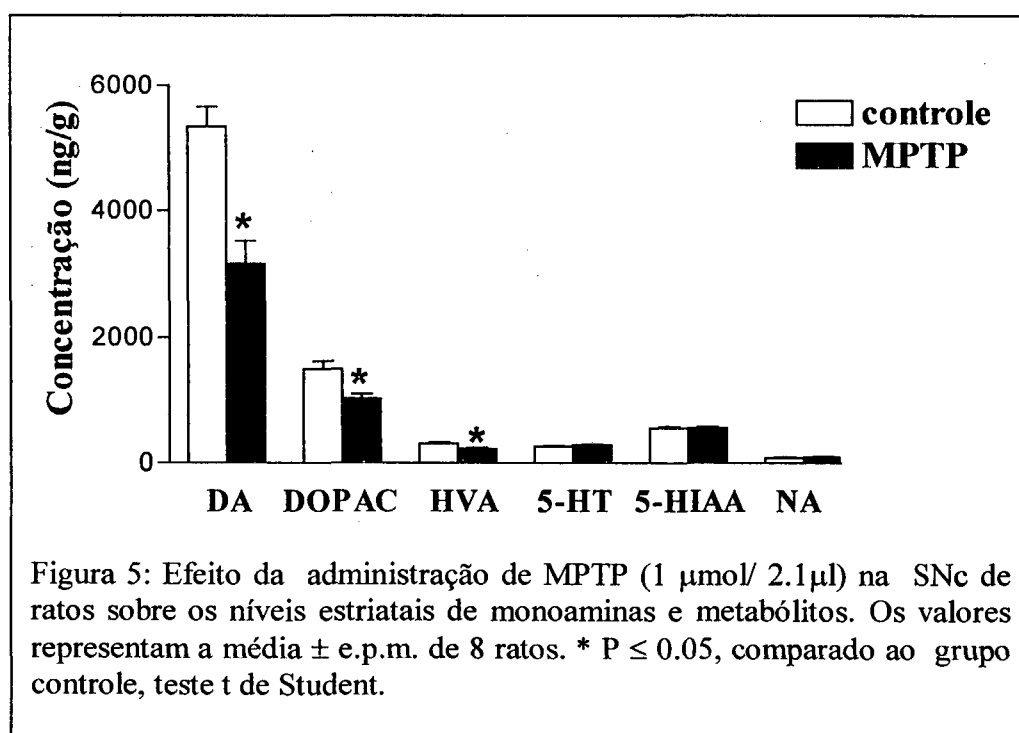


Figura 4: Fotomicrografia ilustrativa de uma sessão cerebral submetida à análise histológica pela técnica de Nissl dos animais SHAM. SNc = substância negra compacta; SNr = substância negra reticulada; VTA = área tegmental ventral.

4.1.2 - Análise Neuroquímica da Lesão Induzida pela Microinfusão de 1 μ mol de MPTP na SNc de Ratos

Os efeitos do MPTP sobre os níveis estriatais de monoaminas e metabólitos, dosados pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica, estão ilustrados na Fig.5. Os resultados analisados pelo teste t de Student demonstraram que o MPTP causou uma redução significativa em torno de 41% nos níveis de DA ($t = 4,45$; $P \leq 0,001$), 31% nos níveis de DOPAC ($t = 3,08$; $P \leq 0,01$) e 26% nos níveis de HVA ($t = 2,57$; $P \leq 0,05$) em comparação com os animais controle. Por outro lado, a lesão não alterou os níveis estriatais de 5-HT, 5-HIAA ou NA ($P > 0,1$).



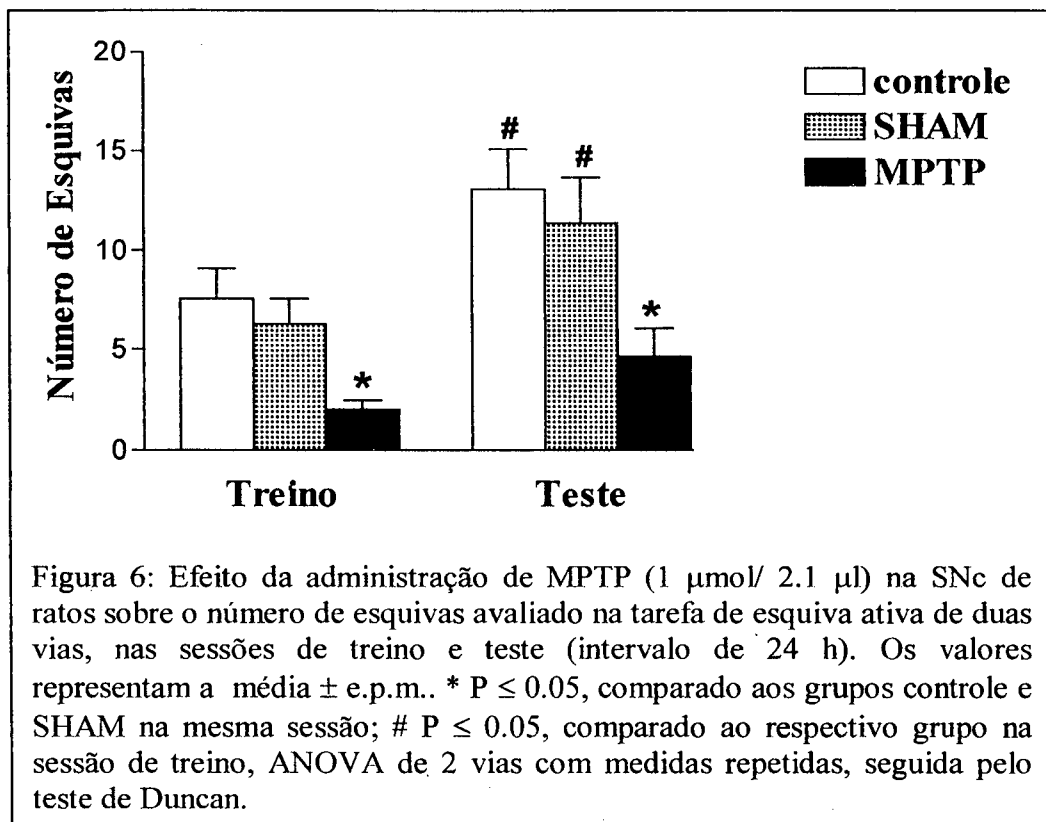
4.1.3 – Efeitos Comportamentais Decorrentes da Lesão na SNc Induzida pelo MPTP em Ratos Submetidos à Tarefa de Esquiva Ativa de Duas Vias

O desempenho dos animais na tarefa de esquiva ativa de duas vias, avaliado através dos escores de esquivas, está representado na Fig. 6. A análise estatística efetuada pela ANOVA de 2 vias com medidas repetidas (sessões treino e teste) revelou diferença significativa entre os grupos ($F_{(2,37)} = 3,66$; $P \leq 0,05$) e entre as sessões ($F_{(1,37)} = 17,68$; $P \leq 0,01$). Na seqüência, os resultados foram analisados através do teste de Duncan, que demonstrou um aumento significativo nos escores de esquivas dos grupos controle e SHAM na sessão teste em comparação com a sessão treino ($P \leq 0,01$). O mesmo resultado não foi observado no grupo MPTP ($P = 0,15$). Esta análise também mostrou que, na sessão treino, os ratos lesados com MPTP apresentaram redução nos escores de esquivas em comparação aos grupos controle ($P \leq 0,01$) e SHAM ($P \leq 0,05$).

Este padrão de redução da resposta do grupo MPTP, em relação aos grupos controle e SHAM, repetiu-se na sessão de teste ($P \leq 0,001$). Além disso, foi verificado que o fator interação entre as sessões e os tratamentos não foi estatisticamente significativo ($F_{(2,37)} = 0,59$; $P = 0,55$), indicando que o desempenho prejudicado dos animais lesados na sessão treino não influenciou o seu desempenho na sessão teste.

Estes dados demonstram que a lesão induzida pelo MPTP prejudicou tanto a aquisição quanto a retenção desta tarefa comportamental. Vale ressaltar ainda que a redução nos escores de esquivas do grupo MPTP apresentou uma melhor correlação

com a lesão do lado esquerdo da SNc ($P = 0,06$) e não foi correlacionada com a lesão observada na VTA (Tabela 1).

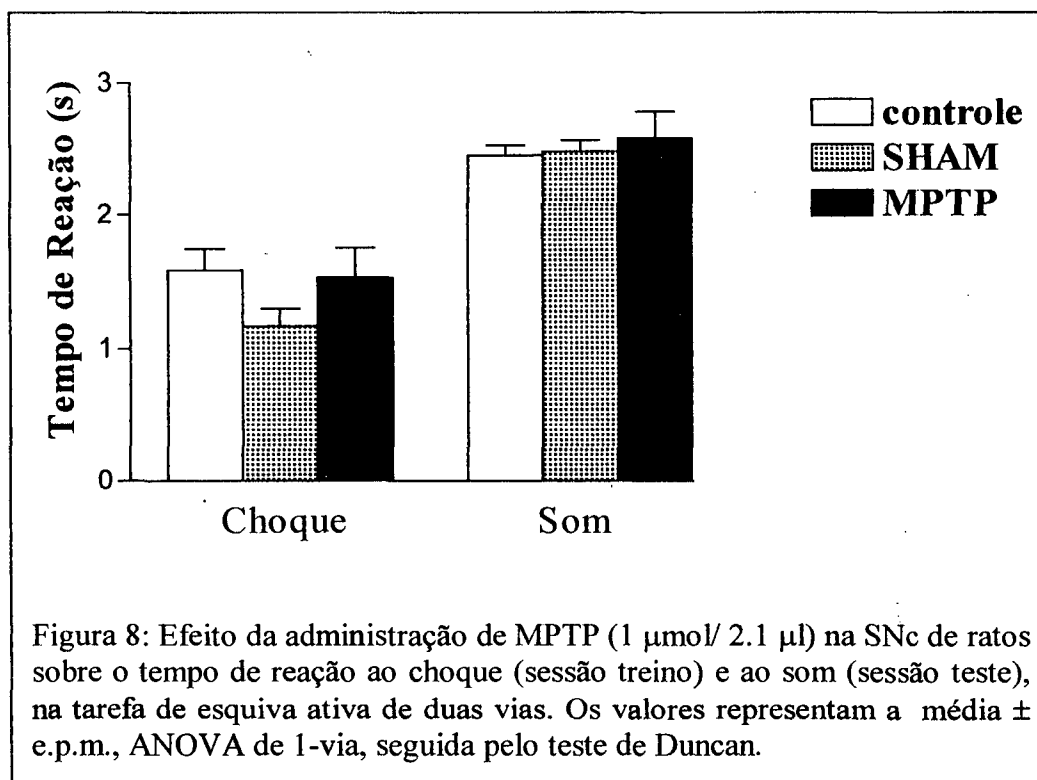
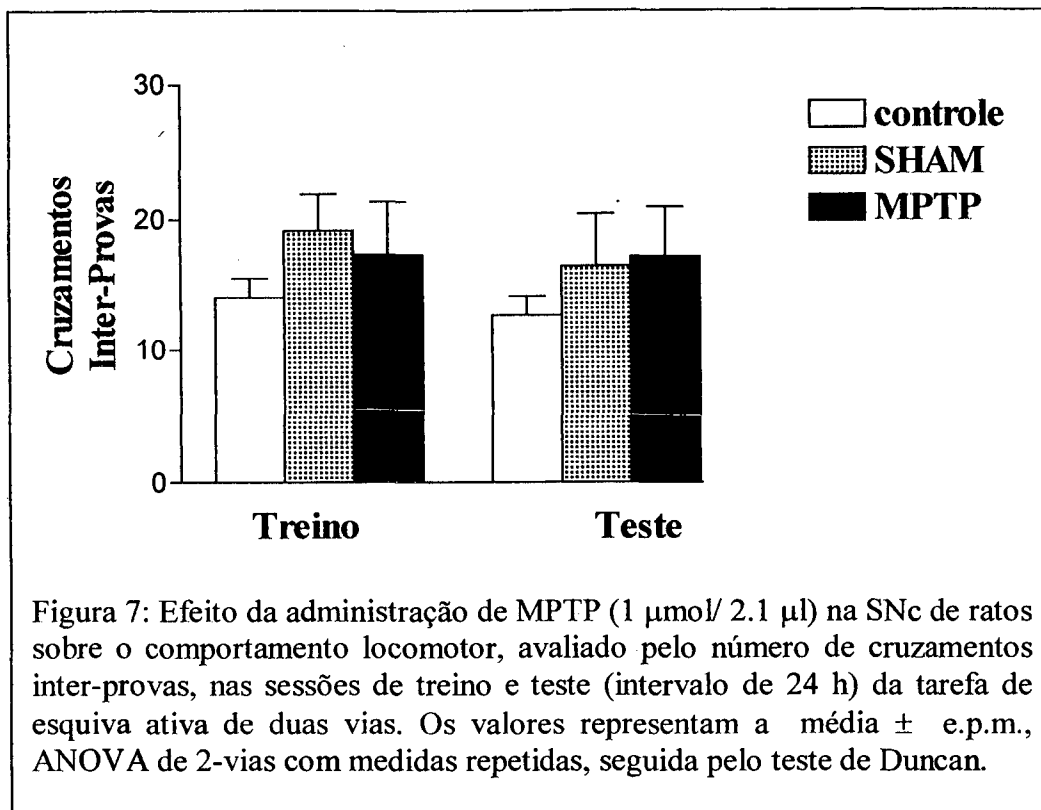


Entretanto, o desempenho dos ratos lesados com MPTP na tarefa de esquiva ativa pode ter sido prejudicado em função de algum problema motor ou sensorial necessário para a execução das respostas de esquiva. Para descartar a influência destes problemas neste estudo, o número de cruzamentos inter-provas foi utilizado como índice de locomoção dos animais (Fig. 7), e o tempo de reação ao som e ao choque foi utilizado como medida de sensibilidade dos animais a estes estímulos (Fig. 8).

Apesar de se saber que lesões nigroestriatais podem induzir hipoatividade, a análise estatística feita pela ANOVA de 1 via não demonstrou nenhuma diferença

significativa entre os grupos com relação ao número de cruzamentos inter-provas, tanto na sessão treino ($F_{(2,38)} = 1,16$; $P \geq 0,2$) quanto na sessão teste ($F_{(2,38)} = 0,58$; $P \geq 0,2$), Fig. 7. Adicionalmente, de acordo com os dados apresentados na Fig. 8, também não houve diferença significativa entre os grupos com relação às latências de esquiva (tempo de reação ao som) ($F_{(2,417)} = 0,15$; $P \geq 0,2$) e de fuga do choque (tempo de reação ao choque) ($F_{(2,125)} = 1,83$; $P = 0,16$). A partir destes dados, pode-se sugerir que o prejuízo cognitivo dos ratos lesados com MPTP na tarefa de esquiva ativa não foi decorrente de problemas motores ou sensoriais.

Em suma, baseado nas características histológicas, neuroquímicas e comportamentais dos ratos lesados com MPTP, parece que o uso destes animais submetidos à tarefa de esquiva ativa de duas vias pode constituir um modelo de déficit cognitivo associado à DP.



4.2 - EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM BENSERAZIDA/L-DOPA EM RATOS COM LESÃO DA SNc INDUZIDA PELO MPTP E SUBMETIDOS À TAREFA DE ESQUIVA ATIVA DE DUAS VIAS

Neste protocolo experimental foram utilizados 47 ratos, sendo 24 animais controle e 23 lesados com MPTP. Posteriormente, os animais de ambos os grupos foram divididos conforme o tratamento: veículo ou benserazida/L-DOPA (denominado a partir de agora somente como L-DOPA). Portanto, foram formados os seguintes subgrupos:

Grupo 1- controle/veículo (12 animais);

Grupo 2- controle/L-DOPA (12 animais);

Grupo 3- MPTP/veículo (11 animais);

Grupo 4- MPTP/L-DOPA (12 animais).

Os tratamentos com benserazida (50 mg/kg, i.p.) e L-DOPA (200 mg/kg, i.p.) ou seus veículos foram administrados 45 e 30 minutos antes da sessão treino, respectivamente. Conforme procedimento descrito, 1 semana após a tarefa de esquiava ativa de duas vias, 8 animais de cada grupo receberam o mesmo esquema de tratamento com veículo ou L-DOPA e foram sacrificados para dosagem dos níveis de monoaminas e seus metabólitos no EST, CX, AMI, HIP e NAc, através da técnica de HPLC com detecção eletroquímica. Os demais animais foram sacrificados e seus cérebros usados para análise histológica da lesão pela coloração de Nissl. Tanto as dosagens neuroquímicas quanto as análises histológicas foram realizadas usando o mesmo procedimento do experimento anterior.

Neste experimento não utilizamos os animais SHAM, pois os dados anteriores demonstraram que não houve diferença nas avaliações histológicas e comportamentais entre este grupo e os animais controle não-operados.

4.2.1 - Análise Histológica da Lesão induzida pela Microinfusão de 1 μ mol de MPTP na SNc de Ratos

Confirmando resultados anteriores, a lesão com MPTP causou uma perda neuronal de aproximadamente 62% na SNc. Mais uma vez observou-se uma pequena expansão da lesão, em torno de 28%, para a VTA.

4.2.2 – Análise Neuroquímica do Tratamento com L-DOPA em Ratos com Lesão da SNc Induzida pelo MPTP

O efeito da lesão com MPTP e do tratamento com L-DOPA sobre os níveis cerebrais de DA, 5-HT, NA e seu metabólitos DOPAC, HVA e 5-HIAA estão apresentados na Tabela 3. Após a análise estatística dos dados, feita pela ANOVA de 2 vias, seguida pelo teste de Duncan, pode ser visto que a lesão induzida pelo MPTP mais uma vez causou uma redução significativa nos níveis estriatais de DA ($F_{(1,25)} = 163,44$; $P \leq 0,01$), DOPAC ($F_{(1,25)} = 111,33$; $P \leq 0,05$) e HVA ($F_{(1,22)} = 68,75$; $P \leq 0,05$), sem alterar os níveis de 5-HT, 5-HIAA ou NA ($P \geq 0,05$), em relação aos animais controle/veículo. Nas demais estruturas estudadas, o tratamento com MPTP não alterou os níveis de DA, 5-HT, NA e seus metabólitos, quando comparados com o grupo controle/veículo ($P \geq 0,05$), exceto na AMI, onde houve uma redução dos níveis

de 5-HT ($P \leq 0,05$). Estes dados reforçam a especificidade da lesão induzida por esta neurotoxina ao sistema DAérgico nigroestriatal.

O tratamento com L-DOPA nos animais lesados (grupo MPTP/L-DOPA) promoveu a reposição dos níveis estriatais de DA para valores próximos do grupo controle/veículo, não havendo diferença significativa entre estes 2 grupos com relação ao nível de DA no EST ($F_{(1,25)} = 165,33$; $P \geq 0,05$) (Tabela 3). Os níveis estriatais de DOPAC ($F_{(1,29)} = 111,83$; $P \leq 0,001$) e HVA ($F_{(1,22)} = 68,75$; $P \leq 0,001$) aumentaram no grupo MPTP/L-DOPA comparado ao grupo controle/veículo, provavelmente em função da metabolização da L-DOPA. O grupo MPTP/L-DOPA também apresentou alteração nos níveis de monoaminas nas demais estruturas cerebrais estudadas, em comparação aos animais controle/veículo (Tabela 3). No EST, além do aumento dos níveis de DOPAC e HVA descritos acima, observou-se um aumento nos níveis de NA ($F_{(1,19)} = 443,36$; $P \leq 0,001$) e uma diminuição nos níveis de 5-HT ($F_{(1,24)} = 42,25$; $P \leq 0,001$). O conteúdo de DA ($F_{(1,19)} = 75,08$; $P \leq 0,001$), DOPAC ($F_{(1,21)} = 147,62$; $P \leq 0,001$) e HVA ($F_{(1,20)} = 32,41$; $P \leq 0,01$) foi aumentado no CTX. Na AMI houve um aumento significativo nos níveis de DA ($F_{(1,17)} = 175,70$; $P \leq 0,001$), DOPAC ($F_{(1,15)} = 108,33$; $P \leq 0,001$), HVA ($F_{(1,16)} = 118,58$; $P \leq 0,001$) e uma redução de 5-HT ($F_{(1,18)} = 17,74$; $P \leq 0,01$). No HIP, os níveis de DA ($F_{(1,15)} = 244,86$; $P \leq 0,001$), DOPAC ($F_{(1,16)} = 204,48$; $P \leq 0,001$) e HVA ($F_{(1,15)} = 764,85$; $P \leq 0,001$) também foram significativamente aumentados enquanto que, os níveis de 5-HT foram reduzidos ($F_{(1,18)} = 15,05$; $P \leq 0,01$). Um aumento nos níveis de DA ($F_{(1,25)} = 69,23$; $P \leq 0,001$),

DOPAC ($F_{(1,24)} = 179,26$; $P \leq 0,001$), HVA ($F_{(1,25)} = 51,97$; $P \leq 0,01$) e NA ($F_{(1,24)} = 289,73$; $P \leq 0,001$) foi também observado NAc.

Entretanto, a administração de L-DOPA por si só (grupo controle/L-DOPA), alterou também os níveis de monoaminas em todas as estruturas analisadas, quando comparada aos animais controle tratados com veículo (Tabela 3). No EST houve um aumento nos níveis de DA ($P \leq 0,001$), DOPAC ($P \leq 0,001$), HVA ($P \leq 0,05$) e NA ($P \leq 0,001$). Foi observado um aumento significativo nos níveis de DA ($P \leq 0,001$), DOPAC ($P \leq 0,001$) e HVA ($P \leq 0,01$) no CTX. Na AMI, os níveis de DA ($P \leq 0,001$), DOPAC ($P \leq 0,001$), HVA ($P \leq 0,001$) também aumentaram, e os níveis de 5-HT reduziram ($P \leq 0,01$). Um aumento nos níveis de DA ($P \leq 0,001$), DOPAC ($P \leq 0,001$), HVA ($P \leq 0,001$) e 5-HIAA ($P \leq 0,05$), e uma redução nos níveis de 5-HT ($P \leq 0,05$) foi observado no HIP. No NAc houve um aumento significativo nos níveis de DA ($P \leq 0,001$), DOPAC ($P \leq 0,001$), HVA ($P \leq 0,001$) e NA ($P \leq 0,001$), (Tabela 3).

Tabela 3: Efeito da administração de MPTP na SNC de ratos e do tratamento com benserazida/L-DOPA sobre os níveis cerebrais de monoaminas e metabólitos.

	Concentração (ng/g)					
	DA	DOPAC	HVA	5-HT	5-HIAA	NA
Estriado						
controle/veículo	5333.13 ± 319.13	1490.15 ± 129.73	298.56 ± 21.40	257.66 ± 10.64	548.72 ± 20.29	80.55 ± 6.19
MPTP/veículo	3150.26 ± 371.43 *	1018.54 ± 80.78 *	219.92 ± 21.50 *	283.33 ± 9.52	553.08 ± 23.58	89.66 ± 7.72
Controle/L-DOPA	15260.91 ± 611.90 **	3955.92 ± 255.07 **	644.18 ± 54.48 **	223.07 ± 16.99 #	614.17 ± 56.38	1167.86 ± 66.70 **
MPTP/ L-DOPA	5368.08 ± 597.47 #	3184.90 ± 378.83 #	444.51 ± 44.50 #	162.90 ± 8.70 #	554.87 ± 45.13	1079.81 ± 78.70 **
Cortex						
controle/veículo	44.47 ± 7.48	39.62 ± 8.39	23.41 ± 8.16	394.78 ± 41.79	339.58 ± 21.22	230.94 ± 29.69
MPTP/veículo	21.85 ± 3.85	16.33 ± 1.41	11.27 ± 1.39	366.31 ± 82.14	339.55 ± 21.81	234.22 ± 32.11
Controle/L-DOPA	468.58 ± 48.15 **	528.23 ± 41.44 **	123.42 ± 8.87 **	229.59 ± 35.83	384.35 ± 28.50	275.62 ± 51.36
MPTP/ L-DOPA	605.26 ± 93.66 **	532.52 ± 75.20 **	134.75 ± 37.38 **	253.02 ± 71.81	384.09 ± 25.84	233.30 ± 20.88
Amígdala						
controle/veículo	99.78 ± 10.38	63.07 ± 8.76	10.50 ± 1.53	382.21 ± 24.81	523.09 ± 16.56	212.18 ± 27.78
MPTP/veículo	69.21 ± 6.03	49.12 ± 2.18	13.51 ± 2.24	309.78 ± 23.53 *	523.33 ± 39.49	182.51 ± 27.07
Controle/L-DOPA	764.22 ± 37.42 **	819.41 ± 66.98 **	148.67 ± 18.50 **	244.59 ± 19.76 *	577.84 ± 34.78	253.38 ± 17.43
MPTP/ L-DOPA	832.37 ± 103.02 **	1039.47 ± 183.85 **	141.93 ± 19.77 **	261.78 ± 18.52 *	561.91 ± 42.71	212.62 ± 14.52
Hipocampo						
controle/veículo	14.27 ± 0.84	11.37 ± 2.18	6.30 ± 1.21	260.72 ± 21.82	422.42 ± 38.27	296.89 ± 18.23
MPTP/veículo	16.83 ± 2.80	15.06 ± 3.01	5.65 ± 1.13	245.31 ± 18.21	342.13 ± 16.83	233.85 ± 24.20
Controle/L-DOPA	573.26 ± 40.38 **	591.39 ± 37.08 **	126.37 ± 7.31 **	172.54 ± 19.91 **	511.31 ± 25.88 **	228.04 ± 22.88
MPTP/ L-DOPA	752.29 ± 76.01 **	566.18 ± 88.84 **	124.55 ± 4.17 **	181.11 ± 18.01 **	478.7 ± 21.54 #	171.69 ± 41.71 #
N. Accumbens						
controle/veículo	2892.57 ± 227.49	1062.31 ± 86.91	234.26 ± 20.43	350.43 ± 51.42	512.93 ± 34.75	156.20 ± 13.14
MPTP/veículo	2442.75 ± 269.49	890.22 ± 58.80	170.20 ± 8.68	386.87 ± 32.25	545.59 ± 43.51	158.44 ± 18.71
controle/L-DOPA	7417.31 ± 994.51 **	3150.52 ± 192.75 **	571.25 ± 69.59 **	288.52 ± 59.43	542.46 ± 56.44	973.83 ± 84.13 **
MPTP/ L-DOPA	8017.69 ± 835.03 **	3078.68 ± 316.92 **	469.32 ± 60.21 **	257.27 ± 41.70	595.75 ± 53.96	804.98 ± 71.96 **

Os valores representam a média ± e.p.m.. * p ≤ 0.05, comparado ao grupo controle/veículo; # p ≤ 0.05, comparado ao grupo MPTP/veículo, ANOVA de 2-vias seguida pelo teste de Duncan.

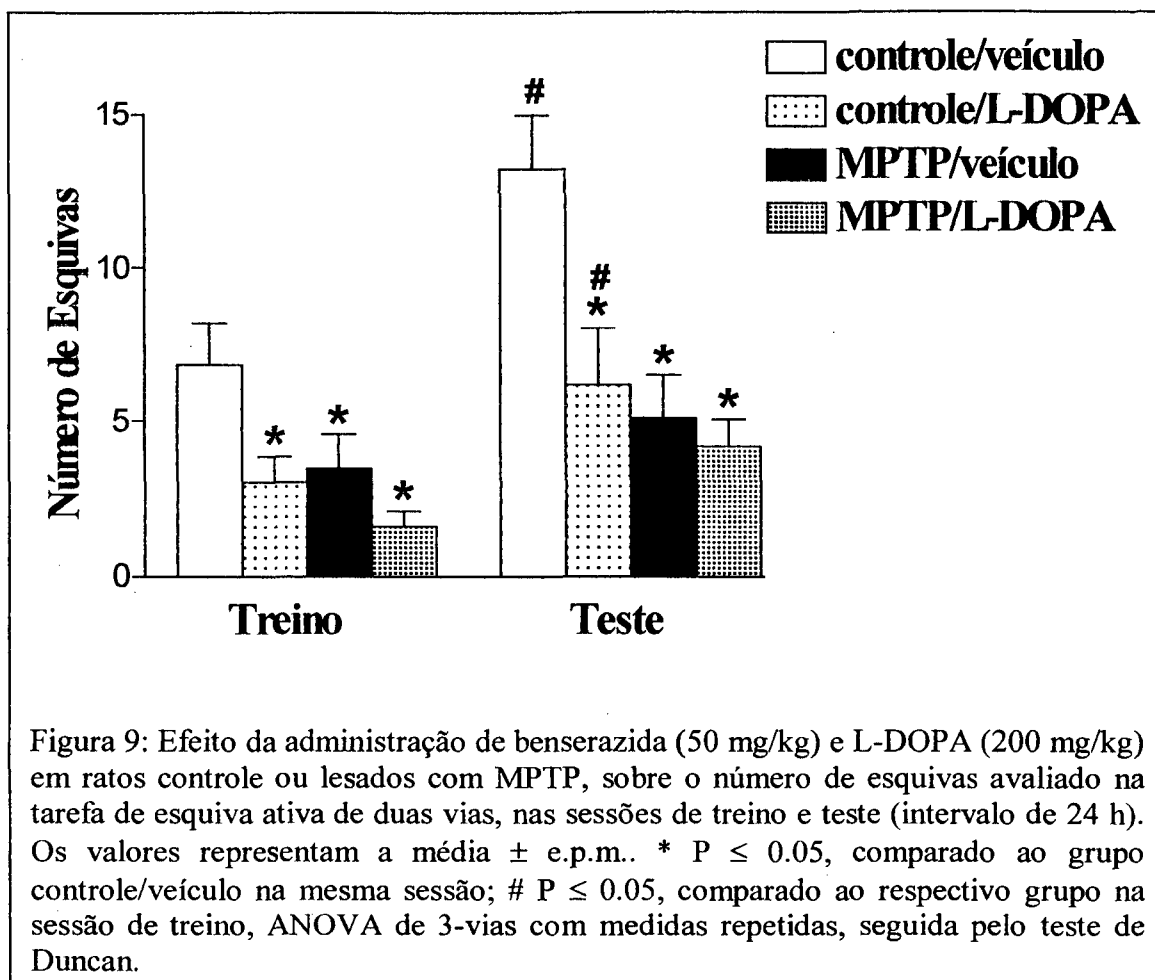
4.2.3 - Efeitos do Tratamento com L-DOPA sobre os Déficits Cognitivos Induzidos pela Lesão com MPTP na SNc de Ratos Submetidos à Tarefa de Esquiva Ativa de Duas Vias

O efeito do tratamento com L-DOPA aos grupos controle e MPTP, sobre o número de esquivas avaliados na tarefa de esquiva ativa de duas vias, está apresentado na Fig. 9. A análise estatística efetuada pela ANOVA de 3 vias com medidas repetidas (sessões treino e teste) revelou efeito significativo da lesão ($F_{(1,43)} = 11,75$; $P \leq 0,001$), do tratamento com L-DOPA ($F_{(1,43)} = 9,88$; $P \leq 0,01$) e das sessões ($F_{(1,43)} = 24,52$; $P \leq 0,001$). Similar ao experimento anterior, também não foi verificada diferença estatística no fator interação entre as sessões e os tratamentos com MPTP e L-DOPA ($F_{(1,43)} = 2,26$; $P = 0,13$). Em seguida, os resultados foram avaliados pelo teste de Duncan, o qual mostrou um aumento significativo no número de esquivas na sessão teste, em comparação à sessão treino nos grupos controle/veículo ($P \leq 0,001$) e controle/L-DOPA ($P \leq 0,05$). Este resultado demonstra que os animais não-lesados aprenderam a evitar o choque nas patas e lembraram desta tarefa 24 h depois da sessão treino. Por outro lado, não houve diferença significativa nos escores de esquivas entre as sessões treino e teste nos grupos MPTP/veículo ($P \geq 0,2$) e MPTP/ L-DOPA ($P = 0,10$).

Na sessão treino, o número de esquivas dos animais MPTP/veículo foi 50% menor que dos animais controle/veículo ($P \leq 0,05$). O tratamento com L-DOPA não reverteu este déficit, uma vez que os escores de esquivas do grupo MPTP/L-DOPA foi 78% menor que os escores do grupo controle/veículo ($P \leq 0,001$). Não houve diferença

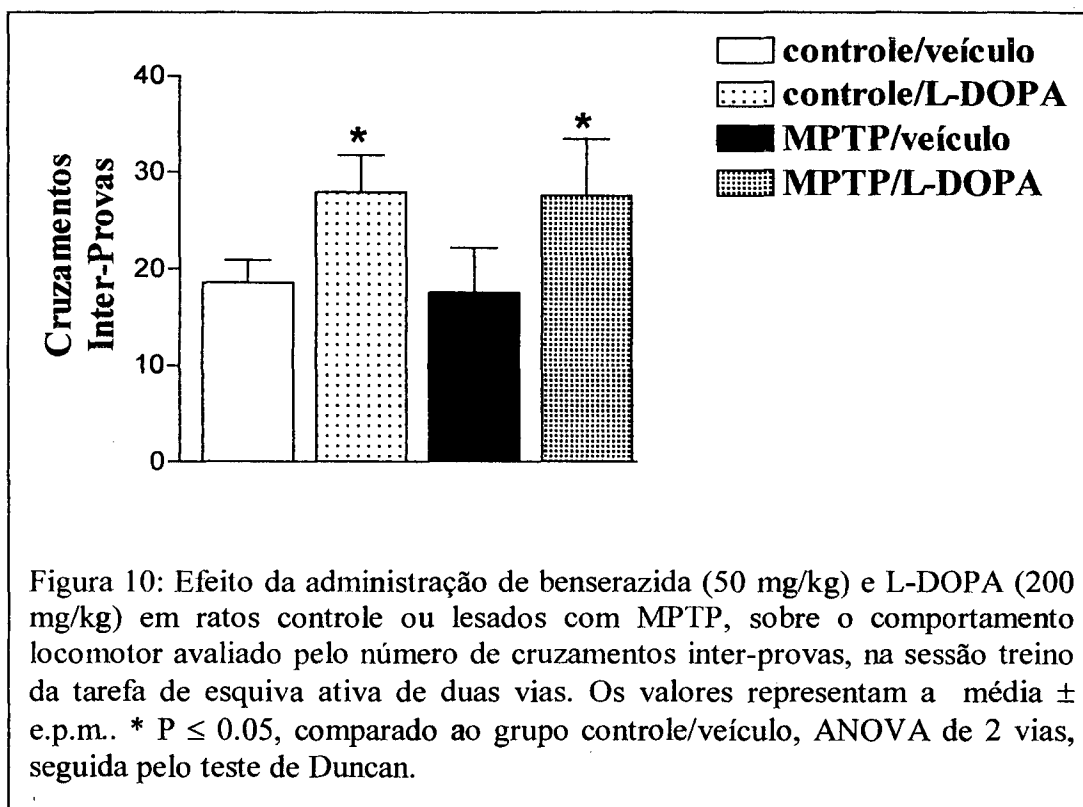
significativa entre os animais lesados com MPTP e tratados com veículo ou L-DOPA ($P \geq 0,2$). Ainda na sessão treino, o tratamento com L-DOPA por si só (grupo controle/L-DOPA) diminuiu em 56% os escores de esquivas em comparação com o grupo controle/veículo ($P \leq 0,001$).

Na sessão teste, o número de esquivas dos animais MPTP/veículo foi 62% menor que os animais controle/veículo ($P \leq 0,001$). Mais uma vez, o tratamento com L-DOPA não reverteu este déficit, pois os escores de esquivas do grupo MPTP/L-DOPA foi 68% menor que os escores do grupo controle/veículo ($P \leq 0,001$). Também, não foi observada diferença significativa com relação ao número de esquivas entre os grupos MPTP/veículo e MPTP/L-DOPA na sessão teste ($P \geq 0,2$). Continuando a análise da sessão teste, os animais controle/L-DOPA apresentaram uma redução de 46% nos escores de esquivas quando comparados aos animais controle/veículo ($P \leq 0,01$). Estes resultados mostraram que o tratamento com L-DOPA, além de não ter revertido o déficit cognitivo induzido pelo MPTP na tarefa de esquiva ativa de duas vias causou prejuízo na aquisição e retenção desta tarefa comportamental nos animais controle.



O efeito do tratamento com L-DOPA sobre o comportamento locomotor dos animais controle e MPTP durante a sessão treino da tarefa de esquiva ativa de duas vias, avaliado pelo número de cruzamentos inter-provas, está representado na Fig. 10. A análise estatística efetuada através da ANOVA de 2 vias revelou que não houve diferença significativa quanto ao fator lesão ($F_{(1,43)} = 0,03$; $P \geq 0,2$), confirmando os resultados anteriores de ausência de diferença significativa entre os grupos controle/veículo e MPTP/veículo. Por outro lado, o tratamento com L-DOPA apresentou significância estatística ($F_{(1,43)} = 4,91$; $P \leq 0,05$) após a ANOVA de 2 vias. Na seqüência, o teste de Duncan evidenciou um aumento significativo no número de

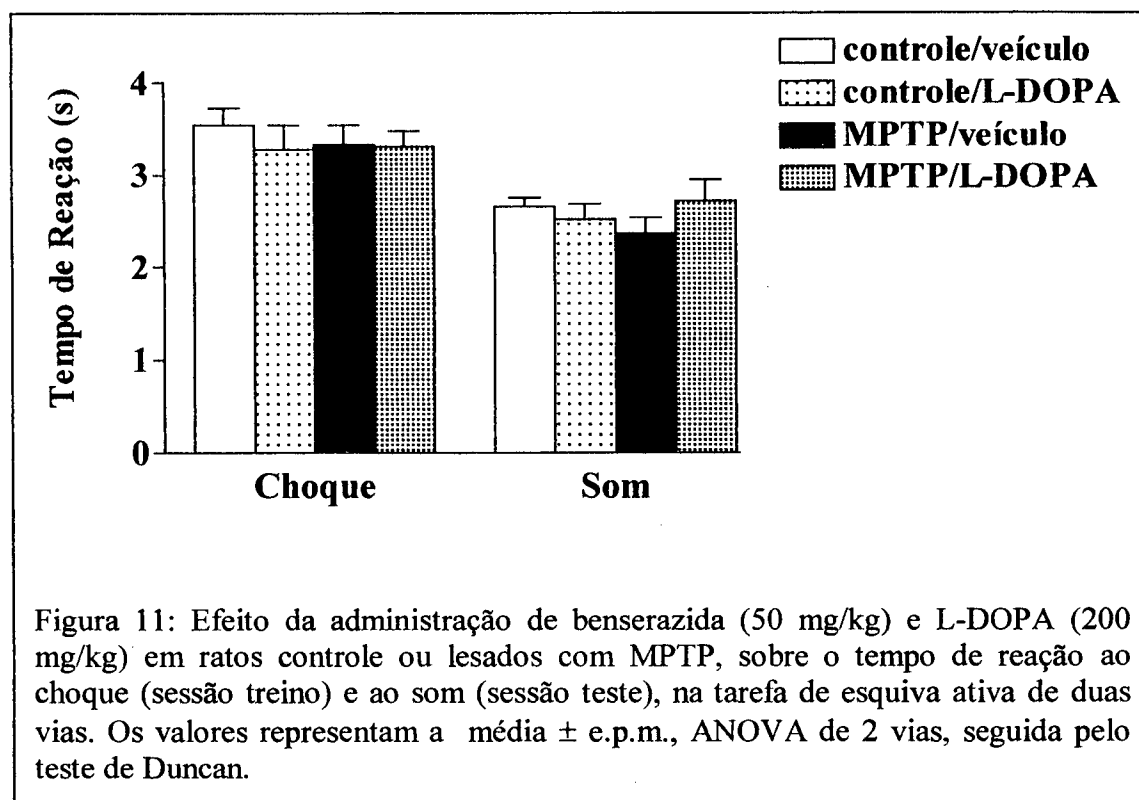
cruzamentos inter-provas nos grupos controle e MPTP tratados com L-DOPA ($P \leq 0,05$). Estes dados reforçam a ausência de prejuízo motor nos animais lesados com MPTP, para execução da tarefa de esquiva ativa de duas vias e evidenciam o efeito estimulante da L-DOPA sobre este parâmetro comportamental.



Adicionalmente, como ilustrado na Fig. 11, também não houve diferença significativa entre os grupos com relação ao tempo de reação ao som ($F_{(1,331)} = 2,97$, $P = 0,15$, ANOVA 2 vias) e ao tempo de reação ao choque ($F_{(1,110)} = 0,31$, $P \geq 0,2$, ANOVA 2 vias). Estes dados confirmam os resultados prévios demonstrando que o prejuízo cognitivo dos ratos lesados com MPTP, na tarefa de esquiva ativa, não foi

decorrente de problemas sensoriais, acrescentando ainda que o tratamento com L-DOPA não afetou estes parâmetros comportamentais estudados.

A partir destes resultados, observou-se que o tratamento com L-DOPA, em dose suficiente para repor os níveis estriatais de DA e estimular o comportamento locomotor dos animais, não reverteu o déficit cognitivo em ratos lesados com MPTP e avaliados na tarefa de esquiva ativa de duas vias. Além disso, este tratamento prejudicou o desempenho dos animais controle nesta mesma tarefa.



4.3 - EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM DIFERENTES DOSES DE CAFEÍNA EM RATOS COM LESÃO DA SNC INDUZIDA PELO MPTP E SUBMETIDOS À TAREFA DE ESQUIVA ATIVA DE DUAS VIAS

Seguindo o procedimento experimental já descrito, um novo grupo de 46 animais foi submetido à cirurgia estereotáxica para lesão da SNC com MPTP e posterior análise comportamental na tarefa de esQUIVA ativa de duas vias. O grupo controle foi composto de 49 animais não operados. O grupo SHAM não foi incluído neste experimento, em função de os resultados anteriores não demonstrarem diferenças nas avaliações histológicas e comportamentais entre este grupo e os animais controle não-operados. Na seqüência, os animais controle e MPTP foram divididos de acordo com o tratamento recebido no dia da sessão treino: veículo, cafeína 0,1 mg/kg, cafeína 0,3 mg/kg ou cafeína 1,0 mg/kg. Foram formados os seguintes subgrupos:

- Grupo 1- controle/veículo (13 animais);
- Grupo 2- controle/cafeína 0,1 mg/kg (12 animais);
- Grupo 3- controle/cafeína 0,3 mg/kg (12 animais);
- Grupo 4- controle/ cafeína 1,0 mg/kg (12 animais);
- Grupo 5- MPTP/veículo (10 animais);
- Grupo 6- MPTP/cafeína 0,1 mg/kg (10 animais);
- Grupo 7- MPTP/cafeína 0,3 mg/kg (13 animais);
- Grupo 8- MPTP/cafeína 1,0 mg/kg (13 animais).

O tratamento com as diferentes doses de cafeína ou seu veículo foi administrado via i.p., 45 minutos antes do treino.

Conforme já descrito, 1 semana após a tarefa de esquiva ativa de duas vias, os animais foram sacrificados e seus cérebros usados para análise histológica da lesão pela coloração de Nissl.

4.3.1 - Análise Histológica da Lesão Induzida pela Microinfusão de 1 μ mol de MPTP na SNc de Ratos

As análises histológicas efetuadas pela coloração de Nissl confirmaram os resultados anteriores, ou seja, a presença de uma lesão significativa na SNc (aproximadamente 60%) induzida pela microinfusão de MPTP.

4.3.2 – Efeitos do Tratamento com Diferentes Doses de Cafeína Sobre os Déficits Cognitivos Induzidos pela Lesão com MPTP na SNc de Ratos Submetidos á Tarefa de Esquiva Ativa de Duas Vias

O efeito do tratamento com diferentes doses de cafeína em ratos controle e lesados com MPTP, sobre o número de esquiva nas sessões treino e teste da tarefa de esquiva ativa de duas vias, está apresentado na Fig. 12. Estes resultados foram analisados através da ANCOVA de 3 vias com medidas repetidas, a qual indicou diferença significativa nos fatores lesão ($F_{(1,86)} = 68,8$; $P \leq 0,01$), tratamento com cafeína ($F_{(3,86)} = 3,37$; $P \leq 0,05$) e sessão ($F_{(1,87)} = 53,5$; $P \leq 0,001$). A partir da análise post-hoc através do teste de Duncan, verificou-se que o grupo controle/veículo

aumentou o número de esquivas na sessão teste em comparação com a sessão treino ($P \leq 0,001$), enquanto que o grupo MPTP/veículo não melhorou seus escores de esquivas entre as 2 sessões ($P \geq 0,2$). Esta análise também revelou que o grupo MPTP/veículo apresentou um número menor de esquivas nas sessões treino ($P \leq 0,01$) e teste ($P \leq 0,001$), quando comparado ao grupo controle/veículo. Por outro lado, foi observado um aumento significativo no número de esquivas na sessão treino (escores de aquisição) em função do tratamento com cafeína ($P \leq 0,05$, ANCOVA de 3 vias). A análise através do teste de Duncan mostrou efeito significativo do tratamento com cafeína somente entre os grupos controle/cafeína 0,1mg/kg e controle/veículo ($P \leq 0,01$). Contudo, a redução nos escores de esquivas, na sessão treino induzida pelo tratamento com MPTP, pareceu ser parcialmente revertida pela cafeína (0,1 e 0,3 mg/kg), uma vez que não houve diferença significativa entre o número de esquivas do grupo controle/veículo e dos animais lesados com MPTP tratados com cafeína 0,1 mg/kg ($P \geq 0,2$) ou cafeína 0,3 mg/kg ($P = 0,07$).

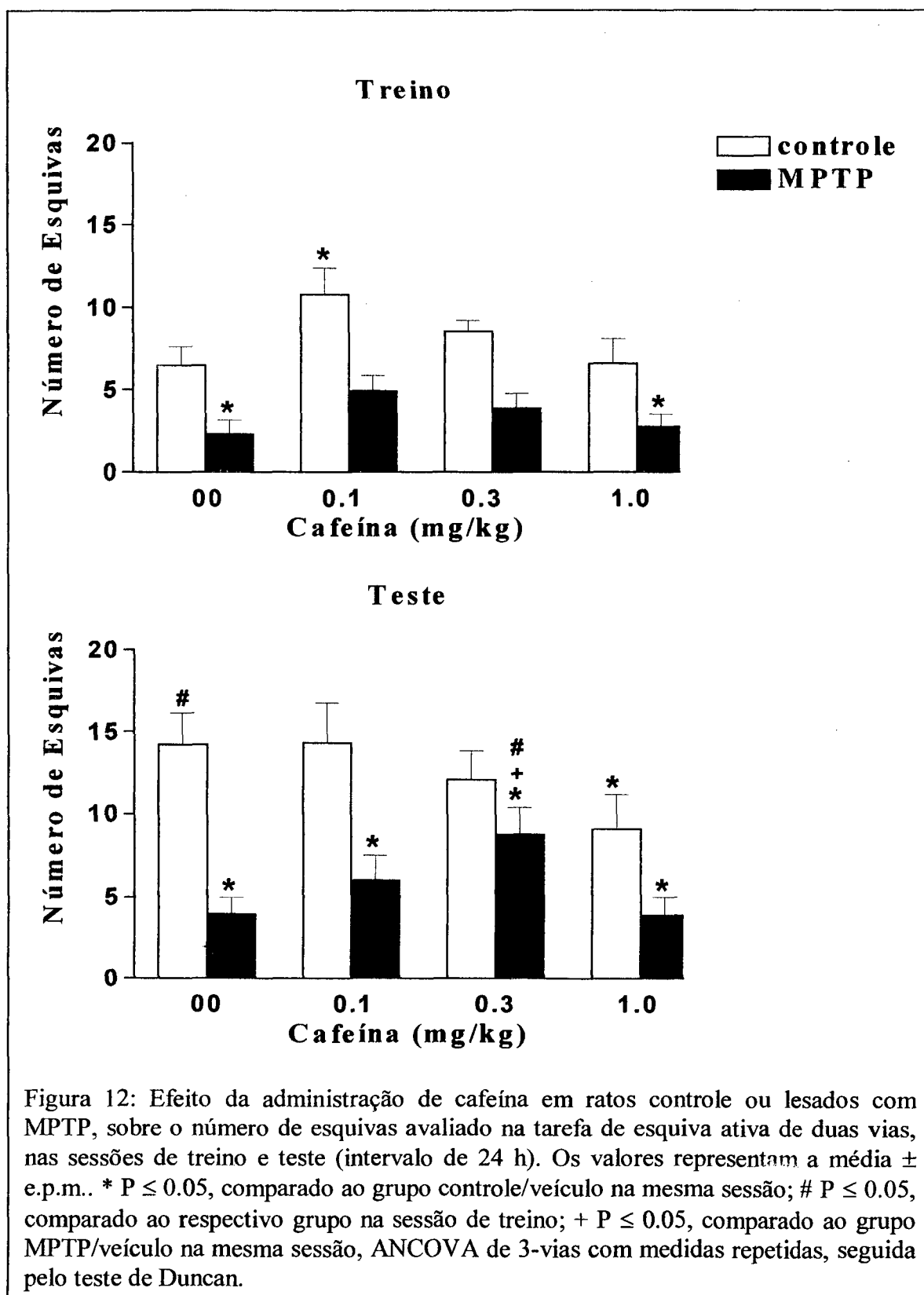
O tratamento com cafeína 0,3 mg/kg também aumentou o número de esquivas na sessão teste (escores de retenção) nos animais lesados com MPTP em comparação ao grupo MPTP/veículo ($P \leq 0,001$). Além disso, os escores de esquivas do grupo MPTP/cafeína 0,3 mg/kg melhoraram na sessão teste quando comparados com a sessão treino ($P \leq 0,001$). Entretanto, estes resultados representam apenas uma reversão parcial do déficit cognitivo induzido pelo MPTP, uma vez que os escores de esquivas dos animais lesados com MPTP e tratados com cafeína (0,1; 0,3 ou 1,0

mg/kg) foram significativamente menores que os escores apresentados pelo grupo controle/veículo na sessão teste ($P \leq 0,05$).

Os resultados apresentados na Fig. 12 também revelaram que o tratamento com cafeína 0,1 mg/kg melhorou os escores de esquivas dos animais controle na sessão treino ($P \leq 0,01$), mas não na sessão teste ($P = 0,94$). Por outro lado, a maior dose de cafeína utilizada neste estudo (1,0 mg/kg) não apresentou efeito sobre os escores de esquivas dos animais controle na sessão treino ($P = 0,92$) e ainda prejudicou os escores de retenção deste mesmo grupo ($P \leq 0,001$). Este tratamento com cafeína 1,0 mg/kg também prejudicou os escores de esquivas nos ratos lesados com MPTP nas sessões treino ($P \leq 0,05$) e teste ($P \leq 0,001$).

Com relação ao desempenho motor dos animais neste experimento, a Fig. 13 apresenta a influência da lesão com MPTP e do tratamento com as diferentes doses de cafeína sobre o número de cruzamentos inter-provas. A análise estatística destes dados, realizada através da ANOVA de 2 vias, revelou um efeito significativo da lesão induzida pela microinfusão de MPTP ($F_{(1,87)} = 10,92$; $P \leq 0,01$). Por outro lado, o tratamento com cafeína (0,1 à 1,0 mg/kg) não alterou estes escores de forma significativa ($F_{(3,87)} = 0,85$; $P \geq 0,2$). Além disso, não foi verificada uma interação significativa entre estes 2 fatores ($F_{(3,87)} = 1,85$; $P = 0,14$). Devido ao fato do tratamento com MPTP ter afetado o número de cruzamentos inter-provas, a análise estatística dos escores de esquivas foi feita por uma ANCOVA de 3 vias, utilizando o número de cruzamentos inter-provas na sessão treino como covariável. Esta análise garantiu que os resultados dos escores de esquivas fossem independentes do efeito do

MPTP sobre a atividade locomotora durante a execução da tarefa de esquiva ativa de duas vias.



Outro parâmetro analisado neste experimento foi o tempo de reação ao som e ao choque, para descartar a influência de alteração na sensibilidade a estes estímulos durante a realização da tarefa de esquivas ativa de duas vias. Os resultados obtidos estão representados na Fig. 14. A partir da análise estatística destes dados, a qual foi feita pela ANOVA de 2 vias, não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos, tanto no tempo de reação ao choque ($F_{(3,295)} = 0,67$; $P = 0,56$) quanto no tempo de reação ao som ($F_{(3,902)} = 2,44$; $P = 0,06$). Em geral, estes dados demonstraram que a cafeína em doses baixas melhorou o desempenho dos animais com lesão da SNc, induzida pelo MPTP, na execução da tarefa de esquivas ativa de duas vias.

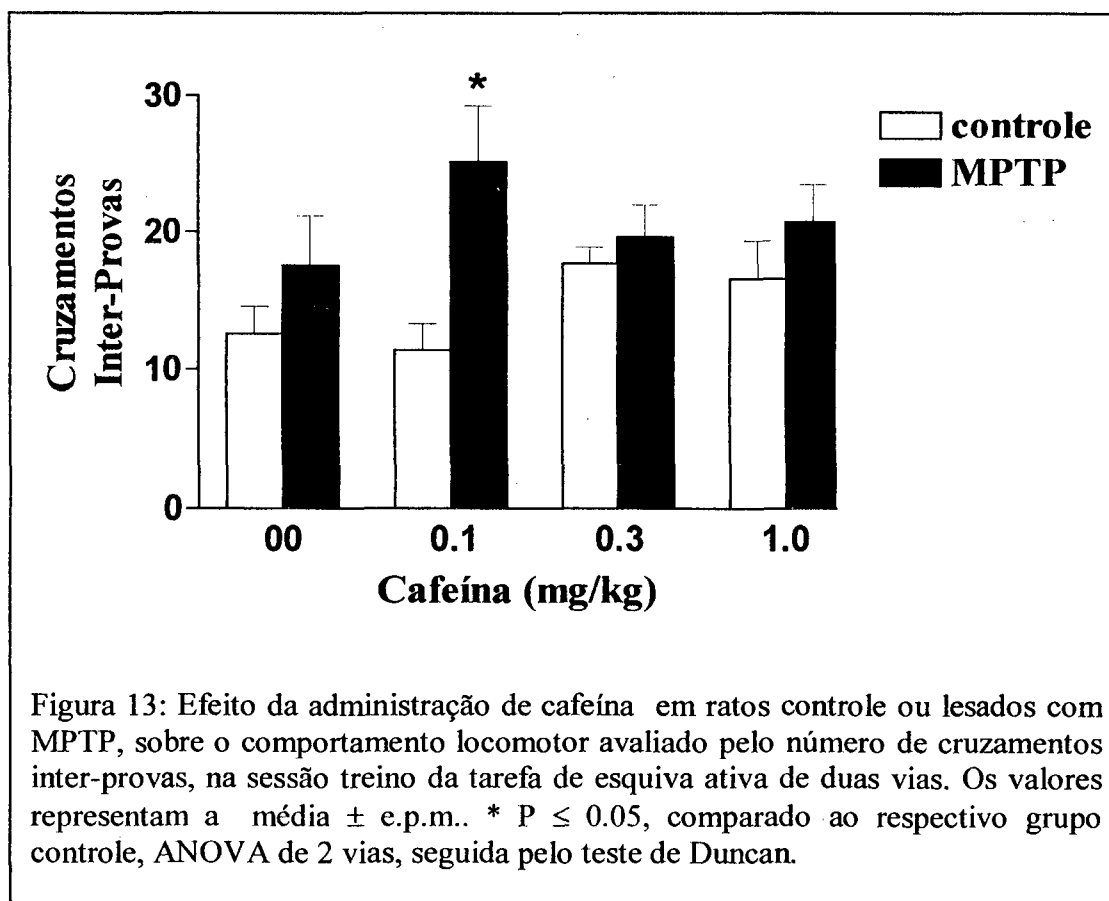
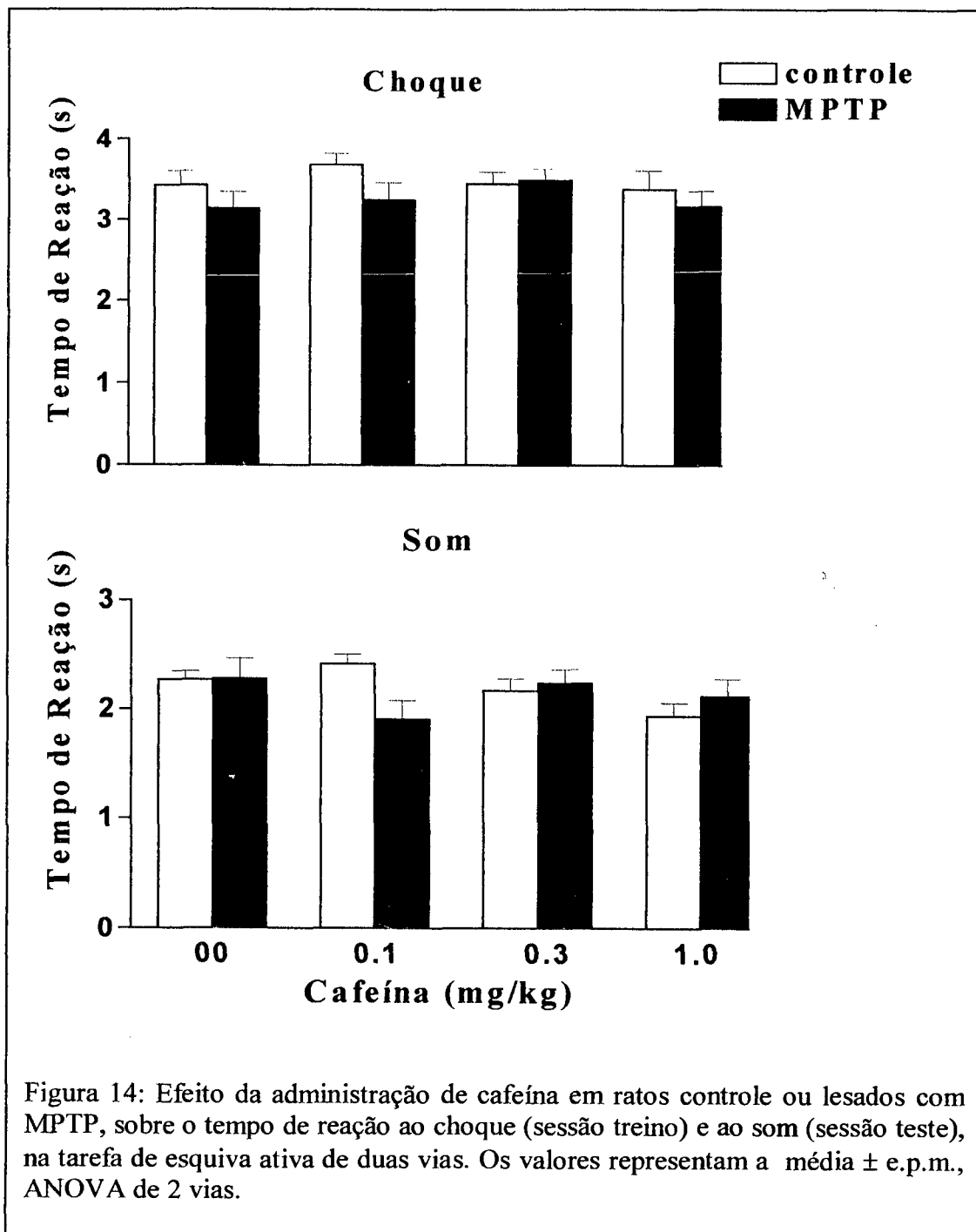


Figura 13: Efeito da administração de cafeína em ratos controle ou lesados com MPTP, sobre o comportamento locomotor avaliado pelo número de cruzamentos inter-provas, na sessão treino da tarefa de esquivas ativa de duas vias. Os valores representam a média \pm e.p.m.. * $P \leq 0.05$, comparado ao respectivo grupo controle, ANOVA de 2 vias, seguida pelo teste de Duncan.



5 - DISCUSSÃO

Considerando os resultados histológicos, neuroquímicos e comportamentais dos ratos lesados com MPTP, parece que o uso destes animais, submetidos à tarefa de esquiva ativa de duas vias, pode constituir um modelo de déficit cognitivo associado à DP, contribuindo para uma melhor compreensão de alguns aspectos da amnésia observada em pacientes parkinsonianos.

Com relação aos dados histológicos e neuroquímicos, verificou-se que a microinfusão intra-nigral de MPTP, na concentração selecionada, causou uma perda celular parcial dos neurônios DAérgicos nigroestriatais, bem como uma redução significativa dos níveis de DA e seus metabólitos somente no estriado. Além disso, a lesão induzida pelo MPTP praticamente não afetou os outros sistemas de neurotransmissão nas demais estruturas estudadas. Estas alterações são consistentes com os dados da literatura (Sundstrom e Jonsson, 1985; Markey e Schmuff, 1986; Heikkila e Sonsalla, 1987), confirmando a especificidade do efeito lesivo do MPTP sobre os neurônios DAérgicos nigroestriatais, em diferentes espécies.

Em relação aos resultados comportamentais, observou-se que os ratos lesados com MPTP na SNc apresentaram dificuldades nos processos de aquisição e retenção da tarefa de esquiva ativa de duas vias, manifestadas pela redução no número de esquivas observado nas sessões de treino e teste. É importante salientar que este efeito do MPTP sobre os processos cognitivos avaliados na tarefa de esquiva ativa de duas vias não foi decorrente de prejuízo motor, uma vez que não houve diferença no número de cruzamentos inter-provas entre os grupos. Resultados similares foram

observados em nossos laboratórios, avaliando o comportamento locomotor de ratos lesados com MPTP e submetidos ao teste do campo aberto. Estes achados do presente estudo estão de acordo com os dados de Schneider e colaboradores (1988), os quais evidenciaram que macacos tratados com baixas doses de MPTP também apresentam déficits cognitivos com reduzido ou nenhum prejuízo motor. Além disso, Heikkila e colaboradores (1989) confirmaram que ratos e camundongos tratados com MPTP não apresentam alterações motoras persistentes.

Adicionalmente, este efeito do MPTP também não parece ser decorrente de problemas sensoriais, pois também não foi verificada diferença entre os grupos experimentais e controle com relação ao tempo de reação ao som e ao choque.

Em conjunto, estes resultados demonstram que os ratos lesados com MPTP não apresentam dificuldade em iniciar movimentos voluntários que possam afetar seu desempenho na tarefa de esquiva ativa de duas vias e, ainda, que a lesão não afeta o processamento sensorial de ambos os estímulos EC e EI. Além disso, estes dados estão de acordo com outros estudos que demonstram que a tarefa de esquiva ativa é sensível às manipulações feitas no estriado (Winacur e Mills, 1969; Kirkby e Polgar, 1974; Guilford *et al.*, 1977; Prado Alcalá *et al.*, 1984; El Massioui e Racht Delatour, 1997).

Estes resultados obtidos a partir das avaliações histológicas, neuroquímicas e comportamentais de ratos com lesão na SNc induzida por MPTP assemelham-se às características observadas nos estágios iniciais da DP, quando se pode observar a ocorrência de alterações cognitivas sem prejuízo motor aparente (Dubois e Pillon, 1997). Este quadro clínico normalmente tem início quando a lesão dos neurônios

DAérgicos nigroestriatais é parcial e restrita (Bonnet, 2000) e quando a redução dos níveis estriatais de DA fica em torno de 40-60% (Obeso *et al.*, 2000). No presente estudo, a lesão da SNc foi parcial e a redução dos níveis estriatais de DA foi de aproximadamente 40% nos ratos tratados com MPTP, enquanto nenhuma diferença significativa com relação aos níveis de DA foi observada no CTX, HIP, AMI ou NAc. Além disso, os sistemas serotoninérgico e noradrenérgico não foram afetados pelo tratamento com MPTP em praticamente todas as estruturas cerebrais estudadas. Harik e colaboradores (1987) também mostraram que a infusão direta de MPTP na região perinigral de ratos (na mesma dose do presente trabalho) causa uma lesão específica da SNc e uma redução de DA estriatal mais seletiva em comparação com outras neurotoxinas que também afetam as células DAérgicas. Estes dados reforçam a possibilidade de se estudar os prejuízos cognitivos associados aos estágios iniciais da DP em ratos lesados com MPTP.

Outra evidência que contribui para esta interpretação é o fato de que a amnésia detectada nos estágios iniciais da DP provavelmente envolve uma interrupção da via DAérgica nigroestriatal (Dubois e Pillon, 1997; Goldman *et al.*, 1998; Weder *et al.*, 1999). Além disso, sabe-se que a neurotransmissão DAérgica participa de processos de aprendizagem e memória (Podgornaya *et al.*, 1997; Beninger e Miller, 1998; Malapani *et al.*, 1998; Nishii *et al.*, 1998).

A manifestação de problemas cognitivos como um sintoma comum da DP foi descrita recentemente (Dubois e Pillon, 1997). Como já mencionado na Introdução, existem algumas diferenças entre os modelos animais utilizando MPTP e a DP

idiopática. Contudo, o tratamento com MPTP tem reproduzido praticamente todos os sintomas clássicos associados ao parkinsonismo em primatas (Burns *et al.*, 1983; Langston *et al.*, 1984; Langston, 1985; Bezard *et al.*, 1997). Mais especificamente, tem sido descrito que macacos tratados com MPTP apresentam dificuldades em desempenhar diferentes tarefas de memória previamente aprendidas, tais como tarefa de respostas com retardo (“delayed response task”), tarefa de alternância com retardo (“delayed alternation task”) e tarefa de reversão da discriminação visual (“visual discrimination reversal task”) (Roeltgen e Schneider, 1994; Fernandez Ruiz, *et al.*, 1995; Schneider *et al.*, 1999).

Por outro lado, roedores tratados com MPTP apresentam somente alguns dos sintomas que ocorrem na DP. Particularmente, as alterações motoras observadas em macacos normalmente não são vistas em roedores tratados com MPTP (Heikkila *et al.*, 1989), somente em tarefas motoras mais elaboradas (Rozas *et al.*, 1998). Contudo, de acordo com os dados do presente trabalho, vários estudos têm demonstrado o efeito neurotóxico do MPTP sobre os neurônios DAérgicos de roedores (Fuller e Steranka, 1985; Heikkila *et al.*, 1985; Jarvis e Wagner, 1985; Sundstrom e Jonsson, 1985; Markey e Schmuff, 1986; Heikkila e Sonsalla, 1987).

Além disso, como já descrito, o emprego de um modelo animal não requer uma reprodução de todos os sintomas de uma determinada doença, sendo possível utilizar um modelo com procedimentos padronizados para estudar apenas um sintoma particular da doença (Carlton, 1978). Este é o caso do presente trabalho com ratos tratados com MPTP, proposto como um modelo de amnésia associada à DP.

Existem muitos estudos evidenciando que os roedores são menos sensíveis à toxicidade do MPTP em comparação aos primatas, quando a droga é administrada sistemicamente (Heikkila e Sonsalla, 1987; Gerlach *et al.*, 1991). Em geral, os camundongos são menos resistentes aos efeitos do MPTP do que os ratos (Heikkila *et al.*, 1989). Os camundongos C57-BL são particularmente sensíveis aos efeitos neurotóxicos do MPTP. Entretanto, esta linhagem apresenta um prejuízo de memória espontâneo, o que dificulta o seu uso em estudos de aprendizagem e memória de um modo geral (Mathis *et al.*, 1994; Castelano *et al.*, 1996). Tanila e colaboradores (1998) estudaram o efeito da administração i.p. de MPTP em camundongos submetidos a uma tarefa de alternância com retardo no labirinto em "T" e verificaram um prejuízo de memória menos severo que aqueles descritos para os primatas tratados com MPTP.

Outros estudos têm demonstrado que a administração sistêmica de MPTP em ratos não gera anormalidades nigroestriatais (Boyce *et al.*, 1984; Heikkila *et al.*, 1989). Por outro lado, estudos prévios (Harik *et al.*, 1987) mostraram que a infusão de MPTP diretamente na SNc de ratos destrói seletivamente os neurônios DAérgicos nigroestriatais e reduz os níveis de DA e seus metabólitos no estriado, sem alterar os níveis de outros neurotransmissores monoaminérgicos. Assim, apesar de descrito que os roedores, mais especificamente os ratos, são menos sensíveis aos efeitos neurotóxicos do MPTP, esta baixa sensibilidade pode estar relacionada à via de administração do mesmo (Heikkila e Sonsalla, 1987; Heikkila *et al.*, 1989). Por este motivo, no presente estudo foi utilizada a infusão intra-nigral de MPTP, reproduzindo os achados de estudos anteriores.

A administração intra-cerebral de 6-OHDA em ratos também tem sido utilizada para produzir a lesão DAérgica nigroestriatal, semelhante à observada na DP (Mokry, 1995). Entretanto, a 6-OHDA não é tóxica somente para as células Daérgicas, mas também afeta os neurônios noradrenérgicos (Costall *et al.*, 1977; Ruckert *et al.*, 1997) e serotoninérgicos (Costall *et al.*, 1977; Annett *et al.*, 1992) em várias estruturas cerebrais importantes. Assim, podemos sugerir que ratos com lesão da SNc induzida pelo MPTP são mais apropriados para estudar os prejuízos cognitivos associados à DP, em comparação aos ratos lesados com 6-OHDA.

Conforme descrito na Introdução, os déficits cognitivos observados na DP afetam principalmente o funcionamento visoespacial, funções executivas e alguns tipos de memória (Appollonio *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1997; Verschueren *et al.*, 1997; Dubois e Pillon, 1997; Giraudo *et al.*, 1997). Os déficits de memória podem incluir: 1) aprendizado procedural (Pascual-Leone *et al.*, 1993; Allain *et al.*, 1995; Daum *et al.*, 1995; Roncacci *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 1996; Thomas-Ollivier *et al.*, 1999), 2) memória de trabalho (Owen *et al.*, 1995; Postle *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1997; Giraudo *et al.*, 1997; Le Bras *et al.*, 1999; Stebbins *et al.*, 1999) e 3) uso inadequado das memórias armazenadas (Appollonio *et al.*, 1994; Buytenhuijs *et al.*, 1994; Dubois e Pillon, 1997; Ergis *et al.*, 1997).

Existem poucos relatos sobre o prejuízo de memória declarativa de longo prazo na DP (Thomas *et al.*, 1996) e alguns autores correlacionam este problema com uma atrofia hipocampal (Riekkinen *et al.*, 1998). É importante enfatizar que no presente estudo, tanto o HIP quanto suas inervações foram aparentemente preservadas após o

tratamento com MPTP. Além disso, como descrito em Resultados, foi verificada uma correlação melhor entre os escores de esquiva e a lesão dos neurônios da SNc que se projetam para o EST, do que com a lesão dos neurônios da VTA que se projetam para o HIP e outras estruturas límbicas. Estes dados estão de acordo com os estudos anatômicos de Albanese e Bentivoglio (1982) e Gasbarri e colaboradores (1994).

De acordo com a descrição feita na Introdução sobre o envolvimento dos GB em processos cognitivos e a respeito dos déficits de memória observados em pacientes parkinsonianos, parece que as funções cognitivas propostas para os GB são necessárias para os processos de aprendizagem e memória envolvidos na execução da tarefa de esquiva ativa de duas vias: 1) identificação de um estímulo ambiental (EC) o qual sinaliza a preparação para o início de uma resposta comportamental (esquiva); 2) identificação de mudanças no estímulo visual (reconhecimento dos 2 compartimentos da caixa de esquiva); 3) resposta a uma memória visoespacial de curto prazo (relembrar qual o último compartimento da caixa que foi visitado). A combinação destas exigências, supostamente prejudicadas pelo baixo nível de DA no estriado, pode explicar o prejuízo observado nos animais lesados com MPTP nesta tarefa comportamental.

Neste sentido, o tratamento com MPTP reduz a capacidade dos animais de elaborar um comportamento adaptativo em resposta a um estímulo ambiental, mesmo que este tenha sido repetido 30 vezes. Ou seja, tentar evitar o choque nas patas durante a apresentação do EC, bem como lembrar desta situação experimental a cada pareamento EC/EI durante as sessões de treino e de teste.

O prejuízo cognitivo observado nos ratos lesados com MPTP também pode estar relacionado a um déficit de memória associativa (associação EC/EI), a qual pode ser prejudicada por problemas de atenção ou de memória de trabalho, habilidades estas que afetam os pacientes da DP. Neste caso, o animal lesado não consegue associar o EC como um sinal para emitir a resposta de esquiva evitando o choque nas patas. Esta explicação está de acordo com os estudos de Dunbar e colaboradores (1993), os quais também mostraram que ratos com lesão estriatal apresentam prejuízo no desempenho da tarefa de esquiva ativa.

Por outro lado, Packard e McGaugh (1992) descreveram a importância do estriado para a memória de hábito e o papel do hipocampo nas memórias declarativas (McDonald e White, 1993; Packard e Teather, 1998). O fato dos ratos lesados com MPTP apresentarem um fraco desempenho na tarefa de esquiva ativa de duas vias, concomitante com uma depleção de DA estriatal, corrobora com os achados de Packard e McGaugh (1992), mostrando que este tipo de aprendizagem depende da integridade do sistema DAérgico nigroestriatal. Estes dados também estão de acordo com outros estudos destes mesmos autores, os quais demonstraram que um agonista DAérgico D_2 pode melhorar o aprendizado no teste do labirinto aquático com pista visual interna (Packard e McGaugh, 1994). Mais recentemente, Setlow e McGaugh (2000) mostraram que a administração sistêmica de sulpiride, um antagonista D_2 , prejudicou o desempenho de ratos nesta mesma tarefa comportamental de memória de hábito.

A esquivada ativa de duas vias, por si, pode ser explicada como uma tarefa de memória de hábito, exigindo uma resposta dependente de um estímulo (estímulo sonoro - resposta de esquivada), sendo consistente com a teoria proposta de que a formação de hábito depende da integridade do estriado. Esta teoria é também consistente com os achados de estudos que utilizam outros tipos de testes de memória com resposta dependente de estímulo, como o citado acima do labirinto aquático com pista visual interna (Packard e Teather, 1998) e o teste de discriminação no labirinto radial de 8 braços (Packard e White, 1991). Alternativamente, os déficits observados nos ratos lesados com MPTP nesta tarefa podem também ser explicados por outras teorias propostas para o papel do estriado nos processos de aprendizagem e memória (Dunbar *et al.*, 1993; Salmon e Butters, 1995; Wise, 1996).

Como pode ser visto, a natureza dos processos de memória envolvidos na tarefa de esquivada ativa de duas vias é complexa e os déficits observados nos ratos lesados com MPTP podem englobar todas estas explicações. Portanto, o fato de que a lesão da SNc em ratos prejudica o aprendizado desta tarefa comportamental, encoraja estudos futuros utilizando este tipo de lesão em outros testes de memória, a fim de esclarecer melhor o papel do estriado nas funções de memória.

Uma série de estudos neuroanatômicos tem sugerido que o EST apresenta diferentes domínios de influência, afetando áreas cerebrais relacionadas com o movimento, podendo assim, controlar o processamento destas informações durante os processos de aprendizagem e memória (Graybiel, 1984; Alexander *et al.*, 1986; Rolls, 1994; Kimura, 1995). Estas observações apontam o EST como um centro de

integração sensoriomotora no qual a seleção de variáveis espaciais e temporais é necessária para a programação dos atos a serem executados (Malapani *et al.*, 1994).

Além disso, uma interação equilibrada entre a DA do CTX pré-frontal e do EST é proposta para mediar funções de atenção ou executivas do lobo frontal (Roberts *et al.*, 1994; Robbins, 2000). Assim, não é surpreendente que alterações em mais de um destes sistemas funcionais dos GB possam induzir prejuízo em funções cognitivas diferentes observadas na DP, bem como em modelos animais. De acordo com este ponto de vista, tem sido demonstrado um prejuízo na orientação sensoriomotora de ratos com lesão na porção dorsal do estriado (Dunnett e Iversen, 1982-b; Iversen, 1984) enquanto que a lesão na porção ventral do estriado afeta a resposta a alguns tipos de estímulos reforçadores (Robbins *et al.*, 1989; Everitt e Robbins, 1992).

Recentemente, muitas informações também têm sido obtidas a respeito das aferências DAérgicas estriatais. Estudos prévios mostraram que tarefas de resposta de esquiva condicionada, como a esquiva ativa de duas vias, são criticamente dependentes de aferências DAérgicas para o EST.

White and Rebec (1993) mostraram que neurônios do EST medial respondem a um estímulo sonoro, em uma tarefa de esquiva condicionada, numa versão de pressionar uma barra para evitar o EI, enquanto os neurônios do EST lateral respondem à atividade neural da resposta emitida. Neste mesmo trabalho, o haloperidol diminuiu esta atividade neural e prejudicou os escores de associação comportamental. Em um outro estudo, Ogren and Archer (1994) mostraram que o

haloperidol e outros antagonistas DAérgicos prejudicam os processos de aquisição e retenção em ratos avaliados na tarefa de esquiva ativa de duas vias.

Estes estudos sugerem que a integração sensoriomotora estriatal é fortemente influenciada pelas aferências DAérgicas, as quais são necessárias para as funções de aprendizagem e memória exigidas para a execução da tarefa de esquiva ativa de duas vias.

Baseando-se nas descrições feitas de que a amnésia associada à DP é decorrente de uma disfunção do sistema DAérgico nigroestriatais (Dubois e Pillon, 1997; Goldman *et al.*, 1998) e no conhecimento de que o tratamento farmacológico dos sintomas motores desta doença consiste principalmente na administração de L-DOPA, associada a um inibidor da dopa-descarboxilase, é de se esperar que este tratamento também possa reverter os déficits cognitivos em pacientes parkinsonianos.

Entretanto, os resultados disponíveis são controversos. Enquanto alguns estudos demonstram uma melhora nas funções cognitivas em pacientes tratados com L-DOPA (Beardsley e Puletti, 1971; Loranger *et al.*, 1972), outros estudos mais recentes demonstram que este tratamento causa apenas uma pequena melhora (Pillon *et al.*, 1989; Growdon *et al.*, 1998) ou, ao contrário, agrava os déficits cognitivos observados na DP (Huber *et al.*, 1989; Poewe *et al.*, 1991; Prasher e Findley, 1991).

Na avaliação do efeito da L-DOPA neste modelo animal, os resultados demonstraram que este tratamento, utilizado em dose suficiente para promover a reposição dos níveis estriatais de DA, não reverteu o déficit cognitivo induzido pelo MPTP, e ainda prejudicou o desempenho dos animais controle no teste de esquiva

ativa de duas vias. Em contraste com estes resultados, outros estudos têm indicado que a reposição de DA melhora o desempenho de macacos tratados com MPTP em tarefas cognitivas (Fernandez-Ruiz *et al.*, 1999; Schneider *et al.*, 1998). Entretanto, um outro estudo evidenciou um prejuízo cognitivo visoespacial tanto em macacos quanto em pacientes com a DP, mesmo após o tratamento com L-DOPA (Vila *et al.*, 1996). Estas diferenças podem ser decorrentes das espécies animais ou das tarefas comportamentais utilizadas em cada experimento.

Por outro lado, o tratamento com L-DOPA alterou a atividade locomotora dos animais de ambos os grupos, observado através do aumento do número de cruzamentos inter-provas. A efetividade desta dose de L-DOPA sobre a atividade motora também foi descrita por Menzaghi e colaboradores (1997), os quais demonstraram que este tratamento altera o comportamento rotatório de ratos com lesão unilateral da SNc induzida pelo MPTP.

Portanto, os resultados do presente estudo estão de acordo com aqueles descritos na literatura de que a L-DOPA não melhora, podendo até piorar, os déficits cognitivos observados na DP, mas atenua os problemas motores desta doença (Huber *et al.*, 1989; Pillon *et al.*, 1989; Poewe *et al.*, 1991; Prasher e Findley, 1991; Growdon *et al.*, 1998).

Considerando estes resultados, parece provável que uma hipótese não-DAérgica possa justificar o prejuízo cognitivo neste modelo de amnésia associada à DP. Neste sentido, Growdon *et al.*, (1998) propuseram um mecanismo não-DAérgico para explicar a ineficácia da L-DOPA terapia em reverter os déficits cognitivos em uma

amostra de 387 pacientes parkinsonianos. Entretanto, a especificidade do modelo usado no presente estudo, afetando a via DAérgica nigroestriatal, evidencia a importância desta via sobre os processos de aprendizagem e memória envolvidos na execução da tarefa de esQUIVA ativa de duas vias.

Apesar da efetividade da L-DOPA em restaurar os níveis estriatais de DA nos ratos lesados com MPTP, verificou-se que este tratamento também causou um aumento significativo nos níveis de DA e seus metabólitos no CX, AMI, HIP e NAc neste grupo de animais. Portanto, o presente estudo sugere que a ineficácia do tratamento com L-DOPA, em reverter o prejuízo cognitivo dos ratos lesados com MPTP, seja decorrente deste aumento significativo de DA em estruturas extra-estriatais, as quais também estão envolvidas na modulação de processos de memória. Esta situação pode ser causada em função da redução do número de neurônios DAérgicos no estriado, capazes de captar a L-DOPA em comparação às outras estruturas cerebrais, nas quais os neurônios DAérgicos não foram lesados. Contudo, não descartamos a influência de outros sistemas de neurotransmissão para explicar a ineficácia da L-DOPA sobre o déficit cognitivo induzido pelo MPTP.

Esta hipótese do aumento de DA em estruturas extra-estriatais é reforçada pelos dados dos animais controle utilizados neste experimento, onde se observou que a administração de L-DOPA aumentou os níveis de DA em todas as estruturas cerebrais estudadas e prejudicou o desempenho destes animais na tarefa de esQUIVA ativa de duas vias.

Dentro deste contexto, existem alguns trabalhos mostrando que muitas substâncias podem melhorar a memória em doses baixas e prejudicá-la com doses elevadas (McGaugh, 1973; Angelucci *et al.*, 1999). Assim, a mesma dose de L-DOPA necessária para repor os níveis normais de DA no estriado e melhorar o desempenho motor dos animais eleva a concentração de DA em outras áreas extra-estriatais, agindo num limite de concentração que prejudica a memória.

Esta hipótese também está de acordo com os estudos feitos por Druzin e colaboradores (2000), os quais mostraram que a microinfusão de agonista DAérgico D₂ no CX frontal de ratos prejudica a memória executiva e a memória de trabalho avaliadas em uma tarefa de labirinto em "U". Por outro lado, como já descrito anteriormente, tem sido demonstrado que a administração intra-estriatal de agonistas DAérgicos D₂ melhora o desempenho de ratos em outras tarefas de aprendizagem e memória (Packard e White, 1991; Packard e McGaugh, 1994). Estas evidências reforçam que o prejuízo cognitivo observado na tarefa de esquiva ativa de duas vias é decorrente da depleção de DA estriatal induzida pela lesão com MPTP, sugerindo que muitos processos mnemônicos dependem de um nível normal de estimulação dos receptores DAérgicos do estriado.

Além disto, estas considerações evidenciam a necessidade de terapias alternativas para o tratamento dos déficits cognitivos associados à DP. Considerando que a base neuroquímica da DP está associada à degeneração dos componentes nigroestriatais pré-sinápticos, levando a um aumento na sensibilidade dos receptores DAérgicos estriatais (Elsworth *et al.*, 1998; Wenning *et al.*, 1998), é provável que as

drogas que ativem estes receptores, direta ou indiretamente, sejam mais efetivas em melhorar os déficits cognitivos observados nesta doença. A partir destas evidências e do recente conhecimento sobre a interação entre os sistemas DAérgico e adenosinérgico estriatais, ressalta-se a possibilidade de se tratar os sintomas cognitivos da DP com antagonistas dos receptores da adenosina.

Neste contexto, vários trabalhos têm demonstrado que a cafeína, um antagonista não seletivo da adenosina, melhora as funções cognitivas avaliadas em diferentes modelos de aprendizagem e memória em animais (Cestari e Castellano, 1996; Angelucci *et al.*, 1999) e em humanos (Lieberman *et al.*, 1987; Warburton, 1995). Por exemplo, tem sido demonstrado que a cafeína em baixas doses melhora os escores de retenção em camundongos submetidos ao teste de esquiva inibitória (Cestari e Castellano 1996; e Angelucci, *et al.*, 1999). Outros estudos, usando outros modelos de aprendizagem e memória, também confirmam que a cafeína melhora o desempenho de roedores nestes testes (Flood *et al.*, 1978; Molinengo *et al.*, 1995). Este efeito também tem sido demonstrado com antagonistas seletivos para os receptores A_1 e A_{2A} (Normile *et al.*, 1994; Kopf *et al.*, 1999), sugerindo o envolvimento de ambos os receptores da adenosina no efeito da cafeína em melhorar a memória.

Estudos em humanos também têm descrito um melhor desempenho em testes psicológicos após o consumo de cafeína, mesmo com doses muito baixas (32 mg) (Lieberman *et al.*, 1987). Jarvis (1993) observou uma melhora cognitiva associada ao consumo diário de cafeína. Outro estudo, usando indivíduos não privados de cafeína, também mostrou uma melhora em testes de atenção, solução de problemas em tarefa

de reconhecimento com retardo ("delay recall task"), mas não no teste de memória de trabalho após o tratamento com baixas doses de cafeína (75 e 150mg) (Warburton, 1995).

Estes resultados de melhora cognitiva, com baixas doses de cafeína, são consistentes com os dados de outros pesquisadores (Clubey *et al.*, 1979; Bättig *et al.*, 1984; Bättig e Buzzi, 1986; Smith *et al.*, 1990), sugerindo que os processos de aprendizagem e memória podem ser melhorados com uma quantidade de cafeína equivalente àquela obtida a partir de 1-2 xícaras de café, 2-4 xícaras de chá ou 3-6 copos de refrigerante do tipo cola, ou seja, o correspondente a 1-2 mg/kg de cafeína. Considerando a diferença entre as espécies (humanos e roedores), estes valores não são muito maiores do que as doses de cafeína usadas no presente estudo (0,1 e 0,3 mg/kg) e que melhoraram os escores cognitivos dos ratos lesados com MPTP.

Curiosamente, não existem estudos a respeito dos efeitos da cafeína sobre o prejuízo cognitivo em pacientes da DP. De fato, os resultados demonstraram que o tratamento com cafeína, nas doses de 0.1 e 0.3 mg/kg, melhorou os escores de aprendizagem e memória envolvidos neste modelo animal de amnésia parkinsoniana. Por outro lado, o tratamento com cafeína 1.0 mg/kg, além de não ter melhorado a performance dos animais controle no treino, reduziu seus escores de retenção e ainda prejudicou os escores de esquiva nos ratos lesados com MPTP durante as sessões treino e teste. Este efeito pode ser explicado pela curva dose-resposta, na forma de U-invertido, observada tanto para a cafeína quanto para outras drogas que melhoram a consolidação da memória (McGaugh, 1973; Angelucci *et al.*, 1999).

Vale ressaltar aqui, também, que a melhora induzida pelo tratamento com cafeína sobre os processos de aprendizagem e memória, envolvidos na tarefa de esquiva ativa de duas vias, foi independente do efeito estimulatório-motor da cafeína. Entretanto, não se pode descartar a importância deste efeito para o tratamento dos sintomas motores da DP, como proposto por inúmeros pesquisadores.

Neste sentido, estudos com modelos animais da DP, usando roedores, têm demonstrado que a combinação de L-DOPA, ou agonistas DAérgicos, com antagonistas adenosinérgicos não-seletivos, como a cafeína, aumenta significativamente o efeito destas drogas sobre o comportamento rotatório, sugerindo que a cafeína pode aliviar os sintomas motores da DP como um adjuvante de agonistas DAérgicos (Fuxe e Ungerstedt, 1974; Fredholm *et al.*, 1976; 1983; Bruns *et al.*, 1986; Casas *et al.*, 1999; 2000; Prat *et al.*, 2000). Resultados similares foram encontrados com um antagonista seletivo para o receptor A_{2A} , o SCH 58261, confirmando a existência da interação A_{2A}/D_2 no estriado, bem como a possibilidade de se usar antagonistas adenosinérgicos para o tratamento das alterações motoras em pacientes parkinsonianos (Popoli *et al.*, 2000).

Em geral, os dados do presente estudo estão de acordo com aqueles descritos anteriormente, pois mostraram que a cafeína em doses baixas pode melhorar os processos de aprendizagem e memória envolvidos na tarefa de esquiva ativa de duas vias, sugerindo, pela primeira vez, que a mesma pode ser efetiva em melhorar os déficits cognitivos observados nos estágios iniciais da DP. Além disso, estes dados confirmam a interação DA/adenosina e seu papel em processos cognitivos, enfatizando a relevância clínica do uso de antagonistas adenosinérgicos, como a cafeína, para o tratamento das alterações cognitivas em pacientes parkinsonianos.

7 – CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente estudo, podemos concluir que:

- A utilização de ratos com lesão parcial da SNc, induzida pela infusão direta de MPTP, e submetidos ao teste de esQUIVA ativa de duas vias, pode constituir um modelo animal de amnésia observada nos estágios iniciais da DP.

- O aumento dos níveis de DA em estruturas extra-estriatais, causado pelo tratamento com L-DOPA, pode ser responsável pela ausência de efeito da L-DOPA sobre os escores de cognitivos observados neste modelo animal, bem como naqueles observados em humanos.

- Os déficits cognitivos induzidos pelo MPTP em ratos podem ser revertidos pelo tratamento com baixas doses de cafeína, sugerindo que este tratamento pode melhorar o efeito amnésico observado nos estágios iniciais da DP.

- Estes dados podem contribuir para uma melhor compreensão e busca de novos tratamentos para as alterações cognitivas observadas em pacientes com DP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGNATI, L.; FUXE, K.; ZINI, I.; LENZI, P.; HÖKFELT, T. Aspects on receptor regulation and isoreceptor identification. **Med. Biol.**, 58: 182-187, 1980.
- AGNATI, L.F.; BENFENATI, F.; SOLFRINI, V.; BIAGINI, G.; FUXE, K.; GUIDOLIN, D.; CARANI, C.; ZINI, I. Intramembrane receptor-receptor interaction: integration of signal transduction pathways in the nervous system. **Neurochem. Int.**, 22: 213-222, 1993.
- ALBANESE, A.; BENTIVOGLIO, M. The organization of dopaminergic and non-dopaminergic mesencephalic neurons in the rat. **Brain Res.**, 238: 421-425, 1982.
- ALBIN, R.; YOUNG, A.B.; PENNEY, J.B. The functional anatomy of basal ganglia disorders. **Trends Neurosci.**, 12: 366-375, 1989.
- ALEXANDER, G.E.; CRUTCHER, M.D. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. **Trends Neurosci.**, 13: 266-271, 1990.
- ALEXANDER, G.E.; DE LONG, M.R.; SRICK, P.L. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. **Rev. Neurosci.**, 9: 357-381, 1986.
- ALLAIN, H.; LIEURY, A.; THOMAS, V.; REYMANN, J.M. GANDON, J.M.; BELLIARD, S. Explicit and procedural memory in Parkinson's disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 49: 179-186, 1995.
- ANGELUCCI, M.E.M.; VITAL, M.A.B.F.; CESÁRIO, C.; ZADUSKY, C.A.; ROSALEN, P.L.; DA CUNHA, C. The effect of caffeine in animal models of learning and memory. **Eur. J. Pharmacol.**, 373: 135-140; 1999.
- ANNETT, L.E.; ROGERS, D.C.; HERNANDEZ, T.D.; DUNNET, T.B. Behavioral analysis of unilateral monoamine depletions in the marmoset. **Brain**, 115: 825-856, 1992.

- APPOLLONIO, I.; GRAFMAN, J.; CLARK, K.; NICHELLI, P.; ZEFFIRO, T.; HALLETT, M. Implicit and explicit memory in patients with Parkinson's disease with and without dementia. **Arch. Neurol.**, 51: 359-367, 1994.
- BADDELEY, A.D. **Working memory**. Oxford Univ. Press, Oxford, 1986.
- BAILEY, E.V.; STONE, T.W. The mechanism of action of amantadine in parkinsonism: a review. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, 216: 246-262, 1975.
- BANDMANN, O. MARSDEN, C.D.; WOOD, N.W. Genetic aspects of Parkinson's disease. **Mov. Disord.**, 13: 203-211, 1998.
- BARTHOLINI, G.; BURKARD, W.F.; PLETSCHER, A.; BATES, H.M. Increase in cerebral catecholamines caused by 3,4-dihydroxyphenylalanine after inhibition of peripheral decarboxylase. **Nature**, 215: 852-853, 1967.
- BÄTTIG, K.; BUZZI, R. Effects of coffee on the speed of subject-paced rapid information processing. **Neuropsychobiology**, 16: 126-130, 1986.
- BÄTTIG, K.; BUZZI, R.; MARTIN, J.R.; FEIERABEND, J.M. The effects of caffeine on physiological functions and mental performance. **Experientia**, 40: 1218-1223, 1984.
- BEARDSLEY, J.V.; PULETTI, F. Personality (MMPI) and cognitive (WAIS) changes after levodopa treatment: occurrence in patients with Parkinson's disease. **Arch. Neurol.**, 25: 145-150, 1971.
- BEISER, D.G.; HOUK, J.C. Model of cortical-basal ganglionic processing: encoding the serial order of sensory events. **J. Neurophysiol.**, 79: 3168-3188, 1998.
- BENABID, A.L.; POLLAK, P.; SIEGNEURETT, E.; HOFFMANN, D.; GAY, E.; PERRET, J. Chronic VIM thalamic stimulation in Parkinson's disease, essential tremor and extra-pyramidal dyskinesia. **Acta Neurochir.**, (Suppl.), 58: 39-44, 1993.
- BENINGER, R.J., MILLER, R. Dopamine D1-like receptors and reward-related incentive learning. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, 22: 335-345, 1998.

- BERGMAN, H.; FEINGOLD, A.; NINI, A.; RAZ, A.; SLOVIN, H.; ABELES, M.; VAADIA, E. Physiological aspects of information processing in the basal ganglia of normal and parkinsonian primates. **Trends Neurosci.**, 21: 32-38, 1998.
- BERNHEIMER, H.; BIRKMAYER, W.; HORNYKIEWICZ, O.; JELLINGER, K.; SEITELBERGER, F. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. **J. Neurol. Sci.**, 20: 415-455, 1973.
- BEZARD, E.; IMBERT, C.; DELOIRE, X.; BIOULAC, B.; GROSS, C.E. A chronic MPTP model reproducing the slow evolution of Parkinson's disease: Evolution of motor symptoms in the monkey. **Brain Res.**, 766: 107-112, 1997.
- BINDMAN, L.; CHRISTOFI, G.; MURPHY, K.; NOWICKY, A. Long-term potentiation (LTP) and depression (LTD) in the neocortex and hippocampus: an overview. In: STONE, T.W. (Ed) **Aspects of synaptic transmission**. London: Taylor & Francis, 3-25, 1991.
- BLISS, T.V.P.; COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation. **Nature**, 361: 31-39, 1993.
- BLISS, T.V.P.; LOMO, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **J. Physiol.**, 232: 331-356, 1973.
- BONNET, A.M. Involvement of non-dopaminergic pathways in Parkinson's disease. **CNS Drugs**, 13: 351-364, 2000.
- BOYCE, S.; KELLY, E.; REAVILL, C.; JENNER, P.; MARSSDAN, C.D. Repeated administration of N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine to rats is not toxic to striatal dopamine neurons. **Biochem. Pharmacol.**, 33: 1747-1752, 1984.
- BRACCO, F. New drugs in the treatment of Parkinson's disease. An introduction. **Adv. Neurol.**, 69: 513-517, 1996.

- BROWN, L.L.; SCHNEIDER, J.S.; LIDSKY, T.I. Sensory and cognitive functions of the basal ganglia. **Curr. Opin. Neurobiol.**, 7: 157-163, 1997.
- BROWN, R.G.; MARSDEN, C.D. Visuospatial function in Parkinson's disease. **Brain**, 109: 987-1002, 1986.
- BRÜCKE, T.; RIEDERER, P. Neurobiologische und pharmakologische untersuchungen zur pathogenese der Parkinson. **Krankheit. Wien. Klin. Wschr.**, 401: 15-16, 1986.
- BRUNS, R.F.; LU, G.H.; PUGSLEY, T.A. Characterization of A₂ adenosine receptor labeled by [³H] NECA in rat striatal membranes. **Mol Pharmacol.**, 29: 331-346, 1986.
- BURN, D.J.; MARK, M.H.; PLAYFORD, E.D.; MARAGANORE, D.M.; ZIMMERMAN, T.R.; DUVOISIN, R.C.; HARDING, A.E.; MARSDEN, C.D.; BROOKS, D.J. Parkinson's disease in twins studied with ¹⁸F-DOPA and positron tomography. **Neurology**, 42: 1894-1900, 1992.
- BURNS, R.S.; CHIUEH, C.C.; MARKEY, S.P.; EBERT, M.H.; JACOBOWITZ, D.M.; KOPIN, I.J. A primate model of parkinsonism: Selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 80: 4546-4550, 1983.
- BUYTENHUIJS, E.L.; BERGER, H.J.C.; VAN SPAENDONCK, K.P.M.; HORSTINK, M.W.I.M.; BORM, G.F.; COOLS, A.R. Memory and learning strategies in patients with Parkinson's disease. **Neuropsychologia**, 32: 335-342, 1994.
- CALNE, D.B.; DUVOISIN, R.C.; KOLLER, W.C. Individualizing therapy in patients with disabling Parkinson's disease symptoms. **Neurology**, (Suppl.1), 44: 8-11, 1994.
- CALNE, D.B.; REID, J.L.; VAKIL, S.D.; RAO, S.; PETRIE, A.; PALLIS, C.A.; GAWLER, J.; THOMAS, P.K.; HILSON, A. Idiopathic parkinsonism treated

- with extracerebral decarboxylase inhibitor in combination with levodopa. **Br. Medic. J.**, 3: 729-732, 1971.
- CARLTON, P.L. Theories and models in psychopharmacology. In: LIPTON M, DIMASCIO A, KILLAR K. (Ed.). **Psychopharmacology: A generation of Progress**. New York: Raven Press, 533-561, 1978.
- CARTER, A.J.; MULLER, R.E. Premipexole, a dopamine D₂ autoreceptor agonist, decreases the extracellular concentration of dopamine in vivo. **Eur. J. Pharmacol.**, 200: 65-72, 1991.
- CASAS, M.; PRAT, G.; ROBLEDO, P.; BARBANOJ, M.; KULISEVSKY, J.; JANE, F. Repeated co-administration of caffeine and bromocriptine prevents tolerance to the effects of caffeine in the turning behavior animal model. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, 9: 515-521; 1999.
- CASAS, M.; PRAT, G.; RUBIO, A.; BARBANOJ, M.; JANE, F. Lack of synergism between caffeine and SKF 38393 on rotational behavior in 6-hydroxydopamine-denervated rats. **Eur. J. Pharmacol.**, 396: 93-99; 2000.
- CASTELLANO, C.; CABIB, S.; PUGLISIALLEGRA, S. Psychopharmacology of memory modulation: Evidence for multiple interaction among neurotransmitters and hormones, **Behav. Brain. Res.**, 77: 1-21, 1996;.
- CEDERBAUM, J.M. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in management of motor response fluctuations in Parkinson's disease. **Neurologic Clinics.**, 8: 31-49, 1990.
- CESTARI, V.; CASTELANO, C. Caffeine and cocaine interaction on memory consolidation in mice. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, 331: 94-104; 1996.
- CLUBLEY, M.; BYE, C.E.; HENSON, T.A.; PECK, A.W.; RIDDINGTON, C.J. Effects of caffeine and cyclizine alone and in combination on human performance, subjective effects and EEG activity. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, 7: 157-163, 1979.
- COLLIS, M.G.; HOURANI, S.M.O. Adenosine receptors subtypes. **Trends. Pharmacol. Sci.**, 14: 360-366, 1993.

- CONWAY, K.A.; HARPER, J.D.; LANSBURY, P.T. Accelerated "*in vitro*" fibril formation by a mutant α -synuclein linked to early onset Parkinson's disease. **Nature Med.**, 4: 1318-1320, 1998.
- COSTALL, B.; MARSDEN, D.; NAYLOR, R.J. PYCOCK CJ. Stereotyped behaviour patterns and hyperactivity induced by amphetamine and apomorphine after discrete 6-hydroxydopamine lesions of extrapyramidal and mesolimbic nuclei. **Brain Res.**, 123: 89-111, 1977.
- COTZIAS, G.C.; VAN WOERT, M.H.; SCHIFFER, L.M. Aromatic amoni acids and modification of parkinsonism. **N. Engl. J. Med.**, 276: 374-379, 1967.
- COTZIAS, G.C.; PAPAVALIIOU, P.S.; GELLENE, R. Modification of parkinsonism:chronic treatment with L-dopa. **N. Engl. J. Med.**, 280: 337-345, 1969.
- CUMMINGS, J.L. Intellectual impairment in Parkinson's disease: clinical, pathological and biochemical correlates. **J. Geriat. Psychiat. Neurol.**, 1: 24-36, 1988.
- CUMMINGS, L.L. Depression and Parkinson's disease: a Review. **Am. J. Psychiat.**, 149: 443-454, 1992.
- D'AMATO, R.J.; LIPMAN, Z.P.; SNYDER, S.H. Selectivity of the parkinsonian neurotoxin MPTP: toxic metabolite MPP⁺ binds to neuromelanin. **Science**, 231: 978-989, 1986.
- DALY, J.W.; BUTTS-LAMB, P.; PADGETT, W. Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system. Interaction with caffeine and related methylxanthines. **Cell. Mol. Neurobiol.**, 1: 69-80, 1983.
- DAUM, I.; SCHUGENS, M.M.; SPIEKER, S.; POSER, U.; SCHOENLE, P.W.; BIRBAUMER, N. Memory and skill acquisition in Parkinson's disease and frontal lobe dysfunction. **Cortex**, 31: 413-432, 1995.
- DAVAL, J.L.; NICOLAS, F.; DORIAT, J.F. Adenosine and pharmacology: how about A₂ receptors. **Pharmacol. Ther.**, 71: 325-335, 1996.

- DAVIS, G.C.; WILLIAMS, A.C.; MARKEY, S.P.; EBERT, M.H.; CALNE, E.D.; REICHERT, C.M.; KOPIN, I.J. Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. **Psychiatry Res.**, 1: 249-254, 1979.
- DE LONG, M.R. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. **Trends Neurosci.**, 13: 281-285, 1990.
- DRUZIN, M.Y.; KURZINA, N.P.; MALININA, E.P.; KOZLOV, A.P. The effects of local application of D2 selective dopaminergic drugs into the medial prefrontal cortex of rats in a delayed spatial choice task. **Behav. Brain Res.**, 109: 99-111, 2000.
- DUBOIS, B.; PILLON, B. Cognitive deficits in Parkinson's disease. **J. Neurology**, 244: 2-8, 1997.
- DUNBAR, G.L.; LESCAUDRON, L.L.; STEIN, D.G. Comparison of GM1 ganglioside, AGF2, and D-amphetamine as treatments for spatial reversal and place learning deficits following lesions of the neostriatum. **Behav. Brain Res.**, 54: 67-79, 1993.
- DUNNETT, S.B.; BJÖRKLUND, A. Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. **Nature**, (Suppl.), 399: A32-A39, 1999.
- DUNNETT, S.B.; IVERSEN, S.D. Sensorimotor impairment following localised kainic acid and 6-hydroxydopamine lesion of the neostriatum. **Brain Res.**, 248: 121-127, 1982.
- DUVOISAN, R.C. Genetics of Parkinson's disease. **Adv. Neurol.**, 45: 307-312, 1987.
- DUVOISIN, R.C. (Ed). **Parkinson's disease**. Third Edition. N.Y., Raven Press, 1991.
- DUVOISIN, R.C. Cholinergic-anticholinergic antagonism in parkinsonism. **Arch. Neurol.**, 17: 124-136, 1967.
- EL MASSIOUI, N.; RACHT DELATOUR, B.V. Contrasting effects of central nucleus of the amygdala and dorsal striatum lesions on active avoidance

- learning and its contextual modification, **Neurosci. Res. Comm.**, 21: 103-111, 1997.
- ELIZAN, T.S.; MOROS, A.; YAHR, D. Early combination of selegiline and low-dose levodopa as initial symptomatic therapy in Parkinson's disease. **Arch. Neurol.**, 48: 31-34, 1991.
- ELSWORTH, J.D.; BRITTAN, M.S.; TAYLOR, J.R.; SLADEK, J.R.; REDMOND, D.E.; INNIS, R.B.; ZEA PONCE, Y.; ROTH, R.H. Upregulation of striatal D2 receptors in the MPTP-treated vervet monkey is reversed by grafts of fetal ventral mesencephalon: an autoradiographic study. **Brain. Res.**, 795: 55-62, 1998.
- ERGIS, A.M.; WINOCUR, G.; SAINT-CYR, J.; VAN DER LINDEN, M.; MELO, B.; FREEDMAN, M. Impaired recognition in Parkinson's disease. **Brain Cogn.**, 35: 310-312, 1997.
- EVERITT, B.J.; ROBBINS, T.W. Amygdala-ventral striatal interactions and reward-related processes. In: J.P. Aggleton (Ed.) **The amygdala**. Wiley, Chichester, 401-430, 1992.
- FABER, R.; TRIMBLE, M.R. Electroconvulsive therapy in Parkinson's disease and other movement disorders. **Mov. Disord.**, 6: 293, 1991.
- FAHN, S. Adverse effects of levodopa. In: OLANOW, C.W.; LIEBERMAN, A.N. (Ed.) **The scientific basis for the treatment of Parkinson's disease**. Lancs, UK., Patheron Publishing Group, 89-112, 1992.
- FAHN, S. Is levodopa toxic? **Neurology**, (Suppl. 3), 47: S184-S195, 1996.
- FEARNLEY, J.; LEES, A.J. Parkinson's disease: neuropathology. **Brain**, 114: 2283-2301, 1991.
- FERNANDES-RUIZ, J.; DOUDET, D.J.; AIGNER, T.G. Long-term cognitive impairment in MPTP-treated rhesus monkey. **Neuroreport**, 7: 102-104, 1995.
- FERNANDEZ-RUIZ, J.; DOUDET, D.; AIGNER, T.G. Spatial memory improvement by levodopa in parkinsonian MPTP-treated monkeys. **Psychopharmacology**, 147: 104-107, 1999.

- FERRAZ, H.B.; ANDRADE, L.A.F.; TUMAS, V.; CALIA, L.C.; BORGES, V. Rural and urban living and Parkinson's disease. **Arq. Neuropsiquiatr.**, 54: 37-41, 1996.
- FERRÉ, S.; FREDHOLM, B.B.; MORELLI, M.; POPOLI, P.; FUXE, K. Adenosine and dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. **Trends Neurosci.**, 20: 482-487, 1997.
- FERRÉ, S.; FUXE, K. Dopamine denervation induces a stronger intramembrane interaction between adenosine A₂ and dopamine D₂ receptors in the neostriatum. **Brain Res.**, 594: 124-130, 1992.
- FERRÉ, S.; FUXE, K.; VON EULER, G.; JOHANSSON, B.; FREDHOLM, B. Adenosine-dopamine interactions in the brain. **Neuroscience**, 51: 501-512, 1992.
- FERRÉ, S.; HERRERA-MARSCHITZ, M.; GRABOWSKA-ANDÉN, M.; UNGERSTEDT, U.; CASAS, M.; ANDÉN, N.E. Postsynaptic dopamine/adenosine interaction: I. Adenosine analogues inhibit a D₂ mediated behaviour in short-term reserpinized mice. **Eur. J. Pharmacol.**, 192: 30-35, 1991.
- FERRÉ, S.; O'CONNOR, W.; FUXE, K.; UNGERSTEDT, U. The striopallidal neurons: a main locus for adenosine-dopamine interaction in the brain. **J. Neurosci.**, 13: 5402-5406, 1993.
- FERRÉ, S.; O'CONNOR, W.; SVENNINGSSON, P.; BJÖRKLUND, L.; LINDBERG, J.; TINNER, B.; STRÖMBERG, I.; GOLDSTEIN, M.; ÖGREN, S.; UNGERSTEDT, U.; FREDHOLM, B.; FUXE, K. Dopamine D₁ receptor-mediated facilitation of GABAergic neurotransmission in the rat strioentopeduncular pathway and its modulation of adenosine A₁ receptor-mediated mechanisms. **Eur. J. Neurosci.**, 8: 1545-1553, 1996.
- FERRÉ, S.; SCOTTI DE CAROLIS, A.; FUXE, K. Postsynaptic antagonistic interaction between adenosine A₁ and dopamine D₁ receptors. **Neuroreport.**, 6: 73-76, 1994.

- FLAHERTY, A.W.; GRAYBIEL, A.M. Output architecture of primate putamen. **J. Neurosci.**, 13: 3222-3237, 1993.
- FLOOD, J.F.; BENNETT, E.L.; ORME, A.E.; ROSENZWEIG, M.R.; JARVIK, M.E., Memory: modification of anisomycin-induced amnesia by stimulants and depressants. **Science**, 199: 324-326; 1978.
- FORNO, L.S.; ALVORD, E.C.JR. The pathology of parkinsonism. Part I: Some observations and new correlations. **Contemp. Neurol.**, 8: 119-130, 1971.
- FREDHOLM, B.B.; FUXE, K.; AGNATI, L. Effect of some phosphodiesterase inhibitors on central dopamine mechanisms. **Eu. J. Pharmacol.**, 38: 31-38, 1976.
- FREDHOLM, B.B.; HERRETA-MARSCHITZ, M. JONZON, B.; LINDSTRÖM, K.; UNGERSTED, U. On the mechanism by which methylxantines enhance apomorphine-induced rotation behaviour in rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 19: 535-541, 1983.
- FREDHOLM, B.B. Purinoceptors in the nervous system. **Pharmacol. Toxicol.**, 76: 228-239, 1995.
- FREEDMAN, M.; OSCAR-BERMAN, M. Selective delayed response deficit in Parkinson's and Alzheimer's disease. **Arch. Neurol.**, 43: 886-990, 1996.
- FULLER, R.W.; STERANKA, L.R. Central and peripheral catecholamine depletion by 1-methyl-4-phenyl-tetrahydropyridine (MPTP) in rodents. **Life Sci.**, 36: 243-247, 1985.
- FUXE, K.; AGNATI, L. Receptor-receptor interactions in the central nervous system. A new integrative mechanism in synapses. **Med. Res. Rev.**, 5: 441-482, 1985.
- FUXE, K.; FERRÉ, S.; ZOLI, M.; AGNATI, L.F. Integrated events in central dopamine transmission as analyzed at multiple levels. Evidence for intramembrane adenosine A_{2A} /dopamine D_2 and adenosine A_1 /dopamine D_1 receptor interactions in basal ganglia. **Brain. Res. Rev.**, 26: 258-273, 1998.

- FUXE, K.; UNGERSTEDT, U. Action of caffeine and theophyllamine on supersensitive dopamine receptors: considerable enhancement of receptor response to treatment with DOPA and dopamine receptor agonists. **Med. Biol.**, 52: 48-54, 1974.
- FUXE, K.; VON EULER, G.; AGNATI, L.; MERLO PICH, E.; O'CONNOR, W.T.; TANGANELLI, S.; LI, X.; TINNER, B.; CINTRA, A.; CARANI, C.; BENFENATI, F. Intramembrane interactions between neurotensin receptors and dopamine D2 receptors as a major mechanism for the neuroleptic-like action of neurotensin. **N.Y. Acad. Sci.**, 668: 186-204, 1992.
- GASBARRI, A.; PACKARD, M.G.; CAMPANA, E.; PACITTI, C. Anterograde and retrograde tracing of projections from the ventral tegmental area to the hippocampal-formation in the rat. **Brain Res. Bull.**, 33: 445-452, 1994.
- GASSER, T.; MULLER-MYHSOK, B.; WSZOLEK, Z.K. et al. A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. **Nat. Genet.**, 18: 262-265, 1998.
- GERFEN, C.R. The neostriatal mosaic: multiple levels of organization. **Trends Neurosci.**, 15: 133-139, 1992.
- GERFEN, C.R.; KEEFE, K.A.; GAUDA, E.B. D1 and D2 dopamine receptors function in the striatum: coactivation of D1 and D2-dopamine receptors and separate populations of neurons. **J. Neurosci.**, 15: 8167-8176, 1995.
- GERLACH, M.; RIEDERER, P.; PRZUNTEK, H.; YODIM, B.H. MPTP mechanisms of neurotoxicity and their implications for Parkinson's disease. **Eur. J. Pharmacol.**, 208: 273-286, 1991.
- GIRAUDO, M.D.; GAYRAUD, D.; HABIB, M. Visuospatial ability of parkinsonians and elderly adults in location memory tasks. **Brain Cogn.**, 34: 259-273, 1997.
- GOEDERT, M.; JAKES, R.; SPILLANTINI, M.G. α -synuclein and the Lewy body. **Neurosci. News**, 1: 47-52, 1998.

- GOLD, P.E.; MCGAUGH, J.L.A. A single- trace, two- processes view of memory storage processes. In: DEUTSCH, D.; DEUTSCH, J.A. (Ed). **Short-term memory**. Academic Press, New York, 355-378, 1975.
- GOLDMAN, W.P.; BATY, J.D.; BUCKLES, V.D.; SAHRMANN, S.; MORRIS, J.C. Cognitive and motor functioning in Parkinson disease - Subjects with and without questionable dementia. **Arch. Neurol.**, 55: 674-680, 1998.
- GRANT, S.E.; SILVA, A.J. Targeting learning. **Trends. Neurosci.**, 17: 71-75, 1994.
- GRAYBIEL, A.M. Neurochemically specified subsystems in the basal ganglia. In: EVERED, D.; O'CONNOR, M. (Ed). **Functions of the basal ganglia**. Ciba Foundation Symposium 107, London, Pritman Press, 114-143, 1984.
- GROWDON, J.H.; KIEBURTZ, K.; MCDERMOTT, M.P.; PANISSET, M.; FRIEDMAN, J.H. Levodopa improves motor function without impairing cognition in mild non-demented Parkinson's disease patients. **Neurology**, 50: 1327-1331, 1998.
- GUILFORD, M.O.; HICKS, L.H.; WOODFORK, C. Caudate-nucleus lesions and active-avoidance performance. **Bull. Psychonomic. Society**, 10: 267-267, 1977.
- HAGAN, J.J.; MIDDLEMISS, D.N.; SHARPE, P.C.; POSTE, G.H. Parkinson's disease: prospects for improved drug therapy. **Trends Pharmacol. Sci.**, 18: 156-163, 1997.
- HALLMAN, H.; JONSSON, G. Neurochemical studies on central dopamine neurons-regional characterization of dopamine turnover. **Med Biol.**, 62: 198-209, 1984.
- HARIK, S.I.; SCHMIDLEY, 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. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 241: 669-676, 1987.

- HAUSER, R.A.; OLANOW, C.W. Orobulal dyskinesia associated with trihexyphenidyl therapy in a patient with Parkinson's disease. **Mov. Disord.**, 8: 512-514, 1993.
- HEIKKILA, R.E.; HESS, A.; DUVOISIN, R.C. Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the mouse: Relationship between monoamine oxidase, MPTP metabolism and neurotoxicity. **Life Sci.**, 36: 231-236, 1985.
- HEIKKILA, R.E.; SONSALLA, P.K. The use of the MPTP-treated mouse as an animal model of parkinsonism. **Can. J. Neurol. Sci.**, 14: 436-440, 1987.
- HEIKKILA, R.E.; SONSALLA, P.K.; DUVOISIN, R.C. Biochemical models of Parkinson's disease. In: BOULTON, A.A.; BAKER, G.B.; JURIO, A.V. (Ed). **Neuromethods**.12. Drugs as tools in neurotransmitter research. N.Y.: The Human Press Inc., 351-384, 1989.
- HIRSCH, E.C.; GRAYBIEL, A.M.; AGID, Y.A. Melanized dopaminergic neurons are differently susceptible to degeneration in Parkinson's disease. **Nature**, 344: 345-348, 1988.
- HORNYKIEWICZ, O. Parkinson's disease and its chemotherapy. **Biochem. Pharmacol.**, 24: 1061-1065, 1975.
- HUBER, S.J.; SHULMAN, H.G.; PAULSON, G.W.; SHUTTLEWORTH, E.C. Dose-dependent memory impairment in Parkinson's disease. **Neurology**, 39:3, 438-40, 1989.
- HUGHES, A.J.; DANIEL, S.E.; KILFORD, L.; HUGHES, A.J.; DANIEL, S.E.; KILFORD, L.; LEES, A.J. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinic-pathological study of 100 cases. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.**, 55: 181, 1992.
- IVERSEN, S.D. Behavioural effects of manipulation of basal ganglia neurotransmitters. In: Functions of basal ganglia, Ciba Symposium, 107, 183-195, Pitman, London, 1984.

- IZQUIERDO, I. Different forms of post-training memory processing. **Behav. Neurol. Biol.**, 51: 171-202, 1989.
- IZQUIERDO, I. The neurobiology of memory consolidation. **Neurosciences**, 18: 1-11, 1992.
- IZQUIERDO, I. The neurobiology of memory consolidation. **Neurosciences**, 18: 1-11, 1992.
- IZQUIERDO, I.; MCGAUGH, J.L. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. **Behav. Pharmacol.**, 11: 517-534, 2000.
- IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. GABA A receptor modulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines. **Trends. Pharmacol. Sci.**, 12: 260-265, 1991.
- IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. On brain lesions, the milkman and sigmundo. **Trends. Neurosci.**, 21: 423-426, 1998.
- JARVIS, M.F.; WAGNER, G.C. Neurochemical and functional consequences following 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) and methamphetamine. **Life Sci.**, 36: 249-254, 1985.
- JARVIS, M.J. Does caffeine intake enhance absolute levels of cognitive performance? **Psychopharmacology**, 110: 45-52, 1993.
- JOEL, D.; WEINER, I. The connections of the dopaminergic system with the striatum in rats and primates: an analysis with respect to the functional and compartmental organization of the striatum. **Neuroscience**, 96: 451-474, 2000.
- JOHANNSEN, J.N.; CHIUH, C.C.; BURNS, R.S.; MARKEY, S.P. Differences in the metabolism of MPTP in the rodent and primate parallel differences in sensitivity to its neurotoxic effects. **Life Sci.**, 36: 219-224, 1985.
- JOHNSON, W.G.; HODGE, S.E.; DUVOISAN, R.C. Twin studies and the genetics of parkinson's disease – a reappraisal. **Mov. Disord.**, 5: 187-194, 1990.
- KAARKOLA, S.; TERAVAINEN, H.; AHTILA, S.; RITA, H.; GORDIN, A. Effects of entacapone, a COMT inhibitor, on clinical disability in parkinsonian patients. **Neurology**, 44: 77-80, 1994.

- KALARIA, R.N.; HARIK, S.I. Blood brain barrier monoamine oxidase: enzymic characterization in cerebral microvessels and other tissues from six mammalian species, including human. **J. Neurochem.**, 49: 856 – 864, 1987.
- KEMP, J.M.; POWELL, T.P.S. The cortico-striate projection in monkey. **Brain**, 93: 525-546, 1970.
- KIMURA M. Role of basal ganglia in behavioral learning. **Neurosci. Res.**, 22: 353-358, 1995.
- KIRKBY, R.J.; POLGAR, S. Active avoidance in laboratory rat following lesions of dorsal or ventral caudate-nucleus. **Physiol. Psychol.**, 2: 301-306, 1974.
- KITADA, T.; ASAKAWA, S.; HATTORI, N.; Matsumine, H.; Yamamura, Y.; Minoshima, S.; Yokochi, M.; Mizuno, Y.; Shimizu, N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. **Nature**, 392: 605-608, 1998.
- KOLLER, W.C. Pharmacologic treatment of parkinsonian tremor. **Arch. Neurol.**, 43: 126-127, 1986.
- KOLLER, W.C.; HUBBLE, J.P. Levodopa therapy in Parkinson's disease. **Neurology**, (Suppl. 3), 40: 40-47, 1990.
- KOLLER, W.C.; MONGOMERY, E.B. Issue in the early diagnosis of Parkinson's disease. **Neurology**, (Suppl.1), 49: S10-S25, 1997.
- KOPF, S.R.; MELANI, A.; PEDATA, F.; PEPEU, G. Adenosine and memory storage: effect of A(1) and A(2) receptor antagonists. **Psychopharmacology**, (Berl.), 146: 214-219; 1999.
- KORNHUBER, J.; WELLER, M.; SCHOPPMAYER, K.; RIEDERER, P. Amantadine and memantine are NMDA receptor antagonists with neuroprotective properties. **J. Neural. Transm.**, (Suppl.), 43: 91-104, 1994.
- KOSTIC, V.; PRZEDBORSKI, S.; FLASTER, E.; STERNIC, N. Early development of levodopa-induced dyskinesias and response fluctuations in young-onset Parkinson's disease. **Neurology**, 41: 202-205, 1991.

- KULISEVSKY, J.; TOLOSA, E. Amantadine in Parkinson's disease. In: KOLLER, W.C.; PAULSON, G. (Ed.). **Therapy of Parkinson's disease**. New York, Marcel Dekker, 143-160, 1990.
- LANG, A.E. Treatment of Parkinson's disease with agents other than levodopa and dopamine agonists: controversies and new approaches. **Can. J. Neurol. Sci.**, (Suppl.), 11: 210-220, 1984.
- LANG, A.E.; LOZANO, A.M. Medical Progress: Parkinson's disease – First of two parts. **Massachusetts Medical Society**, 339: 1044-1053, 1998.
- LANGSTON, J.W. Mechanism of MPTP toxicity: more answers, more questions. **Trends. Pharmacol. Sci.**, 6: 375- 378, 1985.
- LANGSTON, J.W. The etiology of Parkinson's disease with emphasis on the MPTP story. **Neurology**, (Suppl. 3), 47: S153-S160, 1996.
- LANGSTON, J.W.; BALLARD, P.; TETRUD, J.W. IRWIN, I. Chronic parkinsonism in human due to a product of meperidine-analog synthesis. **Science**, 219: 979-980, 1983.
- LANGSTON, J.W.; IRWIN, I.; LANGSTON, E.B.; FORNO, L.S. 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP super(+)): Identification of a metabolite of MPTP, a toxin selective to the substantia nigra. **Neurosci. Lett.**, 48: 87-92, 1984.
- LE BRAS, C.; PILLON, B.; DAMIER, P.; DUBOIS, B. At which steps of spatial working memory processing do striatofrontal circuits intervene in humans? **Neuropsychol.**, 37: 83-90, 1999.
- LEES, A.J. In: Stern, G.M. (Ed). **Parkinson's disease**. Chapman and Hall Medical, 389-413, 1990.
- LI, X.; HEDLUND, P.; FUXE, K. Cholecystokinin octapeptide in vitro and ex vivo strongly modulates striatal dopamine D2 receptors in rat forebrain section. **Eur. J. Neurosci.**, 7: 962-971, 1995.
- LIEBERMAN, H.R.; WURTMAN, R.J.; EMDE, G.G.; ROBERTS, C.; COVIELLA, I.L.G. Effects of low doses of caffeine on human performance and mood. **Psychopharmacology**, 92: 308-312, 1987.

- LINDEN, J. Cloned adenosine A₃ receptors: pharmacological properties, species differences and receptor functions. **Trends. Pharmacol. Sci.**, 15: 298-306, 1994.
- LINDEN, J.; TUCKER, A.L.; LYNCH, K.R. Molecular cloning of adenosine A₁ and A₂ receptors. **Trends. Pharmacol. Sci.**, 12: 326-328, 1991.
- LORANGER, A.W.; GOODELL, H.; LEE, J.E. Levodopa treatment of Parkinson's syndrome: Improved intellectual functioning. **Arch. Gen. Psychiatry**, 26: 163-168, 1972.
- MALAPANI, C.; PILLON, B.; DUBOIS, B.; AGID, Y. Impaired simultaneous cognitive task performance in Parkinson's disease: A dopaminergic-related dysfunction. **Neurology**, 44: 319-326, 1994.
- MALAPANI, C.; RAKITIN, B.; LEVY, R.; MECK, W.H.; DEWEER, B.; DUBOIS, B.; GIBBON, J. Coupled temporal memories in Parkinson's disease: A dopamine-related dysfunction. **J. Cognitive Neurosci.**, 10: 316-331, 1998.
- MALLY, J.; STONE, T.W. The effect of theophylline on parkinsonian symptoms. **J. Pharm. Pharmacol.**, 46: 515-517, 1994.
- MARKEY, S.P.; SCHMUFF, N.R. The pharmacology of the parkinsonian syndrome producing neurotoxin MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) and structurally related compounds. **Medic. Res. Rev.**, 6: 389-429, 1986.
- MARSDEN, C.D. The mysterious motor function of the basal ganglia: The Robert Wartenberg lecture. **Neurology**, 32: 514-539, 1982.
- MARSDEN, C.D.; OBESO, J.A. The functions of basal ganglia and the paradox of stereotaxic surgery in Parkinson's disease. **Brain**, 117: 877-894, 1994.
- MARSDEN, C.D.; PARKES, J.D. Success and problems of long-term levodopa therapy in Parkinson's disease. **Lancet**, 1: 345-349, 1977.
- MARSDEN, C.D. The mysterious function of the basal ganglia: the Robert Wartenberg lecture. **Neurology**, 32: 514-539, 1982.

- MATHIS, C.; PAUL, S.M.; CRAWLEY, J.N. Characterization of benzodiazepine-sensitive behaviors in the A/J and C57BL/6J inbred strains of mice. **Behav. Genetics**, 24: 171-180, 1994.
- MCDONALD, R.J.; WHITE, N.M. A triple dissociation of memory systems: Hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. **Behav. Neurosci.**, 107: 3-22, 1993.
- MCGAUGH, J.L. A multiple-trace view of memory storage processes. **Accademic Nazionale dei Lincei**, 109: 13-28, 1968.
- MCGAUGH, J.L. Drug facilitation of learning and memory. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 13: 229-241, 1973.
- MCGAUGH, J.L. Time dependent processes in memory storage. **Science**, 153: 1351-1358, 1988.
- MCGAUGH, J.L. Time-dependent processes in memory storage. **Science**, 153: 1351-1359, 1966.
- MCGEER, P.L.; ITAGAKI, S.; AKIYAMA, H.; MCGEER, E.G. Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. **Ann. Neurol.**, 24: 574-576, 1989.
- MENESES, M.S.; TEIVE, H.A. **Doença de Parkinson**. Aspectos clínicos e cirúrgicos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
- MENZAGHI, F.; WHELAN, K.T.; RISBROUGH, V.B.; RAO, T.S.; LLOYD, G.K. Interactions between a novel cholinergic ion channel agonist, SIB-1765F and L-DOPA in the reserpine model of Parkinson's disease in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 280: 393-401, 1997.
- MEZEY, E.; DEHEJIA, A.; HARTA, G.; PAPP, M.I.; POLYMEROPOULOS, M.H.; BROWNSTEIN, M.J. α -synuclein in neurodegenerative disorders. Murmuderer or accomplice? **Nature Med.**, 4: 755-757, 1998.
- MIDDELTON, F.A.; STRICK, P.L. Basal ganglia and cerebellar loops: motor and cognitive circuits. **Brain Res.**, 31: 236-250, 2000.

- MIDDLETON, F.A.; STRICK, P.L. The temporal lobe is a target of output from the basal ganglia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93: 8683-8687, 1996.
- MIGUEL, E.C.; RAUCH, S.L.; LECKMAN, J.F. **Neuropsiquiatria dos Gânglios da Base**. São Paulo: Lemos Editorial, 1998.
- MILNER, B.; SQUIRE, L.R.; KANDEL, E.R. Cognitive neuroscience and the study of memory. **Neuron**, 20: 445-468, 1998.
- MOGHAL, S.; RAJPUT, R. Prevalence of movement disorders in elderly community residents. **Neuroepidemiology**, 13: 175-178, 1994.
- MOKRY, J. Experimental-models and behavioral-tests used in the study of parkinsons-disease. **Physiol. Res.**, 44: 143-150, 1995.
- MOLINENGO, L.; ORSETTI, M.; PASTORELLO, B.; SCORDO, I.; GHI, P. Habituation of exploratory activity in rats: action of N₆ phenylisopropyladenosine, caffeine and their combination. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, 19: 1189-1200, 1995.
- MONTASTRUC, J.L.; RASCOL, O.; SENARD, J.M.; RASCOL, A. A randomized controlled-study comparing bromocriptine to which levodopa was later added, with levodopa alone in previously untreated patients with Parkinson's disease – a 5-year follow-up. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, 57: 1034-1038, 1994.
- NISHII, K.; MATSUSHITA, N.; SAWADA, H.; SANO, H.; NODA, Y.; MAMIYA, T.; NABESHIMA, T.; NAGATSU, I.; HATA, T.; KIUCHI, K.; YOSHIZATO, H.; NAKASHIMA, K.; NAGATSU, T.; KOBAYASHI, K. Motor and learning dysfunction during postnatal development in mice defective in dopamine neuronal transmission. **J. Neurosci. Res.**, 54: 450-464, 1998.
- NORMILE, H.J.; GASTON, S.; JOHNSON, G.; BARRACO, R.A. Activation of adenosine A1 receptors in the nucleus accumbens impairs inhibitory avoidance memory. **Behav. Neural Biol.**, 62: 163-166, 1994.
- NYBERG, L.; TULVING, E. Searching for memory systems. **Eur. J. Cognitive Psychol.**, 9: 121-125, 1997.

- OBESO, J.A.; RODRIGUEZ-OROZ, M.C.; RODRIGUEZ, M.; LANCIEGO, J.L.; ARTIEDA, J.; GONZALO, N.; OLANOW, C.W. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. **Trends Neurosci.**, (Suppl.), 23: S8-S19, 2000.
- OGREN, S.O.; ARCHER, T. Effects of typical and atypical antipsychotic drugs on two-way active avoidance. Relationship to DA receptor blocking profile [published erratum appears in *Psychopharmacology (Berl.)* 1994;115(4):550]. **Psychopharmacology (Berl.)**, 114: 383-391, 1994.
- OLANOW, C.W. A rationale for dopamine agonists as a primary therapy for Parkinson's disease. **Can. J. Neurol. Sci.**, 19: 108-112, 1992.
- OLANOW, C.W. Oxidation reactions in Parkinson's disease. **Neurology**, (Suppl. 3), 40: 32-37, 1990.
- OLANOW, C.W.; JENNER, P.; BEAL, M.F. Cell death and neuroprotection in Parkinson's disease. **Ann. Neurol.**, (Suppl.), 44: S1-S196, 1998.
- OLANOW, C.W.; WILLIAM, C.K. An algorithm (decision tree) for the management of Parkinson's disease. Treatment guidelines. **Neurology**, (Suppl. 3), 50: S1-S57, 1998.
- OWEN, A.M.; SAHAKIAN, B.J.; HODGES, J.R.; SUMMERS, B.A.; POLKEY, C. E.; ROBBINS, T.W. Dopamine-dependent frontostriatal planning in early Parkinson's disease. **Neuropsychol.**, 9: 126-140, 1995.
- PACKARD, M.G.; HIRSH, R.; WHITE, N. Different effects of fornix and caudate nucleus lesion on two radial maze tasks: evidence for multiple memory systems. **J. Neurosci.**, 9: 1465-1472, 1989.
- 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. **Behav. Neurosci.**, 106: 439-446, 1992.
- PACKARD, M.G.; MCGAUGH, J.L. Quinpirole and d-amphetamine administration posttraining enhances memory on spatial and cued discriminations in a water maze. **Psychobiol.**, 22: 54-60, 1994.

- PACKARD, M.G.; TEATHER, L.A. Amygdala modulation of multiple memory systems: Hippocampus and caudate-putamen. **Neurobiol. Learn. Mem.**, 69: 163-203, 1998.
- PACKARD, M.G.; WHITE, N.M. Dissociation of hippocampus and caudate nucleus memory systems by posttraining intracerebral injection of dopamine agonists. **Behav. Neurosci.**, 105: 295-306, 1991.
- PALACIOS, J.M.; LANDWEHRMEYER, B.; MENGOD, G. Brain dopamine receptors: characterization, distribution and alteration in disease. In: JANKOVICZ, J.; TOLOSA, E. (Ed). **Parkinson's disease and movement disorders**. Williams & Wilkins, New York, 2. Ed., 35-34, 1993.
- PARENT, A.; HAZRATI, L.N. Anatomical aspects of information processing in primate basal ganglia. **Trends Neurosci.**, 16: 111-115, 1993.
- PARENT, A.; SATO, F.; WU, Y.; GAUTHIER, J.; LÉVESQUE, M.; PARENT, M. Organization of the basal ganglia: the importance of axonal collateralization. **Trends Neurosci.**, (Suppl.), 23: S20-S27, 2000.
- PARKES, J.D.; BAXTER, R.C.; MARSDEN, C.D; REES, J.E. Comparative trial of benzhexol, amantadine and levodopa in the treatment of Parkinson's disease. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.**, 37: 422-426, 1974.
- PARKINSON, J. **An Essay on the Shaking Palsy**. Sherwood, Neely and Jones, 1817.
- PASCUAL-LEONE, A.; GRAFMAN, J.; CLARK, K.; STEWARD, M.; MASSAQUOI, S.; LOU, J.; HALLETT, M. Procedural learning in Parkinson's disease and cerebellar degeneration. **Ann. Neurol.**, 34: 594-602, 1993.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**, 2nd Edition. San Diego: Academic Press, 1986.
- PICCOLI, F.; RIUGGERI, R.M. Dopaminergic agonists in the treatment of Parkinson's disease: a review. **J. Neural. Transm.**, (Suppl.), 45: 187-195, 1995.

- PIERCEY, M.F.; HOFFMANN, W.E.; SMITH, M.W.; HYSLOP, D.K. Inhibition of dopamine neuron firing by pramipexole, a dopamine agonist. **Eur. J. Pharmacol.**, 312: 35-44, 1996.
- PILLON, B.; DUBOIS, B.; BONNET, A.M.; ESTEGUY, M.D.; GUIMARÃES, J.; VIOURET, J.; LHERMITTE, F.; AGID, Y. Cognitive slowing in Parkinson's disease fail to respond to levodopa treatment: The 15-objects test. **Neurology**, 39: 762-767, 1989.
- PINNA A.; DICHIARA, G.; WARDAS, J.; MORELLI, M. Blockade of A_{2A} adenosine c-fos expression induced by D₁ agonist in dopamine-denervated rats. **Eur. J. Neurosci.**, 8: 1176-1181, 1996.
- PIROZZOLO, F.J.; SWIHART, A.A.; REY, G.J.; MAHURIN, R.; JANKOVIC, J. Cognitive impairment associated with Parkinson's disease and other movement disorders. In: JANKOVIC, J.; TOLOSA, E. (Ed). **Parkinson's Disease and Movement Disorders**, 2nd. ed., Williams & Wilkins, Baltimore, 493-510, 1993.
- PODGORNAYA, E.K.; KALKINA, O.V.; ILYUCHENOK, R.Y.; POLYAKOV, O.V. Molecular basis of the activity of the dopamine synapse in the mechanisms of learning and amnesia. **Neurosci. Behav. Physiol.**, 27: 131-136, 1997.
- POEWE, W.; BERGER, W.; BENKE, T.; SCHELOSKY, L. High-speed memory scanning in Parkinson's disease: Adverse effects of L-DOPA. **Ann. Neurol.**, 29: 670-673, 1991.
- POLLAK, P.; BENABID, A.L.; LIMOUSIN, P.; BENAZZOUZ, A. Chronic intracerebral stimulation in Parkinson's disease. **Adv. Neurol.**, 74: 213-220, 1997.
- POPOLI, P.; GIMÉNEZ-LLORT, L.; PEZZOLA, A.; REGGIO, R.; MARTINEZ, E.; FUXE, K.; FERRÉ, S. Adenosine A₁ receptor blockade selectively potentiates the motor effects induced by dopamine D₁ receptor stimulation in rodents. **Neurosci. Lett.**, 218: 209-213, 1996.
- POPOLI, P.; REGGIO, R.; PEZZOLA, A. Effects of SCH 58261, an adenosine A(2A) receptor antagonist, on quinpirole-induced turning in 6-

- hydroxydopamine-lesioned rats. Lack of tolerance after chronic caffeine intake. **Neuropsychopharmacol.**, 22: 522-529, 2000.
- POSTLE, B.R.; LOCASCIO, J.J.; CORKIN, S.; GROWDON, J.H. The time course of spatial and object learning in Parkinson's disease. **Neuropsychol.**, 35: 1413-1422, 1997.
- PRADO ALCALÁ, R.A.; CEPEDA, G.; VERDUZCO, L.; JIMENEZ, A.; VARGAS ORTEGA, E. Effects of cholinergic stimulation of the caudate-nucleus on active-avoidance. **Neurosci. Lett.**, 51: 31-36, 1984.
- PRASHER, D.; FINDLEY, L. Dopaminergic induced changes in cognitive and motor processing in Parkinson's disease: An electrophysiological investigation. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, 54: 603-609, 1991.
- PRAT, G.; ROBLEDO, P.; RUBIO, A.; BARBANOJ, M.; JANE, F.; CASAS, M. Effects of sub-chronic combined treatment with pergolide and caffeine on contralateral rotational behavior in unilateral 6-hydroxydopamine-denervated rats. **Brain Res.**, 23: 376-379, 2000.
- RAJAPUT, A.H. Adverse effects of ergot-derivative dopamine agonists. In: OLANOW, C.W.; OBESO, J.A. (Ed.). **Dopamine agonists in early Parkinson's disease**. Kent, UK. Wells Medical, 209-216, 1997.
- RAJAPUT, A.H.; ROZDIESKY, B.; RAJAPUT A. Accuracy of clinical diagnosis of parkinsonism: a prospective study. **Can. J. Neurol. Sci.**, 18: 275, 1991.
- RIBEIRO, J. A. Adenosine A_{2A} receptor interactions with receptors for other neurotransmitters and neuromodulators. **Eur. J. Pharmacol.**, 375: 101-113, 1999.
- RICHARDSON, P.J.; KASE, H.; JENNER, P.G. Adenosine A_{2A} receptor antagonists as a new agents for the treatment of Parkinson's disease. **Trends Pharmacol. Sci.**, 18: 338-344, 1997.
- RIEDERER, P.; WUKETICH, S. Time course of nigrostriatal degeneration in Parkinson's disease: a detailed study of influential factors in human brain amine analogues. **J. Neural Transm. Park. Dis. Dement. Sect.**, 38: 277-301, 1976.

- RIEDERER, P.; YODIM, M.B. Monoamine oxidase activity and monoamine metabolism in brains of parkinsonian patients treated with L-deprenyl. **J. Neurochem.**, 46: 1359-1365, 1986.
- RIEDERER, P.; YODIM, M.B.H. MPTP induced dopaminergic neurotoxicity – a useful model in the study of Parkinson's disease? **Neurochem. Int.**, 11: 379-381, 1987.
- RIEDL, A.G.; WATTS, P.M.; JENNER, P.; MARSDEN, C.D. P450 enzymes and Parkinson's disease: the story so far. **Mov. Disord.**, 13: 212-220, 1998.
- RIEKKINEN, P.; KEJONEN, K.; LAAKSOM M.P.; SOININEN, H.; PARTANEN, K.; RIEKKINEN, M. Hippocampal atrophy is related to impaired memory, but not frontal functions in non-demented Parkinson's disease patients. **Neuroreport**, 9: 1507-1511, 1998.
- ROBBINS, T.W. CADOR, M.; TAYLOR, J.R.; EVERITT, B.J. Limbic striatal interactions in reward-related processes. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, 13: 155-162, 1989.
- ROBBINS, T.W. Chemical neuromodulation of frontal-executive functions in humans and other animals. **Exp. Brain Res.**, 133: 130-138, 2000.
- ROBERTS, A.C.; DESALVIA, M.A.; WILKINSON, L.S.; COLLINS, P.; MUIR, J.L.; EVERITT, B.J.; ROBBINS, T.W. 6-Hydroxydopamine lesions of the prefrontal cortex in monkeys enhance performance on an analog of the wisconsin card sort test. Possible interactions with subcortical dopamine. **J. Neurosci.**, 14: 2531-2544, 1994.
- ROBERTS, J.V.; CORA-LOCATELLI, G.; BRAVI, D.; AMANTEA, M.A.; MOURADIAM, M.M.; CHASE, T.N. Catechol-O-methyltransferase inhibitor tolcapone prolongs levodopa/carbidopa action in parkinsonian patients. **Neurology**, 44: 2685-2688, 1994.
- ROELTGEN, D.P.; SCHNEIDER, J.S. Task persistence and learning ability in normal and chronic low dose MPTP-treated monkeys. **Behav. Brain Res.**, 60: 115-124, 1994.

- ROLLS, E.T. Neurophysiology and cognitive functions of the striatum. **Rev. Neurol. (Paris)**, 150: 648-660, 1994.
- RONCACCI, S.; TROISI, E.; CARLESIMO, G.A.; NOCENTINI, U.; CALTAGIRONE, C. Implicit memory in parkinsonian patients: evidence for deficient skill learning. **Eur. Neurol.**, 36: 154-159, 1996.
- ROUTTINEN, H.M.; RINNE, U.K. Entacapone prolongs levodopa response in a one month double blind study in parkinsonian patients with levodopa related fluctuations. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.**, 60: 36-40, 1996.
- ROZAS, G.; LÓPEZ -MARTÍN, E.; GUERRA, M.J.; LABANDEIRA-GARCÍA, J.L. The overall rod performance test in the MPTP-treated-mouse model o Parkinsonism. **J. Neurosci. Meth.**, 165-175, 1998.
- RUCKERT, N.; BUBSER, M.; SCHMIDT, W.J. 6-hydroxydopamine lesion of locus coeruleus and the antiparkinsonian potential of NMDA-receptor antagonists in rats. **J. Neural Transm.**, 104: 363-377, 1997.
- RYAN, L.J.; CLARK, K.B. Alteration of neuronal response in the subthalamic nucleus following globus pallidus and neostriatal lesions in rats. **Brain Res. Bull.**, 29: 319-327, 1992.
- RYBICKI, B.A; JOHNSON, C.C.; UMAN, J.; PRELL, J.M. Parkinson's disease mortality and the industrial use of heavy metals in michigan. **Mov. Disord.**, 8: 87-92, 1993.
- SALMON, D.P.; BUTTERS, N. Neurobiology of skill and habit learning. **Curr. Opin. Neurobiol.**, 5: 184-190, 1995.
- SCHNEIDER, J.S.; TINKER, J.P.; VAN VELSON, M.; MENZAGHI, F.; LLOYD, G.K. Nicotinic acetylcholine receptor agonist SIB-1508Y improves cognitive functioning in chronic low-dose MPTP-treated monkeys. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 290: 731-739, 1999.
- SCHNEIDER, J.S.; UNGUEZ, G.; YUWILER, A.; BERG, S.C.; MARKHAM, C.H. Deficits in operant-behavior in monkeys treated with n-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). **Brain**, 111: 1265-1285, 1988.

- SCHNEIDER, J.S.; VAN VELSON, M.; MENZAGHI, F.; LLOYD, G.K. Effects of the nicotinic acetylcholine receptor agonist SIB-1508Y on object retrieval performance in MPTP-treated monkeys: Comparison with levodopa treatment. **Ann. Neurol.**, 43: 311-317, 1998.
- SCHWAB, R.S.; ENGLAND, A.C.Jr.; POSKANZER, D.C.; YOUNG, R.R. Amantadine in the treatment of Parkinson's disease. **JAMA**, 208: 1168-1170, 1969.
- SEMCHUCK, K.M.; LOVE, E.J.; LEE, R.G. Parkinson's disease and exposure to agricultural work and pesticide chemicals. **Neurology**, 42:1328-2335, 1992.
- SEMCHUK, K.M.; LOVE, E.J. LEE, R.G. Parkinson's disease: a test of the multifactorial etiologic hypothesis. **Neurology**, 43: 1173-1180, 1993.
- SETLOW, B.; MCGAUGH, J.L. D2 dopamine receptor blockade immediately post-training enhances retention in hidden and visible platform versions of the water maze. **Learn. Mem.**, 7: 187-191, 2000.
- SHULZER, M.; MAK, E.; CALNE, D.B. The antiparkinson efficacy of deprenyl derives from transient improvement that is likely to be symptomatic. **Ann. Neurol.**, 32: 795-798, 1992.
- SIBLEY, D.R.; MONSMA, F.J. Molecular biology of dopamine receptors. **Trends. Pharmacol. Sci.**, 13: 61-69, 1992.
- SIEGFRIED, J. Traitement du parkinsonisme avec la L-dopa associée à un inhibiteur de la décarboxylase. **Med. Hyg.**, 27: 543-545, 1969.
- SILVER, D.E.; RUGGIERI, S. Initiating therapy for Parkinson's disease. **Neurology**, (Suppl. 6), 50: S18-S22, 1998.
- SMITH, A.P.; RUSTED, J.M.; EATON-WILLIAMS, P.; SAVORY, M.; LEATHWOOD, P. Effects of caffeine given before and after lunch on sustained attention. **Neuropsychobiol.**, 23: 160-163, 1990.
- SMITH, Y.; KIEVAL, J.Z. Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia. **Trends Neurosci.**, (Suppl.), 23: S28-S33, 2000.

- SPENCER, S.E.; WOOTEN, G.F. Altered pharmacokinetics of L-DOPA metabolism in rat striatum deprived of dopaminergic innervation. **Neurology**, 34: 1105-1108, 1984.
- SPILLANTINI, M.G.; SCHMIDT, M.L.; LEE, V.M.Y.; TROJANOWSKI, J.Q.; JAKES, R.; GOEDERT, M. α -synuclein in Lewy bodies. **Nature**, 388: 839-890, 1997.
- SQUIRE, L.R. Mechanisms of memory. **Science**, 232: 1612-1619, 1986.
- SQUIRE, L.R. **Memory and Brain**. Oxford University Press, 1987.
- SQUIRE, L.R. Memory and hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys and humans. **Psychological Rev.**, 99: 195-221, 1992.
- SQUIRE, L.R.; KNOWLTON, B.; MUSEN, G. The structure and organization of memory. **Ann. Rev. Psychol.**, 44: 453-495, 1993.
- SQUIRE, L.R.; ZOLA-MORGAN, S. Memory: brain systems and behavior. **Trends. Neurosci.**, 11: 170-175, 1988.
- STARKSTEIN, S.E.; PREZIOSI, T.J.; BOLDUC, P.L.; et al. Depression in Parkinson's disease. **J. Nerv. Ment. Dis.**, 178: 27-31, 1990.
- STEBBINS, G.T.; GABRIELI, J.D.E.; MASCIARI, F.; MONTI, L.; GOETZ, C.G. Delayed recognition memory in Parkinson's disease: a role for working memory? **Neuropsychol.**, 37: 503-510, 1999.
- STEIGER, M.J.; LLEDO, P.; QUINN, N.P.; MARSDEN, C.D.; TURNER, P.; JENNER, P.G. Debrisoquine hydroxylation in Parkinson's disease. **Acta Neurol. Scand.**, 86: 159-164, 1991.
- STERN, M.B. Contemporary approaches to the pharmacotherapeutic management of Parkinson's disease: An overview. **Neurology**, (Suppl.1), 49: S2-S9, 1997.
- STOOF, J.C.; KEBABIAN, J.W. Opposing roles for D1 and D2 receptors in efflux of cyclic AMP from rat striatum. **Nature**, 294: 366-368, 1981.
- STOOF, J.C.; WINOGRODZKA, A.; MUISWINKEL, F.L.V.; WALTERS, E.CH.; VOORN, P.; GROENEWEGEN, H.J.; BOOIJ, J.; DRUKARCH, B. Leads for the development of neuroprotective treatment in Parkinson's disease and brain

- imaging methods for estimating treatment efficacy. **Eur. J. Pharmacol.**, 375: 75-86, 1999.
- SUNAHARA, R.K.; SEEMAN, P.; VAN TOL, H.H.; NIZNIK, H.B. Dopamine receptors and antipsychotic drug response. **Br. J. Psychiatry.**, 163: 31-38, 1993.
- SUNDSTROM, E.; JONSSON, G. Pharmacological interference with the neurotoxic action of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on central catecholamine neurons in the mouse. **Eur. J. Pharmacol.**, 110: 293-299, 1985.
- SVENNINGSSON, P.; LE MOINE, C.; FISIONE, G.; FRELDHOLM, B.B. Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A2A receptors. **Prog. Neurobiol.**, 59: 355-396, 1999.
- TANDBERG, E.; LARSEN, J.P.; AARSLAND, D.; CUMMINGS, J.L. The occurrence of depression in Parkinson's disease. **Arch. Neurol.**, 53: 175-179, 1996.
- TANILA, H.; BJORKLUND, M.; RIEKKINEN, P. Cognitive changes in mice following moderate MPTP exposure. **Brain Res. Bull.**, 45: 577-582, 1998.
- TANNER, C.M.; OTTMAN, R.; ELLENBERG, J.H.; GOLDMAN, S.M.; MAYEUX, R.; CHAN, P.; LANGSTON, J.W. Parkinson's disease (PD) concordance in elderly male monozygotic (MZ) and dizygotic (DZ) twins. **Neurology**, (Suppl.), 48: 42002, 1997.
- TASKER, R.R. Thalamotomy. **Neurosurg. Clin. A. Am.**, 1: 841-864, 1990.
- TATTON, W.G.; GREENWOOD, C.E. Rescue of dying neurons: a new action for deprenyl in MPTP parkinsonism. **J. Neurosci. Res.**, 30: 666-672, 1991.
- TAYLOR, A.E.; SAINT-CYR, J.A.; LANG, A.E. Frontal lobe dysfunction in Parkinson's disease: the cortical focus of neostriatal outflow. **Brain**, 109: 845-883, 1986.
- THOMAS, V.; REYMANN, J.M.; LIEURY, A.; ALLAIN, H. Assessment of procedural memory in Parkinson's disease. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.**, 20: 641-650, 1996.

- THOMAS-OLLIVIER, V.; REYMAN, J.M.; LE MOAL, S.; SCHUCK, S.; LIEURY, A.; ALLAIN, H. Procedural memory in recent-onset Parkinson's disease. **Dementia & Geriatric Cognitive Disorders**, 10: 172-180, 1999.
- THOMPSON, R.F.; KIM, J.J. Memory systems in the brain and localization of a memory. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 93: 13438-13444, 1996.
- TISSOT, R.; BARTHOLINI, G.; PLEISCHER, A. Drug-induced changes of extracerebral dopa metabolism in man. **Arch. Neurol.**, 20: 187-190, 1969.
- UETTI, R.J.; AHLISKOG, J.E. Comparative review of dopamine receptors agonists in Parkinson's disease. **Drugs**, 5: 369-388, 1996.
- TULVING, E.; MARKOWITSCH, H.J. Episodic and declarative memory: Role of the hippocampus. **Hippocampus**, 8: 198-125, 1997.
- VERSCHUEREN, S.M.P.; SWINNEN, S.P.; DOM, R.; DE WEERDT, W. Interlimb coordination in patients with Parkinson's disease: Motor learning deficits and the importance of augmented information feedback. **Exp. Brain Res.**, 113: 497-508, 1997.
- VILA, M.; HERRERO, M.T.; LEVY, R.; FAUCHEUX, B.; RUBERG, M.; GUILLEN, J.; LUQUIN, M.R.; GURIDI, J.; JAVOY AGID, F.; AGID, Y.; OBESO, J.A.; HIRSCH, E.C. Consequences of nigrostriatal denervation on the gamma-aminobutyric acid neurons of substantia nigra pars reticulata and superior colliculus in parkinsonian syndromes. **Neurology**, 46: 802-809, 1996.
- WARBURTON, D.M. Effects of caffeine on cognition and mood without caffeine abstinence. **Psychopharmacology (Berl.)**, 119: 66-70, 1995.
- WARD, C.D.; GIBB, W.R. Research criteria for Parkinson's disease. In: STREIFER, M.B.; KORCZYN, A.D.; MELAMED, E.; YODIM, M.B.H. (Ed). **Advances in Neurology**. Raven Press, New York, 245-249, 1990.
- WEDER, B.J., LEENDERS, K.L., VONTOBEL, P., NIEHUSMEIER, M., KEEL, A., ZAUNBAUER, W., VONESCH, T., LUDIN, H.P. Impaired somatosensory discrimination of shape in Parkinson's disease: Association with caudate nucleus dopaminergic function. **Human Brain Mapping**, 8: 1-12, 1999.

- WENNING, G.K.; DONNEMILLER, E.; GRANATA, R.; RICCABONA, G.; POEWE, W. 123I-beta-CIT and 123I-IBZM-SPECT scanning in levodopa-naive Parkinson's disease. **Mov. Disord.**, 13: 438-45, 1998.
- WHITE IM, AND REBEC GV. Responses of rat striatal neurons during performance of a lever-release version of the conditioned avoidance response task. **Brain. Res.**, 616: 71-82, 1993.
- WILSON. M.A.; TONEGAWA, S. Synaptic plasticity, place cells and spatial memory: Study with second generation knockouts. **Trends. Neurosci.**, 20: 102-106, 1997.
- WINACUR, G.; MILLS, J.A., Effects of caudate lesions on avoidance behavior in rats. **J. Comp Physiol. Psych.**, 8:39-46, 1969.
- WISE, S.P. The role of the basal ganglia in procedural memory. **Seminars in the Neurosciences**, 8: 39-46, 1996.
- WOOD, N. Genes and Parkinsonism. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.**, 62: 305-309, 1997.
- YAHR, M.D.; DUVOISIN, R.C.; MENDOZA, M.R. Modification of L-DOPA therapy of parkinsonism by alpha-methyldopa hydrazine (MK 486). **Trans. Am. Neurol. Assoc.**, 96: 55-58, 1971.
- YODIM, M.B.H.; RIEDERER, P. Understanding Parkinson's Disease. **Scientific American**, 38-45, 1997.

ANEXOS

Trabalhos Publicados

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. **Behav. Brain Res.**, 124: 9-18, 2001.

GEVAERD, M.S.; TAKAHASHI, R.N.; SILVEIRA, R.; DA CUNHA, C. Caffeine reverses the memory disruption induced by intra-nigral MPTP-injection in rats. **Brain Res. Bull.**, 55: 101-106, 2001.

GEVAERD, M.S.; MIYOSHI, E.; SILVEIRA, R.; CANTERAS, N.S.; TAKAHASHI, R.N.; DA CUNHA, C. Levodopa restores striatal dopamine level but fails to reverse MPTP-induced memory deficits in rats. **Int. J. Neuropsychopharmacol.**, no prelo.