

ANA PAULA IACOPUCCI

**ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES
NMDA NO COLÍCULO INFERIOR SOBRE A
CATALEPSIA INDUZIDA PELO L-NOARG EM RATOS**

Bragança Paulista – SP

2010

ANA PAULA IACOPUCCI

**ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES
NMDA NO COLÍCULO INFERIOR SOBRE A
CATALEPSIA INDUZIDA PELO L-NOARG EM RATOS**

ORIENTADORA

PROFA. DRA. LIANA LINS MELO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco (USF) para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Bragança Paulista – SP

2010

WM 197 Jacopucci, Ana Paula.
J18e Estudo do envolvimento dos receptores NMDA no
 colículo inferior sobre acatalepsia induzida pelo
 L-NOARG em ratos / Ana Paula Jacopucci. --
 Bragança Paulista, 2010.
 71 p.

 Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-
 Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da
 Universidade São Francisco.
 Orientação de: Liana Lins Melo.

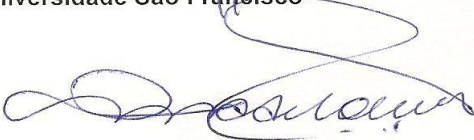
 1. Catalepsia. 2. Óxido nítrico. 3. Colículo inferior.
 I. Título. II. Melo, Liana Lins.

Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de
Processamento Técnico da Universidade São Francisco.


IACOPUCCI, Ana Paula. "Estudo do Envolvimento dos Receptores NMDA no Colículo Inferior sobre a Catalepsia Induzida pelo L-NOARG em Ratos". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em vinte e três de Fevereiro de 2010 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



**Profa. Dra. Liana Lins Melo - Orientadora e Presidente
Universidade São Francisco**



**Profª. Drª. Márcia Aparecida Antônio
Universidade São Francisco**



**Profª. Drª. Regina Barbosa
Universidade Federal de São Paulo_ UNIFESP**

Dedicatória

“A minha mãe, que não está mais presente em minha vida,
mas que me muito me ensinou”.

“Ao meu pai, que nunca mediu esforços para me ajudar”.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e pela sabedoria concedida;

Aos meus pais Alcides e Eunice (*in memoriam*)

“A vocês, que abriram as portas do meu futuro, iluminando o meu caminho com a luz mais intensa que encontraram: o estudo”.

Ao meu querido noivo Rafael Magrini Oliveira pelo carinho, amor e principalmente pela paciência;

Aos meus queridos irmãos Valmir e Valdecir, que apesar da distância, sempre me apoiaram;

À Profa. Dra. Liana Lins Melo, pela oportunidade de trabalhar sob sua orientação e, sobretudo, pelo constante apoio e confiança demonstrado durante o desenvolvimento desta dissertação;

Ao Prof. Ms. Joaquim Gilberto de Oliveira, pela oportunidade e confiança;

A Lucianne, Roseli e Roberto por toda ajuda dada nos momentos em que mais precisei.

As queridas amigas Isabel e Carla, não só pelas palavras de conforto, mas também pelo incentivo e todos os momentos compartilhados.

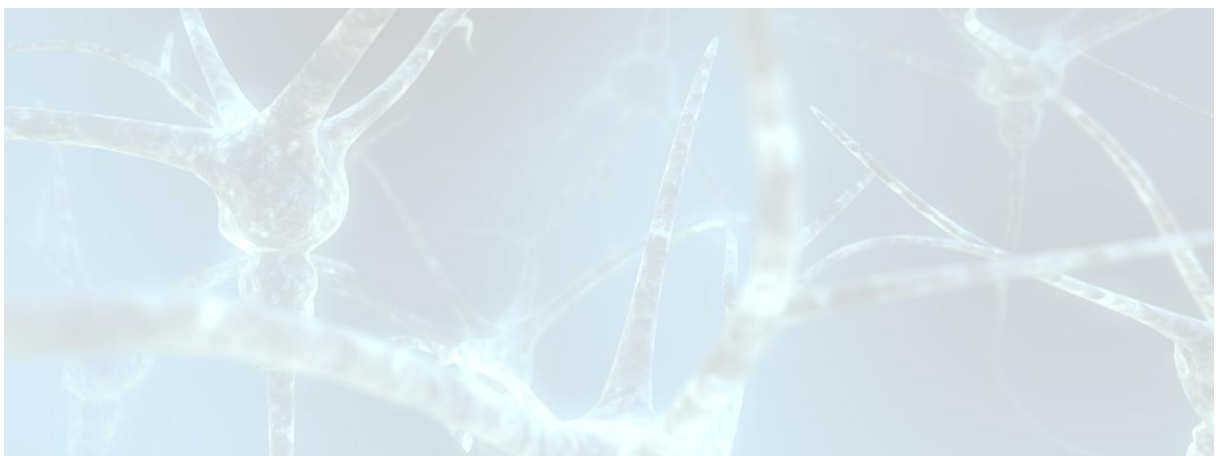
A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação.

“A Percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o mistério passará pela vida sem ver nada”.

(ALBERT EINSTEIN)

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS	5
LISTA DE FIGURAS	6
I. INTRODUÇÃO	8
1.1. COLÍCULO INFERIOR	9
1.1. NÚCLEOS DA BASE E CONTROLE MOTOR.....	14
1.2. ÓXIDO NÍTRICO.....	19
1.3. NO E CATALEPSIA	22
1.4. ÓXIDO NÍTRICO, GLUTAMATO E COLÍCULO INFERIOR	23
1.5. NO E DOPAMINA	24
II. JUSTIFICATIVA	27
III. OBJETIVOS	29
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1. ANIMAIS.....	32
4.2. DROGAS E DOSES	32
4.3. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.....	32
4.4. DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS	33
4.5. MICROINJEÇÃO DE DROGAS	34
4.6. EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DO EFEITO DE BLOQUEIO DE RECEPTOR NMDA NO CI	34
4.7. EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DO EFEITO DO L-NOARG MICROINJETADO DIRETAMENTE NO CI	35
4.8. MEDIDA DA CATALEPSIA.....	36
4.9. PERFUSÃO E ANÁLISE HISTOLÓGICA	36
4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
V. RESULTADOS	38
5.1. EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DO EFEITO DE BLOQUEIO DE RECEPTOR NMDA NO CI.....	39
5.2. EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DO EFEITO DO L-NOARG MICROINJETADO DIRETAMENTE NO CI.....	40
VI. DISCUSSÃO	43
VII. CONCLUSÃO	50
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
IX. ANEXOS	67



RESUMO



RESUMO

O colículo inferior (CI) está primariamente envolvido com o processamento da informação auditiva, mas também integra informações sensoriais de natureza aversiva. Algumas evidências sugerem que o substrato neural responsável pelo comportamento defensivo no CI também pode ser regulado por aminoácidos excitatórios, uma vez que microinjeções de NMDA nessa estrutura induzem comportamentos defensivos como, alerta, congelamento e fuga caracterizada por saltos e galope, que são bloqueadas pelo AP7, um antagonista competitivo de receptor NMDA. Também tem sido demonstrado que um doador de óxido nítrico (NO) microinjetado diretamente no CI induz reação de fuga que pode ser inibida pelo AP7, sugerindo que o NO pode induzir respostas defensivas nessa estrutura através de mecanismos dependentes de glutamato. Também tem sido demonstrado que a administração i.p. de L^G-nitro-arginina (L-NOARG), um inibidor da síntese de NO, induz catalepsia de maneira dose-dependente. A catalepsia pode ser definida por um estado de rigidez muscular e ausência de atividade espontânea (acinesia). O presente trabalho investigou se a microinjeção de AP7 diretamente no CI é capaz de influenciar a catalepsia induzida pela administração de L-NOARG (ip). Também foi investigado se a microinjeção de L-NOARG diretamente no CI poderia influenciar o comportamento motor de ratos. Foram usados (n = 45) ratos Wistar, machos que foram submetidos à cirurgia para implante de uma cânula no CI. Os animais foram distribuídos em cinco grupos, que receberam uma microinjeção de AP7 (10 ou 20 nmol/0,5 µl) ou salina fisiológica diretamente no CI antes da administração sistêmica de L-NOARG (90 mg/kg) ou veículo. Imediatamente depois foram submetidos ao teste de catalepsia. Outros três grupos de animais (n = 29) receberam microinjeções de L-NOARG (50 ou 100 nmol/0,5 µl) ou veículo no CI e uma hora depois os animais foram submetidos ao teste de catalepsia. Os resultados mostraram que a microinjeção de AP7 diretamente no CI reverteu significativamente a catalepsia produzida pela administração intraperitoneal de L-NOARG. Entretanto, o L-NOARG microinjetado diretamente no CI não foi capaz de modificar o tempo de catalepsia. Com base nesses dados pode-se sugerir que a neurotransmissão glutamatérgica no CI pode exercer um papel modulatório importante na catalepsia induzida pelo L-NOARG (ip).



ABSTRACT

ABSTRACT

The inferior colliculus (IC) is primarily involved in auditory information processing but also integrates sensory information of aversive nature. Much evidence suggests that the neural substrates responsible for defensive behavior in the IC can also be regulated by excitatory amino acids since microinjections of NMDA into this structure induce defensive behaviors, characterized by running, rearing, and jumping, that are prevented by AP7, a competitive NMDA receptor-channel blocker. It has been shown that a nitric oxide (NO) donor injected into the IC induces flight reaction. This reaction was inhibited by AP7, suggesting that NO may induce defensive responses in this structure through glutamate-dependent mechanisms. Interestingly, it has been shown that acute *ip* administration of L^G-nitro-arginine (L-NOARG), a nitric oxide synthase inhibitor, induces catalepsy in a dose-dependent manner. Linking these two pieces of information, this work examined whether the microinjection of the AP7, an NMDA antagonist receptors into the IC is able to influence the catalepsy induced by systemic injections of L-NOARG. It was also examined if microinjection of L-NOARG into the IC could influence the motor behavior in rats. Each rat had a cannula implanted in the IC and received microinjection of AP7 (10 or 20 nmol/0,5 µl) or saline into the IC prior to systemic administration of L-NOARG (90 mg/kg). Immediately after that they were submitted to the wooden bar test where three catalepsy evaluations were recorded during 300 seconds. Another group of animals received microinjections of L-NOARG (50 or 100 nmol/0,5 µl) or saline into the IC and an hour after the animals were placed on the wood bar test and the motor behavior was evaluated. The results showed that IC microinjection of AP7 significantly reversed the catalepsy elicited by systemic injections of L-NOARG. However L-NOARG microinjected directly into the IC was not able to influence the catalepsy. Based on these findings, it is suggested that glutamatergic mechanisms in the IC may have a modulatory role in the L-NOARG (*ip*)-induced catalepsy.

LISTA DE ABREVIATURAS

7-NI	7-nitroindazole
AMPA	alpha-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionato
AP7	ácido 2-amino-7-fosfonoheptanóico
BH ₄	tetra-hidrobiopterina
CI	colículo inferior
DA	dopamina
DP	doença de parkinson
eNOS	forma endotelial da sintase do óxido nítrico
FMN	mononucleótido de flavina
GLU	glutamato
H-ARG	NG-hidroxi-L-arginina
iNOS	forma induzida da sintase do óxido nítrico
L-NOARG	L-NG-nitro arginina
NADPH	fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADPH-d	β nicotinamida adenina dinucleotidio fosfato diaforase
NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS	forma neuronal da sintase do óxido nítrico
NO	óxido nítrico
NOS	sintase do óxido nítrico

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1: Fotografia de um corte sagital do encéfalo de rato indicando a localização anatômica do Colículo Inferior. Modificado de: Winer e Schreiner, 2005.9
- Fig. 2: Vista posterior do CI de rato. MB: Mesencéfalo; IC: Colículo Inferior; ICc: Colículo Inferior, núcleo central; ICe: Colículo Inferior, córtex externo; Colículo Inferior, ICd: Colículo Inferior, córtex dorsal; PAG: Substância cinzenta periaquedutal. Modificado de Solan et al., 2008) 10
- Fig. 3: Alça motora no sistema nervoso. Abreviações: SNc, substancia negra parte compacta; SNr, substância negra parte reticulada; GPe, globo pálido segmento externo; GPI, globo pálido segmento interno; NST, núcleo subtalâmico; Glu, glutamato; GABA, ácido gama-aminobutírico; DA, Dopamina; Encef., encefalina; Sub. P, substância P (Modificado de Lange et al., 1997). 16
- Fig. 4: Alteração da neurotransmissão na alça motora na doença de Parkinson. Para abreviações ver Fig. 3 (Modificado de Lange et.al., 1997). 19
- Fig. 5: Reações catalisadas e co-fatores da NOS. AMPA: receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazoleproprônio; NMDA: receptor N-metil-D-aspartato (Modificado de Salum et al., 2008a).21
- Fig. 6. Ilustração da liberação do NO a partir da ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e sua interferência na terminação dopaminérgica; 1: neurônio glutamatérgico pré-sináptico; 2: neurônio pós-sináptico; 3: neurônio dopaminérgico (Modificado de Salum et al., 2008a).25
- Fig. 7: Descrição das etapas para realização do Experimento 1.....35
- Fig. 8: Descrição das etapas para realização do Experimento 2.....36
- Fig. 9: Efeitos da microinjeção de AP7 20nmol/ 0,5 μ l (n= 9) ou 40nmol/ 0,5 μ l (n=9) no CI sobre a catalepsia induzida pelo L-NOARG em ratos. O animal foi mantido na posição de catalepsia por no máximo 300 segundos 10, 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção i.p. de L-NOARG ou veículo. As colunas representam as médias \pm EPM sendo * P < 0.05, ** P < 0,001 pelo teste de Kruskal Wallis seguido do teste Bonferroni para múltiplas comparações entre os tratamentos.40
- Fig. 10: Efeitos da microinjeção intracolicular de L-NOARG 50nmol/ 0,5 μ l (n= 10) ou 100nmol/ 0,5 μ l (n=10). As colunas representam as médias \pm EPM.....41
- Fig. 11: Representação da localização das cânulas (círculos pretos) no CI em cortes transversais, seguindo o Atlas de Paxinos e Watson (1997). As figuras representam as coordenadas do atlas em milímetros em uma visão posterior. Nem todos os sítios de estimulação estão representados devido à sobreposição.42
- Fig. 12: Descrição da projeções existentes entre o CI e estruturas motoras.48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição dos animais no Experimento I.....	33
Tabela 2: Distribuição dos animais no Experimento II.....	34
Tabela 3: Tempo de catalepsia (s) dos animais que receberam microinjeção de veículo/0,5 µl diretamente no CI e 10 minutos após foram submetidos a uma injeção i.p. de L-NOARG 90mg/Kg. O tempo de catalepsia foi avaliado 10, 30, 60, 90 e 120 minutos da injeção i.p. de L-NOARG.	68
Tabela 4: Tempo de catalepsia (s) dos animais que receberam microinjeção de AP7 20 nmol/0,5 µl diretamente no CI e 10 minutos após foram submetidos a uma injeção i.p. de veículo (HCl 0,01N). O tempo de catalepsia foi avaliado após 10, 30, 60, 90 e 120 minutos da injeção i.p. de L-NOARG.....	68
Tabela 5: Tempo de catalepsia (s) dos animais que receberam microinjeção de AP7 40 nmol/0,5 µl diretamente no CI e 10 minutos após foram submetidos a uma injeção i.p. de veículo (HCl 0,01N). O tempo de catalepsia foi avaliado após 10, 30, 60, 90 e 120 minutos da injeção i.p. de L-NOARG.	69
Tabela 6: Efeito do AP7 sobre a catalepsia induzida pelo L-NOARG. Os animais receberam microinjeção de AP7 20 nmol/0,5 µl diretamente no CI e 10 minutos após foram submetidos a uma injeção i.p. de L-NOARG 90mg/Kg. O tempo de catalepsia foi avaliado após 10, 30, 60, 90 e 120 minutos da injeção i.p. de L-NOARG.....	69
Tabela 7: Efeito do AP7 sobre a catalepsia induzida pelo L-NOARG. Os animais receberam microinjeção de AP7 40 nmol/0,5 µl diretamente no CI e 10 minutos após foram submetidos a uma injeção i.p. de L-NOARG 90mg/Kg. O tempo de catalepsia foi avaliado após 10, 30, 60, 90 e 120 minutos da injeção i.p. de L-NOARG.....	70
Tabela 8: Efeito da microinjeção intracolicular de Veículo (HCl 0,05N)/0,5 µl sobre a catalepsia. O tempo de catalepsia foi avaliado após 60, 120, 180 e 240 minutos da microinjeção de L-NOARG.....	70
Tabela 9: Efeito da microinjeção intracolicular de L-NOARG 50 nmol/0,5 µl sobre a catalepsia. O tempo de catalepsia foi avaliado após 60, 120, 180 e 240 minutos da microinjeção de L-NOARG.....	71
Tabela 10: Efeito da microinjeção intracolicular de L-NOARG 100 nmol/0,5 µl sobre a catalepsia. O tempo de catalepsia foi avaliado após 60, 120, 180 e 240 minutos da microinjeção de L-NOARG.....	71



I. INTRODUÇÃO

1.1. Colículo Inferior

O colículo inferior (CI) é uma estrutura bilateral localizada no mesencéfalo dorsal (Fig. 1) envolvida principalmente com o processamento de informações auditivas. Também integra informações sensoriais de natureza aversiva (Schmitt et al, 1986; Brandão et al, 1988, 1994, 1999; Cardoso et al, 1994; Troncoso et al, 1998; Castilho e Brandão, 2001) e possivelmente exerce um papel de filtro para sons que requerem reações de defesa imediatas e explosivas como aquelas executadas por presas e predadores (Casseday e Covey, 1996).

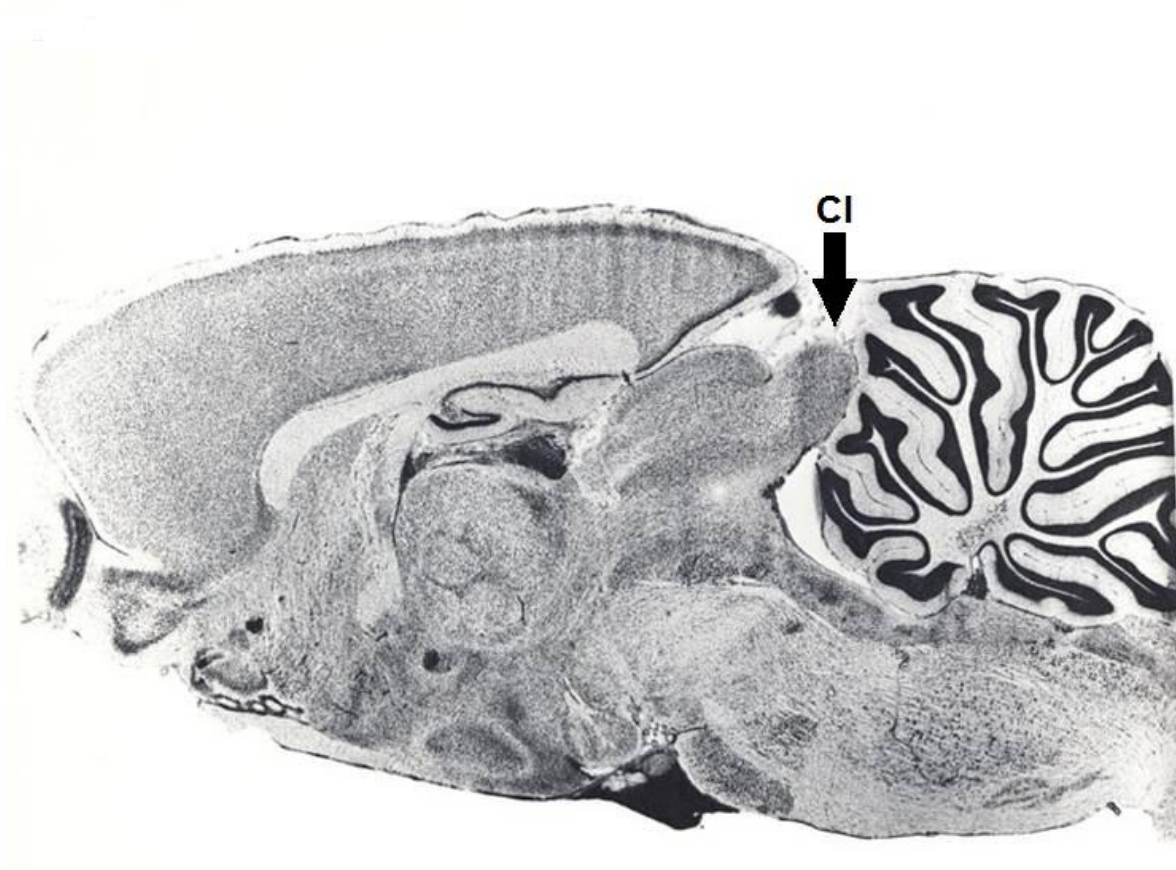


Fig. 1: Fotografia de um corte sagital do encéfalo de rato indicando a localização anatômica do Colículo Inferior. Modificado de: Winer e Schreiner, 2005.

Com base na morfologia celular, no padrão de projeções e nas propriedades fisiológicas dos seus neurônios, o CI pode ser dividido em três núcleos: o núcleo central, um córtex dorsal e um córtex externo (Saldaña e Merchán, 1992) (Fig. 2).

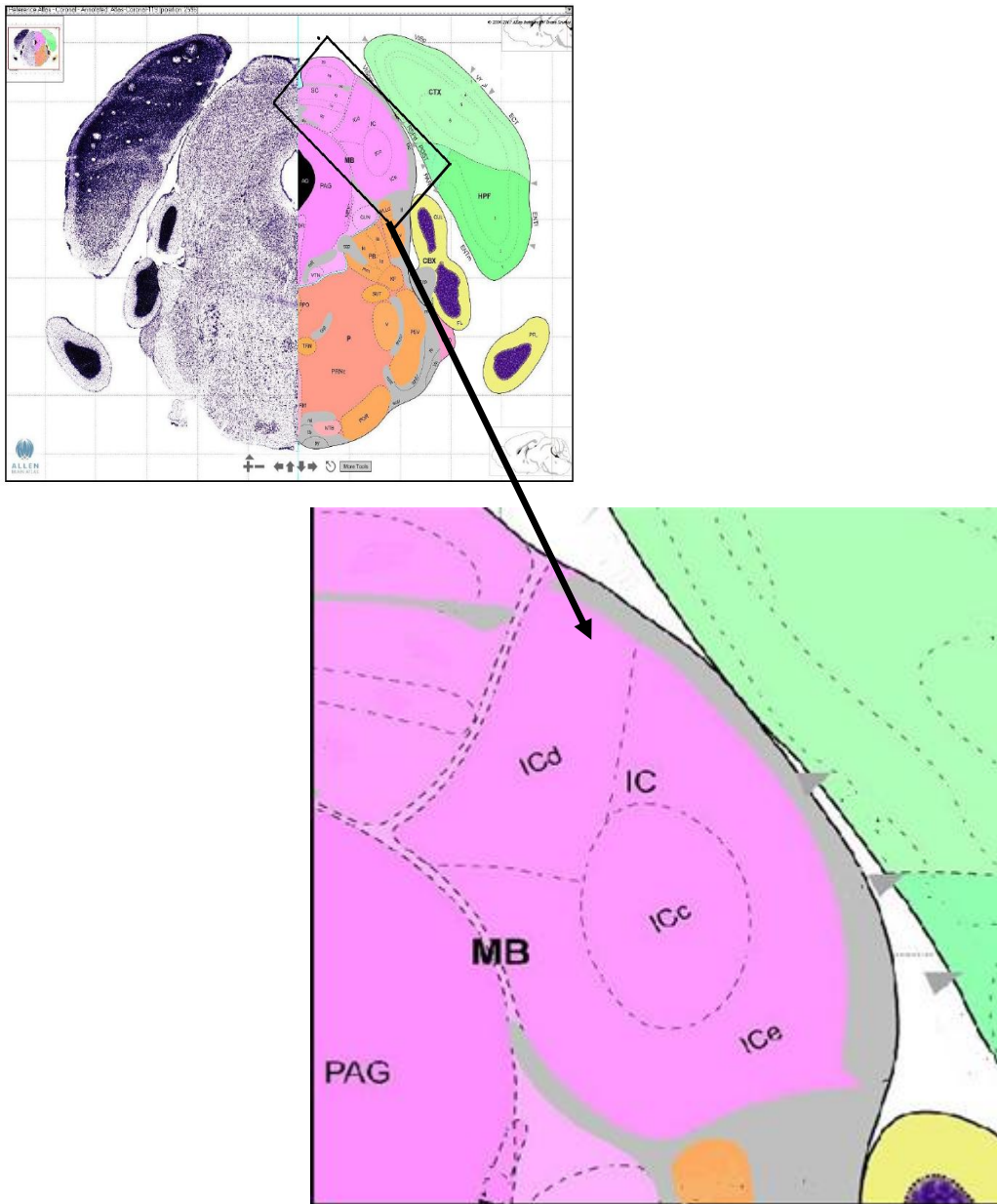


Fig. 2: Vista posterior do CI de rato. MB: Mesencéfalo; IC: Colículo Inferior; ICc: Colículo Inferior, núcleo central; ICe: Colículo Inferior, córtex externo; Colículo Inferior, ICd: Colículo Inferior, córtex dorsal; PAG: Substância cinzenta periaquedutal. Modificado de Solan et al., 2008)

Os CIs estão conectados a áreas corticais (Adams, 1979; Hoffman e Ison, 1980; Meininger et al, 1986; Brodal, 1992). O córtex externo tem suas principais aferências provindas das áreas cerebrais 39 e 41 de Brodmann ipsilaterais, que correspondem à área de Wernicke e áreas auditivas primárias respectivamente, núcleo da coluna dorsal (aferências somatosensoriais), do núcleo central (aferências auditivas), do núcleo parabraquial, núcleo cuneiforme, grácil, trigeminal, e da parte

lateral da substância negra (Coleman e Clerici, 1987). O córtex externo também apresenta conexões com estruturas envolvidas na organização e modulação de comportamentos defensivos como a substância cinzenta periaquedutal, o colículo superior, o hipotálamo e a amígdala medial (via tálamo) (Adams, 1980; LeDoux et al., 1990)

O córtex dorsal também apresenta conexões com a substância cinzenta periaquedutal e a substância negra. Ele recebe aferências corticais ipsilaterais de várias regiões, como as áreas 20, 36 e 41 de Brodmann (córtex temporal), e do globo pálido (Moriizumi e Hattori, 1991). Devido a essas diferentes conexões entre os núcleos do CI, Tokunaga et al., (1984) sugeriram uma divisão entre as funções dessa estrutura: a primeira delas seria uma função de integração auditiva, sendo o núcleo central o responsável, e a outra função seria a de integração sensorial-motora, que estariam envolvidos os córtices dorsal e externo.

Evidências do envolvimento do CI na elaboração de respostas defensivas têm sido comprovadas por estudos imunohistoquímicos e comportamentais (Silveira et al., 1993). Além disso, estudos mostram a presença de conexões recíprocas entre o CI, o colículo superior e a substância cinzenta periaquedutal (Kudo e Niimi, 1980), que são estruturas que juntamente com a amígdala, e o hipotálamo medial, participam na elaboração de estados aversivos no encéfalo, constituindo o “sistema cerebral aversivo” (Graeff, 1990; 1981).

As respostas de defesa expressas pelos diferentes organismos diante de situações aversivas, particularmente os mamíferos, estão organizadas dentro de um padrão hierárquico específico que varia de estados de alerta a congelamento, até fuga (Blanchard e Blanchard, 1988).

Os estudos para investigação da participação do CI na reação de defesa começaram no fim da década de 80, quando Brandão et al., (1988) verificaram que reações de fuga e respostas vegetativas características do comportamento defensivo eram produzidas por microinjeções de bloqueadores GABAérgicos diretamente no CI.

Posteriormente, Melo et al., (1992) observaram que a administração sistêmica ou a microinjeção de midazolam diretamente no CI reduz a resposta de fuga em um procedimento de “switch-off”. Além disso, Cardoso et al., (1994) verificaram o envolvimento de aminoácidos excitatórios no CI, demonstrando que microinjeções

de NMDA realizadas diretamente nessa estrutura produz reações de fuga ou pronunciada imobilidade.

A reação de corrida e galope também pode ser induzida pela microinjeção de um doador de Óxido Nítrico (NO, um neurotransmissor atípico que será discutido posteriormente) no CI. Essa reação é revertida pela administração de AP7, um antagonista de receptores NMDA (Moreira et al., 2003).

Além dos estudos realizados com estimulação química do CI para verificar seu envolvimento em respostas de defesa, foram realizados estudos para verificar se a estimulação elétrica dessa estrutura é capaz de produzir o mesmo padrão comportamental. Os resultados obtidos demonstraram que muitas das características presentes na reação de defesa induzida pela estimulação de outras estruturas pertencentes ao sistema cerebral aversivo, tais como amígdala, camadas profundas do colículo superior, substância cinzenta periaquedutal dorsal e hipotálamo medial, também eram observadas após a estimulação elétrica do CI (Brandão et al., 1980; Melo et al., 1992; Brandão et al., 1994; Maissonette et al., 1996; Brandão et al., 1999; Pandóssio et al., 1999; Castilho et al., 2001; Lamprea et al., 2002; Macedo et al., 2002; Santos et al., 2002). A estimulação elétrica do CI de ratos induz comportamento de defesa caracterizado por alerta (durante o no qual o animal interrompe qualquer atividade em que esteja engajado, perscrutando cuidadosamente o ambiente), seguido de congelamento (imobilidade tensa acompanhada de respostas vegetativas como exoftalmia, piloereção e arqueamento do dorso), e fuga (saltos e galopes) (Brandão et al., 1980; 1993; 1994; 1997; 1999; Melo et al., 1992; Coimbra et al., 1993; Melo et al., 1995; Maissonette et al., 1996; Troncoso et al., 1998; Pandóssio et al., 1999; 2000; Cuadra et al., 2000; Castilho e Brandão, 2001; Lamprea et al., 2002; Macedo et al., 2002). Em geral essas respostas são acompanhadas de alterações vegetativas, alterações na pressão arterial, frequência cardíaca e respiratória (Hilton et al., 1986; Yardley et al., 1986; Brandão et al., 1988) além de analgesia (Coimbra et al., 1992; 1997), que vão dar o suporte necessário ao organismo para uma possível fuga ou luta em uma situação de ameaça.

Além disso, alguns estudos sugeriram também a possível influência de outras estruturas encefálicas sobre os estados aversivos gerados por estimulação do CI, dentre elas possivelmente a substância negra (Coimbra et al., 1989; Coimbra e

Brandão, 1993; Maisonnette et al., 1996). Esses autores demonstram que a lesão prévia da substância negra altera os limiares aversivos do CI.

1.1.1. Colículo Inferior e Controle Motor

Casseday e Covey (1996) sugerem que o CI é uma estrutura biologicamente importante para selecionar informações auditivas e distribuí-las em um ritmo adequado para o desempenho motor. O mecanismo neural para a percepção auditiva e o desempenho motor, tendo evoluído juntos, estão intimamente relacionados. O CI está anatomicamente posicionado de maneira estratégica para enviar informações auditivas para as regiões motoras que participam da organização de comportamentos como a captura da presa e fuga do predador, orientação para um estímulo novo ou comunicação sonora (Casseday e Covey, 1996).

Schweizer (1981), Schuller et al., (1991) e Wenstrup et al., (1994) relatam que o CI de morcegos apresenta grande quantidade de projeções para o cerebelo, via matéria cinzenta periaquedutal. A presença dessas projeções sugere que a informação auditiva é enviada para redes neurais que coordenam movimentos rítmicos (Casseday e Covey, 1996).

Assim, a atividade motora seria influenciada por estímulos auditivos, sejam componentes somático, visceral, vocalização e planejamento de movimento. O sobressalto acústico e sua inibição são modulados pelas aferências sensoriais que exigem a integração entre esses quatro componentes (Winer et al., 1998).

Casseday e Covey (1996) sugerem que um papel importante do CI refere-se ao comportamento denominado pelos etólogos de “padrões fixo de ação”. Esse termo refere-se a comportamentos estereotipados, que são mais complexos do que simples reflexos, mas não são eliciados por um determinado estímulo. Podemos citar como exemplo de *padrões fixos de ação* o movimento da orelha de um gato em resposta a um estímulo sonoro desconhecido, o movimento giratório da cabeça de uma coruja em direção à origem do som emitido por uma presa, ou uma pessoa modulando sua voz durante uma fala ou ao cantar. Esses autores também sugerem que o CI participa na elaboração de *padrões fixo de ação* que dependem da velocidade que eles são executados após o estímulo sonoro. Essa resposta inclui a reação do animal momento a momento, a sons que requerem uma ação imediata

(~100 ms). Cajal, 1911 (apud Casseday e Covey, 1996) acreditava que o CI era um centro reflexo para sons e que as fibras auditivas provenientes de regiões inferiores do tronco encefálico, direcionadas para o tálamo enviariam colaterais para o CI. Devido ao uso de técnicas de traçamento anterógrado e retrogrado, sabe-se atualmente que o CI é um terminal para a maioria das fibras auditivas que ascendem de porções inferiores do tronco encefálico e que o tálamo auditivo recebe quase todas as aferências ascendentes provenientes do CI. Essas observações que enfatizam o sistema talamocortical, revelam pouco sobre o possível papel do CI no comportamento motor. Entretanto é importante salientar que, com exceção dos circuitos relacionados ao reflexo de sobressalto em resposta a um som, o CI é a primeira estrutura do sistema auditivo que envia importantes eferências para vias motoras e sistemas que coordenam o movimento (Casseday e Covey, 1996). Além disso, existem também evidências de que estruturas dos sistemas motores projetam-se para o CI. Assim, Olazabal e Moore (1989) relataram uma projeção da substância negra para o CI em gatos, ratos e morcegos, e Moriizumi e Hattori (1991) descreveram uma projeção do globo pálido também para essa estrutura em ratos. Existem ainda evidências eletrofisiológicas sugerindo que a atividade de neurônios no CI pode ser modulada pela atividade motora (Casseday e Covey, 1996).

Considerando o exposto acima, fica evidente que existem projeções para o CI provenientes de vias motoras. Ainda não está claro como estas conexões estão relacionadas a comportamentos específicos, mas sabe-se que a vocalização, que é considerada uma atividade motora, pode influenciar as respostas de alguns neurônios do CI. Os resultados de experimentos envolvendo crises audiogênicas indicam que uma ação inibitória é importante para regular as eferências do CI para núcleos motores ou pré-motores. A origem dessa regulação inibitória ainda não é conhecida, mas é possível que seja motora e/ou sensorial (Casseday e Covey, 1996).

1.1. Núcleos da Base e Controle Motor

Os núcleos da base são um conjunto de cinco núcleos: o núcleo caudado, o putamen, o globo pálido, o núcleo subtalâmico e a substância negra. Esses núcleos estão situados em diferentes regiões do sistema nervoso, que têm conexões entre si

e participação no mesmo sistema funcional de controle motor. O núcleo caudado e o putamen se desenvolvem na mesma estrutura do telencéfalo e formam os componentes de entrada para os núcleos da base e, em conjunto, são chamados de estriado. O globo pálido é derivado do diencéfalo e dividido em segmentos interno e externo. O núcleo subtalâmico localiza-se abaixo do tálamo e a substância negra localiza-se no mesencéfalo (Kandel et al., 2000).

Estudos mostram que lesões nos núcleos da base podem causar distúrbios de movimentos observados em diversas patologias, incluindo a Doença de Parkinson (DP). Os principais sinais e sintomas da DP parecem estar relacionados à redução na neurotransmissão dopaminérgica no estriado como resultado da degeneração na substância negra parte compacta (Lange et al., 1997) e essa redução tem sido apontada como o mecanismo subjacente aos principais sintomas da DP como acinesia e rigidez (Ehringer e Hornykiewi, 1960).

Apesar da presença de uma grande quantidade de estruturas interconectadas com os núcleos da base, existe um circuito básico que processa as informações através desses núcleos (Fig. 3). O circuito básico é organizado em uma grande alça motora que se inicia no córtex cerebral e se projeta para o corpo estriado, globo pálido, tálamo e volta para o córtex cerebral. Circuitos neurais paralelos que atravessam diferentes porções do estriado, globo pálido e tálamo (Albin et al., 1989) influenciam o funcionamento do circuito básico.

As projeções neuronais provindas do córtex cerebral para o estriado são do tipo excitatórias glutamatérgicas, enquanto as duas outras intermediárias, a estriado-palidal e pálido fugal, são do tipo inibitórias GABAérgicas. Isso significa que a ativação do sistema córtico-estriatal desinibe as regiões do tálamo, bem como áreas do tronco cerebral, que são inervadas por eferências dos núcleos da base. Muitas teorias sobre desordens do movimento relacionadas aos núcleos da base têm sido focadas nesta dupla ação inibitória no circuito motor (Lange et al., 1997).

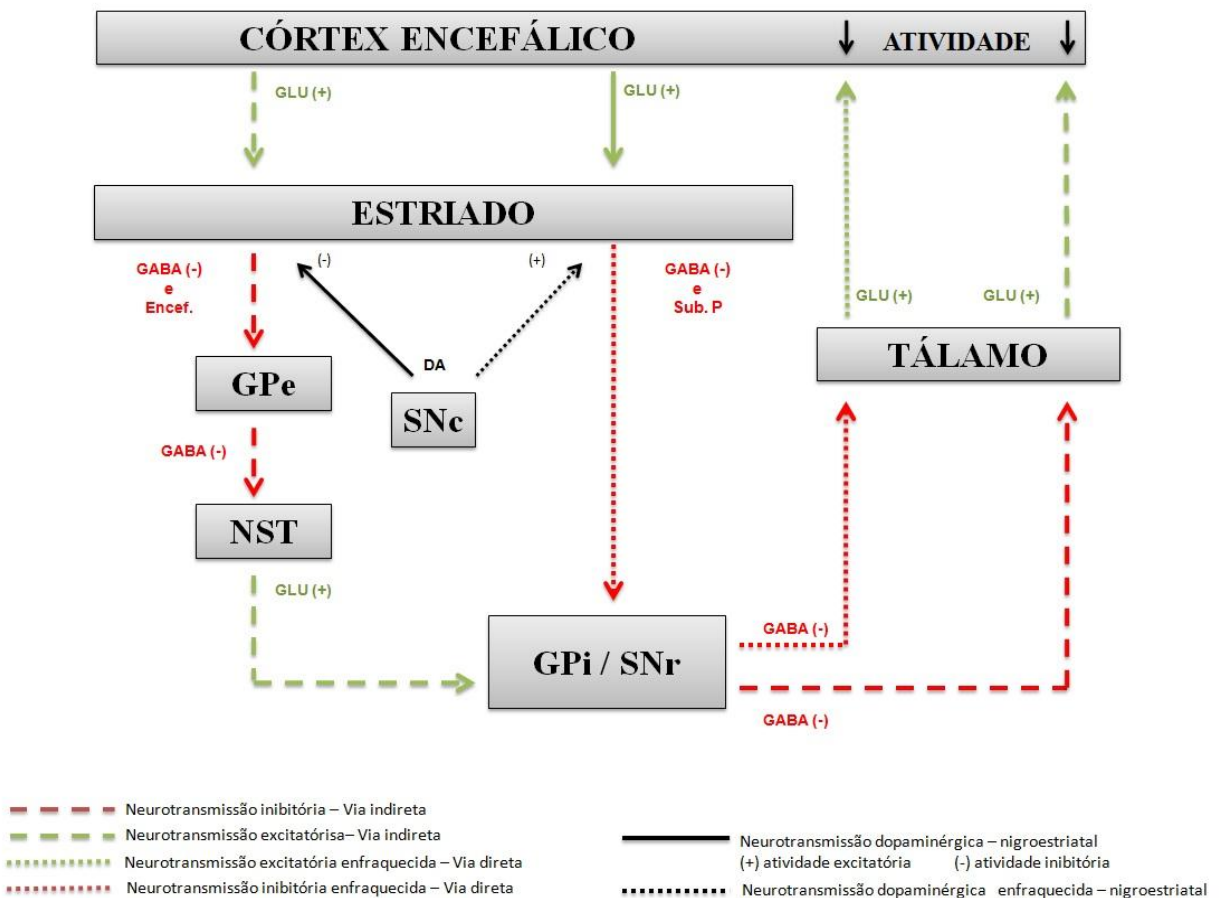


Fig. 3: Alça motora no sistema nervoso. Abreviações: SNC, substancia negra parte compacta; SNr, substância negra parte reticulada; GPe, globo pálido segmento externo; GPi, globo pálido segmento interno; NST, núcleo subtalâmico; Glu, glutamato; GABA, ácido gama-aminobutírico; DA, Dopamina; Encef., encefalina; Sub. P, substância P (Modificado de Lange et al., 1997).

Existem duas grandes projeções dos núcleos da base, isto é, de uma estrutura aferente (putamen no caso do circuito motor) para uma estrutura eferente (representada pelo segmento interno do globo pálido). A **via direta** projeta-se diretamente de uma determinada subpopulação de neurônios estriatais no putamen para o segmento interno do globo pálido e envolve fibras GABAérgicas contendo substância P, esses neurônios exercem uma inibição sobre o segmento interno do globo pálido, que por sua vez causam uma diminuição na atividade inibitória das fibras GABAérgicas pálido fugal, dessa forma, causando uma desinibição do tálamo. Essa estrutura desinibida estimula o córtex encefálico, que por sua vez facilita o desempenho motor. A **via indireta**, que tem origem em uma população diferente de neurônios estriatais, segue através do segmento externo do globo pálido e do

núcleo subtalâmico antes de atingir o segmento interno do globo pálido. Todas as projeções intrínsecas são inibitórias exceto a projeção do núcleo subtalâmico para o segmento interno do globo pálido, que é excitatória (Lange et al., 1997).

Na via indireta, as fibras GABAérgicas/enkefalínérgicas fornecem uma inervação inibitória para o segmento externo do globo pálido. Por sua vez, projeções GABAérgicas do segmento externo fornecem uma inervação inibitória para o núcleo subtalâmico. A via indireta termina com fibras glutamatérgicas excitatórias, dos núcleos subtalâmicos para o segmento palidal interno causando uma excitação dessa estrutura. Os neurônios que se projetam do globo pálido interno em direção ao tálamo são do tipo GABAérgicos, que em conseqüência da excitação do globo pálido interno causam inibição sobre o tálamo. Nesse circuito, uma inibição sobre o tálamo faz com que essa estrutura deixe de estimular o córtex encefálico, diminuindo o desempenho motor (Lange et al., 1997).

Uma vez que tanto a via direta quanto a indireta convergem, com efeitos opostos, no segmento interno do globo pálido, um equilíbrio entre a influência inibitória da via direta e a influência excitatória da via indireta controla as eferências do globo pálido interno. As fibras GABAérgicas da projeção pálido- talâmica exercem uma influencia inibitória no tálamo ventrolateral (Lange et.al., 1997).

Tanto a via direta quanto a via indireta são influenciadas por axônios dopaminérgicos projetando-se da substância negra parte compacta para o putamen. A DA tem, contudo, um efeito diferencial nessas duas vias. A DA excita os neurônios estriato-nigrais ligando-se a receptores D1, e também inibe os neurônios estriato-palidais ligando-se a receptores D2 (Starr, 1995). Fibras dopaminérgicas exercem, portanto, uma ação inibitória nas células estriatais GABAérgicas/enkefalínérgicas que se projetam para o segmento palidal (via indireta), e também uma ação excitatória nos neurônios GABAérgicos contendo substância P que se projetam diretamente para o segmento interno do globo pálido (via direta) e a substância negra parte reticulada. A substância negra pode assim modular o equilíbrio entre as vias diretas e indiretas (Lange et al., 1997).

Com base no exposto acima, o aumento da atividade dopaminérgica no estriado poderia diminuir o efeito inibitório que o segmento palidal interno (via indireta) exerce sobre o sistema tálamo-cortical e o tronco encefálico. Esta desinibição do tálamo teria um efeito facilitatório sobre os movimentos gerados pela

atividade cortical ou do tronco encefálico e contribui para a hiperatividade do paciente. De um modo semelhante, uma lesão nos núcleos subtalâmicos contribuiria para uma redução da excitação de duas estruturas eferentes dos núcleos da base, ou seja, o segmento interno palidal e a substância negra parte reticulada, e uma desinibição do tálamo. Isto poderia explicar os movimentos hipercinéticos observados no hemibalismo após a destruição do núcleo subtalâmico (Lange et al., 1997).

De acordo com o modelo da alça motora, a diminuição da atividade da DA, como acontece na DP, levaria a uma redução da atividade da via direta e também aumentaria a influência inibitória dos núcleos da base sobre o sistema tálamo-cortical e do tronco encefálico (Fig. 4). Na via direta, os neurônios glutamatérgicos que se projetam dos núcleos subtalâmicos poderiam tornar-se hiperativos. Tanto a diminuição da atividade da via direta quanto o aumento da atividade da via indireta resultam em uma grande ativação do segmento palidal interno e aumentam a inibição do tálamo.

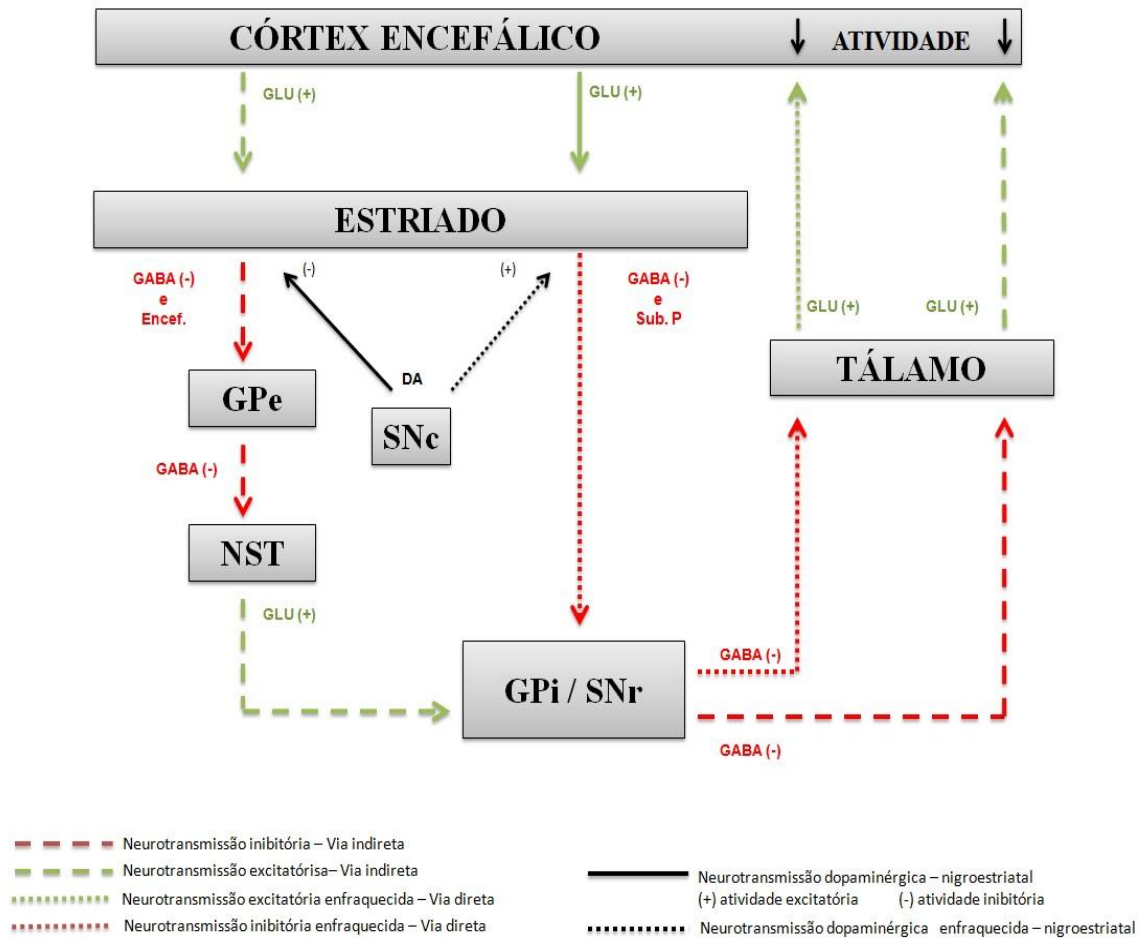


Fig. 4: Alteração da neurotransmissão na alça motora na doença de Parkinson. Para abreviações ver Fig. 3 (Modificado de Lange et.al., 1997).

1.2. Óxido nítrico

O Óxido Nítrico (NO), também conhecido por monóxido de nitrogênio ou monóxido de azoto, de fórmula química NO, é um gás solúvel, altamente lipofílico, sintetizado pelas células endoteliais, macrófagos e certo grupo de neurônios. A síntese de NO se realiza por ação de uma enzima, a sintase do óxido nítrico (NOS) a partir do aminoácido L-arginina que produz NO e L-citrulina necessitando da presença de dois co-fatores, o oxigênio e o fosfato de dinucleotídeo adenina nicotinamida (NADPH).

O NO é um neurotransmissor atípico (Forstermann et al., 1991; Bredt e Snyder, 1992; Bredt, 1999, Wang et al., 1999) e sua primeira identificação foi como um derivado do fator de relaxamento endotelial em vasos sanguíneos periféricos

(Palmer et al., 1987). O NO é expresso em estruturas como o CI, a substância periaqueducal dorsal, a amígdala e o hipotálamo (Vincent e Kymura, 1992).

Embora o NO não preencha todos os critérios da definição clássica de neurotransmissor, possui muitas propriedades de um neurotransmissor, e pode ser considerado como um dos principais mensageiros inter e intracelular, no sistema nervoso periférico e central (Duncan e Heales, 2005). Diferente dos neurotransmissores clássicos, o NO é sintetizado de acordo com a demanda e é sensível a um processo de rápida regulação, não sendo armazenado em vesículas, nem tão pouco liberado por exocitose. Por ser um gás lábil, difunde-se por membranas de células pré e pós-sinápticas (Snyder e Ferris, 2000).

Existem duas formas constitutivas da enzima que sintetiza o NO e uma outra forma induzida. As formas constitutivas (cNOS) são expressas em níveis basais, e apresentam-se em duas isoformas distintas considerando sua localização e efeito: a neuronal (nNOS), principalmente localizada em tecido neural; e a endotelial (eNOS), isolada do endotélio (Garthwaite et al., 1989; Esplugues, 2002; Moncada, 1999). A forma induzida (iNOS) é a isoforma da NOS independente de Ca^{2+} , encontrada em uma variedade de células após a indução com mediadores inflamatórios e produtos bacterianos (Moncada, 1999).

A formação do NO no encéfalo segue percursos semelhantes aos da geração do mesmo em outros tecidos. O encéfalo expressa as três isoformas identificadas de NOS e o NO produzido pode agir fisiologicamente e patologicamente sobre diversos alvos (Lincoln et al., 1997).

O NO é formado a partir do nitrogênio da guanidina presente no aminoácido L-arginina que reage com uma molécula de oxigênio na presença da NOS (Fig. 5). Vários co-fatores são necessários para a formação do NO, incluindo Tetra-hidrobiopterina (BH_4), Mononucleótido de Flavina (FMN), Fosfato de dinucleótido de Nicotinamida e adenina (NADPH), e o complexo Ca^{2+} /Calmodulina, se a enzima de síntese de NO for nNOS ou a eNOS (Duncan, 2005).

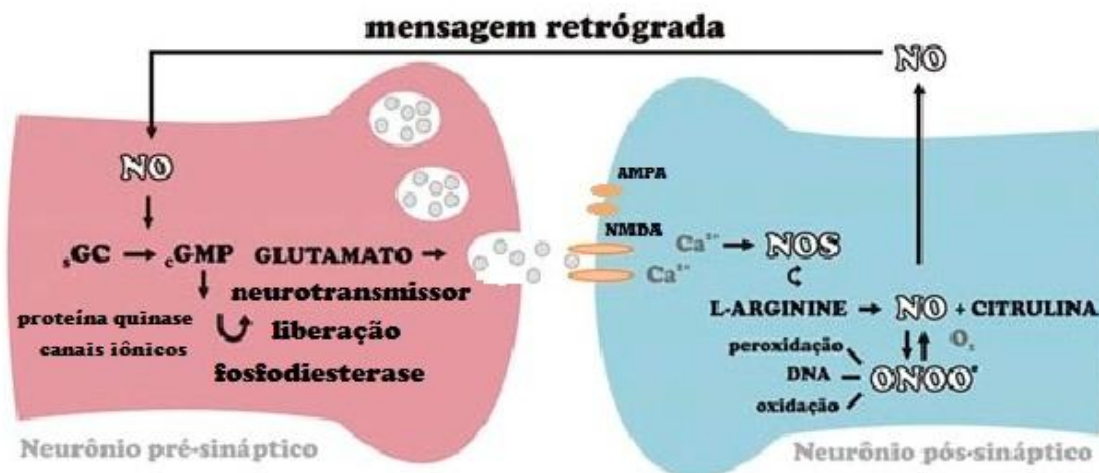


Fig. 5: Reações catalisadas e co-fatores da NOS. AMPA: receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico; NMDA: receptor N-metil-D-aspartato (Modificado de Salum et al., 2008a).

A enzima NOS está fisicamente ligada ao receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) através da proteína PSD-95 (Esplugues, 2002). Sendo assim, no encéfalo, o NO é produzido pela NOS neuronal quase que exclusivamente pela ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA. Apesar dos neurônios que contêm NOS representarem apenas 1% das células neuronais, a ramificação de seus axônios é tão extensa que parece atingir a grande maioria das células cerebrais (Salum et al., 2008b).

O NO é sintetizado pós-sinápticamente e não age em receptores convencionais na membrana de neurônios adjacentes. Porém, ao atravessar a membrana desses neurônios atua intracelularmente (ver Fig. 5). Como mencionado, o NO liberado no sistema nervoso está relacionado tipicamente à ativação de receptores de glutamato do tipo NMDA, e desencadeia uma potencialização a longo prazo que pode ser importante em funções de aprendizagem e memória como aquelas elaboradas pelo hipocampo e também outros tipos de plasticidade sináptica (Schuman e Madison, 1991).

O metabolismo do NO no sistema nervoso parece vital para a função encefálica normal e a produção inapropriada ou excessiva do NO no sistema nervoso está relacionada com várias patologias incluindo a DP, a Doença de Alzheimer e Esclerose Múltipla (Bolaños et al., 1997; Stewart e Heales, 2002).

O mecanismo exato de como o NO contribui para essas doenças neurodegenerativas não é completamente conhecido. Várias evidências indicam que o NO está associado com excitotoxicidade, dano ao DNA, e alterações proteicas, que estão comumente envolvidas em diversas doenças neurodegenerativas (Zhang et al., 2006).

1.3. NO e Catalepsia

A catalepsia é definida como uma dificuldade para a correção de uma postura externamente imposta. Algumas drogas são conhecidas por induzirem rigidez muscular e ausência de atividade espontânea (acinesia), o que caracteriza um estado de catalepsia atribuído à influência modulatória dessas drogas na via dopaminérgica nigroestriatal (Hornykiewicz, 1973).

Quando um animal normal é colocado em uma postura não usual, ele mudará esta posição dentro de segundos. Um animal apresentando catalepsia, em contra partida, manterá essa postura por um longo período de tempo. Esse tempo é considerado como um índice de catalepsia. O teste de catalepsia é usado para avaliar os efeitos motores de determinadas drogas no sistema lateral (antigo sistema extrapiramidal; Sanberg et al., 1988) e é considerado um modelo animal para o estudo de distúrbios motores observados em pacientes portadores da DP. Entretanto, ainda não existe um modelo animal perfeito, que nos permita investigar comportamento, bases celulares e interações bioquímicas e anatômicas dos sintomas da DP (Salum et al., 2008a).

Resultados obtidos utilizando-se o teste de catalepsia mostraram que inibidores da NOS, bem como o haloperidol, antagonista de receptores dopaminérgicos do tipo D₂ podem induzir déficits motores em roedores (Del Bel e Guimarães, 2000), reforçando a hipótese de que a nNOS desempenha um importante papel no controle do comportamento motor. Estudos demonstraram que injeções sistêmicas de L-NOARG e 7-NI, inibidor não específico e específico da nNOS, respectivamente, induzem catalepsia em camundongos (Star e Star, 1995; Dzoljic et al., 1997; Araki et al., 2001; Uzbay, 2001; Dall'Igna et al., 2001; Del Bel et al., 2002).

Os sintomas motores causados pela DP, podem ser reduzidos com terapia de reposição dopaminérgica tanto na fase final, inicial ou intermediária da doença, apesar deste tratamento não ser capaz de interromper ou atrasar a progressão da neurodegeneração. Os sintomas aparecem quando o conteúdo de DA está reduzido em torno de 80% (Hornykiewicz, 1998).

O efeito cataléptico da inibição da NOS pode envolver o estriado. Neurônios positivos da NOS estão localizados nos núcleos da base (Vicente e Kimura, 1992) e o NO parece regular a neurotransmissão dopaminérgica no estriado (West et al., 2002), o que o torna um forte candidato a exercer um importante papel no controle motor (Kriegsfeld et al., 1999).

O NO parece também estar envolvido no controle do comportamento motor. Essa evidência é baseada em pesquisas realizadas em camundongos portadores de mutação na isoforma nNOS que apresentaram alterações na habilidade locomotora (Kriegsfeld et al., 1999).

1.4. Óxido Nítrico, Glutamato e Colículo Inferior

Nas vias auditivas subcorticais, os níveis mais altos de NOS, são encontrados no CI (Coote e Rees, 2000). Dois estudos realizados em ratos descrevem a distribuição de neurônios que expressam o NO no CI (Herbert et al., 1991; Druga and Syka, 1993). Em ambos os estudos a presença de NOS foi identificada pela marcação histoquímica de β nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforase (NADPH-d), que representa a atividade da NOS (Dawson et al., 1991; Hope et al., 1991). Utilizando esse método histoquímico os autores relataram uma distribuição diferencial na marcação de corpos de neurônios entre as três principais divisões do CI: o núcleo central, o córtex dorsal e o córtex externo (Faye Lund e Osen, 1985). O NO se expressa em grande quantidade nos córtex dorsal e externo e em menor quantidade nos núcleos centrais, particularmente na região ventral (Coote e Rees, 2008). É interessante ressaltar que essas duas subdivisões do CI estão particularmente envolvidas na integração sensório-motora (Tokunaga et al., 1984).

São encontrados receptores AMPA e NMDA no CI (Kelly e Caspary, 2005), sugerindo que a neurotransmissão excitatória nessa área é glutamatérgica (Caicedo e Eybalin, 1999). O glutamato ao ligar-se aos receptores NMDA promove influxo de

cálcio que pode ativar a enzima cálcio-calmodulina dependente (Garthwaite et al., 1988; Garthwaite, 1991). Essa enzima sintetiza NO junto com a citrulina da L-arginina (Palmer et al., 1988). Em seguida o NO se difunde para neurônios pré e pós sinápticos (Edelman e Gally, 1992; Garthwaite, 1991; Bredt e Snyder, 1990). É interessante observar que pelo menos 75% do efeito do NO é bloqueado por antagonistas de glutamato (West e Galloway, 1996; Nakahara et al., 1994).

1.5. NO e Dopamina

Em condições fisiológicas o NO facilita a neurotransmissão dopaminérgica no estriado (West et al., 2002). O mecanismo pelo qual o NO aumenta a liberação de DA pode ser dependente (Lonart et al., 1993; West e Galloway, 1996, 1998; Buyukuysal, 1997; Trabace e Kendrick, 2000) bem como independente de Ca^{2+} (Black et al., 1994). No mecanismo dependente de Ca^{2+} , o NO facilita a liberação de DA por um mecanismo dependente de receptor NMDA. Por outro lado o NO pode induzir a liberação de vesículas sinápticas independentemente de Ca^{2+} , por meio de nitrosilação que facilita o ancoramento e a fusão de vesículas sinápticas na membrana (Meffert et al., 1994).

Alguns estudos têm demonstrado que a estimulação da produção de NO, pelo aumento dos substratos da NOS, NG-hidroxi-L-arginina (H-ARG) ou L-arginina, produz um aumento da liberação de DA e de glutamato (GLU) no estriado e em outras regiões encefálicas. Por sua vez, a inibição da NOS por meio de inibidores enzimáticos como o 7-nitroindazole (7-NI) produz efeito oposto (Kiss & Vizi, 2001).

Trabalhos *in vitro* e *in vivo* sugerem que o NO endógeno desempenha um efeito inibitório sobre os transportadores de monoaminas. Assim, o NO parece agir inibindo a recaptação de DA e aumentando a liberação deste neurotransmissor (Fig. 6) (Kiss & Vizi, 2001; Rocchitta et al., 2005). Essa atuação do NO pode representar uma nova forma de comunicação interneuronal, ou seja, uma interação não-sináptica independente de receptores (West et al., 2002).

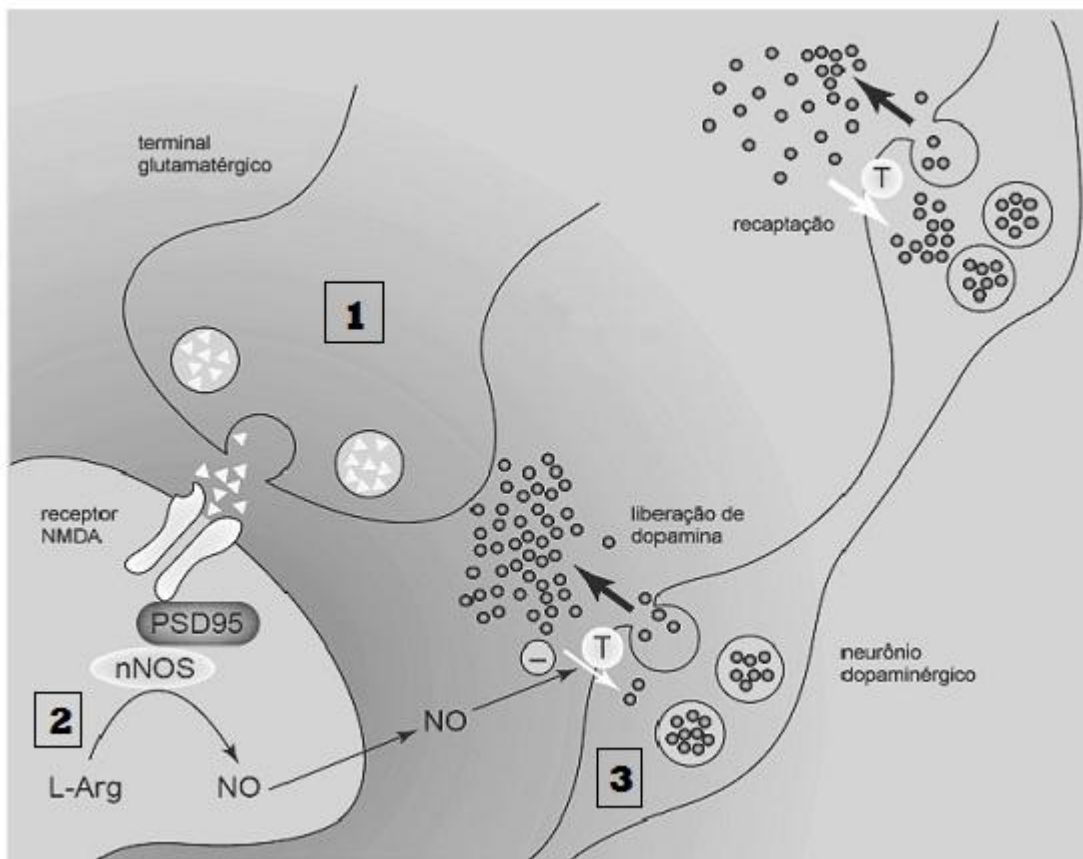


Fig. 6. Ilustração da liberação do NO a partir da ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e sua interferência na terminação dopaminérgica; 1: neurônio glutamatérgico pré-sináptico; 2: neurônio pós-sináptico; 3: neurônio dopaminérgico (Modificado de Salum et al., 2008a).

É provável que o NO exerça seus efeitos por múltiplos circuitos efetores. Estudos utilizando preparações *in vitro* proporcionaram evidências consideráveis indicando que na desnervação ou isolamento do estriado, o NO facilita a liberação de DA através de uma ação direta sobre o terminal de DA. É provável que essa ação do NO resulte em alteração no funcionamento do transportador de DA ou na regulação da liberação de vesículas sinápticas. No animal intacto, essas influências diretas do NO no terminal de DA parecem ser importantes (West et al., 2002).

De acordo com a proposta de West et al., (2002) as aferências glutamatérgicas mantêm tonicamente a concentração extracelular de DA de forma direta, ativando receptores glutamatérgicos ionotrópicos localizados em terminais dopaminérgicos, e de forma indireta via interneurônios que contêm NOS no estriado. Dessa forma, o NO pode desempenhar um papel importante na integração da

informação transmitida aos núcleos da base, mediando e/ou regulando aspectos diversos da neurotransmissão dopaminérgica (Salum et al., 2008a).



II. JUSTIFICATIVA

Embora o CI seja uma estrutura do teto mesencefálico envolvida principalmente com o processamento de informações auditivas e com a integração de informações sensoriais de natureza aversiva, também parece ser uma estrutura importante para selecionar informações auditivas e distribuí-las em um ritmo adequado para o desempenho motor. Como descrito anteriormente o CI é a primeira estrutura do sistema auditivo que envia eferências importantes para estruturas motoras. Sabe-se também que estruturas motoras como a substância negra e o globo pálido projetam-se para o CI (Casseday e Covey, 1996).

Além disso, considerando-se as vias auditivas subcorticiais, observa-se que o CI é a estrutura que apresenta a maior expressão de NO. Além disso, Moreira et al., (2003) mostraram que a microinjeção de doadores de NO no CI é capaz de induzir reações de fuga caracterizada por saltos e galope.

Sabe-se que o NO promove uma facilitação da neurotransmissão dopaminérgica em condições fisiológicas, e que a DA é um neurotransmissor importante nos núcleos da base. Conseqüentemente, alguma alteração na neurotransmissão dopaminérgica envolvida nesse circuito, pode ser capaz de interferir no controle motor. É possível observarmos esse tipo de alteração em doenças neurodegenerativas como a DP, cuja causa principal é a degeneração de neurônios dopaminérgicos na substância negra parte compacta, e se caracteriza por um distúrbio progressivo do movimento,

Estudos prévios realizados em nosso laboratório mostram que a administração de antagonistas de receptores NMDA no CI reduziu a duração da catalepsia induzida pelo haloperidol, um antagonista de receptores dopaminérgicos. Sendo assim, torna-se importante investigar se a microinjeção de antagonistas glutamatérgicos no CI também é capaz de influenciar a catalepsia induzida pelo L-NOARG, um inibidor da síntese de NO, quando administrado intraperitonealmente.



III. OBJETIVOS

Considerando-se que o CI também apresenta funções motoras, como pode ser observado pelas projeções recíprocas entre o CI e estruturas motoras como a substância negra e o globo pálido, o presente trabalho investigou: (i) a participação do substrato neural glutamatérgico presente no CI, na catalepsia induzida pelo L-NOARG administrado intraperitonealmente em ratos; (ii) se a microinjeção de L-NOARG diretamente no CI poderia influenciar a catalepsia em ratos.



IV. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados 74 ratos Wistar machos pesando entre 200 e 250g, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB – Unicamp). Os animais foram mantidos em grupos de 06 animais em caixas de polipropileno, e após a realização da cirurgia estereotáxica, foram acomodados 2 animais em cada caixa de acrílico transparente, todos os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), em um ciclo claro-escuro de 12:12 horas (7:00 – 19:00h), com livre acesso à água e alimento durante todo o experimento. Todos os procedimentos experimentais estão de acordo com o Comitê de ética do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.2. Drogas e Doses

Foram utilizados N-nitro-L-arginina (L-NOARG; Sigma, USA) na dose de 90mg/Kg dissolvido em uma solução de HCl 0,01N (Del Bel et al., 2004). Os animais do grupo controle receberam o veículo (HCl 0,01N) em um volume de 1ml/Kg por via intraperitoneal. Também foram realizadas microinjeções de L-NOARG nas concentrações de 50 ou 100nmol/0,5 μ l. O ácido 2-amino-7-fosfonoheptanóico (AP7; Sigma) foi microinjetado diretamente no CI nas concentrações de 20 ou 40nmol/0,5 μ l dissolvido em solução salina fisiológica.

4.3. Cirurgia Estereotáxica

Os animais foram anestesiados com Cloridrato de Ketamina (100mg/Kg) e Cloridrato de Xilazina (200mg/Kg) em uma relação de 1:1, administrado por via intraperitoneal (i.p.). Em seguida, os animais foram fixados ao aparelho estereotáxico (David Kopf, USA), pelo rochedo temporal e incisivos superiores, foram submetidos à tricotomia na região dorsal da cabeça, seguida de anti-sepsia com álcool iodado a 3% e administração subcutânea de anestésico local (Cloridrato de Lidocaína à 3%, conjugado com vasoconstritor, norepinefrina 1:50.000).

A calota craniana foi exposta cirurgicamente, o tecido subcutâneo removido, assim como o periósteo (por raspagem, com auxílio de pinça e algodão) e em seguida o crânio foi ajustado em posição horizontal, entre bregma e lambda. Três orifícios foram feitos nos ossos parietais, por meio de broca de trepanação (Beltec LB-100). Em dois deles foram fixados parafusos de ancoragem, e no outro foi implantada a cânula guia, constituída de um seguimento de agulha de aço inoxidável (BD 0,70x25 – 22G1), apresentando 0,6mm de diâmetro externo, 0,4mm de diâmetro interno, para micoinjeção de drogas.

A cânula guia foi introduzida no mesencéfalo, direcionado ao CI e introduzida, verticalmente a partir do bregma, seguindo as coordenadas propostas por Paxinos e Watson (1997) utilizando como referência para os planos: ântero-posterior: -1,6mm; médio-lateral: -1,2mm; e dorso-ventral: -4,5mm. A cânula foi fixada à superfície óssea por meio de uma resina acrílica autopolimerizável que encontrou sustentação adicional nos parafusos de ancoragem. Ao final da cirurgia, cada cânula-guia foi selada em seu interior, com um fio metálico, protegendo-a de impurezas e entupimentos que prejudicariam a administração das drogas.

4.4. Distribuição dos grupos

Tabela 1: Distribuição dos animais no Experimento I.

GRUPOS	INTRA PERITONIAL (i.p.)	INTRA CEREBRAL (i.c.)	n
Grupo 1	L-NOARG 90mg/Kg	Veículo	10
Grupo 2	Veículo	AP7 20 nmol	08
Grupo 3	Veículo	AP7 40 nmol	09
Grupo 4	L-NOARG 90 mg/Kg	AP7 20 nmol	09
Grupo 5	L-NOARG 90 mg/Kg	AP7 40 nmol	09

Tabela 2: Distribuição dos animais no Experimento II.

GRUPOS	INTRA CEREBRAL (i.c.)	n
Grupo 1	Veículo	09
Grupo 2	L-NOARG 50 nmol	09
Grupo 3	L-NOARG 100 nmol	08

4.5. Microinjeção de Drogas

Após o período de 5 dias de recuperação cirúrgica, o fio metálico que protegia o interior da cânula-guia foi removido. Uma microagulha confeccionada a partir de uma agulha de injeção gengival (Injecta, G-30) com comprimento de 15 mm, conectada a uma microseringa de 10 µl (Hamilton RN-701) por meio de um seguimento de polietileno, foi inserida na cânula, ultrapassando-a em 1,0 mm abaixo de sua secção. O volume de 0,5 µl foi microinjetado a uma velocidade de 1 minuto controlado por uma bomba de microinjeções (modelo Insight Equipamentos BI2000). Após o termino, foi aguardado 1 minuto para a retirada da microagulha, permitindo assim uma melhor distribuição das drogas no tecido encefálico.

4.6. Experimento 1: Avaliação do Efeito de Bloqueio de Receptor NMDA no CI

No 5º dia pós-cirurgia, os animais foram conduzidos ao laboratório onde receberam a microinjeção de AP7 20 ou 40 nmol/0,5 µl (Melo et al., no prelo) ou salina fisiológica 0,9% diretamente no CI. Após 10 minutos (Melo et al., no prelo) do final da injeção intracolicular foi administrado o L-NOARG 90mg/Kg ou veículo via i.p.

O tempo de catalepsia foi avaliado aos 10, 30, 60, 90 e 120 minutos (Del Bel et al., 2005) após a injeção i.p. de L-NOARG ou veículo .

A representação esquemática desse experimento está descrita na figura 7.

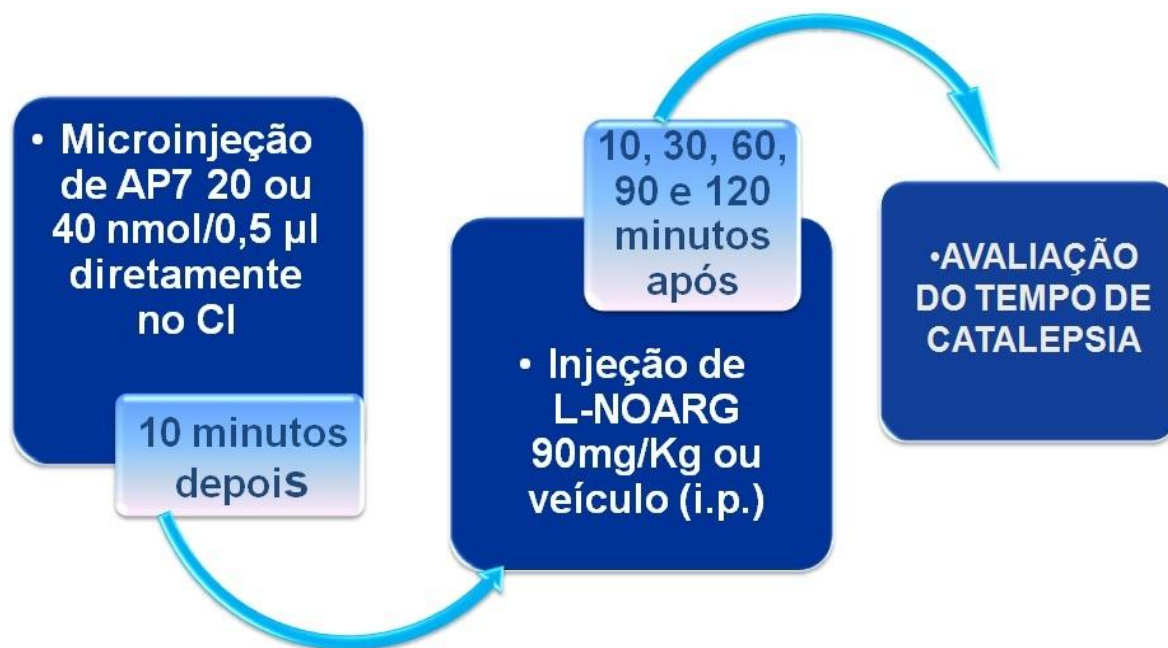


Fig. 7: Descrição das etapas para realização do Experimento 1.

4.7. Experimento 2: Avaliação do Efeito do L-NOARG Microinjetado Diretamente no CI

Os animais receberam uma microinjeção de L-NOARG 50 ou 100 nmol/0,5 µl (Del Bel, 2003) diretamente no CI e, 10 min após, o tempo de catalepsia foi avaliado como descrito para o Experimento 1. Os animais pertencentes ao grupo controle receberam uma microinjeção do veículo (HCl 0,05N) e 10 minutos após o tempo de catalepsia foi avaliado

A representação esquemática desse experimento está descrita na figura 8.

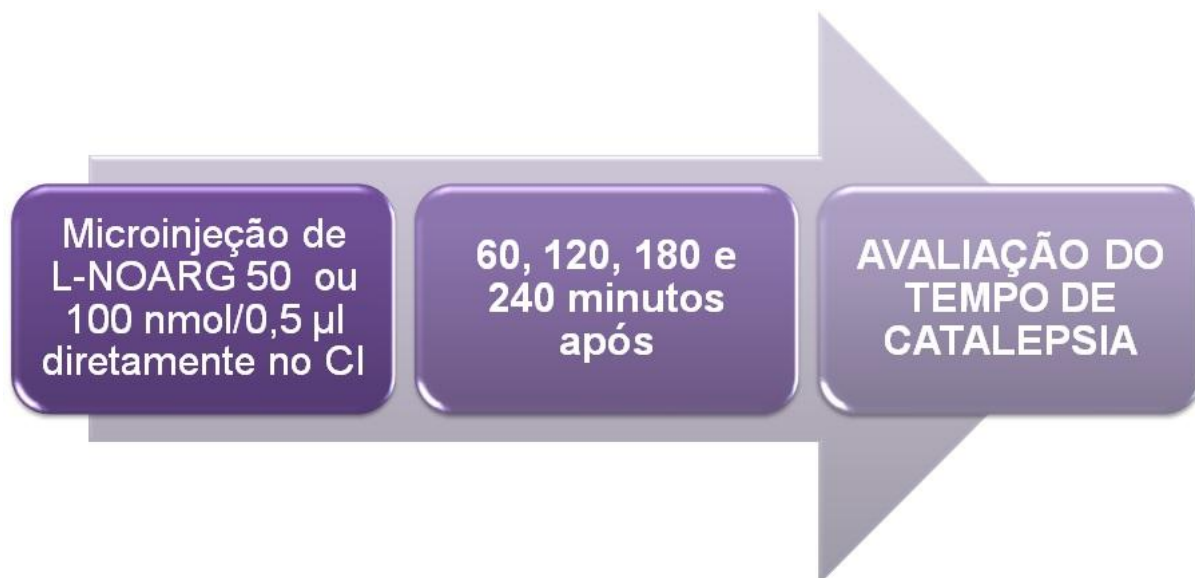


Fig. 8: Descrição das etapas para realização do Experimento 2.

4.8. Medida da Catalepsia

A catalepsia foi avaliada posicionando-se o animal com as patas dianteiras sobre a barra horizontal (diâmetro 0,5 cm), elevada 8,0 cm do chão, colocada em uma caixa de observação construída em acrílico transparente localizada em uma sala com luminosidade controlada (60 lux). O tempo que o animal permaneceu sobre a barra horizontal foi no máximo de 300 segundos (Del Bel e Guimarães, 2000). Caso o animal saísse da barra horizontal antes de 300s ele seria recolocado na por no máximo três vezes. Considerava-se encerrado o tempo de observação da catalepsia quando o mesmo tocava o assoalho do campo aberto com as duas patas dianteiras pela terceira vez.

4.9. Perfusão e Análise Histológica

Ao final dos experimentos comportamentais, os animais foram anestesiados com uma associação de Cloridrato de Ketamina (100mg/Kg) e Cloridrato de Xilazina (200mg/Kg) em uma relação de volume de 1:1, administrado por via i.p., e perfundidos via ventrículo esquerdo com solução salina fisiológica 0,9% tamponada,

seguida por uma solução de formaldeído 4%. Os animais foram decapitados e o encéfalo removido da caixa craniana e colocado em solução de formaldeído 4%. Após dois dias em imersão de solução de formaldeído, os encéfalos foram congelados em gelo seco e cortados no micrótomo (modelo Leica 2000), em secções de 40 μ m. Em seguida os cortes foram moldados, sobre lâminas de vidro gelatinizadas, corados com hematoxilina e eosina, selados com lamínulas, bálsamo do Canadá e observados sob microscopia de luz. Dados obtidos em animais nos quais as extremidades inferior da cânula-guia estivesse localizada fora do CI, não foram incluídos (n = 27) na análise estatística.

4.10. Análise Estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para avaliação dos tempos de catalepsia dos diversos grupos foi empregada uma ANOVA não paramétrica. Foi utilizado o teste Kruskal Wallis, para comparar os efeitos do tratamento em cada tempo de avaliação, seguido do teste Bonferroni, para comparações da significância entre os grupos. O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$.



V. RESULTADOS

5.1. Experimento 1: Avaliação do Efeito de Bloqueio de Receptor NMDA no CI

Para avaliarmos a participação do substrato neural glutamatérgico presente no CI, na catalepsia induzida pelo L-NOARG em ratos, foi realizada a administração intracolicular de AP7 20 ou 40nmol/0,5 µl ou salina fisiológica e 10 minutos após os animais receberam uma injeção i.p. de L-NOARG 90mg/Kg ou veículo (HCl). O tempo de catalepsia foi avaliado 10, 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção i.p. de L-NOARG 90mg/Kg ou veículo (HCl). O índice de catalepsia foi avaliado pelo tempo que o animal permaneceu com as duas patas dianteiras sobre a barra horizontal. O animal poderia ser recolocado por mais duas vezes sobre a barra e o tempo máximo de permanência sobre a mesma era de 300 segundos. Caso esse tempo fosse atingido, o teste era interrompido.

O tempo de catalepsia induzida pela administração de L-NOARG e seu bloqueio pelo antagonista de receptores NMDA, AP7, estão demonstrados na Figura 9. Pode ser observado que a microinjeção de AP7 nas doses de 20 ou 40nmol/0,5µl reduziu significativamente o tempo médio de catalepsia em cada tempo avaliado (10 min: $H= 12,48$, $P= 0,0141$; 30min: $H= 24,16$, $P= 0,0001$; 60min: $H= 25,51$, $P= < 0.0001$; 90min: $H= 28,29$, $P= < 0.0001$; 120min: $H= 27,19$, $P= < 0.0001$).

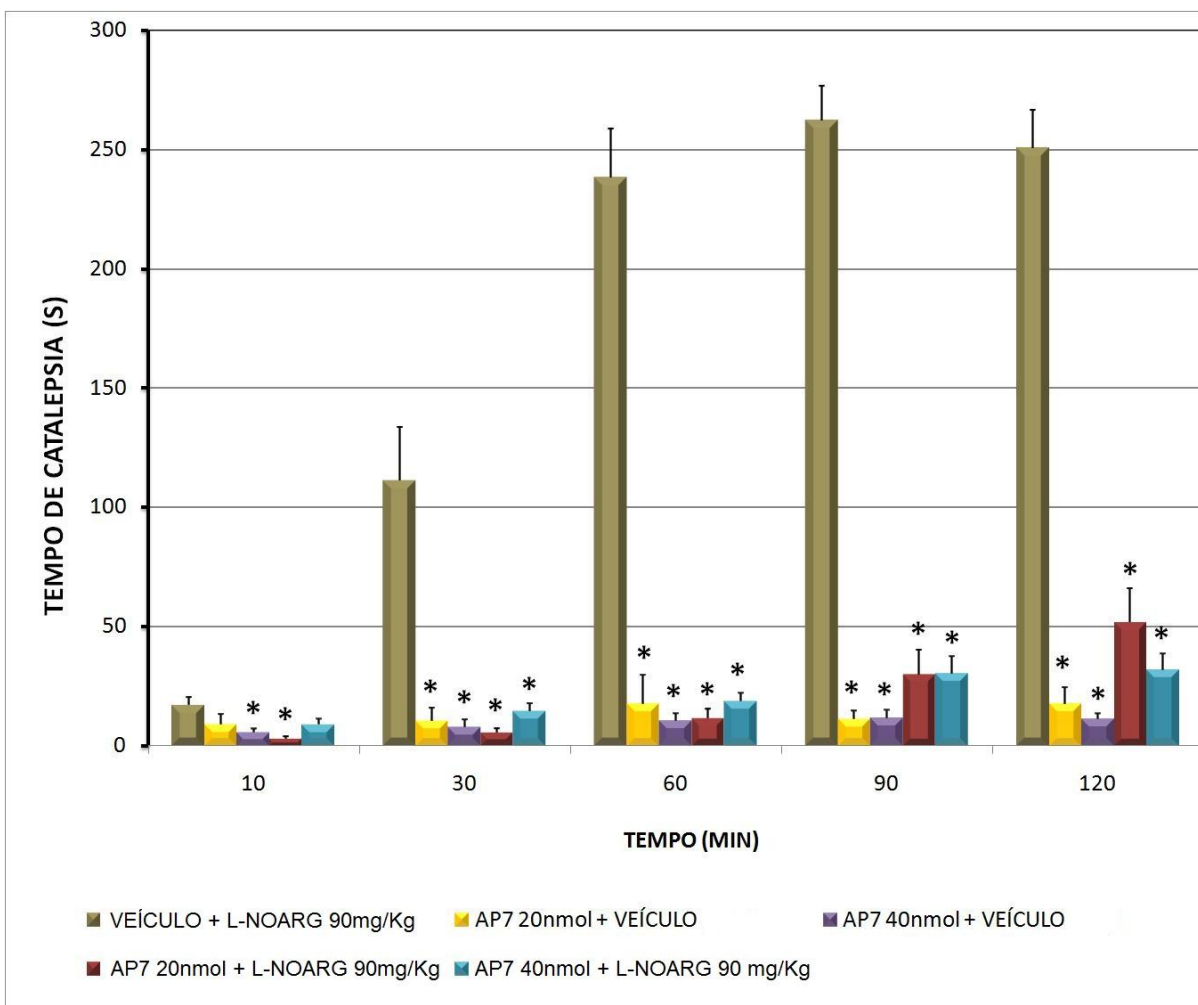


Fig. 9: Efeitos da microinjeção de AP7 20nmol/ 0,5 μ l (n= 9) ou 40nmol/ 0,5 μ l (n=9) no CI sobre a catalepsia induzida pelo L-Noarg em ratos. O animal foi mantido na posição de catalepsia por no máximo 300 segundos 10, 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção i.p. de L-NOARG ou veículo. As colunas representam as médias \pm EPM sendo * $P < 0.05$, ** $P < 0,001$ pelo teste de Kruskal Wallis seguido do teste Bonferroni para múltiplas comparações entre os tratamentos.

5.2. Experimento 2: Avaliação do Efeito do L-NOARG Microinjetado Diretamente no CI

Para avaliarmos se a microinjeção de L-NOARG diretamente no CI poderia influenciar a catalepsia em ratos, foi realizada uma microinjeção intracolicular de L-NOARG 50 ou 100nmol/0,5 μ l ou salina fisiológica. O tempo de catalepsia foi avaliado 60, 120, 180 e 240 minutos após a microinjeção. O índice de catalepsia foi avaliado como descrito para o experimento 1.

A microinjeção intracolicular de L-NOARG nas doses de 50 e 100nmol/ 0,5 μ l, não interferiu no tempo de catalepsia dos animais (60 min: H= 3,19, $P= 0,2023$; 120min: H= 2,12, $P= 0,3456$; 180min: H= 12,27, $P= 0,5413$; 240min: H= 14,41, $P= 0.4864$).

Os resultados obtidos no Experimento 2 estão demonstrados na Figura 10.

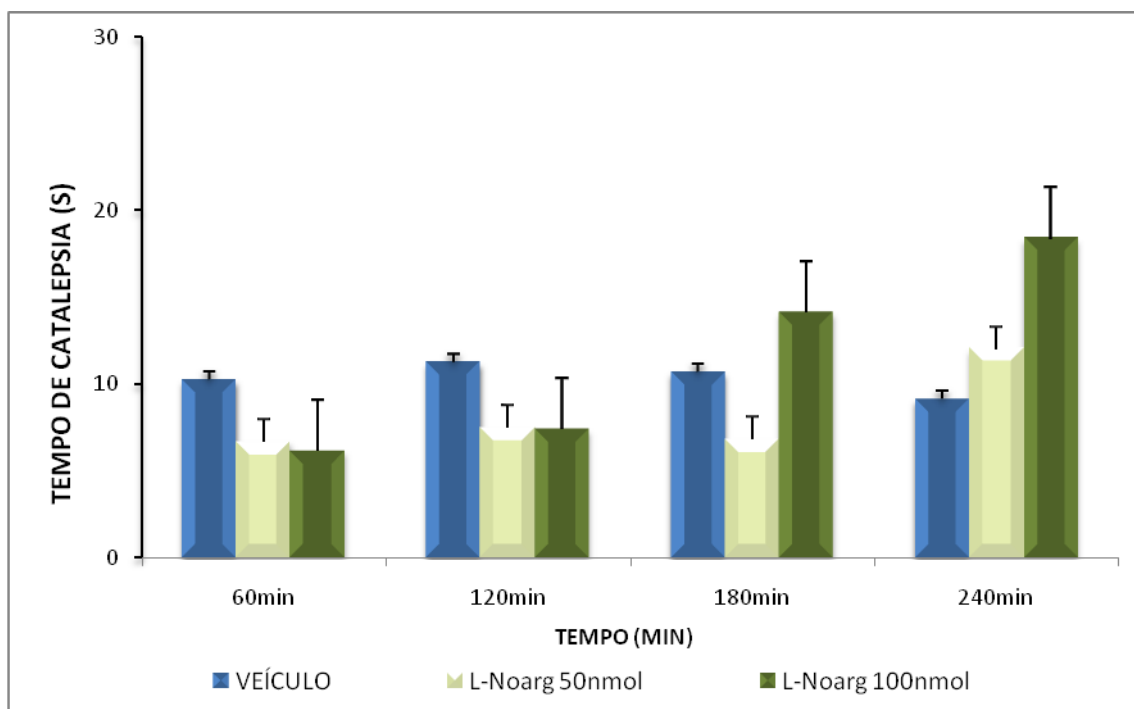


Fig. 10: Efeitos da microinjeção intracolicular de L-NOARG 50nmol/ 0,5 μ l ($n= 10$) ou 100nmol/ 0,5 μ l ($n=10$). As colunas representam as médias \pm EPM.

A identificação histológica dos locais de microinjeção das drogas, nos animais que participaram dos Experimentos 1 e 2, está representada na Figura 11. Nem todos os sítios de microinjeção estão representados devido à sobreposição dos mesmos.

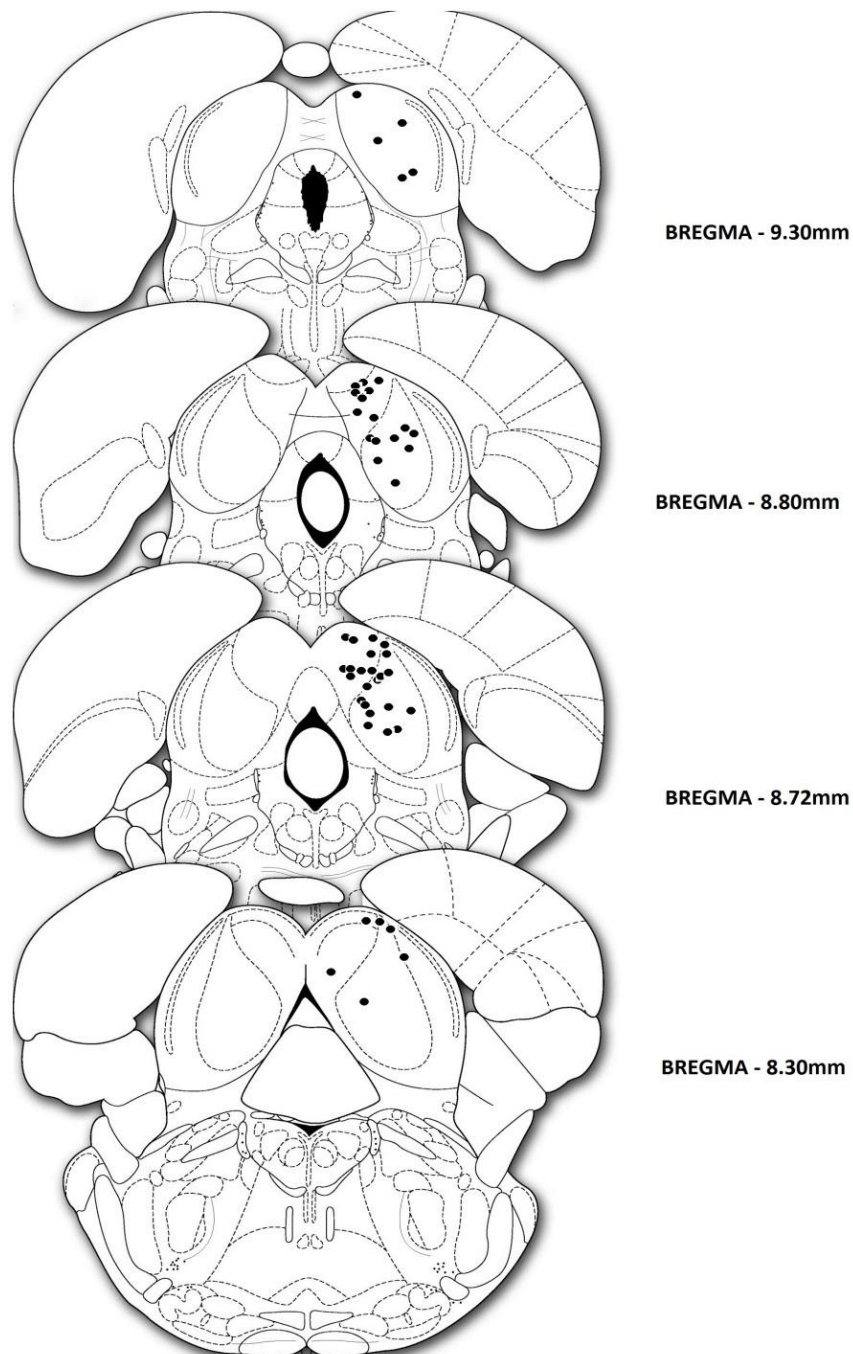


Fig. 11: Representação da localização das cânulas (círculos pretos) no CI em cortes transversais, seguindo o Atlas de Paxinos e Watson (1997). As figuras representam as coordenadas do atlas em milímetros em uma visão posterior. Nem todos os sítios de estimulação estão representados devido à sobreposição.



VI. DISCUSSÃO

O presente estudo mostra que a injeção intraperitoneal de L-NOARG foi capaz de promover catalepsia em ratos. Estudos utilizando inibidores da síntese do NO (L-NOARG, L-NAME, L-NMMA, 7-NIO) mostraram que essas drogas quando administradas intraperitonealmente são capazes de produzir um efeito cataléptico em ratos. Além disso, quando microinjetados diretamente no estriado também são capazes de reproduzir esse efeito, sugerindo que essa estrutura pode ser um importante sítio de ação para os efeitos motores observados após a administração sistêmica dessas drogas (Del Bel et al., 2002; 2003; 2004; 2005).

Inibidores da NOS podem diminuir a atividade motora por interferir na neurotransmissão dopaminérgica estriatal. Estudos utilizando inibidores da NOS mostraram uma redução da liberação da dopamina no estriado (Bowyer et al., 1995; Sandor et al., 1995; West et al., 2002) e inibição do aumento da atividade motora encontrada após a administração de agonistas de dopamina (Abekawa et al., 1994; Star e Star, 1995). Drogas que diminuem a neurotransmissão dopaminérgica no estriado, como por exemplo os neurolépticos, induzem catalepsia em roedores e geram sintomas da DP em humanos (Koffer et al., 1978; Sanberg et al., 1988).

Os núcleos da base têm sido implicados em importantes funções motoras, em particular a iniciação do movimento. De acordo com o atual modelo de funcionamento dos núcleos da base, o aumento ou a diminuição da atividade da parte reticulada da substância negra estão associados com a facilitação ou inibição, respectivamente, da iniciação de respostas motoras. A dificuldade para iniciar o movimento (acinesia) é um dos sintomas que caracterizam a DP e lesões nos núcleos da base podem causar desordens de movimentos observadas em diversas patologias. Os principais sinais e sintomas da DP parecem estar relacionados à redução na neurotransmissão dopaminérgica no estriado como resultado da degeneração na substância negra parte compacta (Lange et al., 1997).

A DP é um distúrbio progressivo do movimento, descrita inicialmente por James Parkinson, em 1817 que na época denominou-a “paralisia agitante” (Gerlach e Riederer, 1996). A DP é caracterizada pela presença de quatro sinais cardinais da doença, quais sejam tremor, lentidão do movimento (bradicinesia), rigidez e dificuldades para manter o equilíbrio. A evolução da doença caracteriza-se pela piora da marcha (passos curtos), quedas freqüentes, constipação, disartria, dificuldades de deglutição, sialorréia constante, incontinência urinária e finalmente

anartria (Weiner, 2008). Esses sinais cardinais iniciam-se unilateralmente e à medida em que a doença progride, podem se tornar bilaterais (Eberhardt e Schulz, 2003).

Entretanto, a DP tem sido reconhecida como uma neuropatologia obscura, que envolve outras regiões encefálicas além do sistema dopaminérgico nigroestriatal, incluindo aquelas que não estão diretamente envolvidas no controle motor como o locus coeruleus, o núcleo dorsal do vago, o núcleo da rafe, o hipotálamo, o tubérculo olfatório e grande parte do córtex límbico e neocórtex (Forno, 1982; Braak, 2003). Várias linhas de evidências indicam que mecanismos patogênicos envolvidos com doenças neurodegenerativas, como a DP, estão associados com excitotoxicidade, dano no DNA e modificações protéicas (Zhang, et al., 2006).

Inibidores da NOS quando administrados sistemicamente em baixas doses, reduzem a ansiedade em animais e em altas doses diminuem a locomoção. Os inibidores da NOS são capazes de reduzir a neurotransmissão dopaminérgica no estriado, o que pode explicar pelo menos em parte esses resultados. Estudos realizados por Del Bel e colaboradores (2005) usando modelos experimentais que mimetizam sintomas motores presentes na DP, sugerem uma interação entre o sistema nitrérgico e a neurodegeneração que acontece em neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal.

É interessante observar no presente estudo que a microinjeção de L-NOARG diretamente no CI não produz catalepsia. Esses resultados indicam que a inibição da síntese de NO no CI não é capaz de interferir na motricidade do animal. É interessante observar que o L-NOARG quando microinjetado diretamente no estriado produz catalepsia sugerindo que essa estrutura pode ser um importante sítio de ação para os efeitos motores observados após a administração sistêmica dessa droga. Vale ressaltar que no presente estudo, para a microinjeção intracolicular de L-NOARG, utilizou-se as mesmas doses (50 ou 100 nmol) capazes de produzir prejuízos motores quando microinjetadas no estriado (Del Bel, 2003). Os nossos resultados sugerem que apesar do CI não estar envolvido na iniciação do movimento voluntário, papel esse atribuído aos núcleos da base, é possível que ele exerça uma influência modulatória sobre a atividade motora. Os resultados obtidos com o bloqueio dos receptores glutamatérgicos no CI sobre a catalepsia induzida pelo L-NOARG, fortalecem essa proposição.

De fato, nossos resultados mostram que a microinjeção prévia de AP7, um antagonista competitivo de receptores NMDA, diretamente no CI foi capaz de reduzir a catalepsia induzida pela injeção intraperitoneal de L-NOARG. De acordo com o que foi sugerido para outras estruturas encefálicas, os presentes resultados sugerem que os mecanismos glutamatérgicos do CI também pareçam ser importantes para modular as eferências motoras nesse circuito. Porém, a natureza desses mecanismos e como o CI modula o circuito motor, ainda permanece desconhecido.

Diversos relatos têm atribuído uma função motora ao CI. A estimulação elétrica ou química dessa estrutura é capaz de produzir excitação comportamental (Brandão et al. 1988; Coimbra et al. 2000). Além disso, diferentes padrões de ativação comportamental podem ser obtidos a partir da estimulação elétrica de diferentes subnúcleos do CI. A estimulação da divisão dorsal produz fuga desabalada que perdura por vários segundos após o término de estímulo (McCown et al. 1984). A estimulação da divisão ventral produz fuga desabalada que persiste apenas durante o estímulo (McCown et al. 1984; Bagri et al. 1991). Microinjeções de aminoácidos excitatórios no CI produzem uma ativação comportamental prolongada que é intercalada por estados de imobilidade (Cardoso et al. 1994).

Exceto para os circuitos relacionados com o reflexo de sobressalto acústico, o CI é a primeira estrutura do sistema auditivo que tem o maior número de eferências para as vias motoras e sistemas que coordenam os movimentos. Por exemplo, o CI envia projeções para camadas intermediárias e profundas do colículo superior que controla os movimentos da cabeça e olhos para orientá-los em direção a objetos no espaço (Henkel e Edwards 1978; Sparks e Nelson 1987; Masino e Knudsen 1993; Casseday e Covey, 1996).

Além disso, existem também evidências que estruturas motoras enviam projeções para o CI. Existem evidências de que existem projeções recíprocas entre o globo pálido e o CI. O globo pálido além de inervar o *brachium* do CI, os córtices externo e dorsal do CI também inerva outras estruturas importantes para o controle motor, como por exemplo a substância negra (Shinonaga et al. 1992; Yasui et al. 1990; Moriizumi e Hattori 1991; Shammah-Lagnado et al. 1996).

A substância negra parte reticulada recebe aferências GABAérgicas dos núcleos da base (Bolam et al. 2000; Castellan-Baldan et al. 2006; Fallon e Laughlin

1995), mas também envia eferências GABAérgicas para o CI, bem como para o núcleo motor do tálamo, para o colículo superior e para a substância cinzenta periaquedutal dorsal (Fallon e Laughlin 1995; Eichenberger et al. 2002; Castellan-Baldan et al. 2006). É interessante notar que a substância negra parte reticulada está envolvida na modulação de respostas que são evocadas por estímulos elétricos (Maisonnette et al. 1996; Castellan-Baldan et al. 2006) e químicos (Castellan-Baldan et al. 2006) do núcleo central do CI.

O córtex dorsal do CI também apresenta conexões com a substância cinzenta periaquedutal e a substância negra. Ele recebe aferências corticais ipsilaterais de várias regiões, como as áreas 20, 36 e 41 de Brodmann, e do globo pálido (Moriizumi e Hattori, 1991). Devido a essas diferentes conexões entre os núcleos do CI, Tokunaga e colaboradores (1984), sugeriram uma divisão entre as funções dessa estrutura: a primeira delas seria uma função de integração auditiva, na qual o núcleo central seria o responsável, e a outra função seria a de integração sensorial-motora, que estariam envolvidos os córtices dorsal e externo. É interessante observar que em nosso estudo a grande maioria dos sítios de microinjeção localizou-se exatamente nos córtices dorsal e externo do CI.

Com base no exposto acima e nos resultados obtidos pelo presente estudo, o esquema abaixo ilustra uma possível participação do CI no circuito já conhecido dos núcleos da base que controlam os movimentos.

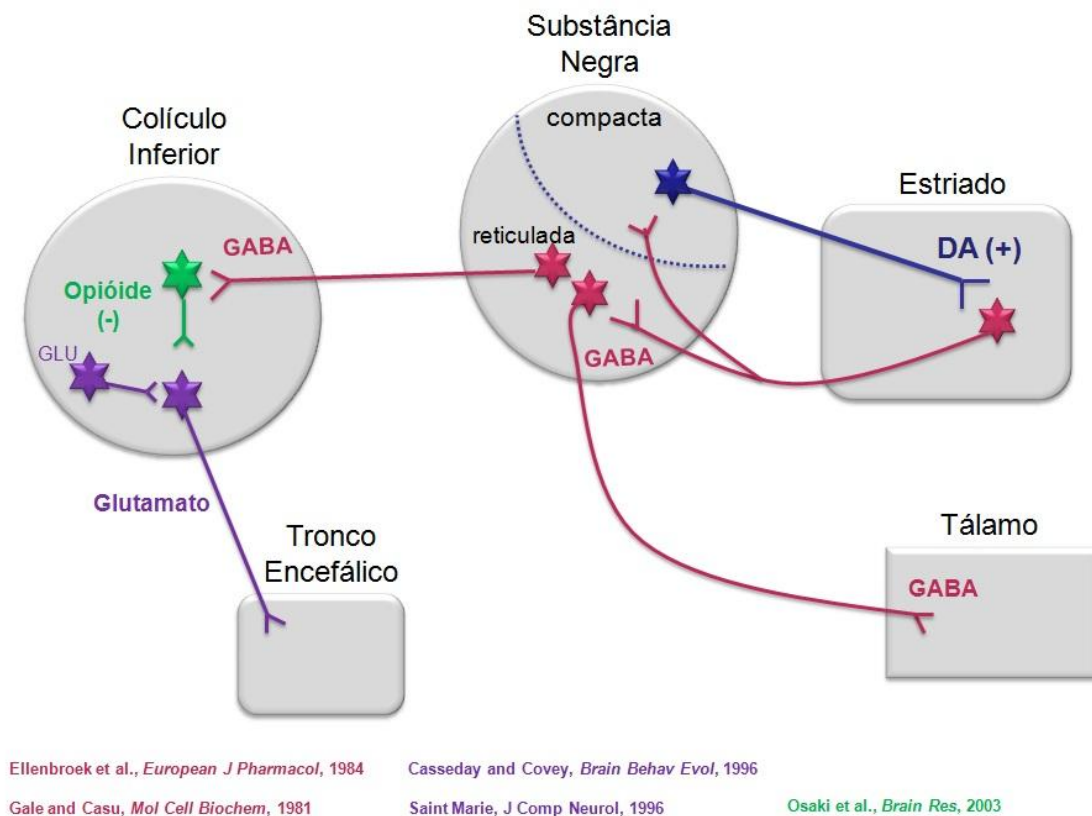


Fig. 12: Descrição da projeções existentes entre o CI e estruturas motoras.

Observando-se o circuito acima, pode-se deduzir que uma menor excitação dos neurônios GABAérgicos estriado-nigrais (resultado da degeneração dos neurônios dopaminérgicos excitatórios da via nigro-estriatal) pode resultar em uma desinibição dos neurônios GABAérgicos que se projetam da parte reticulada da substância negra para o CI. Esses neurônios mais excitados intensificam seu efeito inibitório sobre interneurônios opióidérgicos presentes no CI, que dessa forma reduzem sua influência inibitória sobre neurônios glutamatérgicos que se projetam para núcleos motores pontinos. Esses neurônios glutamatérgicos por sua vez mais excitados, aumentariam o tônus muscular, contribuindo para a catalepsia. Estudos prévios obtidos em nosso laboratório juntamente com os resultados observados no presente trabalho mostram que a catalepsia, causada pela diminuição da atividade dopaminérgica no estriado, pode ser revertida pela microinjeção de antagonistas de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, provavelmente devido a um bloqueio da atividade excitatória dos neurônios glutamatérgicos que se projetam para os núcleos pontinos motores. Como resultado haveria uma redução do tônus muscular,

facilitando o movimento. Inversamente, a administração de agonista de receptores NMDA no CI, aumenta o tempo de catalepsia (Melo et al., no prelo).

As evidências obtidas no presente trabalho reforçando um papel motor para o CI amplia o papel já conhecido do CI como uma estrutura acústica primária. Essa estrutura ocupa uma posição crucial na via auditiva primária, que integra eferências ipsilaterais e contralaterais ascendentes de diversos núcleos auditivos do tronco encefálico e envia essas informações para o tálamo auditivo. Adicionalmente, o CI é também parte do sistema cerebral aversivo, junto com a substância cinzenta periaquedutal dorsal, hipotálamo medial e complexo amigdalóide (Brandão et al. 1999; 2005).

A interface entre do CI e o circuito acima mencionado pode ser importante na modulação do comportamento motor e emoção. Neste sentido, é interessante notar que a bradicinesia, um dos sintomas parkinsonianos, é dependente do estado emocional do paciente. Por exemplo, pacientes com imobilidade quando estimulados podem fazer movimentos rápidos como pegar uma bola, ou podem ser capazes de correr de repente se alguém grita "fogo". Esse fenômeno (cinesia paradoxal) sugere que pacientes com DP possuem programas motores intactos, porém apresentam dificuldade de acessá-los na ausência de um estímulo externo, como por exemplo, um barulho, música cadenciada ou um estímulo visual (Jankovic, 2008). A estimulação sensorial (auditiva ou visual) ou mesmo qualquer mal funcionamento nas vias responsáveis por esses programas, podem levar a conseqüências na performance motora (Matsui et al., 2006; Baker et al., 2007; Arias e Cudeiro, 2008).

No que diz respeito ao uso terapêutico da estimulação sensorial auditiva em pacientes com DP que apresentem imobilidade, tem sido mostrado que movimentos como sair da cama pela manhã ou caminhar, são facilitados quando se utiliza música como estímulo (Thaut et al., 1999; Thaut et al., 1996). Se considerarmos que o CI é uma estrutura importante para selecionar informações auditivas e distribuí-las em um ritmo adequado para o desempenho motor (Casseday e Covey, 1996), não é improvável que as informações auditivas consideradas relevantes, ao serem processadas no CI, possam ativar uma via motora alternativa e dessa forma retirar o paciente da imobilidade.



VII. CONCLUSÃO

O presente estudo mostra que a injeção intraperitoneal de L-NOARG foi capaz de promover catalepsia em ratos e que este efeito foi reduzido pela microinjeção prévia AP7, um antagonista competitivo de receptores NMDA, diretamente no CI. Esses resultados sugerem que o substrato neural glutamatérgico presente no CI pode exercer uma influência sobre o estado de imobilidade que é gerado após a inibição da síntese de NO nos núcleos da base em ratos. Essa possibilidade é apoiada pela presença das conexões anatômicas entre o CI e a substância negra (Olazábal e Moore 1989) ou globo pálido (Moriizumi e Hattori 1991).



VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEKAWA, T., OHINORI, T., KOYAMA, T. *Effect of NO synthase inhibition on behavioral changes induced by a single administration of methamphetamine.* **Brain Res.**, 666: 147– 150, 1994.

ADAMS, J. C. *Crossed and descending projections to the inferior colliculus.* **Neurosci Lett.**, 19: 1-5, 1980.

ADAMS, J.C. *Ascending projections to the colliculus.* **J Comp Neurol.**, 183: 519-538, 1979.

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

ARAKI, T., MIZUTANI, H., MATSUBARA, M., IMAI, Y., MIZUGAKI, M., ITOYAMA, Y. *Nitric oxide synthase inhibitors cause motor deficits in mice.* **Eur. Neuropsychopharmacol.** 11: 125 – 133, 2001.

ARIAS P, CUDEIRO J. *Effects of rhythmic sensory stimulation (auditory, visual) on gait in Parkinson's disease patients.* **Exp Brain Res.**, 186:589-601, 2008.

BAGRI AG, SANDNER G, DI SCALA G. *Wild running and switch-off behavior elicited by electrical stimulation of the inferior colliculus: effect of anticonvulsant drugs.* **Pharmacol Biochem Behav.**, 39:638-688, 1991.

BAKER K, ROCHESTER L, NIEUWBOER A. *The immediate effect of attentional, auditory, and a combined cue strategy on gait during single and dual tasks in Parkinson's disease.* **Arch Phys Med Rehabil.**, 88:1593-1600, 2007.

BLACK MD, MATTHEWS EK, HUMPHREY PPA. *The effects of a photosensitive nitric oxide donor on basal and electrically-stimulated dopamine efflux from the rat striatum in vitro.* **Neuropharmacology**, 33:1357–1365, 1994.

BLANCHARD, D.C., BLANCHARD, R.J. *Ethoexperimental approaches to the biology of emotion.* **Annu Ver Psychol.**, 39: 43-68, 1988.

BOLAM JP, HANLEY JJ, BOOTH PA, BEVAN MD. *Synaptic organization of the basal ganglia.* **J Anat.**, 196(4):527-542, 2000.

BOLAÑOS, J.P., ALMEIDA, A., STEWART, V., PEUCHEN, S., LAND, J.M., CLARK, J.B., HEALES, S.J.R. *Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases*. **J. Neurochem.**, 68, 2227–2240, 1997.

BOWYER, J.F., CLAUSING, P., GOUGH, B., SLIKKER JR., W., HOLSON, R.R., *Nitric oxide regulation of methamphetamine-induced dopamine release in caudate/putamen*. **Brain Res.**, 699: 62–70, 1995.

BRAAK H, DEL TREDICI K, RUB U, DE VOS RA, JANSEN STEUR EN, BRAAK E. *Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease*. **Neurobiology of Aging**. 24:197–211, 2003.

BRANDÃO M.L., ANSELONI V.Z., PANDÓSSIO J.E., DE ARAUJO J.E., CASTILHO V.M. *Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain*. **Neurosci Biobehav Rev.**, 23:863-875, 1999.

BRANDÃO M.L., BORELLI K.G., NOBRE M.J., SANTOS J.M., ALBRECHET-SOUZA L., OLIVEIRA A.R., MARTINEZ R.C. *Gabaergic regulation of the neural organization of fear in the midbrain tectum*. **Neurosci Biobehav Rev.**, 29(8):1299-1311. 2005.

BRANDÃO M.L., CARDOSO S.H., MELO L.L., MOTTA V., COIMBRA N.C. *The Neural substrate of defensive behavior in the mid brain tectum*. **Neurosci Biobehav Rev.**, 18: 339-346, 1994.

BRANDÃO M.L., TOMAZ C., COIMBRA N.C., BAGRI A. *Defense reaction induced by microinjection of bicuculline into the inferior colliculus*. **Physiol Behav.**, 44: 361-365, 1988.

BRANDÃO, M.L., FONTES, J.C., GRAEF, F.G. *Facilitatory effect of ketamine on punished behavior*. **Pharmacol Biochem Behav.**, 13: 1-4, 1980.

BRANDÃO, M.L., MELO, L.L., CARDOSO, S.H. *Mechanisms of defense in the inferior colliculus*. **Behav Brain Res.**, 58: 49-55, 1993.

BRANDÃO, M.L., TRONCOSO, A.C. MELO, L.L., SANDNER, G. *Active avoidance learning using brain stimulation applied to the inferior colliculus as negative reinforcement in rats: evidence for latent inhibition*. **Neuropsychobiology**. 35: 30-35, 1997.

BRETT D.S., SNYDER S.H. *Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme.* **Proc Natl Acad Sci.**, USA 87:682–685, 1990.

BRETT, D. S. *Endogenous nitric oxide synthesis: Biological functions and pathophysiology.* **Free Radic. Res.**, 31:577–596, 1999.

BRETT, D. S., AND SNYDER, S. H. *Nitric oxide, a novel neuronal messenger.* **Neuron.**, 8:3–11, 1992.

BRODAL, P. *The Central Nervous System: Structure and Function.* Oxford University Press: New York, USA. 1992.

BUYUKUYSAL L. *Effect of nitric oxide donors on endogenous dopamine release from striatal slices. II. The role of voltage-dependent sodium channels, calcium channel activation, reverse transport mechanism, guanylate cyclase and endogenous glutamate.* **Fundam Clin Pharmacol.**, 11:528–536, 1997.

CAICEDO A, EYBALIN M. *Glutamate receptor phenotypes in the auditory brainstem and mid-brain of the developing rat.* **Eur J Neurosci.**, 11: 51–74, 1999.

CAJAL, S. RAMON Y. *Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme ET des Vertébrés.* **Maloine**, Paris, 1911.

CARDOSO S.H., COIMBRA NC, BRANDÃO ML. *Defensive reactions evoked by activation of NMDA receptors in distinct sites of the inferior colliculus.* **Behav Brain Res.**, 63:17 – 24, 1994.

CASSEDAY JH, COVEY E. *A neuroethological theory of the operation of the inferior colliculus.* **Brain Behav Evol.**, 47:311-336, 1996.

CASTELLAN-BALDAN L., COSTA-KAWASAKI M., RIBEIRO S.J., CALVO F., CORRÊA V.M.A., COIMBRA N.C. *Topographic and functional neuroanatomical study of GABAergic disinhibitory striatum-nigral inputs and inhibitory nigrocollicular pathways: Neural hodology recruiting the substantia nigra, pars reticulata, for the modulation of the neural activity in the inferior colliculus involved with panic-like emotions.* **J Chem Neuroanat.**, 32:1-27, 2006.

CASTILHO, V.M., BRANDÃO, M.L. *Conditioned antinociception and freezing using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray or inferior colliculus as*

unconditioned stimulus are differentially regulated by 5-HT_{2A} receptors in rats. **Psychopharmacology (Berl)** 155: 154-162, 2001.

COIMBRA N.C., OSAKI M.Y., EICHENBERGER G.C., CISCATO J.G.JR., JUCÁ, C.E. BIOJONE C.R. *Effects of opioid receptor blockade on defensive behavior elicited by electrical stimulation of the aversive substrates of the inferior colliculus in Rattus norvegicus (Rodentia, Muridae).* **Psychopharmacol.**, 152(4):422-430, 2000.

COIMBRA, N.C., BRANDÃO, M.L. *Effects of 5-HT₂ receptors on fear induced analgesia elicited by electrical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray.* **Behav Brain Res.**, 87: 97-103, 1997.

COIMBRA, N.C., BRANDÃO, M.L. *GABAergic nigro-collicular pathways modulate the defensive behavior elicited by midbrain tectum stimulation.* **Behav Brain Res.**, 59: 131-139, 1993.

COIMBRA, N.C., LEO-BORGES, P.C., BRANDÃO, M.L. *GABAergic fibers from substantia nigra pars reticulata modulate escape behavior induced by midbrain central gray stimulation.* **Braz J Med Biol Res.**, 22: 111-114, 1989.

COIMBRA, N.C., TOMAZ, C., BRANDÃO, M.L. *Evidence for the involvement of serotonin in the antinociception induced by electrical or chemical stimulation of the mesencephalic tectum.* **Behav Brain Res.**, 50: 77-83, 1992.

COLEMAN, J. R., CLERICI, W. J. *Sources of projections to subdivisions of the inferior colliculus in the rat.* **J Comp Neurol.**, 262: 215-226, 1987.

COOTE E.J., REES A. *The distribution of NMDA receptor subunits NR1 and NR2a/b compared to nitric oxide synthase (NOS) in the inferior colliculus (IC).* **Assoc Res Otolaryngol Abstr.**, 627, 2000.

COOTE, E. J., REES, A. *The Distribution Of Nitric Oxide Synthase In The Inferior Colliculus Of Guinea Pig.* **Neuroscience**, 154: 218-225, 2008.

CUADRA, G. ZURITA, A., MACEDO, C.E., MOLINA, V.A., BRANDÃO, M.L. *Electrical stimulation of the midbrain tectum enhance dopamine release in the frontal cortex.* **Brain Res Bull.**, 52: 413-418, 2000.

DALL'IGNA, O.P., DIETRICH, M.O., HOFFMANN, A., NETO, W., VENDITE, D., SOUZA, D.O., LARA, D.R., *Catalepsy and hypolocomotion induced by nitric oxide donor: attenuation by theophylline*. **Eur. J. Pharmacol.**, 432, 29– 33, 2001.

Dawson T.M., Bredt D.S., Fotuhi M., Hwang P.M., Snyder S.H. *Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues*. **Proc Natl Acad Sci.**, USA 88:7797–7801, 1991.

DEL BEL E.A., GUIMARÃES F.S. *Sub-chronic inhibition of nitric oxide synthesis modifies haloperidol-induced catalepsy and the number of NADPH-diaphorase neurons in mice*. **Psychopharmacology**, 147:356–361, 2000.

DEL BEL E.A., SILVA, C.A., GUIMARÃES, F.S., BERMÚDEZ-ECHEVERRY, M. *Catalepsy induced by intra-striatal administration of nitric oxide synthase inhibitors in rats*. **European Journal of Pharmacology**, 485:(2004) 175– 181, 2003.

DEL BEL, E. A., GUIMARÃES, F. S., BERMÚDEZ-ECHEVERRY, M., GOMES, M.Z., SCHIAVETO-DE-SOUZA, A., PADOVAN-NETO, F.E., TUMAS, V., BARION-CAVALCANTI, A.P., LAZZARINI, M., NUCCI-DA-SILVA, L.P., PAULA-SOUZA, D. *Role of Nitric Oxide on Motor Behavior*. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 25 (2), 2005.

DEL BEL, E. A., SILVA, C.A., GUIMARÃES, F.S., BERMÚDEZ-ECHEVERRY, M. *Catalepsy induced by intra-striatal administration of nitric oxide synthase inhibitors in rats*. **European Journal of Pharmacology**, 485: 175-181, 2004.

DEL BEL, E.A., SOUZA, A.S., GUIMARÃES, F.S., DA-SILVA, C.A., NUCCI-DA-SILVA, L.P. *Motor effects of acute and chronic inhibition of nitric oxide synthesis in mice*. **Psychopharmacology** 161, 32– 37, 2002.

DRUGA R., SYKA J. *NADPH-diaphorase activity in the central auditory structures of the rat*. **Neuroreport.**, 4:999–1002, 1993.

DUNCAN, A.J., HEALES, S.J.R. *Nitric oxide and neurological disorders*. **Molecular Aspects of Medicine**, 26, 67-96, 2005.

DZOLJIC, E., DEVRIES, R., DZOLJIC, M.R., *New and potent inhibitors of nitric oxide synthase reduce motor activity in mice*. **Behav. Brain Res.**, 118: 215–229, 1997.

EBERHARDT, O. SCHULZ, J.B. *Apoptotic mechanisms and antiapoptotic therapy in the MPTP model of Parkinson's disease*. **Toxicology Letters**. 139, 135-151, 2003.

EDELMAN GM, GALLY J. A. *Nitric oxide: linking space and time in the brain.* **Proc Natl Acad Sci USA.**, 89:11651– 2, 1992.

EHRINGER, H., HOMYKIEWI, Z. O. *Verteilung von Noradrenalin und Dopamin im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems.* **Wien Klin. Wochenschr.**, 72: 1236-1239, 1960.

EICHENBERGER G.C.D., RIBEIRO S.J., OSAKI M.Y., MARUOKA R.Y., RESENDE G.C.C., CASTELLAN-BALDAN L., CORRÊA A.S.L., DA SILVA L.A., COIMBRA N.C. *Neuroanatomical and psychopharmacological evidence for interaction between opioid and GABAergic neural pathways in the modulation of fear and defense elicited by electrical and chemical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray matter.* **Neuropharmacol.**, 42:48–59, 2002.

ESPLUGUES, J. *NO as signalling molecule in the nervous system.* **British Journal of Pharmacology**, 135, 1079-1095, 2002.

FALLON J.J., LAUGHLIN S.E. *Substantia Nigra.* In: Paxinos G (ed) *The Rat Nervous System.* **Academic Press.**, San Diego: 215-237, 1995.

FAYE LUND H., OSEN K.K. *Anatomy of the inferior colliculus in rat.* **Anat Embryol.**, 171:1–20, 1985.

FORNO L.S. *Pathology of Parkinson's disease.* In: Marsden CD, Fahn S, eds. **Movement Disorders.** London: Butterworth Scientific: 25–40, 1982

FORSTERMANN, U., SCHMIDT, H. H., POLLOCK, J. S., SHENG, H., MITCHELL, J. A., WARNER, T. D., NAKANE, M., MURAD, F. *Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types.* **Biochem. Pharmacol.**, 42:1849–1857, 1991.

GARTHWAITE J. *Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system.* **Trends Neurosci.**, 14:60–67, 1991.

GARTHWAITE, J., GARTHWAITE, G., PALMER, R.M.J., MONCADA, S., *NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices.* **Eur. J. Pharmacol.**, 172, 413–416, 1989.

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

GRAEFF, F.G. *Brain defense systems and anxiety: in Roth M, Burrows GD, Noyes R (eds): Handbook of Anxiety, Amsterdam, Elsevier Science Publishers.* vol. 3. Pp 307-354, 1990.

GRAEFF, F.G. *Minor tranquilizers and brain defense systems.* **Braz J Med Biol Res.**, 14:239– 65, 1981.

HENKEL C.K., EDWARDS S.B. *The superior colliculus control of pinna movements in the cat: possible anatomical connections.* **J Comp Neurol.**, 182:763-776, 1978.

HERBERT H., ASCHOFF A., OSTWALD J. *Topography of projections from the auditory cortex to the inferior colliculus in the rat.* **J Comp Neurol.**, 304:103–122, 1991.

HILTON, S.M., REDFERN, W.S. *A search for brain stem cell groups integrating the defence reaction in the rat.* **J Physiol.**, 378: 213-228, 1986.

HOFFMAN H.S., ISON J.A.R. *Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical finding and their implications for how the nervous system processes sensory input.* **Psychol Rev.**, 87: 175-189, 1980.

HOPE B.T., MICHAEL G.J., KNIGGE K.M., VINCENT S.R. *Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase.* **Proc Natl Acad Sci.**, USA 88:2811–2814, 1991.

HORNYKIEWICZ, O. *Biochemical aspects of Parkinson's disease.* **Neurology**, 51: S2-S9, 1998.

HORNYKIEWICZ, O. *Parkinson's disease: from brain homogenate to treatment.* **Fed Proc.**, 32(2):183-90, 1973.

JANKOVIC, J. *Parkinson's disease: clinical features and diagnosis.* **J Neurol Neurosurg Psychiatry.**, 79:368-376, 2008.

KANDEL, Eric R.; SCHWARTZ, James H; JESSELL, Thomas M. (Ed.). **Fundamentos da neurociência e do comportamento**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 591 p.

KELLY, J.B., CASPARY, D.M. *Pharmacology of the inferior colliculus; in Winer JA, Schreiner CE (eds): The Inferior Colliculus*. New York, Springer: 248–310, 2005.

KISS, J. P., & VIZI, E. S. *Nitric oxide: A novel link between synaptic and nonsynaptic transmission*. **Trends in Neurosciences**, 24: 211-215, 2001.

KOFFER, K.B., BERNEY, S., HORNYKIEWICZ, O., *The role of the corpus striatum in neuroleptic- and narcotic-induced catalepsy*. **Eur. J. Pharmacol.**, 47: 81– 86, 1978.

KRIEGSFELD LJ, ELIASSON MJ, DEMAS GE et al. *Nocturnal motor coordination deficits in neuronal nitric oxide synthase knockout mice*. **Neuroscience**, 89: 311-315. 1999.

KUDO, M., NIIMI, K. *Ascending projections of the inferior colliculus in the cat: An autoradiographic study*. **J Comp Neurol.**, 191:545-546, 1980.

LAMPREA, M.R., CARDENAS, F.P., VIANNA, D.M., CASTILHO, V.M., CRUZ-MORALES, S.E., BRANDÃO, M.L. *The distribution of fos immunoreactivity in rat brain following freezing and escape responses elicited by electrical stimulation of the inferior colliculus*. **Brain Res.**, 950: 186-194, 2002.

LANGE, K. W., KORNHUBER, J., RIEDERER, P. *Dopamine/Glutamate Interactions in Parkinson' s Disease*. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. 21(4): 393-400, 1997.

LEDOUX, J.E., CICCHETTI, P., XANGORARIS, A. ROMANSKI, L. M. *The lateral amygdaloid nucleus: Sensory interface of the amygdale in fear conditioning*. **J. Neurosci.**, 10: 1062-1069, 1990.

LINCOLN, J., HOYLE, C.H.V., BURNSTOCK, G., *Nitric Oxide in Health and Disease*. **Cambridge University Press**, 1997.

LONART G, CASSELS KL, JOHNSON KM. *Nitric oxide induces calcium-dependent [3H]dopamine release from striatal slices*. **J Neurosci Res.**, 35:192–198, 1993.

MACEDO, C.E., CASTILHO, V.M., DESOUZA E SILVA, M.A., BRANDÃO, M.L. *Dual 5-HT mechanisms in basolateral and central nuclei of amygdale in the regulation of the defensive behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus.* **Brain Research Bulletin**, 59 (3): 189-195, 2002.

MAISONNETTE, S.S., KAWASAKI, M.C., COIMBRA, N.C., BRANDÃO, M.L. *Effects of lesions of amygdaloid nuclei and substantia nigra on aversive responses induced by electrical stimulation of the inferior colliculus.* **Brain Res Bull.**, 40:93-98, 1996.

MASINO, T., KNUDSEN, E.I. *Orienting head movements resulting from electrical microstimulation of the brainstem tegmentum in the barn owl.* **J Neurosci.**, 13(1):351-370, 1993.

MATSUI H, NISHINAKA K, ODA M, HARA N, KOMATSU K, KUBORI T, UDAKA F. *Hypoperfusion of the auditory and prefrontal cortices in Parkinsonian patients with verbal hallucinations.* **Mov Disord.**, 21:2165-2169, 2006.

MCCOWN TJ, GREENWOOD RS, FRYE GD, BREESE G.R. *Electrically elicited seizures from the inferior colliculus: a potential site for the genesis of epilepsy?* **Exp Neurol.**, 86: 527-542, 1984.

MEFFERT MK, PREMACK BA, SCHULMAN H. *Nitric oxide stimulates calcium-independent synaptic vesicle release.* **Neuron.**, 12:1235–1244, 1994.

MEININGER, V., POL, D., DERER, P. *The inferior colliculus of the mouse. A nissl and golgi study.* **Neuroscience**, 17: 1159-1179, 1986.

MELO, LL; SANTOS, P; MEDEIROS,P; MELLO, RO; FERRARI, EAM; BRANDÃO, ML. MAISONNETTE, SS; FRANCISCO, A; COIMBRA, NC. *Glutamatergic neurotransmission mediated by NMDA receptors in the inferior colliculus can modulate haloperidol-induced catalepsy.* **Brain Research** (no prelo).

MELO, L.L., BRANDÃO, M.L., *Role of 5-HT1A and 5-HT2 receptors in the aversion induced by electrical stimulation of inferior colliculus.* **Pharmacol Biochem Behav.**, 51: 317-321, 1995.

MELO, L.L., CARDOSO, S.H., BRANDÃO, M.L. *Antiaversive action of benzodiazepines on scape behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus.* **Physiol Behav.**, 51: 557-562, 1992.

MONCADA, S. *Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine*. **Journal of the Royal Society of Medicine**. 92: 164-169, 1999.

MOREIRA, F.A., MOLCHANOV, M.L., GUIMARÃES, F.S. *Flight reactions to nitric oxide in the inferior colliculus of rats depend on NMDA receptor activation*. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 76: 35–41, 2003.

MORIIZUMI, T., HATTORI, T. *Pallidotectal projection to the inferior colliculus of the rat*. **Exp Brain Res.**, 87: 223-226, 1991.

NAKAHARA K, YOKOO H, YOSHIDA M, TANAKA M, SHIGEMORI M. *Effect of nitric oxide on central dopamine neurons*. **Brain and Nerve**, 46:1147–1153, 1994.

OLAZÁBAL, E.U., MOORE, J.K. *Nigrotectal projection to the inferior colliculus: horseradish peroxidase transport and tyrosine hydroxylase immunohistochemical studies in rats, cats and bats*. **J Comp Neurol.**, 282:98-118, 1989.

PALMER, J., CHARLES SL, CHESS-WILLIAMS R. *Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptor suggests role as intercellular messenger in the brain*. **Nature.**, 336:385– 8, 1988.

PALMER, R.M.J., FERRIGE, A.G., MONCADA, S. *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxation factor*. **Nature**. 327: 524–526, 1987.

PANDÓSSIO, J.E., BRANDÃO, M.L. *Defensive reactions are counteracted by midazolam and muscimol and elicited by activation of glutamate in the inferior colliculus of rats*. **Psychopharmacology (Berl)**, 142: 360-368, 1999

PANDÓSSIO, J.E., MOLINA, V.A., BRANDÃO, M.L. *Prior electrical stimulation of the inferior colliculus sensitizes rats to the stress of the elevated plus-maze test*. **Behav Brain Res.**, 109: 19-25, 2000.

PAXINOS, G. WATSON, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Third edn. New York: Academic Press, 1997.

ROCCHITTA, G., MIGHELI, R., MURA, M.P., GRELLA, G., ESPOSITO, G., MARCHETTI, B., MIELE, E., DESOLE, M.S., MIELE, M., & SERRA, P.A. *Signaling pathways in the nitric oxide and iron-induced dopamine release in the striatum of*

freely moving rats: role of extracellular Ca²⁺ and L-type Ca²⁺ channels. **Brain Res.**, 1047: 18-29, 2005.

SALDAÑA, E., MERCHÁN, M.A. *Intrinsic and commissural connections of the rat inferior colliculus.* **J. Comp. Neurol.**, 319, 417-437, 1992.

SALUM, C., BERMÚDEZ-ECHEVERRY, M., ISSY, A. C., DEL BEL, E. A. *Dopamine system and its modulation by nitric oxide: approaches in experimental parkinson and schizofrenia.* **Nova Science Publishers**, 21: 153-19, 2008a.

SALUM, C., CASTRO, A.C., PEREIRA, I. DEL BEL, E. A. *Dopamina, Óxido Nítrico e suas Interações em Modelos para o Estudo da Esquizofrenia.* **Psicologia: Reflexão e Crítica**, 21(2): 186-194, 2008b.

SANBERG PR, BUNSEY MD, GIORDANO M. et al. *The catalepsy test: its ups and downs.* **Behavioral Neuroscience**, 102: 748-759, 1988.

SANDOR NT, BRASSAI A, PUSKAS A, LENDVAI B. *Role of nitric oxide in modulating neurotransmitter release from rat striatum.* **Br Res Bull**, 36:483–486, 1995.

SANTOS, N.R., HUSTO, J.P., BRANDÃO, M.L. *Further for the involvement of histamine H₂ receptors in the control of defensive behavior generated in the midbrain tectum.* **Behav Pharmacol.**, 13: 73-80, 2002.

SCHMITT, P., CARRIVE, P., DISCALA, G., JENCK, F., BRANDÃO, M., BAGRI, A., MOREAU, J.L., SANDNER, G. *A neuropharmacological study of the periventricular neural substrate involved in flight.* **Behav. Brain Res.**, 22: 181–190, 1986.

SCHULLER, G., E, COVEY, CASSADAY, J.H. *Auditory pontine grey: connections and response properties in the horseshoe bat.* **Eur. J. neurosci.**, 3:648- 662, 1991.

SCHUMAN, E.M. & MADISON, D.V. *A requirement for the intercellular Messenger nitric oxide in long-term potentiation.* **Science**, 254: 1503-1506, 1991.

SCHWEIZER, H. *The connections of the inferior colliculus and the organization of the brainstem auditory system in the greater horseshoe bat (Rhinolophus ferrumequinum).* **J. Comp. Neurol.**, 201: 25-49, 1981

SHAMMAH-LAGNADO, S.J., ALHEID, G.F., HEIME, L. *Efferent connections of the caudal part of the globus pallidus in the rat.* **J Comp Neurol.**, 376:489-507, 1996.

SHINONAGA, Y., TAKADA, M., OGAWAMEGURO, R., IKAI, Y., MIZUNO, N. *Direct projections from the globus pallidus to the midbrain and pons in the cat.* **Neuroci Lett.**, 135:179-183, 1992.

SILVEIRA, M.C.L., SANDNER, G., GRAEFF F.G. *Induction of Fos-immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze.* **Behav Brain Res.**, 115-118, 1993.

SNYDER, S. H. & FERRIS, C. D. *Novel neurotransmitters and their neuropsychiatric relevance.* **American Journal of Psychiatry**, 11: 1738-1751, 2000.

SOLAN B. M., NG L. L., MORRIS J. A. *Inferior Colliculus.* **Nature Precedings:** doi:10.1038/npre..2033.1, 2008.

SPARKS, D.L., NELSON, J.S. *Sensory and motor maps in the mammalian superior colliculus.* **Trends Neurosci.**, 10:312-317, 1987.

STAR, M.S., STAR, B.S. *NMDA receptor-mediated changes in motor behaviour involve nitric oxide?* **Eur. J. Pharmacol.**, 272, 211– 217, 1995.

STARR, M. S. *Ghitamate/dopamine D1/D2 balance in the basal ganglia and its relevance to Parkinson's disease.* **Synapse**, 19: 264-293, 1995.

STEWART, V.C., HEALES, S.J.R. *Nitric oxide-induced mitochondrial dysfunction: implications for neurodegeneration.* **Free Radical Biol. Med.**, 34: 287–303, 2002.

THAUT, M.H. KENYON, G.P. SCHAUER, M.L. MCINTOSH, G.C. *The connection between rhythmicity and brain function,* **Eng. Med. Biol. Mag.** 18 (2); 1018, 1999.

THAUT, M.H. MCINTOSH, G.C. RICE, R.R. MILLER, R.A. RATHBUN, J. BRAULT, J.M. *Rhythmic auditory stimulation in gait training for Parkinson's disease patients,* **Mov. Disord.** 11 (2); 193–200, 1996.

TOKUNAGA, A. SURGITA , S. OTANI, K. *Auditory and non-auditory subcortical afferents to the inferior colliculus in the rat.* **J Hirnforsch.**, 25: 461-472, 1984.

TRABACE L, KENDRICK KM. *Nitric oxide can differentially modulate striatal neurotransmitter concentrations via soluble guanylate cyclase and peroxynitrite formation.* **J Neurochem.**, 75:1664–1674, 2000.

TRONCOSO, A.C., CIRILO-JUNIOR, G., BRANDÃO, M.L. *Signaled two-way avoidance learning using electrical stimulation of the inferior colliculus as negative reinforcement: effects of visual and auditory cues as warning stimuli.* **Braz J Med Biol Res.**, 31: 391-398, 1998.

UZBAY, I.T. *L-NAME precipitates catatonia during ethanol withdrawal in rats.* **Behav. Brain Res.**, 119: 71–76. 2001.

VINCENT, S., KYMURA, H. *Histochemical mapping of nitric oxide synthesis in the rat brain.* **Neuroscience**, 46(4):755– 84, 1992.

WANG, Y., NEWTON, D.C., & MARSDEN, P.A. *Neuronal NOS: Gene structure, mRNA diversity, and functional relevance.* **Critical Reviews in Neurobiology**, 13: 21-43, 1999.

WEINER W. J. *There Is No Parkinson Disease.* **Arch Neurol.** 65(6):705-708, 2008.

WENSTRUP, J.J., LARUE, D.T., WINER, J.A. *Projections of physiologically defined subdivisions of the inferior colliculus in the mustached bat: targets in the medial geniculate body and extrathalamic nuclei.* **J. Comp. Neurol.**, 346: 207-236, 1994.

WEST AR, GALLOWAY MP. *Nitric oxide and potassium chloride facilitated striatal dopamine efflux in vivo: role of calcium-dependent release mechanisms.* **Neurochem Int.**, 33:493–501, 1998.

WEST, A.R., GALLOWAY, M.P. *Intrastriatal infusion of (+/-)-S-nitroso-N-acetylpenicillamine releases vesicular dopamine via an ionotropic glutamate receptor-mediated mechanism: an in vivo microdialysis study in chloral hydrate-anesthetized rats.* **J Neurochem.**, 66(5):1971-80, 1996.

WEST, A.R., GALLOWAY, M.P., GRACE, A.A. *Regulation of striatal dopamine neurotransmission by nitric oxide: effector pathways and signaling mechanisms.* **Synapse**, 44: 227– 245, 2002.

WINER, J. A., SCHREINER, C. E. **The Inferior Colliculus.** New York: Springer, 2005. 720p.

WINER, J.A., LARUE, D.T., DIEHL, J.J., HEFTI, B.J. *Auditory cortical projections to the cat inferior colliculus.* **J. Comp. Neurol.**, 400, 147–174, 1998.

YARDLEY, C.P., HILTON, S.M. *The hypothalamic and brainstem areas from which the cardiovascular and behavioral components of the defence reaction elicited in the rat.* **J Auton Nerv Syst.**, 15: 227-244, 1986.

YASUI Y, KAYAHARA T, KUGA Y, NAKANO K. *Direct projections from the globus pallidus to the inferior colliculus in the rat.* **Neurosci Lett.**, 115:121-125, 1990.

ZHANG, L., DAWSON, V.L., DAWSON, T.M. *Role of nitric oxide in Parkinson's disease.* **Pharmacology & Therapeutics**, 10: 33-41, 2006.



IX. ANEXOS



Tabela 3: Tempo de catalepsia (s) dos animais que receberam microinjeção de veículo/0,5 µl diretamente no CI e 10 minutos após foram submetidos a uma injeção i.p. de L-NOARG 90mg/Kg. O tempo de catalepsia foi avaliado 10, 30, 60, 90 e 120 minutos da injeção i.p. de L-NOARG.

Animais	TEMPO DE CATALEPSIA (s)				
	10 min	30 min	60 min	90 min	120 min
01	10	58	271	161	210
02	33	106	279	290	272
03	0	69	295	292	293
04	10	286	283	295	297
05	20	138	278	288	285
06	15	118	211	204	230
07	18	71	207	283	139
08	23	102	275	281	290
09	30	128	193	274	261
10	12	35	93	253	231
MÉDIA	17,1	111,1	238,5	262,1	250,8
DesvPad	9,92	69,71	63,02	44,77	49,62
EPM	3,14	22,06	19,94	14,16	15,70

Tabela 4: Tempo de catalepsia (s) dos animais que receberam microinjeção de AP7 20 nmo/0,5 µl diretamente no CI e 10 minutos após foram submetidos a uma injeção i.p. de veículo (HCl 0,01N). O tempo de catalepsia foi avaliado após 10, 30, 60, 90 e 120 minutos da injeção i.p. de L-NOARG.

Animais	AVALIAÇÃO DO TEMPO DE CATALEPSIA (s)				
	10 min	30 min	60 min	90 min	120 min
11	16	6	10	12	11
12	36	48	100	30	21
13	6	7	9	19	62
14	0	4	0	0	0
15	3	4	4	7	18
16	5	7	10	5	12
17	5	3	5	7	3
18	0	3	3	10	13
MÉDIA	8,875	10,25	17,62	11,25	17,5
DesvPad	12,05	15,34	33,47	9,37	19,27
EPM	4,27	5,44	11,87	3,32	6,83

Tabela 5: Tempo de catalepsia (s) dos animais que receberam microinjeção de AP7 40 nmol/0,5 µl diretamente no CI e 10 minutos após foram submetidos a uma injeção i.p. de veículo (HCl 0,01N). O tempo de catalepsia foi avaliado após 10, 30, 60, 90 e 120 minutos da injeção i.p. de L-NOARG.

Animais	AVALIAÇÃO DO TEMPO DE CATALEPSIA (s)				
	10 min	30 min	60 min	90 min	120 min
19	0	3	24	3	13
20	3	6	2	18	13
21	6	6	8	12	6
22	2	0	2	2	6
23	4	4	9	3	3
24	11	12	24	33	23
25	6	5	3	6	8
26	14	32	17	17	20
27	5	3	4	11	9
Média	5,666667	7,888889	10,333333	11,666667	11,222222
DesvPad	4,136558	9,060837	8,550504	9,42809	6,32065
EPM	1,378853	3,020279	2,850168	3,142697	2,106883

Tabela 6: Efeito do AP7 sobre a catalepsia induzida pelo L-NOARG. Os animais receberam microinjeção de AP7 20 nmol/0,5 µl diretamente no CI e 10 minutos após foram submetidos a uma injeção i.p. de L-NOARG 90mg/Kg. O tempo de catalepsia foi avaliado após 10, 30, 60, 90 e 120 minutos da injeção i.p. de L-NOARG.

Animais	AVALIAÇÃO DO TEMPO DE CATALEPSIA (s)				
	10 min	30 min	60 min	90 min	120 min
28	7	10	34	37	26
29	0	0	0	0	0
30	0	15	20	46	54
31	3	5	10	13	95
32	0	0	0	0	11
33	6	2	11	17	73
34	1	6	17	81	101
35	5	9	10	71	101
36	3	2	2	2	4
MÉDIA	2,77	5,44	11,55	29,66	51,66
DesvPad	2,72	5,10	11,00	30,87	42,51
EPM	0,90	1,70	3,66	10,29	14,17

Tabela 7: Efeito do AP7 sobre a catalepsia induzida pelo L-NOARG. Os animais receberam microinjeção de AP7 40 nmol/0,5 µl diretamente no CI e 10 minutos após foram submetidos a uma injeção i.p. de L-NOARG 90mg/Kg. O tempo de catalepsia foi avaliado após 10, 30, 60, 90 e 120 minutos da injeção i.p. de L-NOARG.

Animais	AVALIAÇÃO DO TEMPO DE CATALEPSIA (s)				
	10 min	30 min	60 min	90 min	120 min
37	18	27	13	24	5
38	4	13	32	58	38
39	5	3	11	9	52
40	18	44	30	65	49
41	2	5	7	43	62
42	6	4	14	41	8
43	19	50	78	65	82
44	4	10	22	46	49
45	3	4	8	14	32
Media	9	14,33	18,66	30,33	31,66
DesvPad	6,37	9,84	9,46	20,49	19,70
EPM	2,12	3,28	3,15	6,83	6,56

Tabela 8: Efeito da microinjeção intracolicular de Veículo (HCl 0,05N)/0,5 µl sobre a catalepsia. O tempo de catalepsia foi avaliado após 60, 120, 180 e 240 minutos da microinjeção de L-NOARG.

Animais	AVALIAÇÃO DO TEMPO DE CATALEPSIA (s)			
	60min	120min	180min	240min
46	4	3	2	2
47	4	7	17	5
48	18	18	5	10
49	12	24	16	15
50	24	7	17	12
51	5	5	10	12
52	10	20	16	11
53	7	7	5	3
54	8	10	8	12
55	3	3	2	2
Media	9,5	10,4	9,8	8,4
DesvPad	6,83	7,51	6,25	4,88

EPM	2,16	2,37	1,97	1,54
------------	-------------	-------------	-------------	-------------

Tabela 9: Efeito da microinjeção intracolicular de L-NOARG 50 nmol/0,5 µl sobre a catalepsia. O tempo de catalepsia foi avaliado após 60, 120, 180 e 240 minutos da microinjeção de L-NOARG.

Animais	AVALIAÇÃO DO TEMPO DE CATALEPSIA (s)			
	60 min	120 min	180 min	240 min
56	7	10	7	16
57	8	8	20	25
58	10	15	5	5
59	8	12	3	10
60	2	2	3	26
61	5	5	2	5
62	12	8	10	11
63	4	3	2	2
64	4	4	9	8
Média	6,6	7,4	6,7	12,0
DesvPad	3,20	4,36	5,78	8,66
EPM	1,06	1,45	1,92	2,88

Tabela 10: Efeito da microinjeção intracolicular de L-NOARG 100 nmol/0,5 µl sobre a catalepsia. O tempo de catalepsia foi avaliado após 60, 120, 180 e 240 minutos da microinjeção de L-NOARG.

Animais	AVALIAÇÃO DO TEMPO DE CATALEPSIA (s)			
	60 min	120 min	180 min	240 min
65	1	0	1	1
66	10	5	9	10
67	12	7	18	31
68	3	0	1	18
69	2	2	2	4
70	4	4	9	7
71	4	7	17	5
72	15	17	12	28
73	2	4	31	33
74	3	20	31	33
Media	5,6	6,6	13,1	17
DesvPad	4,88	6,76	11,20	13,11
EPM	1,54	2,14	3,54	4,15